



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Diana Soraia Ferreira Dias

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Epigenetic therapy applied to cancer – new challenges in biomedicine” referentes à Unidade Curricular “Estágio” sob a orientação do Dr. Tiago Sousa e do Professor Doutor João Laranjinha apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro de 2021



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Diana Soraia Ferreira Dias

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Epigenetic therapy applied to cancer – new challenges in biomedicine” referentes à Unidade Curricular “Estágio” sob a orientação do Dr. Tiago Sousa e do Professor Doutor João Laranjinha apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro, 2021

Eu, Diana Soraia Ferreira Dias, estudante de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2016219134, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Epigenetic therapy applied to cancer – new challenges in biomedicine” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 8 de outubro de 2021.

Diana Soraia Ferreira Dias

(Diana Soraia Ferreira Dias)

Agradecimentos

Após um longo percurso ao longo de cinco anos, finda a etapa final destes anos de grandes conquistas pessoais e de grande evolução. Quero por isso dizer, que esta conquista não é só minha, mas sim de todos aqueles que fizeram parte deste percurso e que me deram força e condições para superar todas as adversidades e desafios que surgiram. É com muita gratidão que reconheço que todo o trabalho e dedicação tem mérito.

OBRIGADA

♥ Aos meus pais, pela ajuda incondicional e por me conseguirem proporcionar a oportunidade dos meus sonhos.

♥ A toda a minha família, pelos momentos de alegria e cumplicidade, que nunca deixaram de acreditar no meu potencial.

♥ Ao Professor Doutor João Laranjinha, pelo apoio, profissionalismo e prontidão, pelo exemplo de profissional que é.

♥ A toda a equipa que constitui a Farmácia São José pelo acolhimento, por me proporcionarem bons momentos de crescimento quer ao nível de conhecimentos técnico-científicos, quer a nível pessoal. Agradeço ainda as oportunidades que me proporcionaram e o exemplo do que é honrar a profissão de farmacêutico.

♥ À minha família de praxe, principalmente à minha madrinha, por todo o carinho e por todo o apoio que me deu ao longo destes anos, foste sem dúvida muito especial para mim.

♥ Por fim, agradeço à pessoa que mais apoio me deu, que incondicionalmente me prestou auxílio a qualquer hora e que presenciou os meus momentos mais difíceis. Tu, Tiago, foste a pessoa que permitiu que isto fosse possível, foste o pilar principal que não me deixou desistir em qualquer situação que fosse, muito obrigada.

♥ A todos os Professores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pelo exemplo a seguir e pelos conhecimentos transmitidos.

♥ Em tónica final, resta-me agradecer a todos aqueles que, semana a semana, me ajudaram a enriquecer pessoal e profissionalmente. A todos, o meu bem hajam.

A Coimbra.

Índice Geral

Resumo.....	7
Abstrat.....	8

Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas.....	11
1. Introdução.....	12
2. Contextualização da Farmácia.....	13
3. Análise SWOT.....	13
3.1. Pontos Fortes (<i>Strengths</i>).....	14
3.1.1. Plano de estágio.....	14
3.1.2. Localização e horário da Farmácia.....	15
3.1.3. Integração fácil na equipa.....	16
3.1.4. Organização da farmácia.....	16
3.1.5. Histórico da ficha de utente.....	18
3.1.6. Promoção de rastreios gratuitos.....	18
3.2. Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>).....	19
3.2.1. Plano curricular do MICF.....	19
3.2.2. Ausência de conhecimento dos nomes de marca.....	20
3.2.3. Escassa preparação de manipulados.....	20
3.3. Oportunidades (<i>Opportunities</i>).....	20
3.3.1. Formações contínuas.....	20
3.3.2. Modelos de Prescrição Médica.....	21
3.3.3. Trabalho adicional ao estágio.....	22
3.3.4. Técnicas de <i>Merchandising</i>	22
3.3.5. Serviço de entrega ao domicílio.....	24
3.4. Ameaças (<i>Threats</i>).....	24
3.4.1. Medicamentos esgotados.....	24
3.4.2. Venda de MSRM sem receita.....	25
3.4.3. Ausência de médicos de família.....	26
3.4.4. Limite máximo de duas embalagens por mês.....	27
3.4.5. A (não) aceitação dos Medicamentos Genéricos.....	27
4. Indicação Farmacêutica – Casos Clínicos.....	29
5. Considerações Finais.....	32
Referências Bibliográficas.....	33
Anexos.....	34
Anexos I – Folha de rececionamento de pedidos de encomendas e reservas.....	34
Anexo II – Tabela com os principais medicamentos de referência.....	35

PARTE II – Monografia intitulada “Epigenetic therapy applied to cancer – new challenges in biomedicine”

Abbreviations.....	47
List of Figures.....	49
Resumo.....	50
Abstract.....	52

1. Introduction.....	53
1.1. DNA methylation.....	55
1.2. Post-translational modifications of histones (PTMs).....	57
1.3. Non-coding RNAs (ncRNAs).....	62
2. Influence of environmental factors on epigenetics.....	63
3. Epigenetic changes in cancer.....	64
4. Epigenetic drugs.....	66
4.1. Histone deacetylase inhibitors (HDACi)	67
4.1.1. Short chain fatty acids.....	68
4.1.2. Benzamides.....	69
4.1.3. Hydroxamic acids.....	69
4.1.4. Sirtuins.....	70
4.1.5. Cyclic peptides.....	71
4.2. Histone methyltransferase inhibitors (HMTi).....	72
4.3. Histone Acetyltransferase Inhibitors (HATi).....	74
4.4. Histone demethylase inhibitors (HDMi).....	74
4.5. DNA methyltransferases inhibitors (DNMTi).....	75
4.5.1. Nucleoside Analogs.....	75
4.5.2. Antisense oligonucleotides.....	76
4.5.3. Natural molecules.....	76
4.5.4. Small molecules.....	76
4.5.5. Proteins that recognize epigenetic marks.....	77
5. Resistances to chemotherapy.....	77
6. Final considerations.....	79
Bibliography.....	80

Resumo

O presente documento é parte integrante da unidade curricular “Estágio Curricular”, pertencente ao 5º ano do Mestrado Integrado de Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Desta forma, a sua estrutura assenta em duas partes, a primeira corresponde à realização do Estágio Curricular em Farmácia Comunitária e a segunda parte corresponde à monografia intitulada “Epigenetic therapy applied to cancer – new challenges in biomedicine”.

PARTE I

Inicialmente, é dissertado o relatório de estágio em Farmácia Comunitária, realizado na Farmácia São José, em Sangalhos de 17 de fevereiro a 23 de junho de 2021, decorrido sob a orientação do Dr. Tiago Sousa, num total de 810 horas. O relatório é apresentado tendo em conta a análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), avaliando os Pontos Fortes, os Pontos Fracos, as Oportunidades e as Ameaças que influenciaram o decorrer desta etapa final da minha formação académica.

PARTE II

Seguidamente, é apresentada a monografia intitulada “Epigenetic therapy applied to cancer – new challenges in biomedicine”, realizada sob a orientação do Professor Doutor João António Nave Laranjinha. Numa fase inicial é abordado o que é a epigenética e os principais mecanismos responsáveis pelas modificações epigenéticas – metilação do DNA, modificação pós-translacional das histonas e RNAs não codificantes. Seguidamente são descritas algumas alterações epigenéticas no cancro e apresentados diferentes fármacos epigenéticos com diferentes mecanismos epigenéticos subjacentes. Por fim, é ressaltado o impacto que estes fármacos epigenéticos têm na resistência à quimioterapia.

Abstrat

This document is an integral part of the curricular unit “*Estágio Curricular*”, belonging to the 5th year of the Integrated Master of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra. Thus, its structure is based on two parts, the first corresponds to the completion of the curriculum internship in Community Pharmacy and the second part corresponds to the monograph entitled “Epigenetic therapy applied to cancer – new challenges in biomedicine”.

PART I

Initially, the internship report in Community Pharmacy is disserted, carried out at Farmácia São José, in Sangalhos from February 17th to June 23rd, 2021, conducted under the guidance of Dr. Tiago Sousa, in a total of 810 hours. The report is presented taking into account the SWOT analysis, assessing the Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats that influenced the course of this final stage of my academic training.

PART II

Then, the monograph entitled “Epigenetic therapy applied to cancer – new challenges in biomedicine” is presented, under the supervision of Professor João António Nave Laranjinha. Initially, what are epigenetics and the main mechanisms responsible for epigenetic modifications is discussed – DNA methylation, post-translational modification of histones and non-coding RNAs. Next, some epigenetic changes in cancer are described and different epigenetic drugs with different underlying epigenetic mechanisms are presented. Finally, the impact that these epigenetic drugs have on chemotherapy resistance is highlighted.

PARTE I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária



Farmácia São José, Anadia

Sob a orientação do Dr. Tiago Sousa.

“A paz, o equilíbrio e o autocontrole vêm de dentro.

De dentro da farmácia.”

Tati Bernard

Lista de Abreviaturas

ARA – Antagonista do Recetor da Angiotensina

COVID-19 – Doença de Coronavírus 2019

DCI – Denominação Comum Internacional

DGS – Direção Geral de Saúde

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

I&D – Investigação e Desenvolvimento

IECA – Inibidor da Enzima de Conversão da Angiotensina

IV – Insuficiência Venosa

MG – Medicamento Genérico

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

MNSRM-EF – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica de Dispensa Exclusiva em Farmácia

MSRM – Medicamento Sujeito a Receita Médica

MSRMV – Medicamento Sujeito a Receita Médica Veterinária

SNS – Serviço Nacional de Saúde

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

VVZ – Vírus Varicela-Zoster

I. Introdução

Enceto este relatório, referindo que o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) cumpre com o enunciado na Diretiva do Parlamento Europeu de 20 de novembro de 2013, Artigo 44º, n.º2, o qual menciona a importância da formação do farmacêutico fundada em cinco anos de estudos em entidade superior, dos quais quatro anos decorrem com uma formação teórica e prática, com o complemento obrigatório de seis meses de estágio em farmácia comunitária. (1) A Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) dá cumprimento a esta diretiva, realizando-se o Estágio Curricular como a última unidade curricular do MICF.

No seguimento das disposições da Diretiva supracitada, o farmacêutico é definido como o especialista do medicamento, tratando-se de um agente de Saúde Pública, assegurando-se por isso, uma correta e completa formação ao longo do MICF para que, desta forma, decorra um excelente desempenho das variadas atividades integrantes do Ato Farmacêutico.

É sabido que a farmácia é, amiudamente, o primeiro local de procura dos utentes aquando o surgimento de algum problema de saúde e, desta forma, a promoção e manutenção de saúde pública começa nestes locais, pelos farmacêuticos. A ação farmacêutica assenta, entre outros aspetos, num impacto significativo no desenvolvimento do país, já que a intervenção precoce em doenças e terapias precoces, bem como a promoção da adesão à terapêutica, representam por exemplo, diminuição de custos financeiros. Ao diminuir as necessidades da população em internamentos hospitalares, urgências hospitalares, consultas, bem como o desperdício em medicamentos, leva conseqüente e indiretamente a uma redução dos custos financeiros. Refira-se, ainda, que em diversas situações a medicação não surge efeito terapêutico, porque há falta de adesão ao tratamento, ou porque se verifica a incorreta utilização do mesmo, o que leva a que o problema de saúde não seja tratado. A promoção da utilização de medicamentos genéricos em prol dos de marca é um aspeto crucial que leva ao decréscimo exponencial nos gastos financeiros em participação pelo Estado e a educação da população na aceitação destes passa também pela atividade farmacêutica.

O presente relatório faz alusão ao estágio decorrido na Farmácia São José, que se localiza na freguesia de Sangalhos, Anadia, decorrido entre os meses de fevereiro e junho de 2021, com um total de 810 horas, fazendo em média 50 horas semanais sob a orientação do Dr. Tiago Sousa e contando com a colaboração de toda a equipa farmacêutica. Ao longo do relatório é descrita toda a análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), avaliando os

Pontos Fortes, os Pontos Fracos, as Oportunidades e as Ameaças que influenciaram o decorrer desta etapa final da minha formação académica.

2. Contextualização da Farmácia

A Farmácia São José abriu ao público a 5 de janeiro de 1953 tendo tido, ao longo dos anos, vários proprietários, sendo o Sr. Domingues o atual proprietário. A Farmácia São José encontra-se localizada na Rua do Comércio, em Sangalhos, uma freguesia que se situa no concelho de Anadia. O horário de funcionamento da Farmácia São José decorre das 9h às 20h, em dias úteis e das 9h às 13h e das 15h às 19h aos fins de semana e feriados. Não obstante, no período compreendido entre janeiro e março, os horários foram adaptados e a equipa foi organizada e dividida por turnos alternados entre manhã e tarde, de semana para semana, em consequência da pandemia causada pelo COVID-19.

Ao longo do período do meu estágio contactei com uma equipa multidisciplinar, que me proporcionou bases de conhecimentos importantíssimas, assim como prontamente me prestou toda a ajuda e esclarecimento de dúvidas que surgissem. A equipa é constituída por três farmacêuticos, de entre quais o Diretor Técnico Tiago Sousa, dois técnicos e uma auxiliar.

3. Análise SWOT

A análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*) é uma ferramenta essencial que permite avaliar e identificar os pontos fortes, fracos, as oportunidades bem como as ameaças que influenciaram o decorrer do meu estágio. Tendo em consideração este conhecimento, de um ponto de vista intrínseco, analisarei de que forma a minha aprendizagem ao longo do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) e as características da Farmácia São José, beneficiaram (Pontos Fortes) ou dificultaram (Pontos Fracos) a minha aprendizagem e o meu estágio. Por outro lado, é possível avaliar de uma forma extrínseca ao MICF e à farmácia, as mais-valias e benefícios que me ajudaram na realização do meu estágio curricular (Oportunidades), assim como situações ou ocorrências que de alguma forma se apresentaram como negativas e colocaram o meu estágio e aprendizagem em risco (Ameaças).

Tabela I – Análise SWOT (Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats)		
	Fatores Positivos	Fatores Negativos
Fatores internos	<ul style="list-style-type: none"> • Plano de estágio • Localização e horário da Farmácia • Integração fácil na equipa • Organização da farmácia • Histórico da ficha de utente • Promoção de rastreios gratuitos 	<ul style="list-style-type: none"> • Plano curricular do MICF • Ausência de conhecimento dos nomes de marca • Escassa preparação de manipulados
Fatores externos	<ul style="list-style-type: none"> • Formações contínuas • Modelos de Prescrição Médica • Trabalho adicional ao estágio • Técnicas de Merchandising • Serviço de entrega ao domicílio 	<ul style="list-style-type: none"> • Medicamentos esgotados • Venda de MSRM sem receita • Ausência de médicos de família • Limite máximo de duas embalagens por mês • A (não) aceitação dos Medicamentos Genéricos

3.1. Pontos Fortes (Strengths)

3.1.1. Plano de estágio

A realização do estágio na Farmácia São José seguiu um plano de estágio de uma forma gradual, dividida essencialmente em três partes. Desta forma, numa fase inicial foi possível ambientar-me ao espaço e trabalhar essencialmente em *backoffice* no primeiro mês. Dado que comecei o meu estágio por turnos devido ao COVID-19 fazia poucas horas semanais e, portanto, durante esse intervalo de tempo pude proceder à receção de encomendas, fazer, posteriormente, o armazenamento das encomendas rececionadas tanto nas gavetas e expositores como no armazém, respeitando a ordem das validades. Ao longo desta primeira fase, ao reestabelecer sempre que necessário os expositores, prateleiras e gavetas com produtos que tinham maior rotatividade foi-me possível ter um primeiro conhecimento sobre os nomes comerciais dos produtos, o seu local de armazenamento e maior autonomia na exploração e utilização da plataforma do *Sifarma 2000*[®]. Além disso, face à pouca experiência com a utilização de nomes comerciais, foi possível de uma forma precoce, ir esclarecendo dúvidas quanto a eventuais medicamentos.

Seguidamente, numa fase intermédia foi possível assistir ao atendimento dos funcionários, de forma a ganhar conhecimentos e aptidões para posteriormente ter maior autonomia no meu

atendimento. Assim sendo, durante este tempo foi possível observar quais as perguntas cruciais que devem ser feitas na dispensa de determinados tipos de medicamentos, quais os principais alertas e as recomendações que devem ser tidas em conta para uma dispensa correta de medicamentos e de produtos de saúde. Durante esta fase também tive oportunidade de ir obter os respetivos medicamentos às gavetas organizadoras ou onde se encontrassem armazenados, de forma a aumentar a minha rapidez neste processo. Ao mesmo tempo, comecei a ganhar maior conhecimento e aptidão na utilização da plataforma do *Sifarma*[®] e da nova versão lançada pela *Glint* para atendimento ao público. Ainda nesta fase, comecei a fazer medições de alguns parâmetros analíticos recorrentes da farmácia, assim como atender as chamadas telefónicas e responder a dúvidas colocadas por utentes.

Numa fase final, o atendimento ao público foi realizado com autonomia, ainda que tendo sempre algum funcionário por perto que pudesse auxiliar em caso de necessidade ou dúvida. Durante esta fase continuei sempre a realizar trabalho de *backoffice* de uma forma inteiramente autónoma, assim como a realização de testes analíticos e de outras atividades inerentes ao bom funcionamento da farmácia.

3.1.2. Localização e horário da Farmácia

A Farmácia São José encontra-se situada na rua principal da freguesia de Sangalhos, localizada junto de um Hospital Privado e na rua principal de acesso a centros urbanos, centros comerciais, cafés, hotelaria e GNR. Desta forma, a deslocação à farmácia tem bastante afluência e conveniência para a população residente. Além disso, é a única farmácia existente na freguesia, servindo a população residente e as localidades adjacentes, contando por isso com um número de pessoas afluente diariamente e um grande número de pessoas fidelizadas.

Dada a grande afluência e a existência de diferentes faixas etárias que frequentam a farmácia de forma habitual, fui contactando com casos diferentes que foram extremamente valiosos para a minha aprendizagem ao longo do meu estágio curricular. De uma forma global permiti-me contactar com diferentes tipos de casos e de pessoas, abrangendo a minha aprendizagem para as diferentes áreas do aconselhamento, nomeadamente na área de dermocosmética, Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM), suplementos alimentares, ortopedia, entre muitas outras.

3.1.3. Integração fácil na equipa

A equipa da Farmácia São José é uma equipa jovem e dinâmica, multidisciplinar constituída por Farmacêuticos, Técnicos de Farmácia e Técnicos Auxiliares de Farmácia. A farmácia apresenta uma equipa muito unida e consistente, com um ambiente de trabalho muito bom que se reflete num atendimento de excelência personalizado ao público. O bom relacionamento com todos os elementos da equipa foi fundamental para me sentir bem e confiante para desempenhar as tarefas e para o sucesso do meu estágio. Além disso, eu era a única estagiária durante o meu período de estágio o que me permitiu que tivesse toda a ajuda e atenção necessária para me integrar e, prontamente, me foi prestado todo o esclarecimento de dúvidas e me foram cedidas bases de conhecimentos importantíssimas que enriqueceram o meu conhecimento.

3.1.4. Organização da farmácia

É sabido que todos os produtos expostos nas prateleiras, expositores ou ao balcão à vista dos utentes seguem as leis estipuladas pelo Decreto-Lei n.º330/90 de 23 de outubro. (3) Assim é proibido a exposição ou alcance dos utentes a Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM) ou Psicotrópicos e Estupefacientes, podendo estar expostos produtos de saúde da área da dermocosmética, ortopedia e puericultura, assim como MNSRM, suplementos alimentares e produtos de uso animal não sujeitos a receita médica.

Inicialmente os produtos eram expostos na farmácia segundo as diferentes categorias que passo a exemplificar “Constipações e Gripes”, “Insuficiência Venosa”, “Ansiedade e sono” e por aí adiante, sendo as caixas colocadas sem nenhuma ordem específica e por vezes umas à frente das outras ou em pé, por falta de espaço. Posteriormente, tive a oportunidade de observar e aprender a implementar medidas de *Merchandising* fundamentais, com a criação de “manchas” de produtos com o objetivo de criar um impacto visual no utente e desta forma, melhorar as vendas e organização da disposição dos produtos.

Nos expositores à vista dos utentes, as prateleiras estavam organizadas da seguinte forma:

- Os MNSRM e os Suplementos Alimentares eram colocados por indicação terapêutica com o efeito visual de “mancha” a ocupar toda a prateleira.
- Os produtos com menor validade eram colocados à frente do lado esquerdo das prateleiras e sempre os primeiros a sair.
- Os produtos e MNSRM que tinham menor rotatividade ou com poucas embalagens para criar o efeito “mancha” pretendido, eram colocados por ordem alfabética em

prateleiras que não ficavam à vista dos utentes, junto das gavetas verticais organizadoras, de forma que fosse fácil o acesso e a sua procura.

Já no interior da farmácia a disposição dos medicamentos estava distribuída da seguinte forma:

- Os MSRM que apresentavam como forma farmacêutica comprimidos, cápsulas ou comprimidos de libertação prolongada eram colocados por ordem alfabética em gavetas verticais.
- Os MSRM com outras formas farmacêuticas ou pertencentes a outras categorias eram colocados igualmente em gavetas verticais por ordem alfabética, sendo que cada gaveta estava identificada com a respetiva categoria: Produtos de uso externo, Pós, Antiasmáticos, Ginecológicos, Contraceptivos orais, Transdérmicos, Gotas orais, Gotas e Pomadas Oftálmicas, Injetáveis, Pomadas e Cremes e Anti-helmínticos.
- Os produtos de protocolo da diabetes ficavam em gavetas horizontais devidamente identificadas.
- Nos armários ficavam, por ordem alfabética e devidamente separados, os Xaropes e Pós para preparação de suspensões orais, alguns suplementos alimentares e produtos para tratamento e desinfeção de feridas, bem como diversos tipos de pensos e ligaduras.
- Os Medicamentos Sujeitos a Receita Médica Veterinária (MSRMV) eram armazenados numa prateleira dedicada somente ao espaço animal, juntamente com pílulas para gatos e cães.
- Os produtos termolábeis eram armazenados por ordem alfabética no interior do frigorífico a temperaturas controladas.
- No armazém da farmácia eram colocados em prateleiras verticais os excedentes dos MSRM com maior rotatividade, uma vez que a farmácia fazia encomendas com enorme número de embalagens que seriam organizadas por ordem alfabética no armazém.
- No armazém eram também colocados outros produtos variados como cosméticos, higiene oral e variados produtos de venda livre, também excedentes que não cabiam nos expositores.
- Os produtos reservados ou encomendados a pedido dos utentes e os produtos esgotados para encomendar, eram assinalados em folhas localizadas num portefólio somente para o efeito com o nome do utente, data do pedido, descrição do produto, se rececionado ou não, e o número de telefone do utente, como se exemplifica em Anexo. Quando rececionado, o produto era identificado com o nome do utente e colocado numa estante unicamente para esse efeito.

- Durante a receção de encomendas, os medicamentos e os mais variados produtos rececionados eram colocados num carrinho, divididos consoante o *stock* apresentado aquando da receção: zero, um, dois ou mais de dois. Esta forma sistemática de rececionar encomendas, permitia que, quando fossem armazenadas nos respetivos locais, fossem detetados possíveis erros de *stock*.

3.1.5. Histórico da ficha de utente

O histórico da ficha do utente é uma ferramenta que considero imprescindível no dia-a-dia da farmácia. Na Farmácia São José, todas as vendas realizadas eram, sempre que possível, registadas na ficha de utente o que permite um registo completo das vendas da farmácia.

Este recurso torna-se bastante relevante do ponto de vista clínico e uma ferramenta importante para uma correta dispensa de medicamentos e um atendimento diferenciado. Praticamente em todos os atendimentos é consultada a ficha de utente, uma vez que permitia ter a certeza de que se estava a ceder o medicamento na dosagem e forma farmacêutica certa, assim como a embalagem certa. Isto porque, muitas pessoas habituem-se a tomar um genérico e caso haja troca da embalagem por outro genérico, por norma os utentes não só não reconhecem, como não querem que haja alterações, visto que acreditam não fazer o mesmo efeito. Esta ferramenta, serve ainda, de suporte à consulta quando um utente comprou algum produto ou suplemento há algum tempo atrás e pretende comprar de novo.

Durante a pandemia tornou-se ainda mais difícil a obtenção de receitas novas por parte dos utentes. Por esta razão, aos clientes habituais que se encontravam sem medicação e ainda não tinham receitas novas, eram vendidos os medicamentos em falta e, utilizando a ficha do utente, tinha-se certeza que se estava a vender o medicamento certo, na dosagem correta e do laboratório que o utente está habituado. Além disso, esta ferramenta é também ela, importante para a deteção de erros de prescrição.

3.1.6. Promoção de rastreios gratuitos

A promoção de diferentes tipos de rastreios gratuitos nas farmácias é uma iniciativa valiosa que remete a atenção dos utentes para a sua saúde em geral. Na Farmácia São José tive a oportunidade de assistir a alguns rastreios variados que se realizavam de forma gratuita, nomeadamente rastreios auditivos, rastreio a problemas de Insuficiência Venosa (IV), rastreios capilares e dermatológicos e rastreios nutricionais. Estes rastreios são importantes para a

comunidade, não só para avaliar o seu estado de saúde, mas também para fazer despistes de algum problema. É também um lugar onde as pessoas se sentem à vontade para colocarem questões e dúvidas sobre o tema do rastreio. Além da Farmácia ter um papel fulcral na promoção à saúde, este tipo de rastreios ajuda também a promover os seus próprios produtos e a fidelizar os utentes.

3.2. Pontos Fracos (*Weaknesses*)

3.2.1. Plano curricular do MICF

Ao iniciar o estágio curricular confrontamo-nos com uma imensidão de medicamentos e produtos de saúde, que na sua grande maioria são totalmente desconhecidos para nós. Existem ainda, diferentes medicamentos com a mesma indicação terapêutica e que temos a obrigação de saber toda a parte teórica subjacente às suas indicações, interações, precauções e mecanismo de ação, para nos sentirmos o mais seguros possível no aconselhamento ao utente. Julgo por isso, que algumas unidades curriculares, deviam de ter uma parte prática mais próxima da realidade de trabalho, para chegarmos ao estágio e, futuramente, ao local de trabalho, com um conhecimento teórico-prático mais consolidado.

Farmacologicamente, somos um curso exemplar ao mais alto nível, com uma formação muito profunda e com uma abordagem bilateral, quer teórica, quer prática. Apenas acrescento que devíamos contactar mais com nomes de marca, ao longo das cadeiras de Farmacologia e Farmácia Clínica. Contudo, as áreas de veterinária, dermocosmética, suplementação alimentar, entre outras, são áreas pouco trabalhadas ao nível prático e que são igualmente importantes. Saber quais os aconselhamentos quanto à dispensa de MNSRM, quais as interações de suplementos alimentares em doentes polimedicados ou em casos de gravidez/amamentação, são outros exemplos que faltam abordar. Seria importante, que houvesse a componente prática com a oportunidade de resolver casos clínicos de diferentes áreas consoante a matéria ia sendo lecionada, para que desta maneira se comece a ter mais atenção para o tipo de intervenção farmacêutica que deve ser feita.

A ausência de conhecimento nas diferentes áreas abordadas na farmácia ou a falta de consolidação do mesmo, revela-se em dúvida e insegurança no atendimento. Concluo por isso, que o estágio é fundamental para colmatar a ausência de conhecimento ou prática em determinadas áreas, garantindo maior confiança de atendimento para atendimento e melhor aptidão no momento de aconselhamento ao utente.

3.2.2. Ausência de conhecimento dos nomes de marca

Ao longo de todo o curso do MICF foi possível contactar em diferentes cadeiras com variados princípios ativos. As prescrições por Denominação Comum Internacional (DCI) permitem-nos, com alguma facilidade, associar ao aprendizado que já obtivemos outrora e identificar a indicação terapêutica subjacente. Contudo, pouco se sabe sobre os nomes comerciais e são muitos os medicamentos que são desconhecidos numa fase inicial do estágio. Esse desconhecimento faz transparecer uma imagem de baixo conhecimento e pouco à vontade com o medicamento, instaurando-se uma desconfiança do utente no aconselhamento realizado. Pressupõe-se que o estudante ao fim dos cinco anos de estudo tenha os conhecimentos necessários e que esteja apto a desempenhar a função de Farmacêutico de uma forma autónoma e segura do seu conhecimento, porém isto não corresponde à realidade e muitas lacunas são colmatadas ao longo do Estágio Curricular.

3.2.3. Escassa preparação de manipulados

A preparação de manipulados na Farmácia São José é muito escassa, não só porque a prescrição de manipulados veio a diminuir ao longo dos anos, como também existem farmácias que se dedicam exclusivamente a este tipo de preparações. A cadeira de Farmácia Galénica é uma das cadeiras que melhor prepara os alunos para a preparação de diferentes manipulados e por esta razão, considero que este ponto foi um aspeto negativo do meu estágio, uma vez que gostaria de ter tido um maior contacto nesta vertente de Farmácia Comunitária.

3.3. Oportunidades (*Opportunities*)

3.3.1. Formações contínuas

Os diferentes laboratórios que trabalham com a farmácia promovem formações contínuas sobre os seus produtos nas farmácias. Considero que este tipo de formações é muito importante para o conhecimento das diferentes categorias de produtos que vão ser vendidos na farmácia e desta forma desenvolver um bom aconselhamento ao utente. Quando chegamos à realidade de Farmácia Comunitária concluímos que existem inúmeros temas nos quais apresentamos pouco conhecimento aplicado à prática e aconselhamento, nomeadamente ao nível de produtos dermatológicos, suplementos vitamínicos, veterinária, entre outros.

3.3.2. Modelos de Prescrição Médica

Ao longo do estágio foi possível ter a oportunidade de contactar com diferentes tipos de modelos de prescrição médica – a prescrição manual, a prescrição eletrónica materializada e a prescrição eletrónica desmaterializada. Estes três modelos apresentam diferenças evidentes entre si, porém e, salvo raras exceções, a prescrição por DCI é obrigatória e comum nos três modelos. Contudo, em situações específicas a prescrição poderá não ser apresentada por DCI mas recorrendo ao nome de marca ou comercial com a devida justificação do médico prescriptor. Seguidamente, elenco as diferentes exceções que não obedecem à obrigatoriedade de prescrição por DCI: (5)

- a. Tratamento contínuo superior a 28 dias;
- b. Reação adversa prévia. Em casos de reação adversa prévia reportada ao Infarmed, reação adversa ou suspeita de intolerância a um medicamento com uma substância ativa igual, porém com outra denominação comercial;
- c. Medicamentos com margem ou índice terapêutico estreito.

As prescrições eletrónicas materializadas e as prescrições manuais servem atualmente para ocasiões de impossibilidade de utilização do modelo de prescrição desmaterializada.

Desta forma, quando na prática clínica nos apresentam uma receita manual devemos ter atenção se esta se apresenta válida tendo em conta vários parâmetros a saber: nome do utente, número do beneficiário, prescrição no máximo de 4 caixas no total, assinatura do médico, data de validade até 30 dias após a data de emissão da mesma, ausência de rasurados e a devida justificação assinalada. (5) Assim sendo, o motivo de exceção apresenta-se assinalado no canto superior direito da receita com uma das seguintes justificações:

- a. Falência informática;
- b. Inadaptação fundamentada do prescriptor;
- c. Prescrição no domicílio;
- d. Até 40 receitas por mês.

A necessidade de vários parâmetros de verificação essenciais à validação destas receitas, assim como a necessidade de interpretação da caligrafia, aumenta a complexidade e morosidade de utilização das receitas manuais.

Por sua vez, na receita eletrónica desmaterializada apenas são necessários os três códigos (Número da Receita, Código de Acesso e Código de Direito de Opção) que podem ser enviados para o número de telemóvel ou e-mail dos utentes. Este tipo de prescrição representa

uma mais-valia, dado que torna o ato de dispensa mais fácil e seguro, com menos erros de dispensa de medicamentos ou de planos de comparticipação. Além do mais, existe uma diminuição da utilização de papel, o que permite poupar recursos valiosos.

Graças à grande heterogeneidade de utentes que frequentam a Farmácia São José, foi possível durante o estágio, contactar com diferentes planos de comparticipação complementares e regimes excepcionais de comparticipação, sendo que o regime excepcional com o qual mais contactei foi o da dor crónica não oncológica moderada a forte abrangida pela Portaria n.º 329/2016, de 20 de dezembro. (6)

3.3.3. Trabalho adicional ao estágio

Como supracitado, um dos aspetos menos positivos ao longo do MICF é o escasso contacto com nomes de marca. Pouco se sabe sobre os nomes comerciais e são muitos os medicamentos que são desconhecidos numa fase inicial do estágio. Esse desconhecimento faz transparecer uma imagem de baixo conhecimento e pouco à vontade com o medicamento, instaurando-se uma desconfiança do utente no aconselhamento realizado. Desta forma, resolvi de forma totalmente autónoma e proativa, recorrer à plataforma *Sifarma*[®] e realizar um balanço das vendas dos últimos dois anos na Farmácia São José dos MSRM que se apresentam com a forma farmacêutica de comprimidos, cápsulas, comprimidos de libertação modificada e orodispersíveis. Desta análise, excluí os medicamentos genéricos e foquei-me essencialmente nos medicamentos de referência, uma vez que o meu objetivo era aumentar os meus conhecimentos nestes medicamentos e facilmente conseguir associar o medicamento de marca, ao respetivo princípio ativo e conseqüente indicação terapêutica. Assim sendo, trabalhei arduamente na realização de uma tabela (Anexo) que incluísse o nome do medicamento de marca, todas as dosagens disponíveis na Farmácia São José, a forma farmacêutica, o respetivo princípio ativo, classe farmacológica e por fim, a respetiva indicação terapêutica. A realização deste trabalho, permitiu-me aumentar imenso o meu conhecimento e confiança no contacto com nomes de marca, aumentando as minhas valências como futura profissional de saúde.

3.3.4. Técnicas de *Merchandising*

No atinente a este ponto, ao longo do meu estágio tive a oportunidade de assistir à evolução da farmácia, que sofreu inúmeras alterações, algumas delas assentam nos conceitos de *Marketing* e *Merchandising*, que foram adquiridos e mencionados na unidade curricular de

Marketing e Comunicação Farmacêutica. Estas ferramentas andam de mão dada e juntas promovem um maior alcance ao utente. (7) O *Merchandising* é uma forma não verbal de comunicar com o utente e apresenta como objetivo aumentar a rentabilidade da farmácia, graças a uma gestão cuidada da farmácia. Desta forma existem várias técnicas fundamentais que foram aplicadas desde o exterior da farmácia ao interior, a título exemplificativo destacam-se as seguintes: (7)

- **Fachada da farmácia**

O utente ao passar em frente à farmácia disponibiliza cerca de cinco segundos de atenção para observar a vitrina e, por isso, esta tem de apresentar uma imagem com uma mensagem clara, sem qualquer tipo de informação desnecessária.

- **Zonas quentes e frias**

No interior da farmácia existem zonas “quentes” e zonas “frias”, sendo que as zonas “quentes” se localizam mais à direita e à esquerda da farmácia, ao longo do trajeto de entrada até ao balcão, e as zonas “frias” são aquelas que apresentam menor fluxo de clientes.

- **Gôndolas**

As gôndolas estão localizadas em zonas quentes da farmácia, preferencialmente entre o trajeto da entrada até ao balcão, sabendo que os produtos aí colocados terão um grande destaque e por este motivo, a escolha dos produtos a colocar aqui é muito importante, devendo haver uma boa gestão de quais os produtos com maior interesse de venda para a farmácia que beneficiarão deste destaque.

- **Balcão**

Este local é considerado como o espaço mais “quente” da farmácia e o espaço que beneficia mais da atenção do utente o qual pode, inclusive, observar e mexer nos produtos. Aqui, tal como nas gôndolas, é importante escolher bem os produtos a colocar em destaque, sejam produtos de manifesta sazonalidade, promoções em destaque ou outros.

- **Lineares**

Na Farmácia São José inicialmente fazia-se uma dispersão de vários produtos dentro da mesma indicação terapêutica e no mesmo sortido, porém após as alterações sofridas, preferenciou-se a exposição concentrada dos produtos, formando uma “mancha” horizontal que será visivelmente mais atrativa ao utente, do que uma exposição dispersa de vários produtos que não chama a atenção do mesmo. É sabido também, que a linha dos olhos se situa

entre 1,40 m e 1,60 m, logo esta é a zona que os utentes vão ver *à priori*. Consequentemente, aqui devem ser expostos os produtos que se pretende que tenham maior rotatividade ou os produtos sazonais. Além disso, os MNSRM devem dispor-se em lineares segundo a sua indicação terapêutica, nomeadamente analgésicos, vitamínicos, antigripais e por aí adiante.

Considero que esta experiência e transformação foram uma mais-valia no meu estágio e uma oportunidade de aprendizagem sobre algumas técnicas importantes que já tinha adquirido em unidades curriculares, de forma a impulsionar as vendas e a marcar diferença nas preferências dos utentes.

3.3.5. Serviço de entrega ao domicílio

Destaque-se que a dispensa de medicamentos ao domicílio constitui um fator diferencial da Farmácia São José. A prestação deste serviço de forma gratuita à comunidade teve como principal objetivo o fornecimento de MSRM, MNSRM ou serviços aos utentes que, não podendo deslocar-se à farmácia, recorrem a este serviço. Dado o grande número de pessoas geriátricas na comunidade redundante à farmácia, havia muitos utentes idosos que apresentavam dificuldades motoras para se deslocar, ou que não podiam conduzir e desta forma tinham de recorrer a táxis para ir à farmácia. Com este serviço disponível para a comunidade mais carenciada e dependente, era possível aos utentes ligar, através da linha telefónica da farmácia, para requerer a prestação de algum serviço (medição da glicémia, colesterol total ou pressão arterial), bem como fazer pedidos de medicamentos ou aconselhamento farmacêutico sobre alguma dúvida.

Considero este serviço imprescindível em qualquer farmácia de forma a garantir que ninguém fica sem a sua medicação por falta de acompanhamento ou por impossibilidade de deslocação seja ela por falta de transportes ou por questões motoras.

3.4. Ameaças (Threats)

3.4.1. Medicamentos esgotados

No referente às ameaças, ao longo do meu estágio contactei com a existência de vários medicamentos esgotados no mercado, o que originou o condicionamento de potenciais vendas que não foram realizadas dada a existência desta condição. Apesar deste tipo de situações fugirem ao controlo da farmácia, influenciam de uma forma direta a relação entre o utente e a farmácia. Um exemplo desta situação foi com o *Carveject*[®], produzido pela *Pfizer* que esteve

muito tempo esgotado sem previsões de quando voltaria a ser reintroduzido no mercado. Este injetável, apresenta na sua constituição o Alprostadilo e está indicado para o tratamento de disfunção erétil de origem diversa. Apesar de ter afetado uma pequena percentagem de utentes, levou a que estes não tivessem outro tipo de alternativa similar disponível no mercado. Outro exemplo que andou muito tempo esgotado foi o *Victan*[®], que apresenta como substância ativa o Loflazepato de Etilo, pertencente à família de Benzodiazepinas com ação ao nível do Sistema Nervoso Central. O facto de não haver genéricos deste medicamento disponíveis no mercado, levou a que os utentes tivessem que recorrer obrigatoriamente ao médico para que pudessem avaliar a situação individualmente e prescrever outras alternativas. Esta situação causou algum transtorno aos utentes, ainda mais em altura de pandemia, dado que os utentes em geral tinham imensa dificuldade em conseguir marcar consultas médicas no seu centro de saúde.

3.4.2. Venda de MSRM sem receita

É sabido que por definição, os medicamentos que são sujeitos a receita médica, compreendem, no mínimo, uma das condições seguintes: (8)

- a. Ainda que administrados corretamente, podem constituir um risco se utilizados sem vigilância médica;
- b. Medicamentos de administração parentérica;
- c. Apresentam na sua constituição substâncias ou são preparados com base em substâncias que seja imprescindível avaliar os seus efeitos adversos ou a sua atividade;
- d. Podem constituir um risco para a saúde, se utilizados incorretamente ou para outro fim que não aquele a que se destina.

Ao longo do estágio foram várias as pessoas que solicitaram variados medicamentos sujeitos a receita médica, sem receita, principalmente antibióticos. Apenas em casos excecionais, a lei salvaguarda a dispensa de MSRM sem a receita, nas farmácias. Esta dispensa recorre a uma apreciação farmacêutica e avaliação de caso a caso, assim como a certeza de que o utente já utiliza previamente o medicamento recorrendo ao histórico de vendas. Situações de emergência em que há a impossibilidade de obter a receita médica ou situações que a vida do utente está comprometida na ausência da cedência do medicamento, são alguns exemplos excecionais. Fora disso, são ainda bastas as situações nas quais há solicitação de vários MSRM sem a respetiva receita médica e que são negados, criando-se um ambiente desagradável.

Na farmácia São José cumpre-se a lei na íntegra, o que leva a que muitos utentes fiquem desagrados com o serviço e atendimento prestado. Há perguntas que devem ser feitas, assim como a avaliação da necessidade de dispensa de MSRM, uma vez que há Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica de Dispensa Exclusiva em Farmácia (MNSRM-EF) ou MNSRM que podem resolver e melhorar a condição que o utente procura resolver.

Apesar de todas as justificações válidas apresentadas, o utente fica insatisfeito com o atendimento e por isso, prefere uma farmácia que lhe ceda o medicamento sem restrições, e essa será, pois, uma farmácia à qual o cliente quererá regressar. O facto de haver farmácias que facultam a dispensa de MSRM com alguma facilidade sem haver uma avaliação do risco/benefício, compromete a seriedade com que os utentes veem determinados medicamentos e por essa razão, considero esta situação uma ameaça ao meu estágio.

3.4.3. Ausência de médicos de família

Desde o início da pandemia que os centros de saúde se tornaram praticamente inacessíveis para os utentes, quer para usufruírem de consultas abertas, quer para marcar consultas com os respetivos médicos de família, mantendo-se o centro de saúde com a porta fechada. Além deste aspeto, a grande maioria dos utentes queixava-se que ninguém atendia o telefone do centro de saúde e que, por isso, lhes era difícil conseguir pedir, por exemplo, que o médico lhes receitasse novas receitas com a medicação habitual. Com o levantamento das medidas de restrição impostas pela Direção Geral de Saúde (DGS), as condições melhoraram significativamente, porém o centro de saúde mais próximo ficou sem dois médicos de família o que originou que muitas famílias estejam sem médico desde janeiro. Desta forma, os utentes veem-se obrigados a deslocarem-se a urgências e ficarem sujeitos a horas de espera para poderem resolver algum problema de saúde que lhes tenha surgido. Como farmacêuticos, temos a responsabilidade de encaminhar os utentes para recorrerem a um médico, sempre que surja algum problema de saúde grave ou que se prolongue há vários dias. Como tal, foi possível concluir que muitos utentes desistiam de irem a uma consulta médica, justamente por não terem médico de família e não terem condições de se deslocarem às urgências do hospital de Aveiro ou de Coimbra.

Atingimos este ano, 2021 o marco de “um milhão de utentes sem médico de família”. A importância de um médico de Medicina Geral e Familiar reside em grande parte no acompanhamento dos utentes, sabendo que muitos utentes com doenças crónicas têm de ser sujeitos a exames regulares e consultas periódicas. Além disso, quando surge algum problema

de saúde ou sintomas, são os médicos de família a quem os utentes recorrem para que sejam cedidas as respetivas credenciais para eventuais exames ou medicação. Por estas razões, considero esta situação grave e um problema estrutural no serviço de saúde, uma vez que muitos utentes não têm condições económicas de pagar hospitais privados para fazer exames ou não têm possibilidade de deslocações e simplesmente acabam por descurar a sua saúde, podendo situações benignas tomarem dimensões maiores. Enquanto profissionais de saúde, que nós farmacêuticos somos, ficamos muito aquém de poder intervir neste tipo de situações.

3.4.4. Limite máximo de duas embalagens por mês

No referente ao assunto em epígrafe, relembre-se que em agosto de 2020 entrou em vigor o cumprimento da Portaria n.º 284-A/2016 de 4 de novembro que assegura o limite máximo de somente duas embalagens por mês de um medicamento para o mesmo utente. Salvo algumas exceções em caso de o utente apresentar dificuldade de deslocação à farmácia, residir no estrangeiro ou a posologia o justificar, é que poderá ceder-se mais do que as embalagens permitidas por lei. Esta medida implementada tem como objetivo principal a diminuição de fraude nos medicamentos com receita e permitir por parte do Serviço Nacional de Saúde (SNS) um controlo mais rigoroso da dispensa. Além do mais, permite combater o desperdício de medicamentos por prazos de validade expirados. (4)

Apesar de tudo, esta lei não foi muito bem aceite pelos utentes que já estavam habituados a levar o número de embalagens que pretendiam ou a levantarem toda a receita de uma só vez. Mesmo explicando que se tratava de uma lei que tínhamos de cumprir escrupulosamente, muitos utentes não aceitavam esse facto de boa vontade e, por vezes, referiam que outra farmácia de determinado local não colocava quaisquer restrições, o que poderia trazer alguma insatisfação ao utente por presumirem que se tratava de má vontade. Por esta razão, considero esta situação uma ameaça ao meu estágio, uma vez que numa fase inicial se criava um ambiente de insatisfação no utente, quer comigo quer com qualquer funcionário da farmácia.

3.4.5. A (não) aceitação dos Medicamentos Genéricos

Um medicamento genérico (MG) é por definição, um medicamento que apresenta o mesmo princípio ativo, formulado com a mesma dosagem, forma farmacêutica e a mesma indicação terapêutica que o medicamento que serviu de referência.

O surgimento dos medicamentos genéricos revelou-se como uma mais-valia, uma vez que apresentam segurança e eficácia elevadas e ao mesmo tempo, um custo mais reduzido. O facto de se apresentarem com um custo mais reduzido, tanto para o utente, como para o Estado, tornaram-se num benefício económico e, portanto, a promoção da sua utilização priorizou-se como política nacional.

São milhões de euros que todos os meses são financiados pelo Estado na comparticipação de medicamentos, e por esta razão, foi desenvolvido pelo próprio uma política nacional para que todas as farmácias promovessem os cinco medicamentos mais baratos de cada categoria por forma a diminuir os gastos em comparticipações. Contudo, e apesar de várias campanhas de sensibilização sobre a utilização destes medicamentos, a garantia da sua segurança e eficácia ainda é colocada em causa por muitos utentes, já que associam o seu baixo custo a uma baixa qualidade, segurança e eficácia.

Ainda assim, pode-se afirmar que já grande parte dos utentes utiliza MG, não só porque confiam na palavra do farmacêutico quando nos perguntam se são seguros e eficazes, mas também e, principalmente, por questões financeiras. Ao longo do meu estágio deparei-me com utentes céticos relativamente aos MG, aos quais eu esclarecia que o baixo custo se devia a questões subjacentes à Investigação e Desenvolvimento (I&D) dos medicamentos originais e não devido à baixa qualidade dos MG. Ainda assim, existiam sempre pessoas que, preferiam levantar a receita exclusivamente com medicamentos de marca, mesmo que isso implicasse um custo muito mais elevado, porque não creem na eficácia dos MG. Muitos utentes afirmavam mesmo que já haviam experimentado algum MG que não sortiu o efeito devido. Houve, ainda, pessoas a afirmar que “os medicamentos genéricos são água e farinha” ou que “cada laboratório metia as quantidades que queria para poupar”, não acreditando por isso em qualquer justificação e explicação que eu e outros colegas pudéssemos apresentar.

Aqui fica assente e ressalta-se, uma vez mais, o papel do farmacêutico na promoção da informação à população e a desmistificação de crenças erráticas que se perpetuam ao longo dos tempos na população e o esclarecimento de algumas (des)informações que se fazem espalhar na internet sem fundamentos técnico-científicos.

4. Indicação Farmacêutica – Casos Clínicos

Caso Clínico 1:

Um senhor, com pouco mais de 50 anos, apresenta-se na farmácia muito queixoso a desejar o Lamicreme® para queimaduras ou outro creme similar que servisse igualmente para o efeito. O senhor acrescentou ainda que tinha comprado à dois dias atrás uma caixa de emplastos ThermaCare® para uma dor nas costas que lhe tinha surgido e que depois de utilizar os emplastos apareceram queimaduras na pele. Acrescenta ainda que sente muitas dores nessa zona e bastante prurido.

Expliquei-lhe que desconhecia que tenham sido reportados efeitos secundários desse tipo com o ThermaCare® e solicitei que me mostrasse a lesão na pele que se referia. Ao visualizar percebi que a “queimadura” se estendia desde a zona abaixo da escápula até à zona inferior do peito, unilateralmente, manifestando lesões ao longo do trajeto do nervo afetado.

Dadas as manifestações clínicas, expliquei que muito provavelmente se tratava de um vírus, o vírus varicela-zoster (VVZ) e expliquei que após a infeção primária provocada por este vírus, conhecida por varicela, ele permanece latente nas raízes dos gânglios sensoriais e aquando a sua reativação ele produz lesões distribuídas ao longo dos nervos sensoriais que enervam uma determinada área originando um dermatoma. Aconselhei o senhor a dirigir-se ao médico para visualizar as lesões e ao fim de dois dias o senhor voltou com a prescrição de Zov 800®, para fazer 1 comprimido 5 vezes ao dia, durante 7 dias e Skudexa® para fazer de 8 em 8 horas se dores e confirmou que se tratava de zona. A mulher, que se fazia acompanhar do senhor, questionou ainda se era contagioso ao que respondi que a zona não é contagiosa *per si* e alertei o senhor para as possíveis complicações da zona, havendo a possibilidade de continuar a sentir dor mesmo quando as lesões desaparecerem, conhecida como nevralgia pós-herpética.

Caso Clínico 2:

Uma jovem com cerca de 18 anos, apresenta-se na farmácia a solicitar um aconselhamento sobre uma mancha avermelhada que lhe apareceu em torno da boca, abaixo do nariz e estendia-se para a bochecha. Refere sentir algum prurido na zona, menciona não sentir dor e que a mancha se veio a alastrar ao longo dos dias. Mencionou ainda, que ao toque tinha uma sensação rugosa e áspera.

Comecei por observar a mancha que se encontrava ligeiramente descamada, não apresentava bolhas, nem dor, ao que conclui que tudo indicava se tratar de um fungo. Desta forma indiquei a utilização de Canesten® antifúngico cutâneo, aplicando uma fina camada na zona 2 a 3 vezes

ao dia durante uma semana, se não melhorasse recomendei ir ao médico. Na semana seguinte a mãe da utente foi à farmácia e referiu que já tinha desaparecido praticamente tudo, referindo que ficou muito satisfeita com o atendimento.

Caso Clínico 3:

Uma utente do sexo feminino com cerca de 70 anos de idade, dirige-se à farmácia com alguma dificuldade a andar e solicita Fucidine® creme. Acrescenta ainda que, já alguns dias que sente uma dor ao caminhar e que tinha umas feridas no pé que estavam a infeccionar e lhe causavam um enorme desconforto e uma “dormência” ao ponto de lhe custar a andar. Referiu ainda com alguma indignação que andava há já alguns meses a aplicar Fucidine® e outros cremes e que as feridas não fechavam.

De imediato questionei a senhora se era diabética ao que me afirmou que sim, já há quase 20 anos e pedi que me mostrasse as feridas. A senhora apresentava várias feridas com pus em ambos os pés. Num dos pés apresentava feridas debaixo do dedo maior e na zona lateral e interior do pé (no joanete), enquanto no outro pé apresentava duas feridas laterais, coincidentes com a zona das sandálias que trazia. De uma forma imediata lhe expliquei a gravidade do que se tratava. Dado ser diabética há muitos anos, uma das consequências desta patologia é a diminuição da circulação de sangue na zona dos membros inferiores e, por esta razão, existe uma dificuldade maior no processo de cicatrização o que pode se tornar numa situação perigosa. As feridas infetadas, caso não sejam devidamente tratadas e limpas, podem levar à formação de tecido necrosado e consequentemente, no pior dos casos, a amputação do pé ou perna. Expliquei ainda que, a perda da sensibilidade dos nervos periféricos também é uma consequência comum desta patologia e que por vezes pode ter feridas abertas e não se aperceber. Acrescentei que deve ficar atenta a esta situação e todos os dias ter o cuidado de observar os pés, usar calçado adequado e confortável que não aperte o pé e não usar botijas de água quente nem lareira para aquecer os pés, dado poder queimar-se e não sentir. Por fim, expliquei que o Fucidine® é um antibiótico sujeito a receita médica e que devia dirigir-se ao centro de saúde com urgência para que lhe fizessem um curativo e limpeza das feridas e ser vista por um médico. A senhora afirmou que já tinha tentado ir, mas que era muito difícil conseguir ir a uma consulta médica, mas que iria tentar voltar lá.

Caso Clínico 4:

Uma senhora com cerca de 60 anos, apresenta-se na farmácia com uma nova receita em papel prescrita por DCI com Paroxetina 20 mg e Amlodipina 5mg + Valsartan 80 mg para tomar 1 comprimido de manhã. Alega ainda que já não tinha consulta com a médica de família há mais de 1 ano e que desta vez tinha conseguido que a médica lhe passasse alguns exames e medicação.

Ao consultar o histórico de vendas da utente, para confirmar o laboratório habitual que costuma utilizar, concluí que a utente já tinha deixado de utilizar aquele anti-hipertensor há mais de 1 ano e que por sua vez estava a fazer apenas o *Triplixam*[®] 10 mg / 2,5 mg / 10 mg (perindopril + amlodipina + indapamida) 1 comprimido de manhã. Depois de me aperceber, questionei a senhora se a médica mandou suspender a toma do *Triplixam*[®] e começar a fazer novamente este medicamento. Ao que a senhora me respondeu que a médica não referiu tal situação.

O *Triplixam*[®] apresenta na sua constituição perindopril – Inibidor da Enzima de Conversão da Angiotensina (IECA), amlodipina – bloqueador dos canais de cálcio e Indapamida – diurético. Já o anti-hipertensor prescrito era constituído por amlodipina – bloqueador dos canais de cálcio e valsartan – antagonista do recetor da angiotensina (ARA). É sabido que não se deve prescrever a conjugação de IECA com ARA, uma vez que atuam no mesmo eixo Renina-Angiotensina-Aldosterona, sendo por isso contraindicada a sua combinação. Desta forma, liguei para o centro de saúde e pedi para falar diretamente com a médica de família para clarificar essa situação e a médica de família não sabia que a senhora estava a fazer o *Triplixam*[®], que provavelmente teria sido prescrito por outro médico e por essa razão, o anti-hipertensor que ela prescreveu ficava sem efeito. Esclareci assim, com a utente que continuava a fazer o *Triplixam*[®] de manhã e o prescrito ficava sem efeito.

5. Considerações Finais

Findo o Estágio Curricular do meu percurso académico do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, percurso marcado por uma vasta formação académica teórica e prática, das quase 60 cadeiras constituintes do MICF da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, concluo que o estágio é uma etapa fundamental que permite construir alicerces no âmbito do conhecimento técnico-científico adquirido ao longo de cinco anos e capacita-nos a aplicar na prática clínica bastos conceitos teóricos já adquiridos, assim como aprofundar e sedimentar os mesmos.

Há ainda vários conceitos que inevitavelmente se adquirem com a prática clínica, e que não se consegue, de todo, abordar em contexto teórico, sabendo nós que cada atendimento é único e inigualável a outro. O ato farmacêutico compreende por isso, uma formação contínua e uma aprendizagem constante ao longo da vida.

Acresce dizer que o estágio me obrigou a sair da zona de conforto e a adquirir mais experiências pessoais e profissionais, permitindo-me ter uma evolução francamente positiva e aumentar a minha confiança de atendimento para atendimento. Tenho toda a admiração e carinho pela equipa da Farmácia São José, por me terem acolhido e ensinado tantas valências importantes para a prática do Ato Farmacêutico. Foi possível desenvolver não só competências técnico-científicas, mas também competências pessoais importantes na dignificação da profissão farmacêutica.

Considero que após a conclusão do meu percurso académico, estou preparada para honrar a profissão enquanto futura profissional de saúde e preparada para encarar novos desafios. Termina esta etapa final do percurso académico com um balanço extremamente positivo e com uma experiência muito relevante e auspiciosa.

Referências Bibliográficas

1. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **Valor social e económico das intervenções em saúde pública dos farmacêuticos nas farmácias em Portugal**, atual. (2015). [Acedido a 2 set. 2021]. Disponível na Internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/publicacoes/estudos/valor-social-eeconomico-das-intervencoes-em-saude-publica-dos-farmaceticos-nas-farmacias-em-portugal/>
2. Parlamento Europeu – **Diretiva relativa ao reconhecimento das qualificações profissionais** (2013/55/UE). Jornal Oficial da União Europeia; (2013). [Acedido a 25 de junho de 2021]. Disponível na internet: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:354:0132:0170:PT:PDF>
3. DIÁRIO DA REPÚBLICA PORTUGUESA – **Decreto-Lei n.º330/90**. [Acedido a 15 ago. 2021]. Disponível na Internet: <https://dre.pt/home/-/dre/565417/details/maximized>
4. DIÁRIO DA REPÚBLICA PORTUGUESA – **Portaria n.º 284-A/2016**. [Acedido a 15 ago. 2021]. Disponível na Internet: <https://dre.pt/web/guest/pesquisa//search/75660778/details/normal?!=1>
5. INFARMED, I.P. – **Regras de prescrição e dispensa**. [Acedido a 15 ago. 2021]. Disponível na Internet: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/profissionais-de-saude/prescricao-e-dispensa>
6. DIÁRIO DA REPÚBLICA PORTUGUESA – **Portaria n.º 329/2016**. [Acedido a 15 ago. 2021]. Disponível na Internet: <https://dre.pt/home/-/dre/105578483/details/maximized>
7. Aguiar, A. H. (2014). – **Boas Práticas De Comunicação Na Farmácia** (1a Edição). Hollyfar - Marcas e Comunicação, Lda.
8. DIÁRIO DA REPÚBLICA PORTUGUESA – **Decreto-Lei n.º 209/94**. [Acedido a 23 ago. 2021]. Disponível na Internet: <https://dre.pt/web/guest/pesquisa-avancada/-/asearch/advanced/maximized?types=SERIEI&tipo=DecretoLei&numero=209%2F94&search=Pesquisar>

Anexos

Anexos I – Folha de rececionamento de pedidos de encomendas e reservas

NOME	DATA DO PEDIDO	DESCRIÇÃO	RECECIONADO		ASSINATURA	OBSERVAÇÕES (NÚMERO DO UTENTE)
			SIM	NÃO		



Anexo II – Tabela com os principais medicamentos de referência

NOME	DOSAGEM	FORMA FARMACÉUTICA	PRINCÍPIO ATIVO	CLASSIFICAÇÃO FARMACOTERAPÉUTICA	INDICAÇÃO TERAPÉUTICA
Aalka®	1080 mg x 60	Comprimido de libertação modificada	Citrato de potássio	Acidificantes e alcalinizantes urinários	Manutenção a longo prazo de urina alcalina.
Acfol®	5 mg x 20	Comprimido	Ácido Fólico	Medicamento para o tratamento de anemias megaloblásticas	Indicado na gravidez, períodos de rápido crescimento e aleitamento como prevenção ou tratamento de carência de ferro.
Actidox®	100 mg x 16	Comprimido dispersível	Doxiciclina	Cloranfenicol e tetraciclina	Infeções provocadas por microorganismos sensíveis.
Adalat CR®	30 mg x 27	Comprimido de libertação prolongada	Nifedipina	Bloqueadores da entrada de cálcio – Antianginoso	Angina de esforço e hipertensão, como prevenção da morbidade e mortalidade em doentes hipertensos.
Adalgr N®	500 mg + 2 mg x 30 500 mg + 2 mg x 60	Comprimido	Paracetamol + Tiocolquicosido	Ação central	Tratamento concomitante de contraturas agudas na coluna vertebral.
Adartrel®	0.5 mg x 21	Comprimido revestido por película	Ropinirol	Dopaminomiméticos	Síndrome das Pernas Inquietas Idiopática.
Adenuric 80®	80 mg x 28	Comprimido revestido por película	Febuxostate	Medicamentos usados para o tratamento da gota	Hiperuricemia crónica.
Adrovanse®	70 + 5.600 U.I. 70 + 2.800 U.I.	Comprimido	Ácido alendrónico + Colecalciferol	Bifosfonatos	Osteoporose em mulheres pós-menopausa.
ADT®	10 mg x 60 25 mg x 60	Comprimido revestido	Amitriptilina	Antidepressores	Estados depressivos.
Airtal®	100 mg x 20	Comprimido revestido por película	Aceclofenac	Derivados do ácido acético	Reumatismo articular.
Aldactone®	25 mg x 20 25 mg x 60 100 mg x 60	Comprimido	Espironolactona	Diurético poupadores de potássio	Indicado no tratamento, entre outras patologias de ICC e HE.
Aldomet®	250 mg x 60	Comprimido revestido	Metildopa	Agonistas alfa 2 centrais	Hipertensão arterial.

Algimate®	125 mg	Comprimido revestido por película	Clonixina	Analgésicos e antipiréticos	Dor ligeira a moderada.
Aspirina GR®	100 mg x 30	Comprimido gastrorresistente	Ácido Acetilsalicílico	Antiagregante plaquetar	Prevenção de coágulos sanguíneos em situações que envolvem um RCV moderado a elevado.
Betaserc®	16 mg 24 mg x 60	Comprimido	Dicloridrato de betaistina	Antiemáticos e Antivertiginosos	Indicado no tratamento de tonturas e na síndrome de Ménière.
Betmiga®	50 mg x 30	Comprimido de libertação prolongada	Mirabegrom	Medicamentos usados na incontinência urinária	Alívio da sintomatologia associada à síndrome de bexiga hiperativa (BH).
Bilaxten®	20 mg x 20	Comprimido	Bilastina	Anti-histaminico H1 não sedativos	Alívio da sintomatologia associada à urticária e rinoconjuntivite alérgica.
Biloban®	40 mg x 60	Comprimido revestido	Ginkgo Biloba	Medicamento utilizado no tratamento sintomático das alterações das funções cognitivas	Demência ligeira.
Blopress®	32 mg + 25 mg x 56	Comprimido	Candesartan + Hidroclorotiazida	Antagonista dos receptores da angiotensina	Indicado para o tratamento da HA primária.
Brilique®	90 mg x 56	Comprimido orodispersível e comprimido revestido por película	Ticagrelor	Antiagregante plaquetar	Prevenção de acontecimentos aterotrombóticos em doentes com SCA ou EAM, em conjunto com a administração concomitante de AAS.
Cartia®	100 mg x 28	Comprimido Gastrorresistente	Ácido Acetilsalicílico	Antiagregante plaquetar	Prevenção de coágulos sanguíneos em situações que envolvem um RCV moderado a elevado.
Cartilon®	1500 mg x 60	Comprimido revestido por película	Glucosamina	Medicamento para tratamento da artrose	Alívio sintomático da osteoartrrose ligeira a moderada do joelho.
Cialis®	10 mg x 4	Comprimido revestido por película	Tadalafil	Medicamento usado na disfunção erétil	Disfunção erétil no homem adulto.
Ciprallex®	10 mg x 56	Comprimido revestido por película	Escitalopram	Antidepressor	Perturbações obsessiva-compulsiva, ansiedade, pânico e depressão maior.

Combodart®	0,5 mg + 0,4 mg x 30	Cápsula	Dutasterida + Tansulosina	Medicamentos usados na retenção urinária	Indicado no tratamento dos sintomas da HBP.
Concor®	5 mg x 28	Comprimido revestido por película	Bisoprolol	Betabloqueador seletivo cardíaco	HA, IC crónica e andina pectoris.
Coveram®	5 mg / 5 mg 5 mg / 10 mg 10/5 mg x 30 10 mg / 10 mg	Comprimido	Perindopril + Amlodipina	Inibidores da enzima de conversão da angiotensina; Bloqueadores da entrada de cálcio	Tratamento de doença coronária arterial estável e/ou HA essencial.
Coversyl®	5 mg x 10 5 mg x 30 10 mg x 30	Comprimido orodispersível	Perindopril	Inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA)	HA e doença arterial coronária estável (diminui o risco de eventos cardíacos em doentes com EAM prévio).
Descontran®	500 mg + 2 mg x 30 500 mg + 2 mg x 60	Comprimido	Paracetamol + Tiocolquicosido	Ação central	Contraturas agudas na coluna vertebral.
Diplexil®	200 mg x 60	Comprimido revestido	Ácido valpróico	Antiepilépticos e Anticonvulsivantes	Epilepsias parciais e generalizadas.
Diplexil-R®	500 mg x 60	Comprimido gastrorresistente	Valproato semisódico	Antiepilépticos e Anticonvulsivantes	Epilepsias parciais e generalizadas, assim como em episódios maníacos da doença bipolar (quando lítio está CI) e na profilaxia de cefaleias.
Dolénio®	1500 mg x 60	Comprimido revestido por película	Glucosamina	Medicamento para tratamento da artrose	Alívio sintomático da osteoartrrose ligeira a moderada do joelho.
Edarclor®	40/25 mg x 56 40/12,5 mg x 56	Comprimido revestido por película	Azilsartan medoxomilo + Clortalidona	Antagonista dos Recetores da Angiotensina (ARA) + Diurético	Tratamento da HA, diminuindo a tensão arterial por aumento da excreção de fluidos (diurético) e ação vasodilatadora (ARA).
Edistride®	10 mg x 28	Comprimido revestido por película	Dapagliflozina	Antidiabético	Tratamento da diabetes mellitus tipo 2 em doentes adultos com mais de 18 anos em monoterapia ou em terapia combinada.
Efficib®	1000/56	Comprimido revestido por película	Sitagliptina + Cloridrato de metformina	Antidiabético	Tratamento da diabetes mellitus tipo 2 em associação com uma sulfonilureia ou em terapêutica de associação tripla ou em terapêutica adjuvante à insulina.

Eliquis®	2,5 mg x 60 5 mg x 60	Comprimido revestido por película	Apixabano	Anticoagulante	Prevenção de acontecimentos TEV em doentes submetidos a artroplastia eletiva do joelho ou anca; Acidente Vascular Cerebral e embólico em doentes com FA com mais de cinco fatores de risco.
Entresto®	24/26 mg x 28 49/51 mg x 56 97/103 mg x 56	Comprimido revestido por película	Sacubitril e Valsartan	Antagonista dos Recetores da Angiotensina (ARA)	Tratamento de IC crónica com fração de ejeção diminuída em doentes adultos.
Eucreas®	50/850 mg x 56 50/1000 mg x 56	Comprimido revestido por película	Cloridrato de metformina + Vildagliptina	Antidiabético	Tratamento da diabetes mellitus tipo 2 em doentes adultos com mais de 18 anos em monoterapia ou em associação combinada.
Flexiban®	10 mg x 20 10 mg x 60	Comprimido	Ciclobenzaprina	Ação central	Alívio e tratamento de lesões músculo-esqueléticas e de fibrosites, promovendo um alívio da contração muscular.
Folicil®	5 mg x 20	Comprimido	Ácido Fólico	Medicamento para o tratamento de anemias megaloblásticas	Indicado na gravidez, períodos de rápido crescimento e aleitamento como prevenção ou tratamento de carência de ferro.
Folifer®	1 mg + 90 mg x 60	Comprimido revestido por película	Ácido Fólico + Ferro	Compostos de Ferro	Indicado na gravidez, puerpério e aleitamento como prevenção e tratamento de carência de ácido fólico e ferro.
Forxiga®	10 mg x 28	Comprimido revestido por película	Dapagliflozina	Antidiabético	Tratamento da diabetes mellitus tipo 2 em doentes adultos com mais de 18 anos em monoterapia ou em terapia combinada.
Fycompa®	6 mg x 28	Comprimido revestido por película	Perampanel	Antiepilépticos e anticonvulsivantes	Indicado em doentes com idade superior a 4 anos com crises epilépticas parciais (POS) e em doentes com idade superior a 7 anos com convulsões tónico-clónicas generalizadas (PGTC).
Galvus®	50 mg x 56	Comprimido	Vildagliptina	Antidiabético	Tratamento da diabetes mellitus tipo 2 em doentes adultos com mais de 18 anos em monoterapia ou em terapia combinada.

Gincoben®	40 mg x 60	Comprimido revestido	Ginkgo Biloba	Medicamento utilizado no tratamento sintomático das alterações das funções cognitivas	Demência ligeira.
Gluart®	1500 mg x 60	Comprimido revestido por película	Glucosamina	Medicamento para tratamento da artrose	Alívio sintomático da osteoartrrose ligeira a moderada do joelho.
Hyperium®	1 mg x 30	Comprimido	Rilmenidina	Agonistas α -2 centrais	Indicado no tratamento da HA.
Hytacand®	16 / 12,5 mg x 28	Comprimido	Candesartan + Hidroclorotiazida	Antagonista dos receptores da angiotensina	Indicado no tratamento da HA primária.
Icandra®	50/1000 mg x 60 50/850 mg x 60	Comprimido revestido por película	Metformina + Vildagliptina	Antidiabético	Tratamento da diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 em doentes adultos com mais de 18 anos em monoterapia ou em associação combinada.
Inegy®	10/10 mg x 28 10/20 mg x 28 10/40 mg x 28	Comprimido	Ezetimiba + Sinvastatina	Antidislipidémico	Prevenção de eventos cardiovasculares. Indicado em situações de hipercolesterolemia.
Invokana®	100 mg x 30 300 mg x 30	Comprimido revestido por película	Canagliflozina	Antidiabéticos	Tratamento da diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 em doentes adultos com mais de 18 anos em monoterapia ou em terapia combinada dupla.
Janumet®	50/850 mg x 56 50/1000 x 56	Comprimido revestido por película	Sitagliptina e Cloridrato de metformina	Antidiabético	Tratamento da diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 em doentes adultos com mais de 18 anos em monoterapia ou em terapia combinada.
Januvia®	100 mg x 28	Comprimido revestido por película	Sitagliptina	Antidiabético	Tratamento da diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 em doentes adultos com mais de 18 anos em monoterapia ou em terapia combinada dupla ou tripla.
Jardiance®	10 mg x 30 25 mg x 30	Comprimido revestido por película	Empagliflozina	Antidiabéticos	Tratamento da diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 em doentes adultos com mais de 18 anos em monoterapia ou em terapia combinada. Tratamento de IC crónica sintomática com fração de ejeção reduzida.
Jurnista®	32 mg x 30	Comprimido de libertação prolongada	Hidromorfona	Analgésicos estupefacientes	Dor intensa.

Lasix®	40 mg x 60	Comprimido	Furosemida	Diurético da ansa	Edemas de origem cardíaca, hepática ou renal. Tratamento de HA.
Lergonix®	20 mg x 20	Comprimido	Bilastina	Anti-histaminico H1 não sedativos	Alívio da sintomatologia associada a urticária e rinoconjuntivite alérgica.
Lipocomb®	10 mg + 10 mg x 30	Cápsula	Rosuvastatina + Exetimiba	Antidislipidémico	Hipercolesterolemia primária.
Lixiana®	30 mg x 28 60 mg x 28	Comprimido revestido por película	Edoxabano	Anticoagulante	Prevenção de Acidente Vascular Cerebral (AVC) e Embolismo Sistémico em doentes com FA não valvular com mais de cinco fatores de risco.
Minirin®	0,12 mg x 30	Liofilizado oral	Desmopressina	Lobo posterior da hipófise	Diabetes insípida central.
Nebilet®	5 mg x 28	Comprimido	Nebivolol	Seletivos cardíacos	Hipertensão essencial e ICC.
Olsar plus®	20 mg + 12,5 mg x 56	Comprimido revestido por película	Olmesartan medoxomilo + Hidroclorotiazida	Antagonistas dos receptores da angiotensina	Hipertensão essencial em doentes que não apresentam a tensão arterial controlada com monoterapia.
Olsar®	20 mg x 28 40 mg x 28	Comprimido revestido por película	Olmesartan medoxomilo	Antagonistas dos receptores da angiotensina	Indicado no tratamento da hipertensão essencial.
Ongentys®	50 mg x 30	Cápsula	Opicapona	Dopaminomiméticos	Indicado como terapêutica adjuvante da doença de Parkinson.
Pantoc®	20 mg x 56	Comprimido gastrorresistente	Pantoprazol	Inibidor da bomba de prótons	Doença de refluxo gastroesofágico em doentes a partir dos 12 anos. Prevenção de úlceras gastroduodenais provocadas por medicamentos.
Pentasa®	1000 mg x 60	Comprimido de libertação prolongada	Messalazina	Anti-inflamatórios intestinais	Colite ulcerosa e doença de Crohn.
Permixon®	160 mg x 60	Cápsula	Serenoa repens	Medicamentos usados na retenção urinária	Tratamento sintomático da Hiperplasia Benigna da Próstata (HBP).
Pradaxa®	110 mg x 60	Cápsula	Dabigatran	Anticoagulante	Prevenção primária de TEV ou tratamento de TEV recorrentes.

Pravafenix®	40/160 mg x 56	Cápsula	Pravastatina + Fenofibrato	Antidislipidémico	Indicado no tratamento de hiperlipidemia mista, com o objetivo de reduzir os triglicéridos e aumentar o colesterol HDL, em doentes com elevado RCV.
Ranexa®	750 mg x 30	Comprimido de libertação prolongada	Ranolazina	Antianginosos	Tratamento auxiliar dos sintomas da angina de peito, que não responderam ao tratamento de primeira linha (betabloqueantes e/ou antagonistas do cálcio).
Rantudil 90 Retard®	90 mg x 60	Cápsulas de libertação prolongada	Acemetacina	Derivado do indol e do indeno	Alívio sintomático de situações inflamatórias agudas ou crónicas, dolorosas e de agudizações de doenças crónicas.
Rantudil 90 Retard®	60 mg x 10 60 mg x 60	Cápsulas	Acemetacina	Derivado do indol e do indeno	Alívio sintomático de situações inflamatórias agudas ou crónicas, dolorosas e de agudizações de doenças crónicas.
Rosumibe®	10 mg + 10 mg x 60 20 mg 10 mg x 30	Comprimido revestido por película	Rosuvastatina + Exetimiba	Antidislipidémico	Hipercolesterolemia primária.
Rovezix®	10 mg + 10 mg x 30	Cápsula	Rosuvastatina + Exetimiba	Antidislipidémico	Hipercolesterolemia primária.
Rozor®	10/10 mg x 60	Comprimido revestido por película	Rosuvastatina + Exetimiba	Antidislipidémico	Hipercolesterolemia primária.
Sedoxil®	1 mg x 60 1 mg x 20	Comprimido não revestido	Mexazolam	Benzodiazepínico	Tratamento da ansiedade podendo estar associada ou não a estados psiconeuróticos.
Sevikar®	5 mg + 20 mg x 56	Comprimido revestido por película	Amlodipina + Olmesartan medoxomilo	Antagonista dos canais de cálcio e Bloqueador dos canais de cálcio	Indicado no tratamento da HE.
Sinemet®	100/25 mg x 60	Comprimido	Levodopa + Carbidopa	Dopaminomimético	Tratamento e alívio dos sintomas associados à doença de Parkinson.
Skudexa®	75 mg + 25 mg x 20	Comprimido revestido por película	Tramadol + Dexcetoprofeno	Analgésicos e estupefacientes	Indicado para o alívio da dor aguda moderada a grave.

Sodolac®	400 mg x 20 400 mg x 60	Cápsula	Etodolac	Derivados do indol e do indeno	Tratamento e alívio sintomático de tendinite, fibrosite, osteoartrite, lombalgias e alívio da dor ligeira a moderada pós-operatória, entre outras.
Trajenta®	5 mg x 30	Comprimido revestido por película	Linagliptina	Antidiabético	Tratamento da diabetes mellitus tipo 2 em doentes adultos com mais de 18 anos em monoterapia ou em terapia combinada.
Triplixam®	5/ 1,25/5 mg x 30 5/1,25/10 mg x 30 10/2,5/5 mg x 30 10/2,5/10 mg x 30	Comprimido revestido por película	Perindopril + Indapamida + Amlodipina	Bloqueador da entrada de cálcio	Indicado para o tratamento da HE como terapêutica de substituição.
Triticum AC®	150 mg x 60	Comprimido de Liberação Modificada	Cloridrato de Trazodona	Antidepressor	Estados depressivos.
Tromalyt®	150 mg x 28	Cápsula de libertação modificada	Ácido acetilsalicílico	Antiagregante plaquetar	Prevenção secundária de AVC e de cardiopatia isquémica.
Unilan®	0,25 mg x 60 0,5 mg x 60 1 mg x 60	Comprimido	Alprazolam	Ansiolíticos, sedativos e hipnóticos	Ansiiedade de origem vária e perturbações relacionadas com o pânico.
Velmetia®	1000/50 mg x 56	Comprimido revestido por película	Sitagliptina + Cloridrato de metformina	Antidiabético	Tratamento da diabetes mellitus tipo 2 em associação com uma sulfonilureia ou em terapêutica de associação tripla ou em terapêutica adjuvante à insulina.
Vesomni®	6 mg + 0,4 mg x 30	Comprimido de libertação modificada	Solifenacina + Tansulosina	Medicamentos usados na retenção urinária	Tratamento sintomático da HBP.
Viagra®	50 mg x 8	Comprimido revestido por película	Sildenafil	Medicamento usado na disfunção erétil	Disfunção erétil no homem adulto.
Vipdomet®	1000 + 12,5 mg x 56	Comprimido revestido por película	Metformina + Alogliptina	Antidiabético	Tratamento da diabetes mellitus tipo 2 em terapêutica de associação tripla com uma pioglitazona ou com insulina.
Vipidia®	25 mg x 28	Comprimido revestido por película	Alogliptina	Antidiabético	Tratamento da diabetes mellitus tipo 2 em doentes adultos com mais de 18 anos.

Vokanamet®	1000 mg + 50 mg x 20 1000 mg + 50 mg x 60	Comprimido revestido por película	Metformina + Canagliflozina	Antidiabético	Tratamento da diabetes mellitus tipo 2 em doentes adultos com mais de 18 anos em monoterapia ou em terapia combinada.
Xadago®	50 mg x 30 100 mg x 30	Comprimido revestido por película	Safinamida	Dopaminomiméticos	Indicado no tratamento de doentes com Doença de Parkinson (DP).
Xanax XR®	0,5 mg x 60	Comprimido de libertação prolongada	Alprazolam	Ansiolíticos, sedativos e hipnóticos	Ansiedade de origem vária e perturbações relacionadas com o pânico.
Xanax®	0,25 mg x 60 0,5 mg x 60 1 mg x 60	Comprimido	Alprazolam	Ansiolíticos, sedativos e hipnóticos	Ansiedade de origem vária e perturbações relacionadas com o pânico.
Xarelto®	20 mg x 28 15 mg x 42	Comprimido revestido por película	Rivaroxabana	Anticoagulante	Prevenção de eventos tromboembólicos.
Xelevia®	100 mg x 28	Comprimido revestido por película	Sitagliptina	Antidiabético	Tratamento da diabetes mellitus tipo 2 em doentes adultos com mais de 18 anos em monoterapia ou em terapia combinada dupla ou tripla.
Xigduo®	1000/5 mg x 56 850/5 mg x 56	Comprimido revestido por película	Dapagliflozina + Cloridrato de metformina	Antidiabético	Tratamento da diabetes mellitus tipo 2 em doentes adultos com mais de 18 anos em monoterapia ou em terapia combinada.
Zaldiar®	37,5 mg + 3 25 mg	Comprimido revestido por película	Tramadol + Paracetamol	Analgésicos estupefacientes	Indicado no tratamento sintomático da dor moderada a intensa.
Zarator®	10 mg x 56	Comprimido revestido por película	Atorvastatina	Antidislipidémico	Indicado no tratamento de hipercolesterolemia e como prevenção de doença cardiovascular em doentes com um RCV elevado.
Zebinix®	800 mg x 60	Comprimido	Acetato de Eslicarbazepina	Antiepilético e Anticonvulsivantes	Indicado no tratamento de crises epilépticas parciais.
Zenon®	20 mg + 10 mg x 30	Comprimido revestido por película	Rosuvastatina + Exetimiba	Antidislipidémico	Indicado no tratamento de hipercolesterolemia primária.
Zilpen LP®	75 mg + 650 mg x 20	Comprimido de libertação prolongada	Tramadol + Paracetamol	Analgésicos estupefacientes	Indicado no tratamento sintomático da dor moderada a intensa em doentes a partir dos 12 anos.

Zipen®	75 mg + 650 mg x 20	Comprimido	Tramadol + Paracetamol	Analgésicos estupefacientes	Indicado no tratamento sintomático da dor moderada a intensa.
Zipos®	500 mg x 16	Comprimido revestido por película	Cefuroxima	Cefalosporinas de 2ª geração	Antibiótico indicado para infeções para crianças a partir dos 3 meses de idade (suspensão oral).
Zolnor®	5 mg + 20 mg x 56	Comprimido revestido por película	Amlodipina + Olmesartan medoxomilo	Antagonista dos canais de cálcio e Bloqueador dos canais de cálcio	Indicado no tratamento da HE.
Zomarist®	1000 mg + 50 mg x 60	Comprimido revestido por película	Metformina + Vildagliptina	Antidiabético	Tratamento da diabetes mellitus tipo 2 em doentes adultos com mais de 18 anos em monoterapia ou em associação combinada.
Zoref®	500 mg x 16	Comprimido revestido por película	Cefuroxima	Cefalosporinas de 2ª geração	Antibiótico indicado para infeções para crianças a partir dos 3 meses de idade (suspensão oral).
Zuvatek®	10 mg + 10 mg x 30	Cápsula	Rosuvastatina + Exetimiba	Antidislipidémico	Indicado para o tratamento de hipercolesterolemia primária.

Derivados do indol e do indeno

Antiheméticos

Antidiabéticos

Analgésicos e Estupefacientes

Antiagregante plaquetar

Medicamentos usados na incontinência urinária

Anticoagulantes

Antiepilépticos e Anticonvulsivantes

Dopaminomiméticos

Anti-hipertensores, Antidislipidémico; Antianginoso

Inibidor da bomba de prótons

Medicamento para tratamento da artrose

Medicamento utilizado no tratamento sintomático das alterações das funções cognitivas

Ansiolíticos, sedativos e hipnóticos

Antibióticos - Cefalosporinas de 2ª geração

Medicamento usado na disfunção erétil

Bifosfonatos

AAS – Acido Acetilsalicílico

ARA – Antagonista dos Recetores da Angiotensina

AVC – Acidente Vascular Cerebral

BH – Bexiga Hiperativa

CI – Contraindicado

DP – Doença de Parkinson

EAM – Enfarte Agudo do Miocárdio

FA – Fibrilhação Auricular

HA – Hipertensão Arterial

HE – Hipertensão Essencial

HBP – Hiperplasia Benigna da Próstata

HE – Hipertensão Essencial

IC – Insuficiência Cardíaca

ICC – Insuficiência Cardíaca Congestiva

PGTC – Convulsões Tónico-Clónicas Generalizadas

POS – Crises Epiléticas Parciais

RCV – Risco Cardiovascular

TEV – Tromboembolismo Venoso

PARTE II

Monografia

“Epigenetic therapy applied to cancer – new challenges in biomedicine”



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Sob orientação do Professor Doutor João Laranjinha

*“De Coimbra, fica um tempo que não passa
Neste passar de tempo que não volta”*

Manuel Alegre

Abbreviations

5caC – 5-carboxycytosine

5fC – 5-formylcytosine

5hmC – 5-hydroxymethylcytosine

5hmU – 5-hydroxymethyluracil

5mC – 5-methylcytosine

Ac – Acetylation

acetyl-coA – Acetil-Coenzima A

AID – activation-induced deaminase

AMI-I – Arginine N-methyltransferase inhibitor

AOE – 2-amino-8-oxo-9,10-epoxy-decanoyl

APOBECs – Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like

BER – Base excision repair

BET – Bromodomain and extra terminal

BRD – Bromodomain family

COMT – catechol-O-methyltransferase enzyme

DMTs – Histones demetilases

DNA – Deoxyribonucleic acid

DNMT – DNA methyltransferase

DNMTi – DNA methyltransferase inhibitors

EMA – European Medicines Agency

FAD – Adenine flavine dinucleotide

FDA – Food and Drug Administration

FTO – α -ketoglutarate-dependent deoxygenase enzyme

H3K9 – Methylated histone H3

HAT – Histone acetyltransferase

HATi – Histone acetyltransferase inhibitors

HDAC – Histone deacetylase

HDACi – Histone deacetylase inhibitors

HDM – Histone demethylase

HIV – Human immunodeficiency virus

HIV-1 RT – HIV-1 reverse transcriptase
HMT – Histone methyltransferase
HMTi – Histone methyltransferase inhibitors
HMTs – Histone methyltransferases
HPI – Heterochromatin protein I
HPV – human papilloma virus
lncRNA – Long non-coding RNA
KMT – Lysine methyltransferase
m⁶A – N⁶-methyl-adenosine
MAO – monoamine oxidase
Me – Methylation
miRNAs – microRNA
mRNA – Messenger RNA
NAD⁺ – Oxidized nicotinamide adenine dinucleotide
NADH – Reduced nicotinamide adenine dinucleotide
ncRNA – Non-coding RNAs
P – Phosphorylation
PTMs – Post-translational modifications
RMT – Arginine methyltransferase
RNA – Ribonucleic acid
ROS – Oxygen-reactive species
RT – Reverse transcriptase
SAH – S-adenosyl-homocysteine
SAM – S-adenosylmethionine
siRNA – small interfering RNA
TDG – Thymine-DNA-glycosylase
TET – Ten-eleven translocation
VPA – Valproic acid

List of Figures

Figure 1 – Chromatin structure.....	57
Figure 2 – Interdependent mechanisms involved in the modification of chromatin structure.....	58
Figure 3 – Active processes of DNA demethylation.....	60
Figure 4 – DNA – nucleosome interaction.....	61
Figure 5 – Post-translational modifications in the N-terminal tails of the nucleosome.....	63
Figure 6 – Representation of histone acetylation and DNA methylation reactions.....	64
Figure 7 – Classes of epigenetic regulators responsible for chromatin modification – Writers, Readers and Eraser.....	65
Figure 8 – Examples of chemical structure of messenger RNA and long non-coding RNA	67
Figure 9 – Methylation blocks transcription in CpG islands.....	70
Figure 10 – Performance of epigenetic drugs.....	71
Figure 11 – Structure of the main HDAC inhibitor compounds.....	77
Figure 12 – Catalysis reaction by lysine methyltransferases (KMT).....	78

Resumo

A epigenética compreende o estudo das modificações do DNA, RNA e de histonas com impacto na expressão genética que não alteram a sequência primária do DNA. As mudanças epigenéticas consistem, regra geral, na adição e remoção de grupos químicos (marcadores epigenéticos) de um modo regulado por famílias de enzimas que ao adicionar e remover os marcadores epigenéticos específicos alteram a expressão dos genes associados, produzindo um código epigenético. A cromatina apresenta vários mecanismos epigenéticos independentes envolvidos na modificação da sua estrutura, dos quais se destaca, por serem os mais bem estudados, a metilação do DNA, as modificações pós-translacionais de histonas e RNAs não codificantes. De facto, a metilação do DNA é um importante regulador da expressão genética e compreende a transferência de um grupo metilo para o carbono da quinta posição do anel de carbono de citosina, originando a 5-metilcitosina (5mC), por intermédio da família de enzimas, metiltransferases, DNMTs. Uma das modificações pós-translacionais mais relevante e mais estudada é a acetilação de histonas, que tem influência na estrutura da cromatina. A acetilação de histonas consiste na adição de grupos acetilo da Acetil-Coenzima A (acetil-coA) às caudas e “core” das histonas pela família de enzimas acetiltransferases das histonas (HAT). As modificações epigenéticas têm a particularidade de ser afetadas pelo ambiente, metabolismo e pela dieta e, contrariamente às anormalidades genéticas, as modificações epigenéticas têm um carácter reversível, benéfico ou não, podendo desta forma recuperar-se a função/expressão dos genes afetados. Um dos desenvolvimentos mais recentes no âmbito da saúde, diz respeito à caracterização de padrões de modificações epigenéticas associadas a doenças específicas, como por exemplo a hipermetilação do DNA no caso do cancro. Assim, a compreensão do impacto que os mecanismos epigenéticos têm nas doenças humanas, é crucial para conseguir reverter ou estabilizar o agravamento destas doenças, nomeadamente do cancro. Com base neste conhecimento baseia-se o grande potencial das terapias epigenéticas e o desenvolvimento de fármacos capazes de modular o perfil epigenético. Dentro dos fármacos que atuam na maquinaria epigenética citam-se os inibidores das histonas desacetilases (iHDAC), inibidores das histonas metiltransferases (iHMTs), das acetiltransferases (iHATs), das desmetilases (iHDMs) e, por fim, os inibidores das DNA metiltransferases (iDNMTs).

Ademais, a resistência à quimioterapia é um fator limitante nas terapias antitumorais e desta forma, a combinação de fármacos epigenéticos com as terapias clássicas anti-tumorais, aumentam a probabilidade de êxito do tratamento. A epigenética assenta numa abordagem

terapêutica promissora e com inúmeras oportunidades de aplicações em diversas áreas da prática clínica. Neste trabalho farei, inicialmente, uma abordagem genérica da epigenética para, depois, e dada a novidade e impacto na saúde humana, concentrar a atenção em mecanismos relacionados com fármacos epigenéticos.

Palavras-chave: Epigenética, modificações epigenéticas, metilação do DNA, alterações pós-translacionais, cancro, fármacos epigenéticos.

Abstract

Epigenetics comprises the study modifications in gene expression patterns that do not alter the primary DNA sequence, involving the reversible chemical modification of DNA, RNA and histones. Epigenetic changes are regulated by sets of enzymes that add or remove specific epigenetic markers and alter the expression of associated genes, producing an epigenetic code. Chromatin has several independent epigenetic mechanisms involved in modifying its structure, among which DNA methylation, post-translational modification of histones and non-coding RNAs. DNA methylation is an important regulator of gene expression and comprises the transfer of a methyl group to the fifth position carbon of the cytosine carbon ring, giving rise to 5-methylcytosine (5mC), through the DNMTs family of enzymes. One of the most relevant and most studied post-translational modifications is histone acetylation, which influences chromatin structure. The acetylation of histones consists of the addition of acetyl groups from Acetyl-Coenzyme A (acetyl-coA), to histone core and tails catalyzed by the histone acetyltransferase (HAT) family of enzymes. Epigenetics is influenced by external factors, such as diet and metabolism, and, contrary to genetic abnormalities, epigenetic changes have a reversible character and can thus recover the function of the affected genes. A new trend in the molecular mechanisms of disease is the identification of epigenetic patterns with specific diseases, such as the hypermethylation of DNA in cancer. Thus, understanding the impact that epigenetic mechanisms have on human diseases is crucial to succeeding in reversing or stabilizing the worsening of these diseases, namely cancer. Based on this knowledge, the great potential of epigenetic therapies and the development of drugs capable of modulating the epigenetic profile emerges. Among the drugs that act on the epigenetic machinery, the histone deacetylases inhibitors (HDACi), histone methyltransferases inhibitors (HMTi), acetyltransferases (HATi), demethylases (HDMi) and, finally, DNA methyltransferases inhibitors (DNMTi). Furthermore, resistance to chemotherapy is a limiting factor in anti-tumor therapies and, therefore, the combination of epigenetic drugs with classical anti-tumor therapies increases the probability of treatment success. Epigenetics is based on a promising therapeutic approach and with numerous application opportunities in different areas of clinical practice. In this work a general introduction to epigenetics and epigenetic mechanisms is followed by a more deeper revision concerning the use of epigenetic drugs in the case of cancer.

Keywords: Epigenetics, epigenetic modifications, DNA methylation, post-translational modification, cancer, epigenetic drugs.

I. Introduction

The nucleotide sequence that contains genetic information present in the DNA constitutes genes, which in turn encode proteins through a complex process of transcription and translation with messenger RNA (mRNA) intermediacy. This process is called gene expression. Epigenetic processes are processes that alter gene expression without altering the DNA sequence. (Biswas and Rao, 2018) Thus, epigenetics comprises the study of DNA (also RNA and histones) modifications in gene expression patterns that do not alter the primary DNA sequence. (Ahuja, Sharma and Baylin, 2016) It is well known that altering the architecture of chromatin might, in turn, impact in the expression of the genes. Epigenetic changes are reversible and are regulated by sets of enzymes that add or remove specific epigenetic markers and alter the expression of associated genes, producing an epigenetic code. (Yao *et al.*, 2016) Epigenetic mechanisms are involved in cell function throughout life, starting soon after fertilization and are influenced by lifestyle habits, diet, disease states and xenobiotics. These mechanisms may involve structural changes in position that can alter chromatin, with genes turning off or on. (Deans and Maggert, 2015; Liester and Sullivan, 2019)

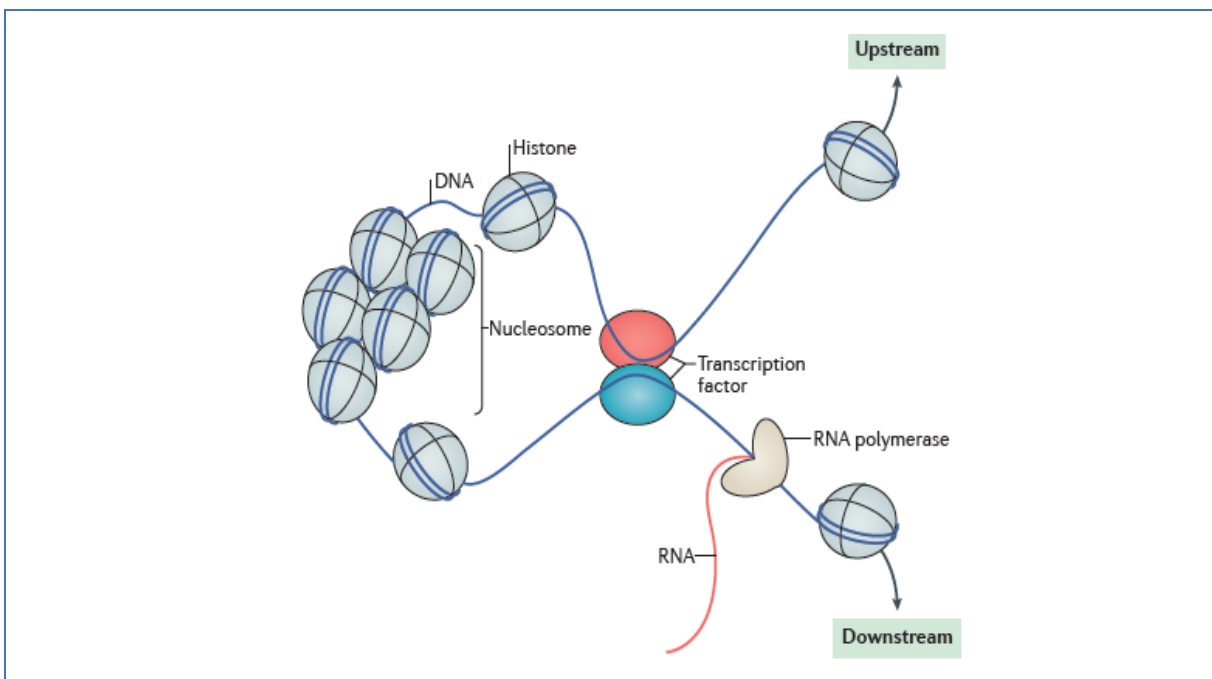


Figure 1 – Chromatin structure. Chromatin represents the basic unit of the nucleosome, which in turn divides into two spirals surrounded by four pairs of histones. (Yao *et al.*, 2016)

Chromatin represents the basic unit of the nucleosome, which in turn divides into two spirals surrounded by four pairs of histones – H2A, H2B, H3 and H4 (Figure 1). Depending on the chromatin's condensation state, it is possible to divide into two conformational states: euchromatin and heterochromatin. Euchromatin is characterized by having a stretched

conformation and for this reason transcription is more common. In contrast, heterochromatin is in a condensed state and is defined by genomic regions that are transcriptionally silent. (Biswas and Rao, 2018; Hake, Xiao and Allis, 2004) The chromatin is a dynamic structure with an important role in numerous metabolic processes associated with DNA. Processes such as replication, transcription, repair, recombination and centromere formation are some examples. Chromatin may be targeted by several independent epigenetic mechanisms (Figure 2) involved in its structure modification such as DNA methylation, reorganization through remodeling complexes, post-translational modifications of histone, insertion of histone variants and modulation by non-coding RNAs. (Deans and Maggert, 2015; Dulac, 2010)

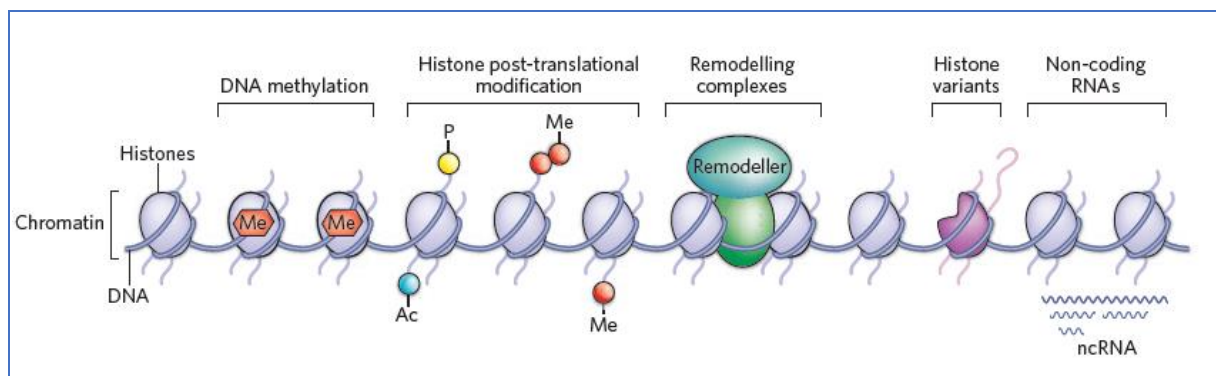


Figure 2 – Interdependent mechanisms involved in the modification of chromatin structure. Different mechanisms responsible for chromatin modifications are known DNA methylation, post-translational modification of histone, non-coding RNAs, complex remodeling and insertion of histone variants. All these mechanisms influence the global structure of chromatin, through changes that influence the interactions between DNA and histones and, consequently, influence the degree of DNA folding and transcription. From these enumerated mechanisms, DNA methylation and post-translational modification of histone stand out as the most relevant and most studied mechanisms. Ac: acetylation; Me: methylation and P: phosphorylation. (Dulac, 2010)

All these interdependent mechanisms influence the global structure of chromatin, through alterations that influence the interactions between DNA and histones and, consequently, influence the degree of DNA folding and transcription. Epigenetic mechanisms represent the epigenetic information of the cell that is essential for cell development and proliferation. From these enumerated mechanisms, DNA methylation and post-translational modification of histone stand out as the most relevant and most studied mechanisms. (Deans and Maggert, 2015; Dulac, 2010)

1.1 DNA methylation

Covalent attachment of methyl groups to DNA, also identified as DNA methylation, is the most widely studied modification of the genome, as it is an important regulator of gene expression. (McGowan and Roth, 2015) DNA methylation, namely cytosine methylation, comprises the transfer of a methyl group (CH_3) from the S-adenosylmethionine (SAM) donor, which functions as a cofactor, to the fifth position carbon of the cytosine carbon ring, originating the 5-methylcytosine (5mC). Since cytosines are paired with the guanine nucleotide, this methylation is commonly referred to as Cytosine-Phosphate-Guanine (CpG) methylation. (Deans and Maggert, 2015; Skvortsova, Stirzaker and Taberlay, 2019) DNA methylation occurs almost exclusively in CpG dinucleotides, with a great impact on gene expression regulation and on the silencing of repetitive elements in the genome. CpG dinucleotides appear dispersed throughout the eukaryotic genome or are clustered in defined regions and are called CpG islands. Generally, CpG dinucleotides are methylated and these CpG islands are demethylated. (Vaissière, Sawan and Herceg, 2008; Skvortsova, Stirzaker and Taberlay, 2019)

The transfer of the methyl group is achieved with the aid of a family of enzymes known as DNA methyltransferases (DNMTs). (Liester and Sullivan, 2019) Four DNMTs are known, all expressed in the brain, namely DNMT1 – involved in the maintenance of DNA methylation throughout the replication process; DNMT3A and DNMT3B – involved in most methylation processes that occur without the presence of prior methylation and the DNMT3L– which only acts in combination with DNMT3A as it has a non-existent catalytic domain. Methyl group donors can also be found in food, such as folate, choline, vitamin B12 and methionine, thus being obtained by a rich and varied diet. (Szyf, 2007; Mudbhary and Sadler, 2011)

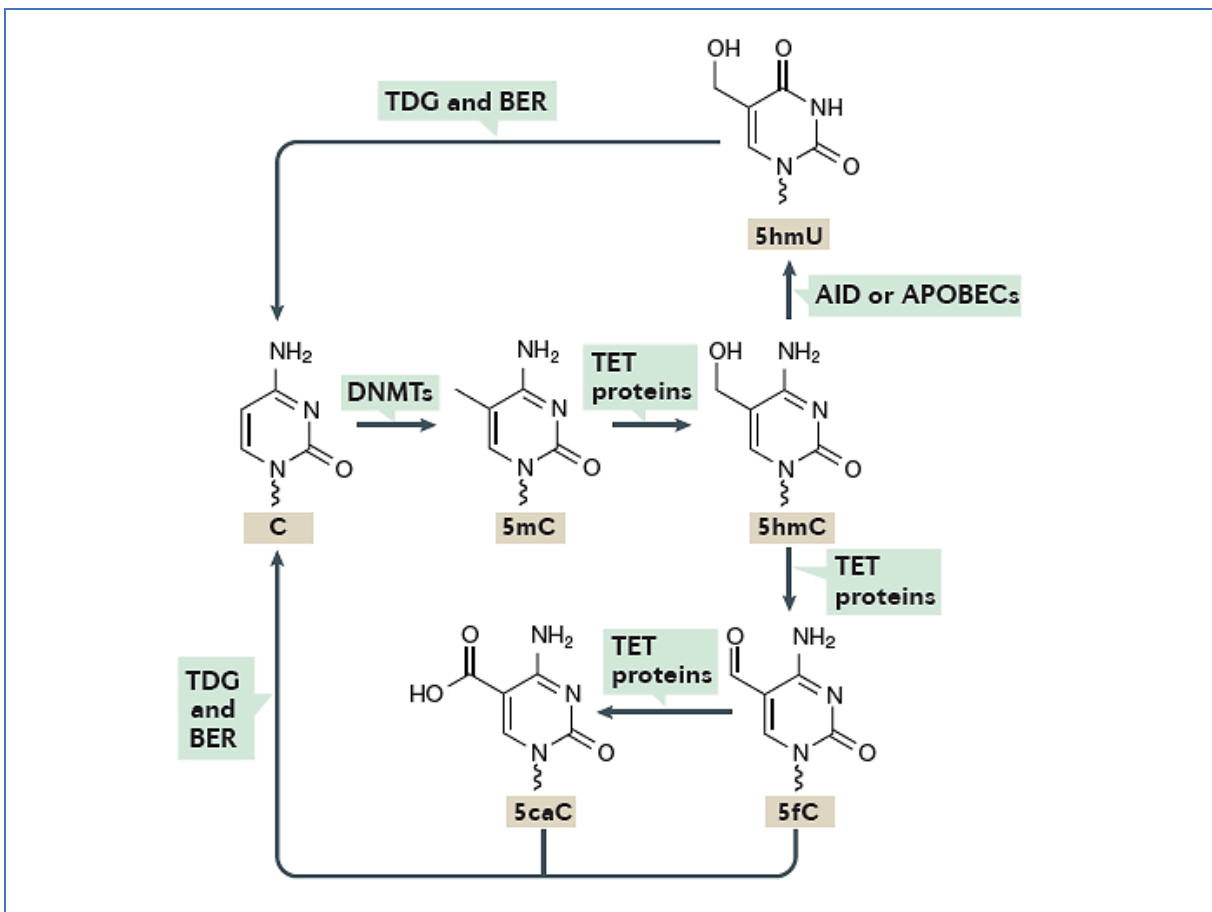


Figure 3 – Active processes of DNA demethylation. The family of enzymes DNA methyltransferases (DNMTs) are responsible for the methylation of cytosine into 5-methylcytosine (5mC). Throughout the demethylation process, several steps are underlying that correspond to the oxidation of 5mC to 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), through the group of TET enzymes. Likewise, 5hmC is converted to 5-formylcytosine (5fC) by an oxidation reaction and finally, this intermediate is converted to 5-carboxycytosine (5caC). Demethylation of 5hmC can still occur to give rise to 5-hydroxymethyluracil (5hmU) through the APOBECs or by activation of cytidine deaminase (AID). During the process the 5fC, 5hmU and 5caC intermediates can be cleaved by thymine-DNA-glycosylase (TDG) and then can be converted back to an unmethylated cytosine by DNA repair mechanisms, mainly via the base excision repair pathway (BER). (Yao *et al.*, 2016)

Active processes of DNA demethylation might be assisted by the help of another group of enzymes, the ten-eleven translocation (TET) which can be divided into subfamilies, TET1, TET2 and TET3. The demethylation process involves several steps, including the modification of 5mC to 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) by TET enzymes. In turn, 5hmC is converted to 5-formylcytosine (5fC) and finally, this intermediate is converted to 5-carboxycytosine (5caC) (Figure 3). Demethylation of 5hmC can still occur to give rise to 5-hydroxymethyluracil (5hmU) via the APOBECs or by activation-induced cytidine deaminase (AID). During the process the 5fC, 5hmU and 5caC intermediates can be cleaved by thymine-DNA-glycosylase (TDG) and then can be converted back to an unmethylated cytosine by DNA repair mechanisms, mainly via the base excision repair (BER). (Yao *et al.*, 2016) (Jones, Issa and Baylin, 2016). This brief description of the mechanisms of DNA demethylation emphasizes both, the

dynamics and the complexity of the process. This process seems to be relevant in the activation or inhibition of specific genes during the development of responses to environmental disturbances. However, when there is no involvement of demethylases and when maintenance by methyltransferases is inactive during the cell cycle, DNA demethylation can occur by passive processes. In these processes the enzymes involved must be highly regulated in both the methylation and demethylation processes. (Dulac, 2010; Wu and Zhang, 2017)

1.2 Post-translational modifications of histones (PTMs)

Histones, the main protein component of chromatin, are proteins with an important role in gene regulation, located in the nucleosome of eukaryotic cells. Histones can undergo post-translational modifications that determine the regulation of genes and are responsible for the first degree of chromatin compaction, originating the nucleosome – the basic and fundamental unit of chromatin. The nucleosome, consisting of eight histone molecules – the histone octamer core – in which the DNA is wrapped, may then acquire sequential supercoiled structures (Figure 4), originating high-order structure of chromatin and the chromosomes. Understanding the structure of the nucleosome is important for designing the role of chromatin in gene expression. (Figueiredo, Cross and Janzen, 2009)

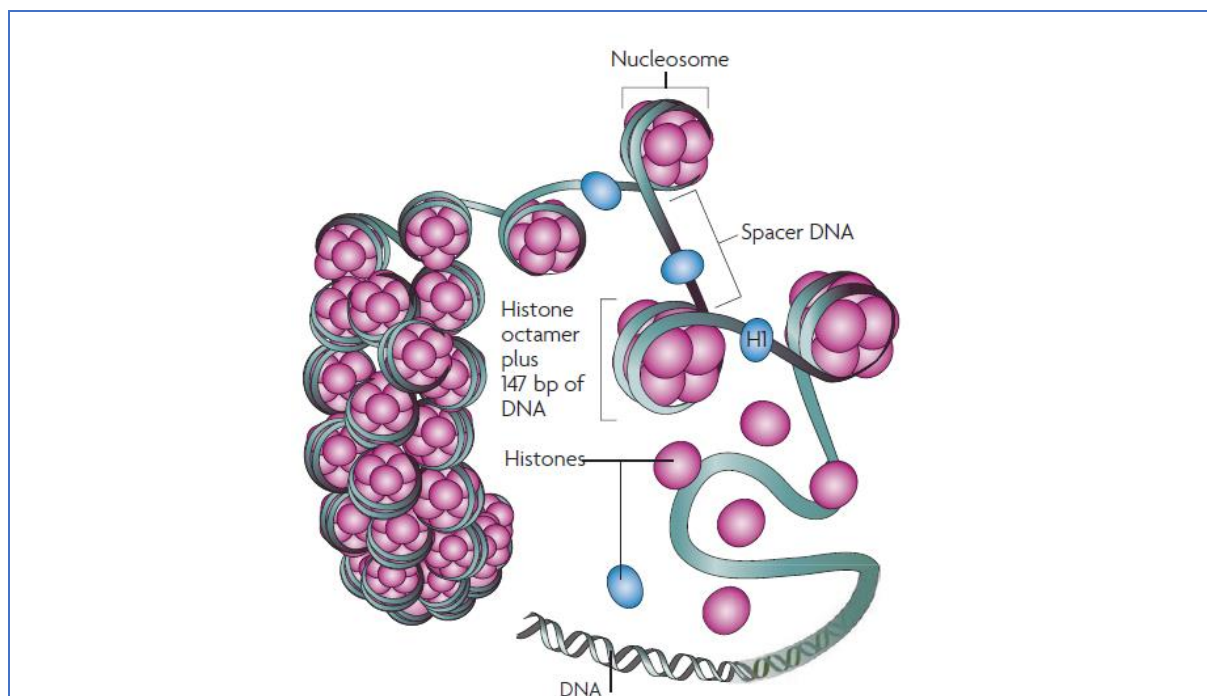


Figure 4 – DNA – nucleosome interaction. The DNA wraps itself on a central octamer, formed by four pairs of histones – two H2A-H2B dimers and two H3-H4 dimers and the histone H1 which confers greater compaction between nucleosomes, originating a strong DNA-nucleosome interaction. (Figueiredo, Cross and Janzen, 2009)

Histones are characterized by the existence of a conserved globular domain, formed by the C-terminal region and an N-terminal tail that has 40 amino acids in H3 and 15 amino acids in the case of H2A. The center of the nucleosome contains four pairs of histones – two H2A-H2B dimers and two H3-H4 dimers and the histone H1 which confers greater compaction between nucleosomes. DNA wraps around a central octamer (Figure 4) forming a strong DNA-nucleosome interaction. (Hake, Xiao and Allis, 2004; Miranda Furtado *et al.*, 2019; Mudbhary and Sadler, 2011)

Histone post-translational modifications (PTMs), mainly modifications in their N-terminal tails, have been relevant as markers of gene expression patterns. Within the PTMs we can enumerate deamination, ADP-ribosylation, sumoylation, ubiquitination, methylation, acetylation and phosphorylation, which can lead to alterations in the respective histone function and, consequently, affect gene expression. (Miranda Furtado *et al.*, 2019)

One of the most relevant and most studied post-translational modifications is histone acetylation, which has a structural influence on chromatin, both in its physical structure and in the binding to specific proteins that alter the chromatin's compaction state. This reaction allows gene expression through a reversible reaction dominated by the histone deacetylases (HDACs) and histone acetyltransferase (HATs) enzymes. This reaction neutralizes the positive charge of lysines and consequently leads to a decrease in the strength of histone interaction with DNA, thus allowing gene expression. Acetylation is often associated with active transcription, unlike other modifications. (Vaissière, Sawan and Herceg, 2008; Hassell, 2019)

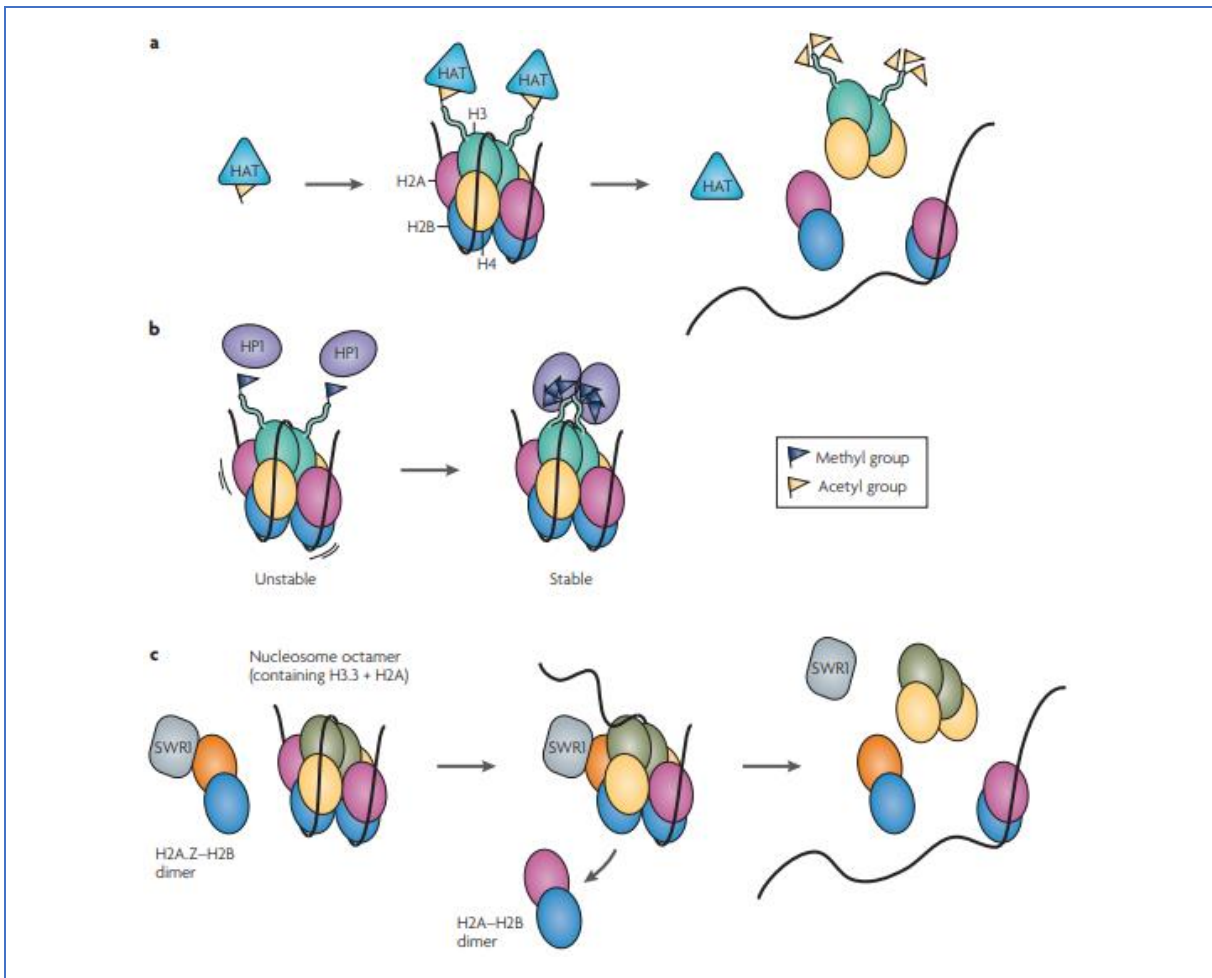


Figure 5 – Post-translational modifications in the N-terminal tails of the nucleosome. (a) Modifications to histone tails. (b) Chromatin-associated proteins; (c) Histone variants. (Henikoff, 2008)

Histone acetylation consists of the addition of acetyl groups from acetyl-coenzyme A (acetyl-coA) to the tails of histone H3 catalyzed by HAT enzymes, leading to a decrease in histone interactions with chromatin components and destabilizing the nucleosomes (Figure 5, a). The HP1 or protein I dimer heterochromatin is a protein that makes up heterochromatin, when it binds to two tails of histone H3 methylated in lysine 9 (H3K9), it leads to the union of two tails of the same nucleosome or two adjacent nucleosomes, leading to a decrease of nucleosome mobility by association of proteins to chromatin (Figure 5, b). The replacement of the H2A-H2B dimer by the H2AZ-H2B dimer is mediated by SWR1. In nucleosomes with H3.3 and H2A, they become unstable with the replacement of H2A by H2AZ (Figure 5, c). (Henikoff, 2008; Sharma, Kelly and Jones, 2009)

As mentioned before, the epigenetic modifications are reversible and dynamic. Therefore, genetic repression is possible through an inverse reaction, deacetylation, mediated by the family of HDACs enzymes (Figure 6). These enzymes can be classified into four groups – class I, II and IV HDACs are zinc dependent, while class III HDACs are NAD-dependent. (Deans

and Maggert, 2015; Dulac, 2010; Miranda Furtado *et al.*, 2019) There are several pathologies that are associated with dysregulation of the activity of HATs or HDACs, such as cancer, neurodegenerative diseases, autoimmune diseases and epilepsy, in which some pharmacological treatments can reduce the activity of HDACs and/or increase the action of HATs. (Fischer *et al.*, 2010)

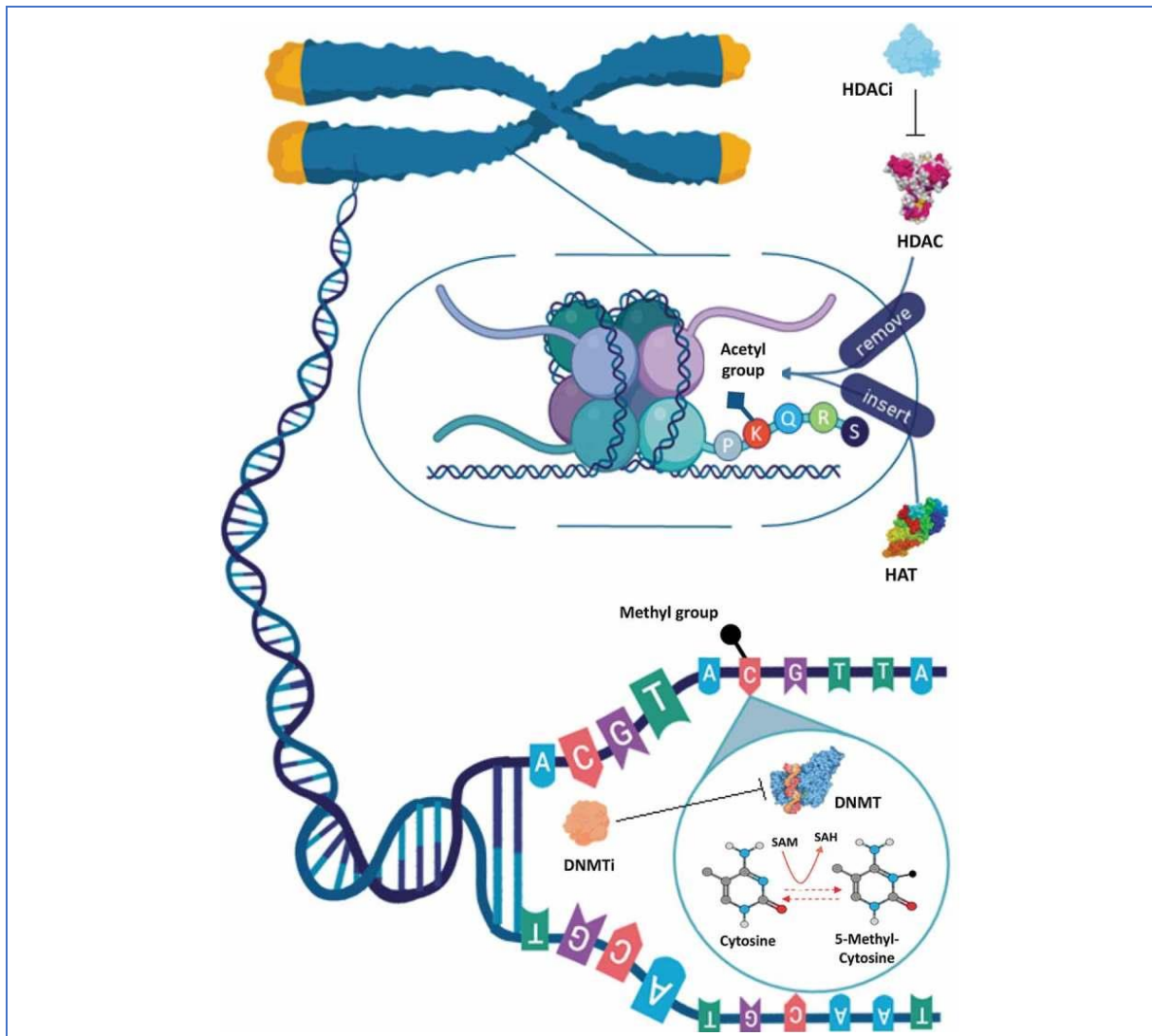


Figure 6 – Representation of histone acetylation and DNA methylation reactions. Representation of histone acetylation through HAT enzymes responsible for inserting the acetyl group and HDAC enzymes that participate in the deacetylation reaction. DNA methylation comprises the transfer of a methyl group (CH_3) from the S-adenosylmethionine (SAM) donor, which functions as a cofactor, to the fifth position carbon of the cytosine carbon ring, originating the 5-methylcytosine (5mC). (Miranda Furtado *et al.*, 2019)

The modifications mentioned above, DNA methylation and histone acetylation, (Figure 6) are the most studied epigenetic markers but it is known that many others may occur, including, among others, phosphorylation, sumoylation, hydroxylation, ubiquitylation and propionylation. Additionally, both the methylation and the acetylation might occur in different amino acid residues in the histones, producing different outcomes in terms of gene expression.

One strategy to address these modifications in a simplified way is to categorize the enzymes in Writers (those that add the chemical groups), Erasers (those enzymes that remove the chemical groups) and Readers (the proteins assisting the transcription of the gene) (Figure 7).

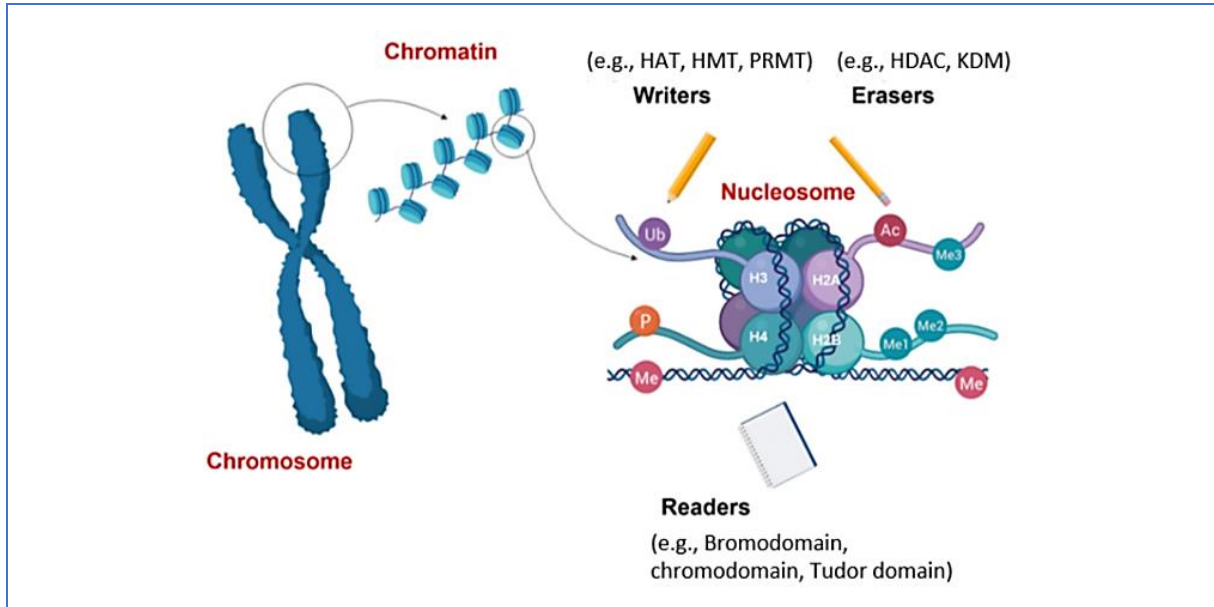


Figure 7 – Classes of epigenetic regulators responsible for chromatin modification – Writers, Readers and Erasers. Writers include HAT enzymes that catalyze acetylation, HMTs that catalyze methylation, and kinases that catalyze phosphorylation. Readers contain amino acid binding residues and recognize specific modifications. Erasers incorporate HDACs that remove acetylation, DMTs remove methylation and phosphatases remove phosphorylation. HATs: histone acetyltransferases; HMTs: histone methyltransferases; HDACs: histone deacetylases; DMTs: histone demethylases. (Ozyerli-Goknar and Bagci-Onder, 2021)

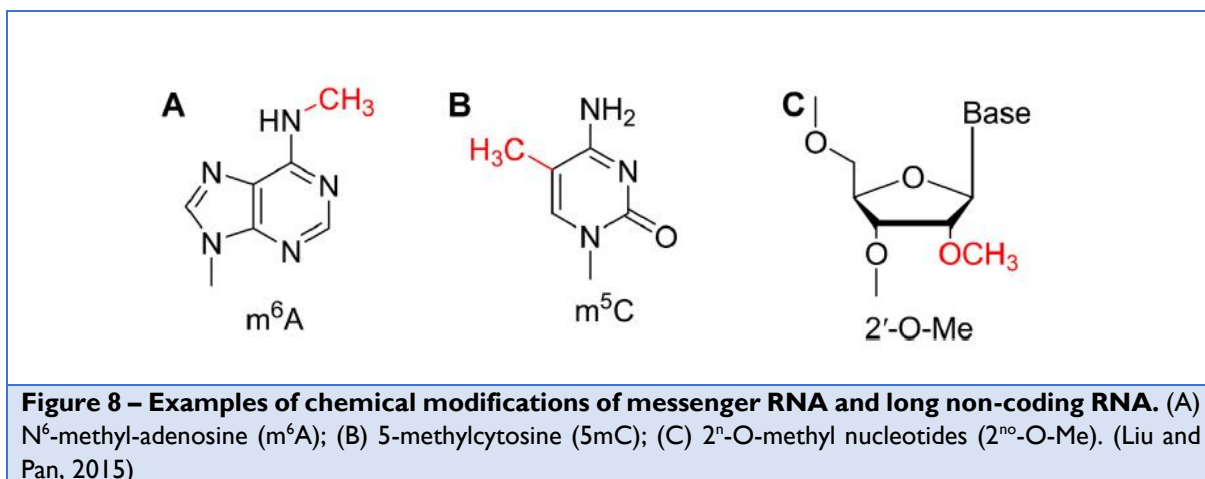
In fact, to signal genetic transcription states it is necessary that these modifications be added, recognized and removed. For this, as mentioned above, there are three groups of proteins in epigenetic control – Writers, Readers and Erasers. Addition is done by Writers in which methylation is a paradigmatic example, being catalyzed by histone methyltransferases (HMTs), acetylation by histone acetyltransferases (HATs) and phosphorylation by kinases (Figure 7). HTMs can be further divided into two groups, arginine methyltransferases and lysines methyltransferases, as they are the amino acids where histone modifications preferentially occur. Recognition is done by proteins that have binding domains to modified amino acid residues, by Readers proteins. Removal is done by Erasers of which the histone deacetylase (HDACs) that remove acetylation; histone demethylases (DMTs) including lysine and arginine demethylases, which remove methylation and phosphatases remove phosphorylation. PTMs interact with proteins responsible for DNA methylation, catalyzed by DNA methyltransferases (DNMTs) into cytosines, more stable than PTMs into histones. (Falkenberg and Johnstone, 2014; Biswas and Rao, 2018; Dedola *et al.*, 2020; Gillette and Hill, 2015)

It is known that histone modifications are important regulators of DNA transcription, replication and repair processes. Histones play several important roles in the body, not only in regulating the accessibility and action of machinery based on gene transcription, but also in packaging and preserving DNA in organized structures. Changes in epigenetic profiles may be related to health and disease status and, therefore, it is important to understand how one can act to reverse diseases originating in these states.

1.3 Non-coding RNAs (ncRNAs)

Non-coding RNAs are generically transcribed RNA molecules from the genome that cannot be translated into polypeptides. These RNA molecules are in the cell nucleus and act to regulate gene expression. Inside of ncRNA it is possible to distinguish two groups according to their size, the short and long non-coding RNAs. Thus, within the short non-coding RNAs, the miRNAs of endogenous origin that acts in post-transcriptional silencing and RNA interference (siRNA) of exogenous origin, both correspond to well-preserved molecules. On the other hand, long non-coding RNAs present themselves as poorly conserved molecules. (Allis and Jenuwein, 2016)

Long non-coding RNA (lncRNA) and messenger RNA (mRNA) contain numerous post-translational chemical modifications. The most abundant post-translational chemical modification in mammals is N⁶-methyl-adenosine (m⁶A). m⁶A can be removed by specific enzymes present in mammals and is recognized by families of proteins that bind to RNA, consequently affecting mRNA function (Figure 8). Modification of mRNA / lncRNA represents a new epigenetic regulation, analogous to DNA methylation and histone modification. (Wu et al., 2017; Liu and Pan, 2015; Wu et al., 2017)



The most abundant internal modification of mRNA / lncRNA, discovered during the 1970s, is made from N⁶-methyl-adenosine (m⁶A), present at more than three sites per mRNA molecule. Modifications such as 5-methylcytosine (5mC) or Nm have already been identified to occur internally in mRNA. A common feature of these modifications is that their presence cannot be identified using reverse transcriptase (RT) in complementary DNA. (Liu and Pan, 2015; Wu *et al.*, 2017)

The mRNA/lncRNA modification is of enormous interest as m⁶A has been discovered to be the substrate for the human FTO enzyme. The FTO enzyme is part of a family of human genes that catalyze the oxidative reversion of methylated DNA and RNA bases. In several genome-wide association studies, the human FTO gene is strongly associated with diabetes and obesity in the population. Other studies performed in FTO knockout mice also indicate that they are leaner than wild-type mice, possibly due to alterations in the control of cell metabolism. (Wu *et al.*, 2017; Liu and Pan, 2015)

The evidence for this RNA-modifying enzyme inconsequentially leads to highlighting that RNA modifications can act as epigenetic markers like DNA methylation and histone modification. (Liu and Pan, 2015)

2. Influence of environmental factors on epigenetics

Throughout life, the human body is continually exposed to numerous environmental factors, which are closely related to the lifestyle of each individual, the environmental conditions where it lives and working conditions. Exposure to risk factors such as infectious microorganisms such as the *Helicobacter pylori* bacteria and the human papilloma virus (HPV), exposure to heavy metals such as cadmium, arsenic and nickel, as well as tobacco smoke and different types of radiation are harmful risk behaviors for the body. It is now known that several factors that are associated with risk behaviors and that are at the origin of epigenetic dysregulation, which in turn is at the origin of the appearance of disease. (Alam, Abdolmaleky and Zhou, 2017; Vaissière, Sawan and Herceg, 2008).

Changes in gene expression patterns are present in several studies, namely on the influence of ionizing radiation on the appearance of lung carcinoma. This relationship is based on a study carried out by Belinsky who reported the existence of DNA methylation at the level of the promoter region of tumor suppressors, such as p16 or CDKN2A. (Vaissière, Sawan and Herceg, 2008)

Metals can also influence epigenetic mechanisms such as arsenic and cadmium. Arsenic's mechanism of action consists of decreasing the SAM enzyme, which is fundamental in the DNA methylation process. This metal is closely related to numerous types of tumors such as kidney, bladder, liver and lung. (Li *et al.*, 2019) On the other hand, cadmium is a metal that inhibits DNMTs enzymes, and consequently leads to hypomethylation. This enzyme inhibitor is at the origin of different types of tumors, such as stomach, kidney, prostate, liver and lung. (Genchi *et al.*, 2020)

It is also known that epigenetic programming might be triggered by stress experiences during the first period of life. In this regard, a study by McGowan in 2008 revealed how psychological and physical abuse during childhood influences the brain in adulthood. This study described that in victims who suffered these abuses in childhood, there was a methylation at the level of the promoter region of neurospecific glucocorticoid receptors and that in adulthood committed suicide. It was concluded that there was an increase in this methylation in people who were abused and committed suicide, compared to people who committed suicide with no history of physical or psychological abuse. It was concluded that the increase in methylation leads to a decrease in the expression of glucocorticoid receptors and, consequently, to a greater propensity for the occurrence of suicide. (Stevens, Rucklidge and Kennedy, 2018)

Overall, from the above mentioned studies can be inferred that understanding the impact that epigenetic mechanisms have on human diseases is crucial to succeeding in reversing or stabilizing the worsening of these diseases. The main epigenetic processes were listed above. These epigenetic processes can be influenced by the different environments to which each person is exposed throughout life and mutations associated with these epigenetic mechanisms can exponentially increase the onset of diseases. It is therefore important to understand the origin of these diseases in order to develop epigenetic treatments capable of treating these diseases.

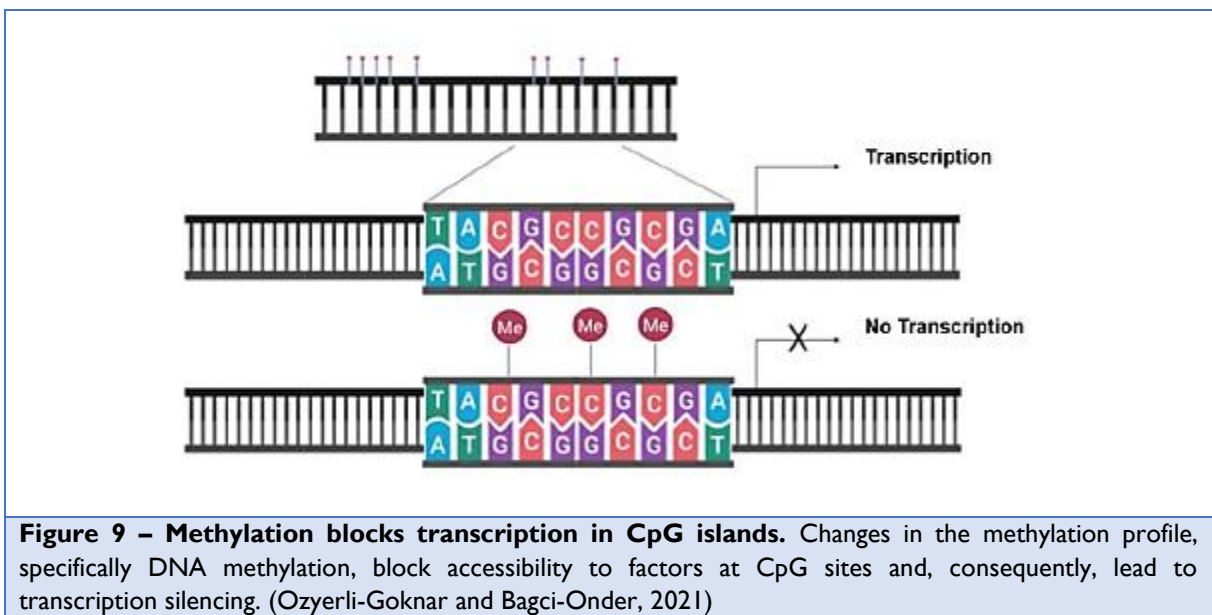
3. Epigenetic changes in cancer

Epigenetic mechanisms are capable of being altered in face of various stimuli, with DNA methylation and histone modification being important regulatory mechanisms, as discussed. The epigenome, a set of epigenetic modifications, provides complex mechanisms for diversity and differentiation, thus allowing to regulate the accessibility of genetic information to the cellular machinery. Minor failures in the establishment or maintenance of epigenetic processes can lead to improper activation or inhibition of several genes, leading to changes in the

physiology and cell functions, triggering the development of diseases. (Sharma, Kelly and Jones, 2009; Dawson and Kouzarides, 2012)

The impact of epigenetic processes, namely flaws in DNA methylation and histone modifications, have been strongly emphasized in several types of cancer – colon, liver, breast, esophagus, skin cancer, among others, associated with epigenetic alterations. (Rodríguez-Paredes and Esteller, 2011)

Modifications in the DNA methylation profile are the most studied and have been present in all steps of the carcinogenesis process. The methylation profile of neoplastic cells is marked by global DNA hypomethylation, consequently leading to an increase in genetic instability associated with the development of cancer. Studies have described that there is hypomethylation of some CpG islands (Figure 9) in oncogene promoting regions and local hypermethylation of tumor suppressor gene promoter regions and cell repair genes. (Allis and Jenuwein, 2016)



Histone modifications have already been related to clinical parameters of the disease, including prognostic and recurrence factors, appearing altered in tumor processes. A decrease in the HPI protein, which binds to two methylated H3 histone tails (H3K9), is associated with tumor progression. Some specific histone modifications, namely deacetylation of H3 and H4, methylation of H3K9 and trimethylation of H3K4 and H3K27, have been associated with hypermethylation of CpG islands in cancer cells. (Ozyerli-Goknar and Bagci-Onder, 2021; Sharma, Kelly and Jones, 2009)

Little is known about the profile of histone modifications, however through the analysis of the histone H4 profile, it was possible to verify the loss of monoacetylation in K16 and trimethylation in K20, corresponding to areas of DNA hypomethylation, in cancer cells . In several types of tumors, the presence of mutations in the HAT enzyme or increased expression of the HDAC enzyme was also verified, consistent with the loss of acetylation associated with these processes. (Sharma, Kelly and Jones, 2009)

4. Epigenetic drugs

Over the years, the number of diseases caused by changes in the epigenetic profile has grown exponentially, emphasizing the importance of developing drugs capable of acting on specific targets to reverse these changes. In the treatment of diseases that are caused by epigenetic mutations, it is possible to use modulators (drugs) that act at the level of the enzymes involved in the epigenetic processes and, in particular, those enzymes involved the reversible epigenetic chemical signatures, that is, the Writers and the Erasers.

There are different modulators depending on the type of enzyme involved, which can be classified as inhibitors of the DNMTs enzyme family and modulators that exert action in the histone modification process. Among the drugs that act on the epigenetic machinery are the histone deacetylase inhibitors (HDACi), histone methyltransferase inhibitors (HMTi), acetyltransferase (HATi), demethylases (HDMs) and DNA methyltransferase inhibitors (DNMTi) (Figure 10).

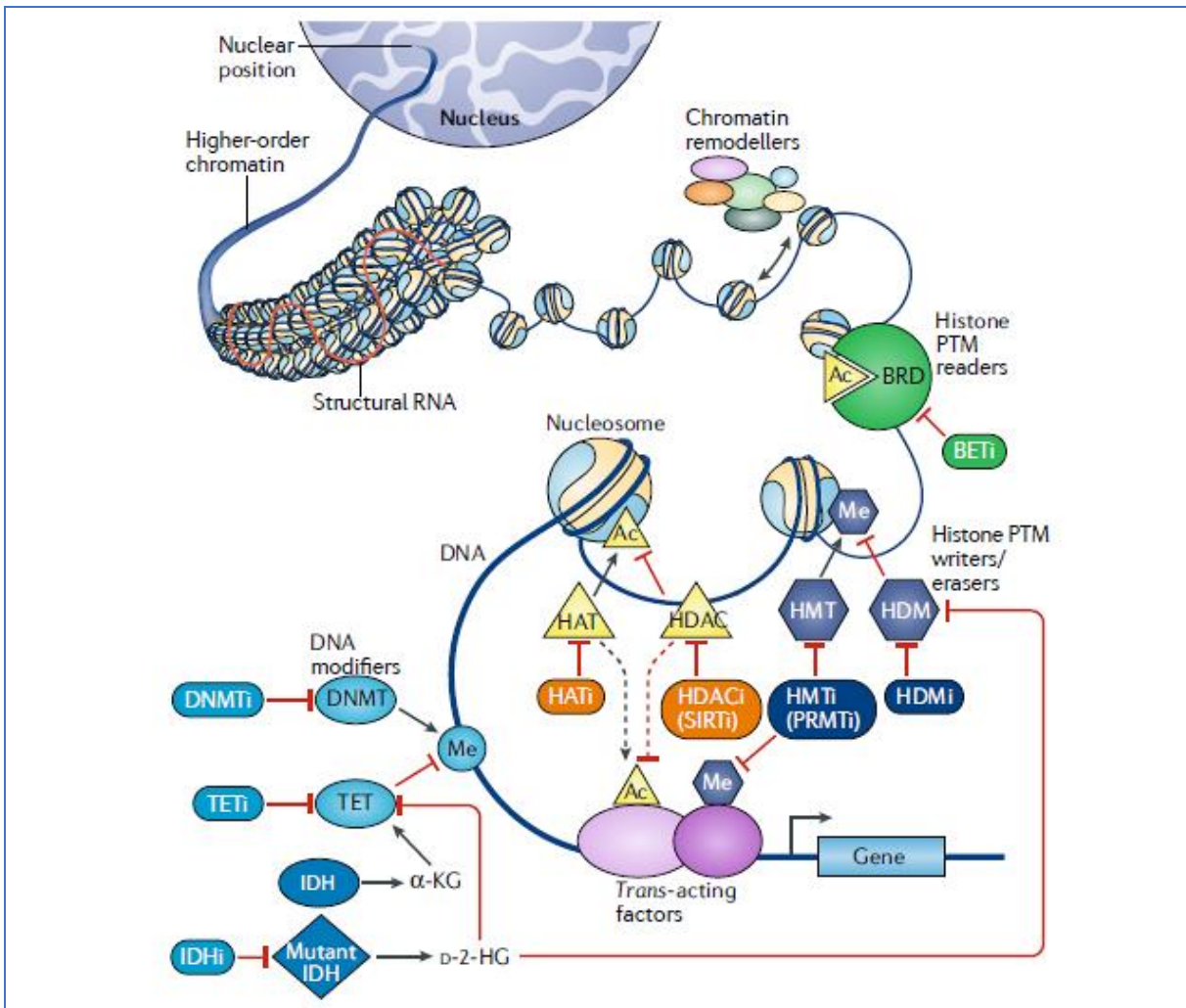


Figure 10 – Performance of epigenetic drugs – representation of enzyme writers, readers and erasers and the site of action of epigenetic drugs. There are different modulators depending on the type of enzyme involved, which can be classified as inhibitors of the DNMTs enzyme family and modulators that exert action in the histone modification process. Among the drugs that act on the epigenetic machinery are the histone deacetylase inhibitors (HDACi), histone methyltransferase inhibitors (HMTi), acetyltransferase (HATi), demethylases (HDMs) and DNA methyltransferase inhibitors (DNMTi). (Morel *et al.*, 2020)

4.1. Histone deacetylase inhibitors (HDACi)

Histone deacetylase (iHDAC) inhibitors, the so called Erasers of the histone modification process, are responsible for removing acetyl groups from. (Kumar Singh, Bishayee and Pandey, 2018) These enzymes can be classified into four groups – class I, II and IV HDACs are zinc dependent, while class III HDACs are NAD-dependent. (Deans and Maggert, 2015; Dulac, 2010)

Histone deacetylase (HDAC) is the most emphasized target in the search for new treatments involving modulation of epigenetic markers in the genome. Histone deacetylase inhibitors (HDACis) have a wide spectrum of effects described as antineoplastic, neuroprotective and anti-inflammatory, thus acting as possible antitumor drugs. (Bolden, Peart and Johnstone, 2006)

HDACs have a wide structural variety as well as diversity in power of action, having very complex mechanisms of action and, in particular, regulatory pathways not yet fully elucidated. The overall notion is that the alteration of acetylation patterns and proteins lead to biological effects involved in the regulation of gene expression, cell cycle progression, apoptosis, mitosis and DNA repair. The mechanism of the blocking of substrate recognition and, consequently, to the accumulation of acetylated histones. (McClure, Li and Chou, 2018; Ozyerli-Goknar and Bagci-Onder, 2021)

HDAC inhibitors have a wide variety of chemical structures and can be divided essentially into five structural groups (hydroxamic acids, short-chain fatty acids, benzamides, sirtuins and cyclic tetrapeptides) consisting of compounds with HDAC inhibitory activity. Hydroxamic acids, short-chain fatty acids and sirtuins inhibit class I and II HDACs while benzamides inhibit class I, II and III (Table I). These inhibitors have shown great effectiveness in decreasing the rate of proliferation and increasing apoptosis of cancer cells in various types of cancer. (Boon Toh, Jieh Lim and Kai-Hua Chow, 2017; Eckschlager *et al.*, 2017; Miranda Furtado *et al.*, 2019)

Table I – Class of HDAC inhibitors	
Hydroxamic acids	SAHA, TSA, PXD101, Panabinstat (LBH589), Givinostat (ITF2357), CHR-3996, Belinostat (PXD101), SB939 and CHR-2845.
Short chain fatty acids	Butyric acid, valproic acid, OSUHDAC42
Sirtuins	Nicotinamide, Splitomycin and analogues: tenovins, AGK2, suramin, UVI5008, EX-257, sirtinol
Benzamides	MS-275 (Entinostat) and MGCD-0103 (Mocetinostat)
Cyclic tetrapeptides	Romidepsin or FK228

4.1.1. Short chain fatty acids

This class of HDAC inhibitors has a mechanism of action based on the action of the carboxylic group. Deacetylation of an acetate group occurs, forming a space in the form of a tunnel, which is later occupied by the carboxylic group. The carboxylic group when in this position can thus bind to a Zn^{2+} ion or compete with the previously released acetate group. (Hassell, 2019)

It is possible to highlight valproic acid (VPA), commonly used as an antiepileptic and anticonvulsant with HDAC inhibitory activity, and the compound sodium phenylbutyrate, often used in excess production of ammonia and changes in the urea cycle. Both compounds

are test targets, alone or in combination with other types of drugs, for various diseases. (Ruijter, de *et al.*, 2003; Eckschlager *et al.*, 2017; Hassell, 2019)

4.1.2. Benzamides

This class of HDAC enzyme inhibitors are characterized by the presence of a structure composed of 2-amioanilide. The 2-amioanilide present in the structure of benzamides, contacts specific amino acids that are present in the tunnel-shaped active site located in the nucleus of HDAC enzymes, which may or may not have the participation of the zinc ion. This class of inhibitors has MS-275, also known as SNDX-275 or Entinostat, and MGCD0103 or Mocetinostat, as the main drugs with inhibitory action, both selective for class I of HDAC enzymes. (Falkenberg and Johnstone, 2014; Miranda Furtado *et al.*, 2019)

The mechanism of action of the drug Mocetinostat allows inducing hyperacetylation of histones and apoptosis, and also influences the antiproliferative activity of numerous cell lines from various tumors. This antiproliferative activity is extremely important and has been highlighted by numerous clinical trials on several different types of cancers, including leukemia and lymphomas. (Hassell, 2019; Kumar Singh, Bishayee and Pandey, 2018; Ruijter, de *et al.*, 2003)

The drug Entinostat has a mechanism of action similar to Mocetinostat, inhibiting HDAC enzymes through its binding to the active site, with or without chelation of the zinc ion. The regulation of genes associated with apoptosis and differentiation and the promotion of histone acetylation are the result of Entinostat activity, presenting several promising studies in several neoplasms. (Boon Toh, Jieh Lim and Kai-Hua Chow, 2017; Falkenberg and Johnstone, 2014; Hassell, 2019; Ruijter, de *et al.*, 2003)

4.1.3. Hydroxamic acids

This class of HDAC inhibitors has a polar group in its constitution and is the class with the greatest diversity of clinical trials for numerous types of diseases. From this class we can highlight Vorinostat, approved for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma, by the European Medicines Agency (EMA) and by the Food and Drug Administration (FDA). (Boon Toh, Jieh Lim and Kai-Hua Chow, 2017; Kumar Singh, Bishayee and Pandey, 2018)

The drug Vorinostat is widely used in clinical trials for different types of diseases, such as brain and nervous system tumors, lymphomas, breast cancer and kidney cancer. This drug has also been studied for the treatment of the HIV virus, first combining the inhibition of HDAC

enzymes with antiretroviral therapy, but further studies are still needed. (Boon Toh, Jieh Lim and Kai-Hua Chow, 2017; Hassell, 2019)

In addition to the drug Vorinostat, it is also possible to highlight other drugs such as Panabinstat (LBH589), Givinostat (ITF2357), CHR-3996, Belinostat (PXD101), SB939 and CHR-2845. Of these listed drugs, Panabinstat is currently in clinical trials in the study of lymphomas, non-Hodgkin's lymphoma and cutaneous T-cell lymphoma, multiple myeloma and leukemia. (Eckschlager *et al.*, 2017; McClure, Li and Chou, 2018; Ruijter, de *et al.*, 2003) CHR-3996 stands out as the most recent molecule in clinical trials with promising neoplastic activity in the treatment of advanced tumors, acting as a selective inhibitor of HDAC class I. The drug SB939, on the other hand, has an improved pharmacokinetic and physicochemical activity, not interfering with enzymes that exhibit zinc bonds, improving its antiproliferative activity in numerous tumors. (Eckschlager *et al.*, 2017; Miranda Furtado *et al.*, 2019)

4.1.4. Sirtuins

Sirtuins, also known as class III of HDAC enzymes, can be divided into four distinct classes, with different activities, locations and functions. The activity of sirtuins is dependent on the reduced adenine dinucleotide nicotinamide (NADH), which exerts the inhibitory activity as well as nicotinamide; and the oxidized nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺), acting as an activator. (Eckschlager *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2012)

It is important to highlight that this class of sirtuins act as catalysts for two important distinct reactions – deacetylation and ADP-ribosylation. The ADP-ribosylation reaction is catalyzed by SirT4 and SirT6 subclasses and deacetylation is catalyzed by the remaining sirtuin subclasses: SirT1, SirT2, SirT3, SirT5 and SirT7. Special emphasis is placed on the regulation of chromatin, the SirT1, SirT2, SirT3 and 6 and SirT1 subclasses in the formation of heterochromatin through the deacetylation reaction. (Hassell, 2019; Li and Seto, 2016)

There is a convergence regarding the various functions of the different classes of sirtuins, namely regarding SirT1, which has a divergent function, presenting itself as tumor suppressor or tumor promoter, due to its suppressive effect on the cytoplasmic protein and tumor suppressor p53. The SirT3 protein, on the other hand, shows signs of regression of various types of cancer, but it leads to an increase in reactive oxygen species (ROS) and, therefore, to aggravation of the tumor. Nevertheless, SirT2 is found in low numbers in many cell lines of human brain tumors, having an influence on the cell cycle progression of diseases such as Huntington's and Parkinson's disease. (Miranda Furtado *et al.*, 2019)

Studies on sirtuins show that there is a direct correspondence between an elevated SirT2 expression and an increase in people's average life expectancy. It is also known that the average life expectancy increases even more when there is an association of sirtuins and caloric restriction. (Miranda Furtado *et al.*, 2019)

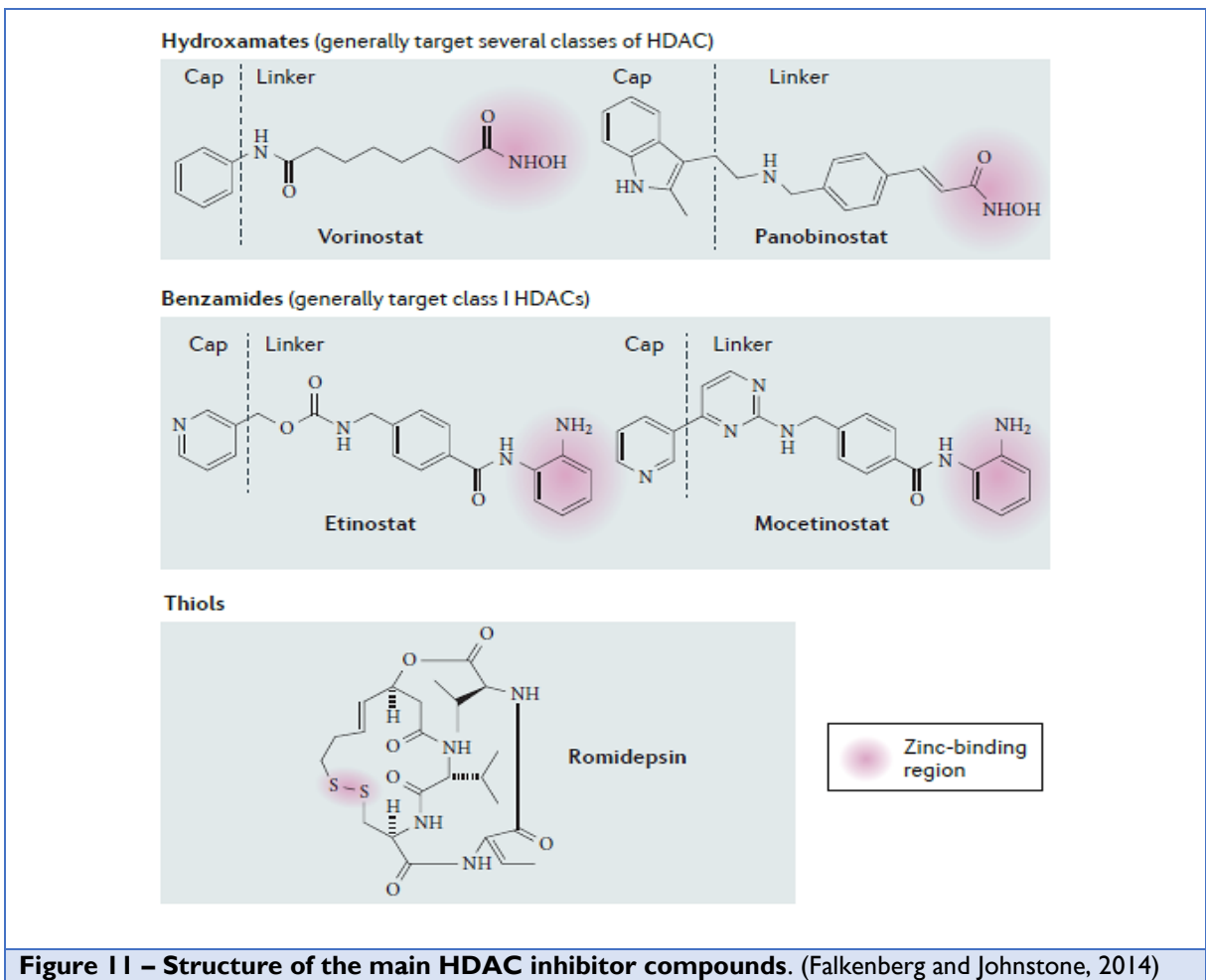
Since SirT1 presents a tumor or promoter suppression behavior, it was necessary to highlight chemical compounds with capacity to inhibit or activate SirT1. Nicotinamide is a physiological inhibitor that is commonly associated with anticancer therapies (Table 2). The other compounds with inhibitory capacity, have non-specific mechanisms of inhibition of sirtuins, and can be used in diseases caused by infections. (Hassell, 2019)

Table 2 – SirT1 inhibitory drugs and promoters	
Inhibitory capacity	Nicotinamide, Splitomycin and analogues: tenovins, AGK2, suramin, UVI5008, EX-257, sirtinol
Inductive capacity	Quercetin, resveratrol and piceatannol

Contrary to the drugs listed above, quercetin, resveratrol and piceatannol have a high capacity to activate sirtuins, with resveratrol standing out as the drug with the greatest activation potency. This type of activator only has a physiological function when binding to a substrate, which can be visualized in fluorescence assays by labeling the substrate with fluorescence. Therefore, these compounds have no activity in their original form and, therefore, cannot be used. Regarding resveratrol, its mechanism of action is thought to involve blocking either the cell cycle or the growth of tumor cells and/or the increase in antioxidant and anti-inflammatory activities. (Eckschlager *et al.*, 2017; Hassell, 2019)

4.1.5. Cyclic peptides

This class of HDAC inhibitors features a drug already approved by the FDA for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma called Romidepsin or FK228 (Figure 11). This class may or may not have the functional group in its constitution AOE or 2-amino-8-oxo-9,10-epoxy-decanoyl. In the specific case of the drug Romidepsin, it does not have the AOE functional group in the constitution of its cyclic peptide and acts as a pro-drug. The mechanism of action of this prodrug resides in the reduction of the disulfide bond and being taken up by cells and transformed into its active form. In this way it acts inducing apoptosis and inhibiting the growth of cancer cells. (Eckschlager *et al.*, 2017)

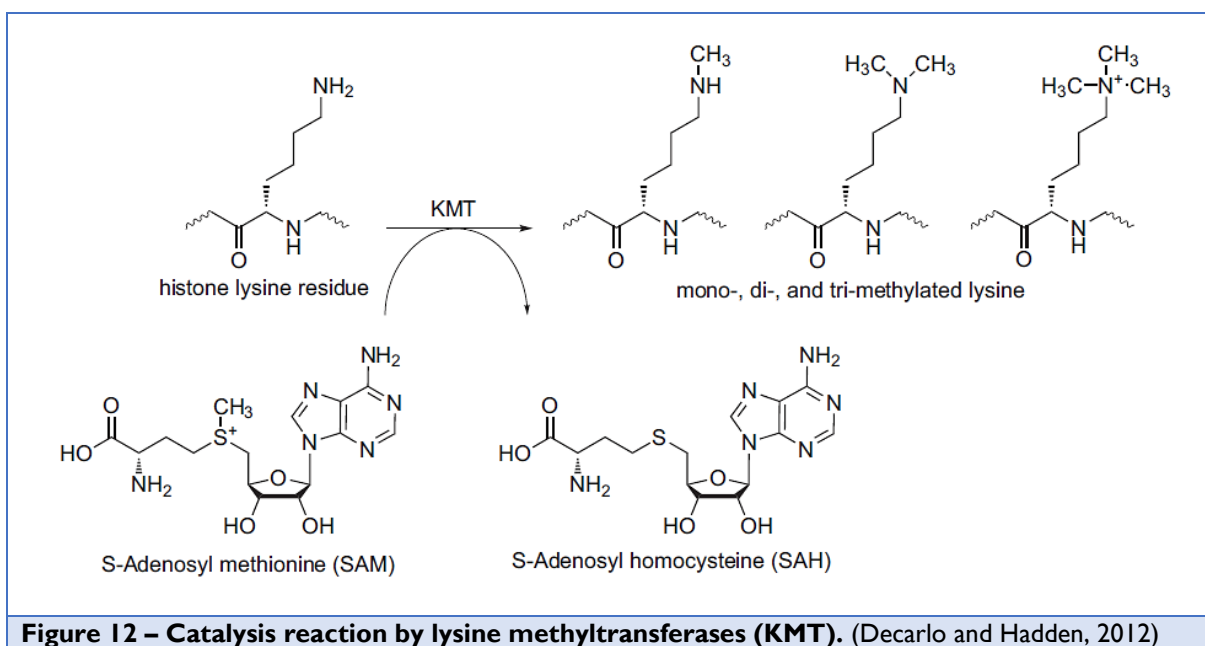


4.2. Histone methyltransferase inhibitors (HMTi)

HMT enzymes are located in the terminal zone of histones and act on different amino acids such as arginine and lysine and are directly related to gene regulation. Because these enzymes act on different amino acids, they can be subdivided into two families, those that act on arginine – arginine methyltransferases (RMT) and lysine methyltransferases (KMT) that act on lysine. Due to the various connections that are established, there is activation or silencing of genes. Therefore, arginine can be mono- or di-methylated and lysine can be mono-, di- and tri-methylated, contributing to a diversification of binding sites. This diversification is an obstacle in studies of the variety of binding combinations in the development of HDM and HMT inhibitors. (Decarlo and Hadden, 2012; Sharma, Kelly and Jones, 2009)

HMT inhibitors can be classified into two classes, the first consisting of naturally occurring inhibitors. This class includes chaetocin, a mycotoxin discovered to have highly inhibitory properties of the HMT enzyme, as well as the H3K9 and KMT enzyme, when used in low concentrations. This mycotoxin has, compared to the SAM co-substrate, a competitive mechanism. The anticancer drug SAM was the first drug used as an inhibitor of HMT enzymes,

but its use was controversial due to its low specificity. This drug was metabolized from SAM to S-adenosyl-homocysteine (SAH), which led to a decline in the levels of p53, an important tumor suppressor, and, consequently, to an abrupt increase in tumor growth and disease progression. Chaetocin, on the other hand, has a mechanism of action that consists of inducing oxidative stress and thus leads to apoptosis of specific tumor cells and primary primary cells of the disease. It is a disulfide bond (SS), present in molecules such as chetomin and gliotoxin, which is responsible for the KMT inhibitory action of these molecules. (Decarlo and Hadden, 2012; Ozyerli-Goknar and Bagci-Onder, 2021)



Regarding the second class of inhibitors, drugs that are characterized by being small molecules are included. Of these drugs, it is possible to highlight the arginine AMI-I methyltransferase, which is the most studied inhibitor in this class. It is characterized by having in its structure a sulfonyleurea group, responsible for the activity that AMI-I presents as a non-competitive inhibitor of the SAM of the RMT enzymes, with no interference with the KMT enzymes. Other studies have also shown that this enzyme has activity in inhibiting receptors that are precursors of human breast adenocarcinoma cell lines, as well as inhibiting the enzyme involved in the progression of the HIV virus, HIV-I RT polymerase. (Decarlo and Hadden, 2012; Selvi *et al.*, 2010)

Within this class, we can also highlight BIX-01294, as an important specific inhibitor of G9a, but it needs the SAM co-factor to achieve G9a binding. Its mechanism of action makes it possible to reduce demethylated H3K9, without causing other methylations or interference with the remaining histones, with no consequences for PRMT1 and SUV39H1. Additionally,

the lysine methyltransferase EZH2 or KMT6 also participates in the proliferation of neoplastic cells by catalyzing in histone 3 the trimethylation of lysine 27. Therefore, the Dznep molecule was developed as an important inhibitor of the SAH hydrolase co-substrate, as well as of the EZH2 catalyst in acute myeloid leukemia. (Decarlo and Hadden, 2012; Selvi *et al.*, 2010; Treviño, Wang and Walker, 2015)

It is important to mention that these HMT inhibitors are only found in pre-clinical trials and have low specificity and relatively high levels of toxicity of some of these compounds, therefore further studies and clinical trials of these inhibitors are necessary. (Ozyerli-Goknar and Bagci-Onder, 2021)

4.3. Histone Acetyltransferase Inhibitors (HATi)

Histone acetylation is a process of enormous importance in the regulation of gene transcription, in which the state of gene transcription depends on the balance between histone acetylation and deacetylation state. This balance is balanced by the action of the HAT enzymes responsible for histone acetylation and the HDAC enzymes responsible for deacetylation, with gene transcription being active and repressed depending on whether the histones are acetylated or deacetylated, respectively. When this balance of enzymes is unadjusted or there is a dysfunction in one of them, there is a direct relationship with the development of several pathologies, including cancer, asthma or coronary heart disease. (Chistiakov, Orekhov and Bobryshev, 2017; Chao and Pecot, 2021)

After the appearance of the first HAT inhibitors isolated from plants, it was discovered that the active compound from the plant *Curcuma longa*, curcumin, is a potent HAT inhibitor, managing to penetrate cells by specifically binding to the p300/CBP family. Its inhibitory activity is based on the inhibition of p300 associated with the conformation of chromatin, it is therefore not associated with DNA transcription and, therefore, it has few side effects and is therefore a potential and promising HAT inhibitory agent. (Mudbhary and Sadler, 2011; (Chistiakov, Orekhov and Bobryshev, 2017)

4.4. Histone demethylase inhibitors (HDMi)

As stated before, HDM enzymes are important in removing the methyl group of histones and can be divided into two families of HDM: JmjC (PHF8 and JHDM1D) and LSD1. LSD1 has active site similarities compared to monoaminoxidases (MAO) A and B and given this similarity, this group of inhibitors is commonly used in the treatment of pathologies such as

depression and Parkinson's disease. Its mechanism of action consists of removing methyl groups from histones H3K9 and H3K4 through an oxidation reaction that depends on the adenine flavine dinucleotide (FAD). (Chao and Pecot, 2021; Decarlo and Hadden, 2012; Ganesan, 2018; Hassell, 2019)

4.5. DNA methyltransferases inhibitors (DNMTi)

As previously mentioned, DNA methylation is an important epigenetic mechanism that is involved in imprinting regulation and epigenetic control, as well as ensuring X chromosome stability and genome integrity. This epigenetic mechanism is involved in vital physiological functions in our body, namely cell reprogramming and the development of the immune system.

The epigenetic mechanism underlying DNA methylation is achieved by the transfer of a methyl group (CH₃) from the SAM donor, to the fifth position carbon of the cytosine carbon ring, at the CpG site. The transfer of this methyl group is achieved with the aid of the DNMTs enzyme group. Therefore, DNMT inhibitors act to inhibit abnormal activities related to this group of enzymes, which are directly related to different types of diseases, such as neoplasms. The association of drugs that affect chromatin and DNMT inhibitors is common, in order to increase the desired effect. Within DNMT inhibitors it is possible to subdivide them into four subclasses – DNMT inhibitor antisense oligonucleotides, natural molecules, small molecules and nucleoside analogues. (Boon Toh, Jieh Lim and Kai-Hua Chow, 2017; Miranda Furtado *et al.*, 2019)

4.5.1. Nucleoside Analogs

Nucleoside analogues are a widely studied class of DNMT inhibitors consisting of nucleoside analogues phosphorylated by cellular kinases. In this way, the nucleotides interconnect with the DNA, thus forming a covalent bond with the DNMT, consequently this enzyme is not viable for future methylations, thus causing a demethylation of the DNA. (Sharma, Kelly and Jones, 2009; Shapiro and Bratslavsky, 2013)

Among the nucleoside analogues we can highlight azacitidine (marketed as Vidaza[®]), 1-(β-D-ribofuranosil)-1,2-dihydropyrimidine-2-1 (Zebularine[®]) and 5-aza-2'-deoxycytidine or decitabine (Decogen[®]), which are incorporated into the DNA molecule during replication. As previously mentioned, these demethylating agents bind to the DNMT enzyme covalently, inhibiting DNA methylation. However, while decitabine is incorporated into DNA, azacitidine is incorporated into RNA, both being susceptible to deamination by cytidine deaminase and

thus inactivated by it. (Decarlo and Hadden, 2012; Jones, Issa and Baylin, 2016; Sharma, Kelly and Jones, 2009; Eckschlager *et al.*, 2017)

The use of these compounds demonstrated that in numerous types of tumors there was a decrease in the rate of tumor proliferation, especially in hematopoietic diseases. These compounds are already widely used in the treatment of myelodysplastic syndrome. This therapy proves to be very promising, especially when combined with HDAC inhibitors. (Sharma, Kelly and Jones, 2009; Chao and Pecot, 2021)

4.5.2. Antisense oligonucleotides

This class of DNMT enzyme inhibitors have less toxicity than other inhibitors as they are not incorporated into the DNA strands. The mechanism of action of antisense oligonucleotides is based on the complementarity of these sequences with mRNA. This binding leads to mRNA inactivation and consequently transcription blockage. The main purpose of these inhibitors is to create an inhibitor that binds to the DNMT1 enzyme and MG98 is an example of a specific DNMT inhibitor that simultaneously blocks DNMT1 and DNA replication. General lack of response as in the case of kidney cancer and stimulation of tissue-specific genes can occur, resulting in an increase in tumors. (Sharma, Kelly and Jones, 2009; Chao and Pecot, 2021)

4.5.3. Natural molecules

This subclass appears as cancer chemoprevention and presents several alternative molecules that have inhibitory activity at the level of DNMTs. An example of a natural compound with inhibitory capacity is EGCG, which is part of the polyphenol class and is present in tea. This compound inhibits an enzyme structurally similar to DNMT, the catechol-O-methyltransferase enzyme (COMT). Given the similar structure of both enzymes, this compound can also inhibit DNMT enzymes, inducing cell apoptosis in various types of cancer. (Baud *et al.*, 2012; Decarlo and Hadden, 2012)

4.5.4. Small molecules

Procainamide and hydralazine molecules, used respectively for the treatment of arrhythmias and arterial hypertension, are drugs that belong to the sub-class of DNMTs inhibitors. These drugs act by competitively inhibiting the DNMT1 enzyme and by reducing its affinity with DNA and SAM substrates, it subsequently leads to DNMT1 dissociation. The binding of these molecules to CpG sites intercedes for the translocation of DNMT enzymes in the DNA strand.

These drugs are in pre-clinical studies, but several revelations about hydralazine have already been discovered, namely its capacity to induce the re-expression of numerous suppressor genes in patients with cervical cancer. Yet, very high drug concentrations are needed to achieve the DNA demethylating effect and for this reason it has many toxic effects for the human body. (Decarlo and Hadden, 2012; Shapiro and Bratslavsky, 2013)

4.5.5. Proteins that recognize epigenetic marks

This class of inhibitors resides in a group of proteins that have the ability to recognize epigenetic marks and induce alterations in the arrangement of the chromatin structure. However, they also influence processes such as DNA replication, transcription or repair. Methylation and acetylation of arginine and lysine residues in the N-terminal tails of histones are the main epigenetic marks recognized by these proteins. The protein group *Bromodomain family* (BRDs), has inhibitory capacity of readers present in post-translational histone modifications (PTMs), mainly in histone acetylation. Within this family of proteins, the *bromodomain and extraterminal* (BET) that are able to recognize acetylated lysines from histones. The BET family includes BRD2, BRD3, BRD4 and BRDT and has been shown to have a relevant action in cancer, namely in B-cell lymphoma that overexpress BRD2 and thus promote studies for inhibitors of BET proteins. (Chao and Pecot, 2021; Morel *et al.*, 2020)

5. Resistances to chemotherapy

It is known that cancer is one of the main causes of death and resistance to therapeutic processes is a limiting factor in antitumor therapies. Chemotherapy resistance can be acquired/primary or can be intrinsic. In the case of resistance acquired during treatment, a tumor may be originally sensitive to a drug and later mutations may occur that compromise the treatment, making it ineffective. In intrinsic resistance, tumor cells present factors that promote resistance, leading to therapeutic failure. (Cossío, Esteller and Berdasco, 2020; Mummaneni and Shord, 2014)

There are different factors and mechanisms responsible for conferring cellular susceptibility to a drug. Within these factors, there are different underlying mechanisms that increase the drug's efflux to the outside of the cell or lead to a decrease in the expression of transport channels, thus decreasing the influx to its interior; mechanisms that rely on the modification of cellular targets or even on the inhibition of drug activation. (Cossío, Esteller and Berdasco, 2020; Hajji *et al.*, 2021)

Furthermore, epigenetic alterations are an important factor to be taken into account, as they contribute to the development of tumors or resistance to anti-tumor drugs. Thus, the combination of epigenetic drugs with classical anti-tumor therapies increases the probability of treatment success. An example of successful therapy applies in the case of decitabine in combination with 5-FU in the treatment of colorectal cancer. Decitabine promoted global hypomethylation and, consequently, allowed the sensitization of tumor cells. Due to its effectiveness, decitabine is also used in other types of cancer, particularly cervical cancer and ovarian cancer, by decreasing sensitivity to treatment with oxaliplatin, taxol and cisplatin and reversing resistance to carboplatin. (Hajji *et al.*, 2021; Morel *et al.*, 2020)

6. Final considerations

Studies on epigenetic regulation of gene expression, a topic of high biomedical relevance, have been increasing more and more, with great emphasis on the level of the whole cell genome. Epigenetic regulation is essential for correct cell function. It is important not only to know the normal cellular epigenome, but also how aberrant epigenetic profiles that can be associated and constitute chemical signatures of disease. By understanding the abnormal epigenetic profile associated with disease conditions, most notably cancer,, it is possible to identify molecular markers for detection, progression and prediction of responses to conventional treatments. There are several diseases that are involved in the alteration of gene regulation, which is why studies in the development of epigenetic therapies capable of reversing epigenetic failures are relevant.

Numerous epigenetic modifications are known, involving chemical reversible modifications of DNA, RNA and histones, which can result in abnormal changes in the gene expression, and which can be the origin of several pathologies, namely cancer. These epigenetic mechanisms are achieved through the intervention of specific known enzymes, which when increased in certain tumors, can be inhibited using epigenetic therapy. Epigenetic drugs have different mechanisms, namely the modulation of the activity of the Writers and Erasers. The modulation of the acetylation of methylation landscape in the chromatin is the best studied mechanism.

Several clinical trials on various drugs are ongoing and several have already been approved by both the FDA and the EMA, including vorinostat, which acts on cutaneous T-cell lymphoma. However, epigenetic therapy still raises uncertainties regarding the applicability of treatments, involving genetic activation nonspecific, mutagenic and carcinogenic potential and the dysregulation of transposable elements in normal cells. The combined therapy of different epigenetic drugs appears as an advantageous alternative, since it presents an improvement in tolerance, the need for lower dosages to obtain the same effect and fewer side effects. This combination is already used with decitabine, which belongs to the class of nucleoside analogues, a important inhibitor of DNMT.

Epigenetics is based on a promising therapeutic approach and with numerous application opportunities in different areas of clinical practice. It is therefore a promising area under intense study. At the biomedical level, future perspectives may be based on advances aimed at personalized therapies for everyone using the beneficial combination of known molecules with molecules under study in order to reverse epigenetic abnormalities associated with cancer.

Bibliography

AHUJA, Nita; SHARMA, Anup R.; BAYLIN, Stephen B. – **Epigenetic therapeutics: A new weapon in the war against cancer.** Annual Review of Medicine. ISSN 1545326X. 67:2016) 73–89. doi: 10.1146/annurev-med-111314-035900.

ALAM, Reza; ABDOLMALEKY, Hamid M.; ZHOU, Jin Rong – **Microbiome, inflammation, epigenetic alterations, and mental diseases.** American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics. ISSN 1552485X. 174:6 (2017) 651–660. doi: 10.1002/ajmg.b.32567.

ALLIS, C. David; JENUWEIN, Thomas – **The molecular hallmarks of epigenetic control.** Nature Reviews Genetics. ISSN 14710064. 17:8 (2016) 487–500. doi: 10.1038/nrg.2016.59.

BAUD, Matthias G. J. *et al.* – **Defining the mechanism of action and enzymatic selectivity of psammaplin against its epigenetic targets.** Journal of Medicinal Chemistry. ISSN 00222623. 55:4 (2012) 1731–1750. doi: 10.1021/jm2016182.

BISWAS, Subhankar; RAO, C. Mallikarjuna – **Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy.** European Journal of Pharmacology. ISSN 18790712. 837:2018) 8–24. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.08.021.

BOLDEN, Jessica E.; PEART, Melissa J.; JOHNSTONE, Ricky W. – **Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors.** Nature Reviews Drug Discovery. ISSN 14741776. 5:9 (2006) 769–784. doi: 10.1038/nrd2133.

BOON TOH, Tan; JIEH LIM, Jhin; KAI-HUA CHOW, Edward – **Epigenetics in cancer stem cells.** BioMed Central. doi: 10.1186/s12943-017-0596-9.

CHAO, Yvonne L.; PECOT, Chad V. – **Targeting epigenetics in lung cancer.** Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. ISSN 21571422. 11:6 (2021) 1–21. doi: 10.1101/csh.perspect.a038000.

CHISTIYAKOV, Dimitry A.; OREKHOV, Alexander N.; BOBRYSHV, Yuri V. – **Treatment of cardiovascular pathology with epigenetically active agents: Focus on natural and synthetic inhibitors of DNA methylation and histone deacetylation.** International Journal of Cardiology. ISSN 18741754. 227:2017) 66–82. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.11.204.

COSSÍO, Fernando P.; ESTELLER, Manel; BERDASCO, María – **Towards a more precise therapy in cancer: Exploring epigenetic complexity.** Current Opinion in Chemical Biology. ISSN 18790402. 57:2020) 41–49. doi: 10.1016/j.cbpa.2020.04.008.

- DAWSON, Mark A.; KOUZARIDES, Tony – **Cancer epigenetics: From mechanism to therapy**. *Cell*. ISSN 10974172. 150:1 (2012) 12–27. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.013.
- DEANS, Carrie; MAGGERT, Keith A. – **What do you mean, “Epigenetic”?** *Genetics*. ISSN 19432631. 199:4 (2015) 887–896. doi: 10.1534/genetics.114.173492.
- DECARLO, Daniel; HADDEN, M. Kyle – **Oncoepigenomics: Making histone lysine methylation count**. *European Journal of Medicinal Chemistry*. ISSN 02235234. 56:2012) 179–194. doi: 10.1016/j.ejmech.2012.08.010.
- DEDOLA, Simone *et al.* – **Revisiting the Language of Glycoscience: Readers, Writers and Erasers in Carbohydrate Biochemistry**. *ChemBioChem*. ISSN 14397633. 21:3 (2020) 423–427. doi: 10.1002/cbic.201900377.
- DULAC, Catherine – **Brain function and chromatin plasticity**. *Nature*. ISSN 00280836. 465:7299 (2010) 728–735. doi: 10.1038/nature09231.
- ECKSCHLAGER, Tomas *et al.* – **Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs**. *International Journal of Molecular Sciences*. ISSN 14220067. 18:7 (2017) 1–25. doi: 10.3390/ijms18071414.
- FALKENBERG, Katrina J.; JOHNSTONE, Ricky W. – **Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders**. *Nature Reviews Drug Discovery*. ISSN 14741784. 13:9 (2014) 673–691. doi: 10.1038/nrd4360.
- FIGUEIREDO, Luisa M.; CROSS, George A. M.; JANZEN, Christian J. – **Epigenetic regulation in African trypanosomes: A new kid on the block**. *Nature Reviews Microbiology*. ISSN 17401526. 7:7 (2009) 504–513. doi: 10.1038/nrmicro2149.
- FISCHER, André *et al.* – **Targeting the correct HDAC(s) to treat cognitive disorders**. *Trends in Pharmacological Sciences*. ISSN 01656147. 31:12 (2010) 605–617. doi: 10.1016/j.tips.2010.09.003.
- GANESAN, A. *et al.* – **Epigenetic drug discovery: A success story for cofactor interference**. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. ISSN 14712970. 373:1748 (2018). doi: 10.1098/rstb.2017.0069.
- GENCHI, Giuseppe *et al.* – **The effects of cadmium toxicity**. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. ISSN 16604601. 17:11 (2020) 1–24. doi: 10.3390/ijerph17113782.

- GILLETTE, Thomas G.; HILL, Joseph A. – **Readers, writers, and erasers: Chromatin as the whiteboard of heart disease.** *Circulation Research*. ISSN 15244571. 116:7 (2015) 1245–1253. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303630.
- HAJJI, Nabil *et al.* – **The bitter side of epigenetics: Variability and resistance to chemotherapy.** *Epigenomics*. ISSN 1750192X. 13:5 (2021) 397–403. doi: 10.2217/epi-2017-0112.
- HAKE, S. B.; XIAO, A.; ALLIS, C. D. – **Linking the epigenetic “language” of covalent histone modifications to cancer.** *British Journal of Cancer*. ISSN 00070920. 90:4 (2004) 761–769. doi: 10.1038/sj.bjc.6601575.
- HASSELL *et al.* – **Histone Deacetylases and their Inhibitors in Cancer Epigenetics.** *Diseases*. ISSN 2079-9721. 7:4 (2019) 57. doi: 10.3390/diseases7040057.
- HENIKOFF, Steven – **Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression.** *Nature Reviews Genetics*. ISSN 14710056. 9:1 (2008) 15–26. doi: 10.1038/nrg2206.
- JONES, Peter A.; ISSA, Jean Pierre J.; BAYLIN, Stephen – **Targeting the cancer epigenome for therapy.** *Nature Reviews Genetics*. ISSN 14710064. 17:10 (2016) 630–641. doi: 10.1038/nrg.2016.93.
- KUMAR SINGH, Amit; BISHAYEE, Anupam; PANDEY, Abhay K. – **Targeting Histone Deacetylases with Natural and Synthetic Agents: An Emerging Anticancer Strategy.** *Nutrients*. doi: 10.3390/nu10060731.
- LI, Lingzhi *et al.* – **Metabolic and epigenetic reprogramming in the arsenic-induced cancer stem cells.** *Seminars in Cancer Biology*. ISSN 10963650. 57:(2019) 10–18. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.04.003.
- LI, Yixuan; SETO, Edward – **HADCs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. ISSN 21571422. 6:10 (2016). doi: 10.1101/cshperspect.a026831.
- LIESTER, Mitchell B.; SULLIVAN, Erin E. – **A review of epigenetics in human consciousness.** *Cogent Psychology*. ISSN 23311908. 6:1 (2019). doi: 10.1080/23311908.2019.1668222.
- LIU, Nian; PAN, Tao – **RNA epigenetics.** *Translational Research*. ISSN 18781810. 165:1 (2015) 28–35. doi: 10.1016/j.trsl.2014.04.003.

- MCGOWAN, Patrick O.; ROTH, Tania L. – **Epigenetic pathways through which experiences become linked with biology.** *Development and Psychopathology*. ISSN 14692198. 27:2 (2015) 637–648. doi: 10.1017/S0954579415000206.
- MIRANDA FURTADO, Cristiana Libardi *et al.* – **Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment.** *Epigenetics*. ISSN 15592308. 14:12 (2019) 1164–1176. doi: 10.1080/15592294.2019.1640546.
- MOREL, Daphné *et al.* – **Combining epigenetic drugs with other therapies for solid tumours - past lessons and future promise.** *Nature Reviews Clinical Oncology*. ISSN 17594782. 17:2 (2020) 91–107. doi: 10.1038/s41571-019-0267-4.
- MUDBHARY, Raksha; SADLER, Kirsten C. – **Epigenetics, development, and cancer: Zebrafish make their ARK.** *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*. ISSN 1542975X. 93:2 (2011) 194–203. doi: 10.1002/bdrc.20207.
- MUMMANENI, Padmaja; SHORD, Stacy S. – **Epigenetics and oncology.** *Pharmacotherapy*. ISSN 02770008. 34:5 (2014) 495–505. doi: 10.1002/phar.1408.
- OZYERLI-GOKNAR, Ezgi; BAGCI-ONDER, Tugba – **Cancers Epigenetic Deregulation of Apoptosis in Cancers.** MDPI. doi: 10.3390/cancers13133210.
- RODRÍGUEZ-PAREDES, Manuel; ESTELLER, Manel – **Cancer epigenetics reaches mainstream oncology.** *Nature Medicine*. ISSN 10788956. 17:3 (2011) 330–339. doi: 10.1038/nm.2305.
- RUIJTER, Annemieke J. M. DE *et al.* – **Histone deacetylases (HDACs): Characterization of the classical HDAC family.** *Biochemical Journal*. ISSN 02646021. 370:3 (2003) 737–749. doi: 10.1042/BJ20021321.
- SELVI, B. Ruthrotha *et al.* – **Small molecule modulators of histone acetylation and methylation: A disease perspective.** *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. ISSN 18749399. 1799:10–12 (2010) 810–828. doi: 10.1016/j.bbagr.2010.09.005.
- SHAPIRO, O.; BRATSLAVSKY, G. – **Genetic Diseases.** *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*. 429:May (2013) 246–247. doi: 10.1016/B978-0-12-374984-0.00614-8.
- SHARMA, Shikhar; KELLY, Theresa K.; JONES, Peter A. – **Epigenetics in cancer.** *Carcinogenesis*. ISSN 01433334. 31:1 (2009) 27–36. doi: 10.1093/carcin/bgp220.
- SHEN, Li *et al.* – **Class I Histone deacetylase inhibitor entinostat suppresses regulatory T cells and enhances immunotherapies in renal and prostate cancer models.** *PLoS ONE*. ISSN 19326203. 7:1 (2012). doi: 10.1371/journal.pone.0030815.

SKVORTSOVA, Ksenia; STIRZAKER, Clare; TABERLAY, Phillippa – **The DNA methylation landscape in cancer.** *Essays in Biochemistry*. ISSN 00711365. 63:6 (2019) 797–811. doi: 10.1042/EBC20190037.

STEVENS, Aaron J.; RUCKLIDGE, Julia J.; KENNEDY, Martin A. – **Epigenetics, nutrition and mental health. Is there a relationship?** *Nutritional Neuroscience*. ISSN 14768305. 21:9 (2018) 602–613. doi: 10.1080/1028415X.2017.1331524.

SZYF, Moshe – **The dynamic epigenome and its implications in toxicology.** *Toxicological Sciences*. ISSN 10966080. 100:1 (2007) 7–23. doi: 10.1093/toxsci/kfm177.

TREVIÑO, Lindsey S.; WANG, Quan; WALKER, Cheryl L. – **Phosphorylation of epigenetic “readers, writers and erasers”: Implications for developmental reprogramming and the epigenetic basis for health and disease.** *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. ISSN 00796107. 118:1–2 (2015) 8–13. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2015.02.013.

VAISSIÈRE, Thomas; SAWAN, Carla; HERCEG, Zdenko – **Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing.** *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. ISSN 13835742. 659:1–2 (2008) 40–48. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.02.004.

WU, Baixing *et al.* – **Readers, writers and erasers of N6-methylated adenosine modification.** *Current Opinion in Structural Biology*. ISSN 1879033X. 47:(2017) 67–76. doi: 10.1016/j.sbi.2017.05.011.

WU, Xiaoji; ZHANG, Yi – **TET-mediated active DNA demethylation: Mechanism, function and beyond.** *Nature Reviews Genetics*. ISSN 14710064. 18:9 (2017) 517–534. doi: 10.1038/nrg.2017.33.

YAO, Bing *et al.* – **Epigenetic mechanisms in neurogenesis.** *Nature Reviews Neuroscience*. ISSN 14710048. 17:9 (2016) 537–549. doi: 10.1038/nrn.2016.70.