

Joana Filipa Rodrigues Marinheira

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Células Estaminais Pluripotentes Induzidas no Tratamento da Doença de Alzheimer”

Referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Carla Paiva e da Dra. Maria Cacilda Borges,
e Monografia sob orientação da Professora Doutora Maria Teresa da Teixeira Cruz Rosete,
apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Joana Filipa Rodrigues Marinheira

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Células Estaminais Pluripotentes Induzidas no Tratamento da Doença de Alzheimer”, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Carla Paiva, da Dra. Maria Cacilda Borges e da Professora Doutora Maria Teresa da Teixeira Cruz Rosete e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Imagens finais adaptadas a partir das seguintes fontes:

<https://www.hypeness.com.br/2014/01/pintor-com-alzheimer-faz-auto-retratos-registrando-o-avanco-de-sua-doenca/>,

<https://goo.gl/images/AUF7QW>

Eu, Joana Filipa Rodrigues Marinheira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2012136062, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Células Estaminais Pluripotentes Induzidas no Tratamento da Doença de Alzheimer”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade 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, 7 de setembro de 2018

Joana Filipa Rodrigues Marinheira

Agradecimentos

À minha orientadora de estágio na indústria farmacêutica (FARMALABOR), a Dra. Carla Paiva e à equipa extraordinária que me acompanhou, em especial a Isabel Querido e a Eng. Olga Santos, um grande obrigado por toda a dedicação na minha formação e pela confiança que depositaram na realização das várias tarefas que me ensinaram. Foi muito gratificante poder fazer parte da equipa diversa, foi um sonho realizado.

À minha orientadora de estágio na farmácia comunitária (Farmácia Lima Natário), a Dra. Maria Cacilda Borges e aos farmacêuticos João Tiago, Joana Cortez e Cristina Carvalho, um agradecimento muito especial por tornarem a nossa profissão tão bonita e por me fazerem gostar tanto dela. Graças a eles, hoje sinto-me uma pessoa mais competente, responsável e sábia no que diz respeito à saúde e bem-estar da população. Um obrigada por todos os conhecimentos que me transmitiram e pela experiência que me proporcionaram.

Quero agradecer à minha orientadora da monografia, a professora Maria Teresa Rosete, por ter aceite a minha iniciativa no tema e por toda a disponibilidade, dedicação e motivação que me ofereceu durante a realização desta monografia.

Quero agradecer ainda às minhas melhores amigas, Ana Paula, Andreia e Carolina, pelo apoio que sempre me deram, e às minhas amigas e eternas companheiras de faculdade pela motivação que ofereceram.

Por fim, estarei eternamente grata a toda a minha família pela paciência, pelo carinho, pelo apoio e por todo o esforço que fizeram para que eu pudesse chegar até aqui. Sem eles é que nada seria possível!

ÍNDICE

Relatório de estágio em Indústria Farmacêutica	8
Abreviaturas	9
1. Introdução	10
2. Análise SWOT	12
2.1. Pontos fortes.....	13
2.1.1. Pessoal e ambiente de trabalho.....	13
2.1.2. Organização do estágio	13
2.1.3. EPI's.....	13
2.1.4. PRAA	14
2.1.5. Autonomia nas tarefas.....	14
2.1.6. Forte componente laboratorial	15
2.2 Pontos fracos.....	15
2.2.1. Rotatividade no CQ	15
2.2.2. Limitação com certos equipamentos	15
2.3. Oportunidades	16
2.3.1. Experiência na área da indústria farmacêutica	16
2.3.2. Desenvolvimento do sentido crítico e de responsabilidade	16
2.3.3. Conhecimento das análises ao material de acondicionamento.....	17
2.3.4. Execução de análises às matérias-primas e produto acabado.....	18
2.3.5. Contacto com as técnicas laboratoriais	18
2.4. Ameaças.....	18
2.4.1. Estagiários de outras áreas	18
3. Considerações finais.....	19
Referências Bibliográficas	20

Relatório de estágio em Farmácia Comunitária	21
Abreviaturas	22
1. Introdução	23
2. Breve descrição da Farmácia Lima Natário	24
3. Análise SWOT	25
3.1. Pontos fortes.....	26
3.1.1. Pessoal e ambiente de trabalho.....	26
3.1.2. Perfil de utentes.....	26
3.1.3. Diversidade de tarefas executadas.....	26
3.1.4. Formação contínua.....	31
3.1.5. Única estagiária.....	31
3.1.6. Circulares do INFARMED (IP).....	31
3.2 Pontos fracos.....	32
3.2.1. Familiarização inicial com o espaço da farmácia.....	32
3.2.2. Insegurança no atendimento	32
3.2.3. Limitação em determinadas categorias	32
3.2.4. Receitas manuais.....	33
3.2.5. Associação das marcas comerciais ao princípio ativo.....	33
3.3. Oportunidades	34
3.3.1. Desenvolvimento de características para a profissão	34
3.3.2. Consolidação do funcionamento do Sifarma 2000®.....	34
3.3.3. Desenvolvimento de estratégias de marketing	34
3.3.4. Participação na atualização do Manual da Qualidade	34
3.4. Ameaças.....	35
3.4.1. Recusa da venda de MSRM.....	35
3.4.2. Estabelecimentos de venda concorrentes.....	35
4. Casos práticos.....	36
5. Considerações finais.....	37
Referências Bibliográficas	38

Células Estaminais Pluripotentes Induzidas no Tratamento da Doença de Alzheimer..	40
Abreviaturas	41
Resumo.....	43
Abstract.....	44
A. Introdução	45
1. Células Estaminais	45
1.1. Definição.....	45
1.2. Tipos de células estaminais	45
1.3. Aplicações.....	46
1.4. Limitações.....	46
2. Reprogramação Celular	48
2.1. Historial	48
2.2. Métodos de reprogramação celular	48
2.3. Papel dos fatores de reprogramação	49
2.4. Expressão sequencial dos marcadores de pluripotência.....	49
2.5. Vetores	50
2.6. Epigenética.....	51
B. Células Estaminais Pluripotentes Induzidas	52
1. Caracterização	52
1.1. Avaliação da pluripotência.....	52
1.2. Detecção de colónias iPSCs.....	53
1.3. Danos no DNA e mecanismos de reparação durante a reprogramação	53
1.4. Integridade do genoma.....	53
1.5. Genética e epigenética: ESCs vs. iPSCs.....	54
1.6. Sistemas de edição de genes	55
2. Aplicações	56
2.1. Criação de modelos de doenças	56
2.2. <i>Screening</i> de fármacos	56
2.3. Tratamento de doenças	57

C. Doença de Alzheimer	58
1. Caracterização e estado em Portugal	58
2. Fisiopatologia.....	59
3. iPSCs na Doença de Alzheimer	61
3.1. Estudo dos mecanismos celulares e moleculares na patologia e <i>screening</i> de fármacos	62
3.2. Tratamento da patologia	66
3.3. Ensaios clínicos na Doença de Alzheimer	68
D. Limitações, perspetivas futuras e conclusão	68
Referências Bibliográficas	71

Relatório de estágio em Indústria Farmacêutica



Abreviaturas

BPL – Boas Práticas de Laboratório

BPF – Boas Práticas de Fabrico

CQ – Controlo da Qualidade

DGE – Documento de Gestão Externa

EPI's – Equipamento de Proteção Individual

FEFO – *First-End, First-Out*

FIFO – *Fist-In, First-Out*

I&D – Investigação & Desenvolvimento

IF – Indústria Farmacêutica

IPC – *In Process Control*

ISO – *International Organization for Standardization*

HPLC – *High Performance Liquid Cromathography*

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

OHSAS – *Occupational Health and Safety Assessments Series*

OOS – *Out Of Specification*

OTC's – *Over-The-Counter*

PRAA – Plano de Redução de Análises e Amostragens

PVC – *Polyvinyl Chloride*

PVC/PVDC – *Polyvinyl Chloride/Polyvinylidene Chloride*

SWOT – *Strengths (forças), Weaknesses (fraquezas), Opportunities (oportunidades), Threats (ameaças)*

TLC – *Thin-Layer-Chromatography*

I. Introdução

O crescimento da Indústria Farmacêutica potenciou a descoberta de novos medicamentos, para doenças até então incuráveis. [1]

A Indústria Farmacêutica, é, para mim, uma área dotada de uma imensidão de conhecimento que me desperta um interesse inigualável, e também a que cobre muitos dos postos do ramo farmacêutico. Embora o nosso curso tenha uma formação diversificada nas áreas, talvez seja o setor que mais difícil de ganhar noção enquanto estudante. Este interesse em conjunto com a minha formação, licenciada previamente em Ciências Bioanalíticas, decidi escolher o Controlo da Qualidade (CQ).

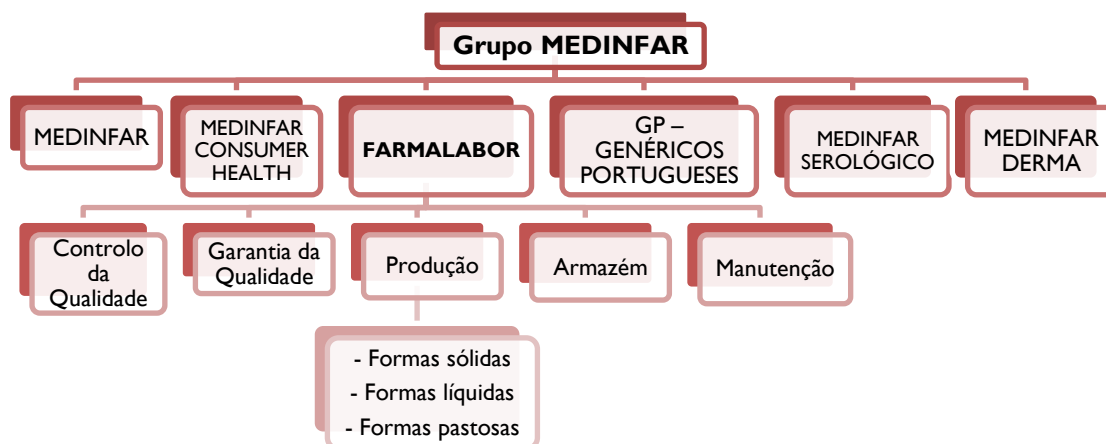
A primeira parte do meu estágio curricular, de dia 8 de Janeiro a dia 30 de Março, decorreu na indústria farmacêutica FARMALABOR.

Localização	Zona Industrial de Condeixa-a-Nova, 3150-194
Diretora Técnica	Doutora Sónia da Costa Heleno
Responsável do CQ	Doutora Carla Paiva
Horário de funcionamento	08:00h – 18:30h (segunda-feira a quinta-feira) 08h00h – 13:30h (sexta-feira)
Número de funcionários no CQ	20 (aproximadamente)

Tabela I – Informações relevantes sobre a FARMALABOR e contextualização do CQ.

A FARMALABOR é uma empresa *outsourcing*, do grupo MEDINFAR, que se dedica à produção de produtos farmacêuticos (tanto os sujeitos a receita médica como os de venda livre – *OTCs*), cosméticos e suplementos alimentares para uma diversidade de clientes, nacionais e internacionais. [2] É constituída pelos departamentos de produção, de controlo da qualidade, da garantia da qualidade, de logística (armazém) e pelo departamento da manutenção, estando os restantes departamentos na sede, em Lisboa, como o I&D, o departamento regulamentar, financeiro, de marketing, recursos humanos e comercial.

Da produção nesta empresa, resultam formas sólidas, líquidas e pastosas, não estéreis. A organização do grupo MEDINFAR encontra-se no organograma abaixo representado:



Esquema I – Estrutura organizacional do grupo farmacêutico MEDINFAR.

É uma empresa certificada pelas normas ISO9001, ISO14001 e OHSAS18001 que oferece confiança no que produz e competitividade no mercado farmacêutico. [2] Desta gama variada faz parte, por exemplo, o Halibut, que foi eleito pelo 5º ano consecutivo Prémio Escolha do Consumidor.

O grupo MEDINFAR tem tido um crescimento exponencial notável, com o destaque da empresa de produção de vacinas e da empresa de cosmética, com a criação da linha *Divine*, que começa a ter destaque nas farmácias.

Este relatório apresenta-se sob a forma de uma breve análise SWOT, em que o objetivo é descrever os pontos fortes, os pontos fracos, as oportunidades e as ameaças que enfrentei ao longo do meu estágio.

2. Análise SWOT

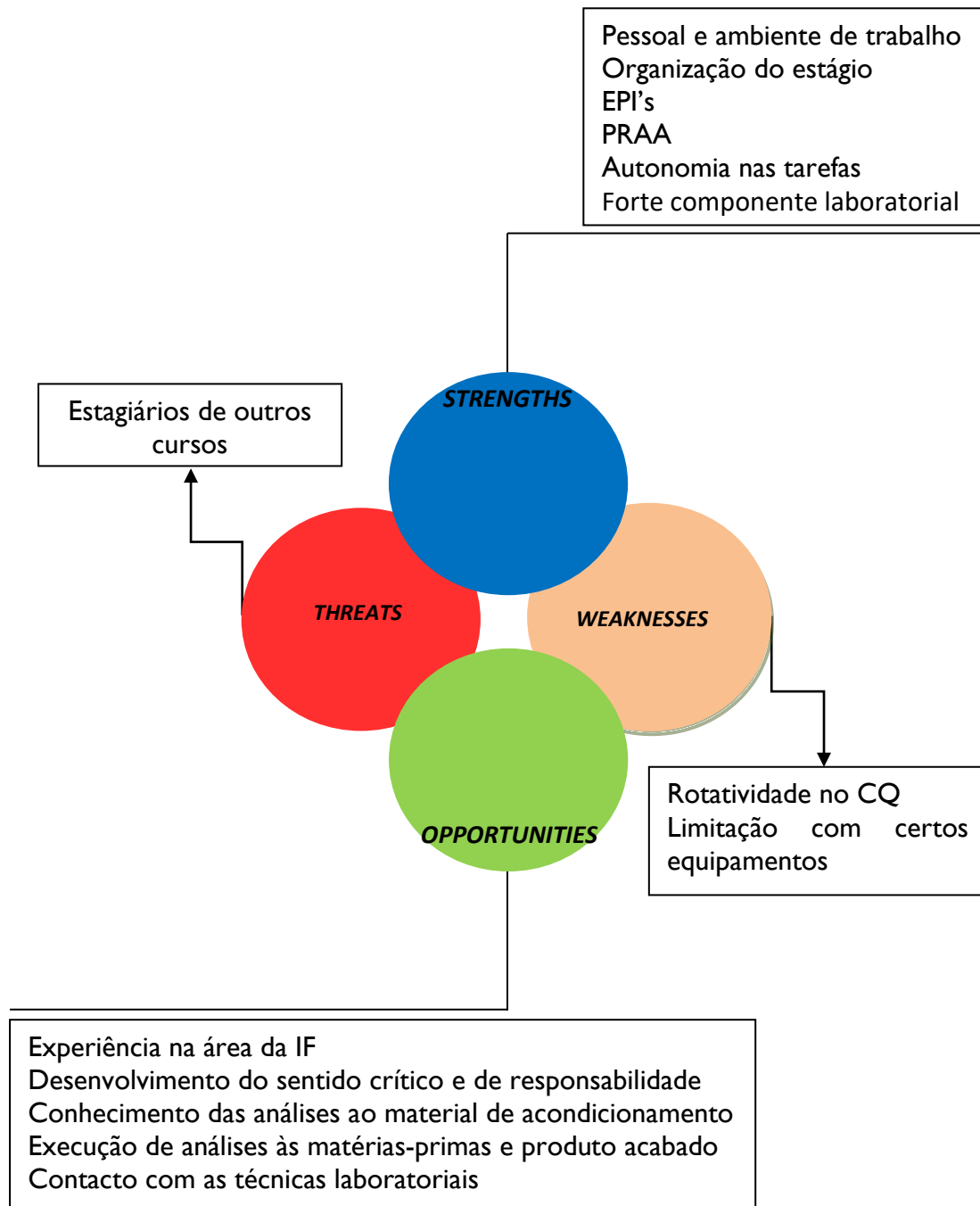


Figura 1 - Análise SWOT relativa ao estágio em Indústria Farmacêutica.

2.1. Pontos fortes

2.1.1. Pessoal e ambiente de trabalho

Desde o primeiro até ao último dia em que estive na FARMALABOR, conheci e fui acompanhada por uma equipa excelente. A Dra. Isabel Ferreira foi quem nos recebeu, entrevistou, integrou na equipa e deu a conhecer um pouco sobre o grupo MEDINFAR e a FARMALABOR. A Dra. Carla Paiva planeou o meu estágio, encarregando a Engenheira Teresa Martinho (no material de acondicionamento) e a Engenheira Olga Santos (nas matérias-primas/produto acabado) na minha formação e no trabalho, juntamente com o resto do grupo de analistas. Estar num laboratório exige muitas regras [3] que vamos aprendendo ao longo do curso, as Boas Práticas de Laboratório e de Fabrico, no entanto, o ambiente de trabalho é muito importante para o desenrolar de todas as ações. Todas as pessoas me ofereceram total disponibilidade para dúvidas, informações e formações, o que é essencial tanto em termos profissionais como pessoais. Assim, foi-me permitido evoluir e melhorar o meu desempenho durante o estágio, superando as minhas expectativas.

2.1.2. Organização do estágio

Dada à curta duração deste tipo de estágio, 3 meses, é difícil planeá-lo de modo a que possa passar por todos os setores e usufruir ao máximo. No entanto, a Eng. Olga juntamente com a Dra. Carla fizeram-no muito bem: no mês de Janeiro estive no controlo do material de acondicionamento; no mês de Fevereiro e início de Março encontrei-me no controlo das matérias-primas; visitei o controlo em processo (do inglês *in process control - IPC*) durante um dia; e terminei no produto acabado. Tive também a possibilidade de ajudar na colheita da água purificada produzida na FARMALABOR e fazer a sua análise.

2.1.3. EPI's

No primeiro dia de estágio foi-nos dada uma formação sobre a segurança e higiene no trabalho, particularmente no setor onde iríamos estagiar. Este tipo de informação é muito importante uma vez que, no controlo da qualidade, estamos diariamente em contacto com uma diversidade de produtos que podem ser prejudiciais para a nossa saúde pelas diferentes vias, não só na altura mas também a longo prazo. Para tal, foram-me dados os equipamentos de proteção individual: bata (e sapatos), tampões para os ouvidos, máscara com filtros para os pós e para os solventes, luvas e outras máscaras de proteção que se encontram no laboratório. Após ter todo o equipamento necessário aprendi que sempre que se inicia uma análise, a primeira tarefa a realizar após registo é ver a ficha de segurança

da substância em questão, de modo a trabalhar com o que é necessário à nossa segurança. [4, 5]

2.1.4. PRAA

O Plano de Redução de Análises e Amostras é um plano que permite rentabilizar o tempo aos analistas no que diz respeito às análises. [6] Este plano é aplicado tanto no controlo da qualidade das matérias-primas, como do material de acondicionamento. As análises de um produto podem ser completas, quando é necessário fazer todos os ensaios descritos no boletim de análise, ou reduzidas, quando apenas são feitos alguns ensaios, por exemplo, uma identificação é sempre feita. A classificação dos ensaios está dividida em ensaios críticos, periódicos e de rotina, e assim, numa análise completa são efetuados todos os ensaios, e, numa análise reduzida apenas os críticos e os de rotina. Nas matérias-primas, sempre que chega um produto nunca antes analisado na indústria, os três primeiros lotes têm de ter análises completas; por outro lado, é obrigatório uma análise completa com um espaçamento de um ano. No caso do material de acondicionamento, as análises completas são obrigatórias quando se trata de um novo produto, de um novo fornecedor ou de uma nova revisão. Foi importante para mim perceber como é que o PRAA funciona, no sentido de saber o tipo de análise a efetuar (e gerir o meu tempo), e permitiu-me aplicar alguns conhecimentos da disciplina de Assuntos Regulamentares.

2.1.5. Autonomia nas tarefas

Na minha opinião, estagiar no controlo da qualidade dá-nos o benefício de, gradualmente, ganhar autonomia na elaboração de tarefas. No controlo da qualidade do material de acondicionamento, primeiro observava as análises feitas num determinado material, depois fazia com a supervisão da minha formadora até me sentir à vontade para o fazer sozinha; sempre que mudasse o material, o processo era o mesmo, com o objetivo de tentar aprender as análises no maior número de tipo de materiais de acondicionamento. No controlo da qualidade das matérias-primas, dos produtos semi e acabados, como a diversidade de análises é maior, comecei por análises mais simples, tendo sempre formação sobre o equipamento que iria precisar e, com o passar do tempo, passava para as análises mais complexas que me poderiam suscitar dúvidas e/ou exigiam acompanhamento por parte da minha formadora. Com isto, foi-me possível ir ganhando autonomia nas tarefas que desempenhava e, desta forma demonstrar confiança no meu trabalho aos outros analistas.

2.1.6. Forte componente laboratorial

Sempre vi a área do controlo da qualidade com muito interesse devido à forte componente laboratorial. Com este estágio tive a oportunidade de desenvolver a minha postura no laboratório desde a procura do material e reagentes adequados, à preparação e aferição de soluções, às diluições e cálculos envolventes, o próprio envolvimento com os equipamentos, até à colocação do material sujo e resíduos nos contentores apropriados. Embora pouco explorado durante o percurso académico, desenvolvi também a prática da consulta da 9ª Edição da Farmacopeia Europeia (versão digital) tanto para a preparação de soluções ou reagentes, como para a verificar os procedimentos das análises em questão.

2.2 Pontos fracos

2.2.1. Rotatividade no CQ

Devido à curta duração do estágio, é, de facto, impossível passar por todos os laboratórios: o laboratório da microbiologia ficou pendente e apenas passei um dia no IPC. Sendo um estágio nesta área, acho muito relevante a rotatividade entre os diversos setores, uma vez que, só pelo contacto com cada um deles é que observamos o que se faz: aprendemos quais e como são feitas as análises, técnicas e equipamentos utilizados e, conseguimos perceber o que há de comum ou não relativamente às outras secções. Como o laboratório das matérias-primas é comum ao do produto acabado, consegui esclarecer algumas diferenças, como por exemplo: o registo dos resultados nas matérias-primas é no Boletim de Análise enquanto o produto acabado tem um Documento Único Laboratorial; o PRAA não é aplicado ao produto acabado, ou seja, as análises são sempre completas e as reanálises não são habituais; entre outras. Relativamente ao IPC, foi interessante observar criticamente os pontos da produção onde são feitas colheitas para análise, mas a parte do registo documental deixou algumas dúvidas.

2.2.2. Limitação com certos equipamentos

O laboratório do CQ é dotado de uma variedade imensa de equipamentos, alguns dos quais não tive oportunidade de desenvolver autonomia, nomeadamente com o HPLC.

Embora apenas tenha observado os outros analistas no manuseamento do HPLC, senti alguma dificuldade em acompanhá-los. Para além de existirem 6 aparelhos de HPLC, cada um funciona de modo ligeiramente diferente e o sistema informático também exige bastante prática. Por outro lado, senti necessidade de rever alguns conceitos e de estudar e

compreender cada especificação no que diz respeito à preparação das soluções de referência e fases móveis.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Experiência na área da indústria farmacêutica

Um estágio de verão numa indústria é sempre mais complicado de fazer, pois é pouco tempo para aprender e porque muitas indústrias param, principalmente no mês de Agosto, daí a curiosidade em fazer neste setor.

O CQ da FARMALABOR, assim como de outras indústrias, é obrigado a reger-se pelo Decreto-Lei nº 26/2018, de 24 de Abril (11ª alteração ao Decreto-Lei nº 176/2006), que estabelece o regime jurídico dos medicamentos de uso humano, ou seja, princípios e diretrizes das boas práticas de fabrico dos mesmos. [7] Este documento foi o primeiro que tive oportunidade de ler quando iniciei o estágio, para que eu tivesse ideia do conjunto de normas por trás de uma indústria farmacêutica.

O facto de ter começado o estágio na sala do Controlo da Qualidade do Material de Acondicionamento, que se localiza ao lado do armazém, permitiu-me ganhar uma ideia mais consistente do circuito farmacêutico, o que foi muito produtivo para mim. O lote é recebido por um dos operadores logísticos, é criado um lote interno no sistema informático com a associação de um item. De seguida, entra na listagem de Planeamento de Amostragens, sendo atribuída uma ordem conforme a prioridade da produção e/ou conveniência de amostragem [1º FEFO (*First-End, First-Out*), 2º FIFO (*First-in, First-Out*)]. Outro operador logístico faz a amostragem das matérias-primas e de algum material de acondicionamento (maioria dos fabricantes deste último já envia com antecedência uma amostragem realizada por eles), e envia para o controlo da qualidade, com o respetivo Registo de Amostragem que é depois anexado ao Boletim de Análise do produto. Se as análises estiverem conforme a especificação o lote é aprovado, podendo avançar para a produção. [8] Em determinados pontos da produção é feito o IPC até à análise do produto acabado. Mais uma vez, se as análises estiverem conforme as especificações, o produto pode ser libertado para o mercado.

2.3.2. Desenvolvimento do sentido crítico e de responsabilidade

À medida que fui melhorando o meu desempenho, foram-me dadas várias matérias-primas de uma só vez. Esta forma é para minimizar o tempo perdido no sentido em que se podem colocar alguns ensaios a fazer, comuns ou que demorem tempo e não precisem da

presença do analista, como por exemplo cinzas totais/sulfúricas, perda por secagem, alguns índices (saponificação, hidroxilo), entre outros. Embora seja rentável, é necessário muita atenção ao tempo e coordenação na ordem dos ensaios. Este estágio fez com que aumentasse o meu nível de concentração nas tarefas que desempenhava, pois uma falha da minha parte poderia colocar a qualidade do produto em risco, sendo este aprovado para a produção com falhas.

Mais do que saber executar uma análise é saber observar os resultados. Nas vezes em que estes saíam fora das especificações (OOS), senti-me obrigada a recordar todos os passos que tinha efetuado durante todo o ensaio, no sentido de identificar um possível erro. Isto é tão ou mais importante do que chegar ao resultado final. Contudo é necessário excluir todas as hipóteses, partindo para uma Investigação OOS; pois o erro poderá ser do analista, mas também de uma série de interferentes no processo que não dependem de nós. Neste momento, posso dizer que sou capaz de olhar de uma forma diferente para um resultado.

2.3.3. Conhecimento das análises ao material de acondicionamento

Foi muito útil ter estagiado nesta secção e ter ganho a noção das análises que são feitas a este tipo de material, uma vez que, durante o percurso académico, não temos contacto com tal. Maioria das análises são físicas (comparação com o padrão, descrição, cor, medidas, gramagem, texto) e não laboratoriais. Conforme a avaliação do fabricante/fornecedor (selecionado, aprovado ou qualificado) e a dimensão do lote, é "escolhido" o número de unidades a amostrar, ou seja, quanto melhor for o comportamento destes, menos unidades são necessárias amostrar (conforme as tabelas da ISO 2859-1:1999). [9] Em termos de acondicionamento secundário aprendi a analisar cartonagens, folhetos informativos e rótulos; no acondicionamento primário lidei com fitas de alumínio, frascos/boiões, tampas, bombas, aplicadores de plástico, fitas de PVC, PVC/PVDC; ficando por "aprender" os frascos de polietileno tereftalato, o algodão hidrófilo, as cápsulas de gelatina dura, entre outros. Achei bastante interessante o pormenor que se dá aos ensaios e como determinados defeitos, que no nosso dia-a-dia quando compramos os produtos nem notamos, podem ser responsáveis por observações ao fabricante ou até mesmo pela rejeição de um lote.

2.3.4. Execução de análises às matérias-primas e produto acabado

Neste estágio consegui ter contacto e aprender maioria das análises que são feitas no controlo da qualidade.

Conforme o tipo de matéria-prima, sólida ou líquida, como era de esperar, os ensaios são diferentes e no geral, os sólidos têm mais análises do que os líquidos. Resumindo, as análises que executei foram: descrição, solubilidade, identificação (por IV, ponto de fusão, determinação de iões de grupos funcionais), índices, humidade (perda por secagem, Karl-Fisher), cinzas totais e sulfúricas, viscosidade, determinação do limite de impurezas, poder rotatório específico, índice de refração, densidade relativa (método do picnómetro), medição do pH, TLC, doseamento (manual e no potenciógrafo), entre outros.

2.3.5. Contacto com as técnicas laboratoriais

A diversidade de análises exige também uma variedade de equipamentos associados aos procedimentos. Para além de seguir passo-a-passo cada etapa da técnica laboratorial, aprendi a lidar com maioria dos equipamentos, inclusivamente a calibrar os que necessitavam de calibração diária: balanças, potenciógrafo e Karl-Fisher. Permitiu-me aplicar e desenvolver os conhecimentos que fui adquirindo ao longo das aulas prático-laboratoriais.

2.4. Ameaças

2.4.1. Estagiários de outras áreas

Embora o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) tenha um leque enorme de saídas profissionais, outros cursos podem ocupar o mesmo cargo de um farmacêutico técnico analista. A FARMALABOR acolhe outros estagiários provenientes tanto de cursos profissionais, como de outros cursos superiores como os técnicos de farmácia, bioquímicos, químicos e engenheiros químicos. Embora cada um tenha mais ou menos competências em determinados aspetos, senti que outras pessoas tinham dificuldades em perceber alguns conceitos que para mim já não eram novidade, como a consulta de farmacopeias, termos técnicos e mesmo a postura no laboratório. No entanto, não deixam de ser uma ameaça, pois retiram tempo aos analistas para se dedicarem à minha formação e poderão um dia ocupar o mesmo posto que um Mestre em Ciências Farmacêuticas.

3. Considerações finais

O farmacêutico é um especialista do medicamento multifacetado que, de hoje em dia, representa um papel chave na saúde e no bem-estar da população. Na indústria farmacêutica, é responsável por manter a segurança e a qualidade dos produtos que são libertados para o mercado, assumindo um dos principais postos no controlo da qualidade. Este setor controla todas as operações desde a entrada dos materiais e matérias-primas até à libertação do produto acabado.

A experiência vivenciada neste estágio permitiu-me crescer tanto a nível profissional como pessoal, principalmente por conseguir aplicar e desenvolver todo o trabalho teórico de 5 anos de curso numa realidade completamente diferente. Por outro lado, é extremamente importante contactar com uma das possíveis saídas profissionais que o MICF oferece. Embora tenha tido um período de excelência em termos de organização, o tempo não foi suficiente para conhecer tão bem o resto do CQ e para conhecer as outras áreas, principalmente onde o farmacêutico atua e como atua.

Em resumo, as minhas expectativas foram superadas, tirei o máximo partido do estágio e consegui reter uma ideia geral de como uma indústria farmacêutica funciona.

Para finalizar, resta-me acrescentar que fiquei com as melhores impressões da FARMALABOR e agradecer a todos, mas principalmente, ao Controlo da Qualidade, por me terem proporcionado um estágio maravilhoso.

Referências Bibliográficas

1. Ordem dos Farmacêuticos. Indústria Farmacêutica. [Acedido a 5 de Março de 2018]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/industria-farmaceutica/>

2. Grupo MEDINFAR – Compromisso com a Saúde. FARMALABOR. [Acedido a 6 de Março de 2018]. Disponível em: <http://www.medinfar.pt/farmalabor/>

3. Boas Práticas de Fabrico (BPF) 7000138 – Normas de acesso, conduta e circulação. Documento interno não publicado.

4. Boas Práticas de Laboratório (BPL) 700035 – Higiene, saúde, segurança e ambiente no Controlo da Qualidade. Documento interno não publicado.

5. Documento de Gestão Externa (DGE) 700083 – Política de gestão e utilização de EPI's. Documento interno não publicado.

6. Boas Práticas de Laboratório (BPL) 7000113 – Política de análise de risco: suporte ao PRAA de MP e MA. Documento interno não publicado.

7. Decreto-Lei n° 26/2018, de 24 de Abril. Diário da República: Série I, n° 80, 2018. [Acedido a 20 de Março de 2018]. Disponível em: <https://dre.pt/application/conteudo/115172415>

8. Boas Práticas de Laboratório (BPL) 700017 – Procedimento para ensaio e registo. Documento interno não publicado.

9. Boas Práticas de Laboratório (BPL) 700019 – Material de acondicionamento. Documento interno não publicado.

Relatório de estágio em Farmácia Comunitária



FARMÁCIA
Lima Natário

Abreviaturas

ANF – Associação Nacional das Farmácias

BPF – Boas Práticas Farmacêuticas

CCF – Centro de Conferências de Faturas

DCI – Designação Comum Internacional

FEFO – *First-Expired, First-Out*

FLN – Farmácia Lima Natário

GSK – *GlaxoSmithKline*

IMC – Índice de Massa Corporal

IP - INFARMED

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

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

MSRM – Medicamento Sujeito a Receita Médica

PNV – Plano Nacional de Vacinação

PUV – Preparações de Uso Veterinário

PVF – Preço de Venda à Farmácia

PVP – Preço de Venda ao Público

SNS – Sistema Nacional de Saúde

SWOT – *Strengths* (forças), *Weaknesses* (fraquezas), *Opportunities* (oportunidades), *Threats* (ameaças)

I. Introdução

A farmácia comunitária é a face mais visível da profissão. É o primeiro local a que os portugueses recorrem em questões de saúde. [1]

O papel que o farmacêutico comunitário desempenha tem ganho valor no sentido de ser a primeira pessoa a ser procurada para esclarecer dúvidas, numa prevenção ou no tratamento de algum problema menor de saúde. E porquê? Porque as filas nos centros de saúde e nos hospitais são enormes e o tempo de espera também, porque o tempo de consulta é reduzido, o Sistema Nacional de Saúde (SNS) não facilita no pagamento das taxas de consulta e exames, e, na sua maioria, os utentes não desenvolvem uma relação de confiança com os médicos,... E, finalmente, é sempre mais fácil ir à farmácia como primeira opção!

Desta forma, o farmacêutico comunitário tem deixado de ser visto como “a pessoa que vende medicamentos ao balcão” e passado a ser visto como um especialista do medicamento que executa diversas funções relacionadas com a saúde e bem-estar da população em geral. [2] Tal como as outras profissões, o farmacêutico rege-se segundo princípios éticos e deontológicos específicos, onde o ato farmacêutico é exclusivamente da sua responsabilidade. [3]

Embora a profissão esteja a ganhar cada vez mais interesse, na minha opinião, as farmácias também têm de proporcionar um crescimento ao farmacêutico, sendo inovadoras, dinâmicas e criando mais postos de trabalho, ao desempenhar tarefas diferenciadoras.

O estágio curricular obrigatório em farmácia comunitária no último ano do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), faz com que nós, alunos, apliquemos toda a teoria que aprendemos ao longo dos anos na realidade da profissão.

Durante a minha formação, tive a iniciativa de fazer dois estágios de verão, ambos em farmácias comunitárias, mas em contextos diferentes: um na cidade e outro numa vila. Esta ideia foi propositada para me fazer crescer enquanto profissional ao lidar com as “duas versões de farmácias”. Aprendi e lidei com diferenças como, por exemplo, o público-alvo, o tipo de produtos explorados, número de campanhas promocionais, serviços farmacêuticos desempenhados e carga de trabalho.

Para estágio curricular, optei por escolher a Farmácia Lima Natário (FLN) que se localiza na minha área de residência, Miranda do Corvo, entre os meses de Abril e Julho.

2. Breve descrição da Farmácia Lima Natário

A Farmácia Lima Natário encontra-se aberta ao público desde 2003 e tem como proprietária e diretora técnica a Doutora Maria Cacilda Lima Natário Lourenço Borges. Está integrada num edifício que alia uma área comercial (com Caixa Geral de Depósitos, seguros, salão de cabeleireiro e gabinete de advogados) com uma zona residencial. Esta localização permite que a farmácia tenha uma boa afluência de utentes.

O horário de funcionamento é de acordo com o horário da outra farmácia do concelho. Sendo assim, está aberta nos dias úteis entre as 9h e as 20h, sem interrupção para almoço, trabalhando ainda aos sábados de manhã, das 9h às 13h. Quinzenalmente a farmácia faz serviço de disponibilidade, tendo nessa semana um horário diferente: das 8h às 22h nos dias úteis e das 9h às 22h nos fins-de-semana e feriados. Depois das 22h é colocado um aviso na porta com a indicação que só se atendem receitas urgentes, com o número para o qual o utente tem de telefonar.

O espaço físico interior da farmácia foi organizado segundo as Boas Práticas Farmacêuticas (BPF) e, portanto é dotado de uma zona de atendimento ao público, de uma sala de atendimento privado, de um laboratório, de um local de administração de injetáveis, de uma área de armazenamento, de um escritório, de um armazém e de instalações sanitárias. [2] Por outro lado, a farmácia apresenta uma fachada envidraçada que permite que se insiram duas montras relativamente grandes e assim que sejam visualizadas campanhas promocionais e publicidade a determinados produtos.

Sendo Miranda do Corvo uma área com tradições rurais, a população ainda é um pouco envelhecida, o que ajuda a determinar o perfil de utentes da farmácia.

Localização	Rua do Cruzeiro, nº67 loja 10,3220-209 Miranda do Corvo	
Diretora Técnica	Doutora Maria Cacilda Lima Natário Lourenço Borges	
Horário de funcionamento (semana não serviço/semana de serviço)	9h-20h (dias úteis) 9h-13h (sábados)	8h-22h (dias úteis) 9h-22h (sábados, domingos e feriados)
Funcionários	Dra. Maria Cacilda Borges João Tiago Costa (farmacêutico adjunto) Joana Cortez (farmacêutica) Cristina Carvalho (farmacêutica) Manuel António Borges (ajudante técnico) Suzana Santos (ajudante técnica) Luís Miguel Borges	

Tabela I – Informações relevantes sobre a Farmácia Lima Natário.

Este relatório assume a forma de análise SWOT, ferramenta de análise que permite identificar os pontos fortes e fracos, as oportunidades e as ameaças, onde cada ponto referido é criticamente avaliado.

3. Análise SWOT

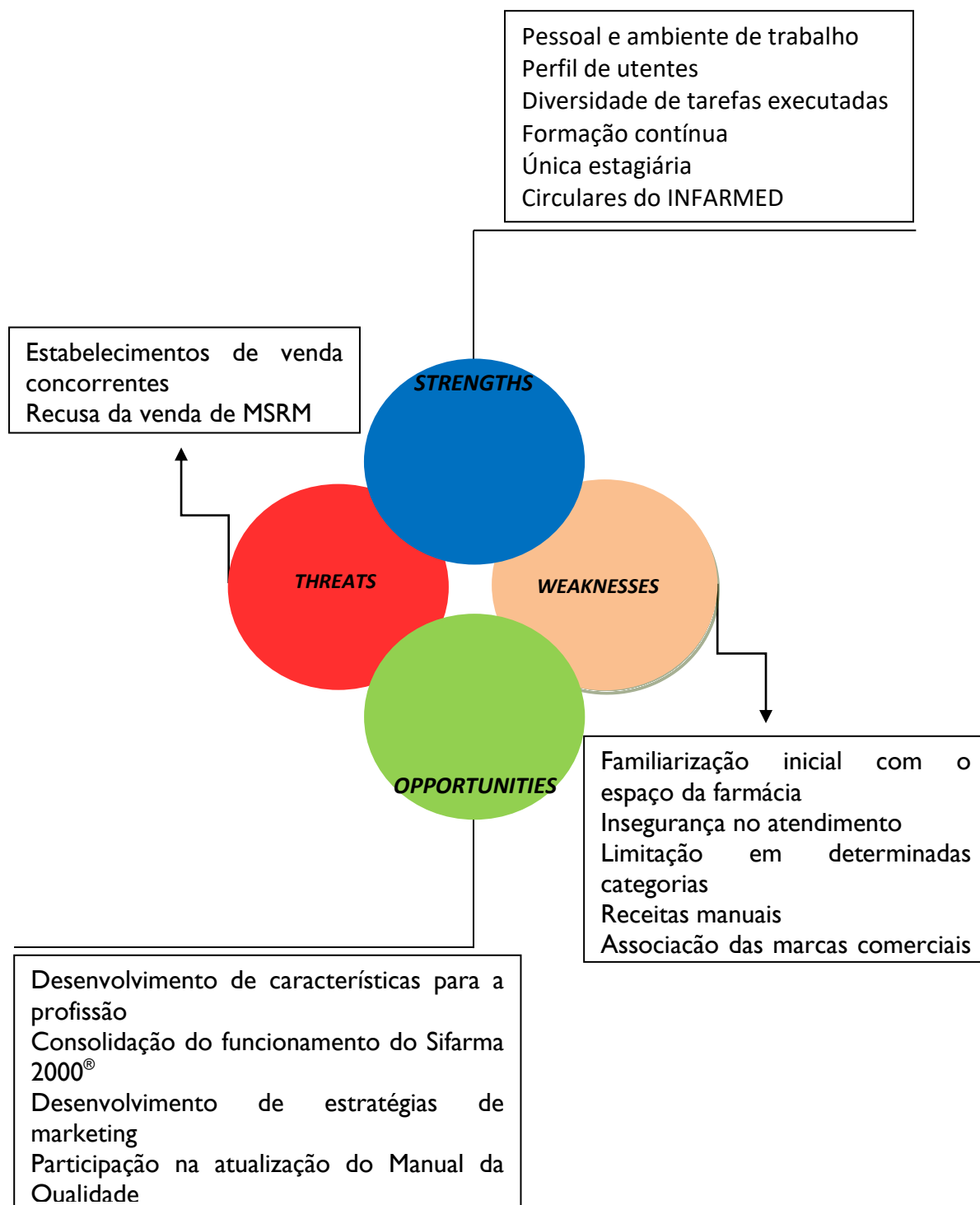


Figura I - Análise SWOT relativa ao estágio em Farmácia Comunitária.

3.1. Pontos fortes

3.1.1. Pessoal e ambiente de trabalho

O ambiente de trabalho é um dos pontos mais importantes em qualquer empresa, pois determina a chave do sucesso de cada profissional assim como os resultados atingidos no geral. Desde o primeiro dia que a equipa me fez sentir como mais um elemento pertencente à farmácia, não só por todos os ensinamentos e esclarecimento de dúvidas, mas também pelos momentos de alegria e boa disposição no *backoffice*. Outra questão muito importante foi na ajuda que me deram na interação com os utentes, fazendo com que eles ganhassem confiança nos meus serviços para com eles, que é bastante gratificante. Sem dúvida que é essencial que existam pausas para conversar para aliviar o stress do dia-a-dia e para nos fazer sentir mais animados, principalmente nesta jornada complicada.

3.1.2. Perfil de utentes

O concelho de Miranda do Corvo engloba muitas aldeias, onde existe a prática da agricultura, mas também se encontra perto da cidade de Coimbra, local de trabalho de muita gente residente da zona. Desta forma, o perfil de utentes é diversificado, embora a maioria seja uma população envelhecida. Devido à sua localização (no centro mas ao mesmo tempo numa zona de passagem para as outras localidades), as pessoas optam por passar nesta farmácia, sendo a maioria dos utentes fidelizados. Dadas estas condições, tive a oportunidade de lidar com várias situações: desde a dispensa (complicada) de medicamentos e prestação de serviços à população mais idosa; ao auxílio de pessoas que possuem gado e animais de estimação; ao aconselhamento da população mais jovem na cosmética; entre outras.

Esta heterogeneidade de utentes foi uma experiência incrível tanto a nível pessoal como profissional, pois ajuda a consolidar alguns conhecimentos que trazemos da faculdade, assim como a contactar pela primeira vez com determinadas situações.

3.1.3. Diversidade de tarefas executadas

3.1.3.1. Receção de encomendas e respetivo acondicionamento

Foi a primeira tarefa que desempenhei no estágio de modo a uma noção dos produtos que fazem parte do stock da farmácia e o local respetivo de acondicionamento.

A farmácia tem vários distribuidores, mas a postura a adaptar é igual para todos; quando a encomenda chega é dada uma assinatura ao colaborador que a trás e de seguida é

iniciada a sua receção. Ao retirar produtos dos baques devemos verificar em primeira mão se as embalagens vêm acondicionadas corretamente e se não vêm danificadas. No “pick”, se o stock estiver a zero, a nova validade deve ser introduzida; as restantes devem ser verificadas para evitar que sejam adquiridos produtos com validade curta. Depois de dar entrada, os produtos do frio devem ser acondicionados imediatamente no frigorífico, enquanto que os restantes podem aguardar até que a fatura seja conferida e as etiquetas de preços colocadas (em determinados produtos). Seguidamente, confere-se a entrada da encomenda de acordo com a fatura: número de unidades faturadas, preço de venda ao público (PVP), preço de venda à farmácia (PVF) e o preço unitário (ou seja, quando houver descontos). O PVP dos MRSM é regulado pelo INFARMED (IP), logo sempre que houver alterações do mesmo, os medicamentos devem ser distinguidos dos que já existiam em stock. Os MNSRM/suplementos alimentares/outras produtos não têm PVP tabelado e este é fixado tendo em conta as margens de lucro da farmácia, que são diferentes entre algumas categorias. Por fim, procede-se ao acondicionamento dos produtos tendo em conta as categorias (frio/psicotrópicos/MSRM/MNSRM/produtos de venda livre) e o espaço da farmácia. Também se dá entrada dos medicamentos esgotados quando estes não vêm, voltando a colocá-los como esgotados.

Foi uma etapa determinante do meu estágio que me permitiu lidar com a gestão de stocks, isto é, de acordo com o histórico de vendas, os produtos que se justificam ter ou não em stock, assim como evitar acumulações ou rupturas, o que é determinante para a gestão do capital da farmácia.

3.1.3.2. Reposição de stocks

Nos momentos mortos da farmácia, uma das tarefas que me dediquei, juntamente com os colegas, foi na reposição de stocks. Repor os stocks significa basicamente esvaziar o armazém, ou seja, colocar os produtos em falta nos lineares, gôndolas e expositores, gavetas e estantes deslizantes. Todos os produtos são arrumados segundo a regra do FEFO (*First-Expired, First-Out*) e de acordo com a categoria a que pertencem. Isto significa voltar a dar vida aos olhos das pessoas que entram na farmácia e por outro lado, reduzir o tempo de procura dos medicamentos e de outros produtos no atendimento.

3.1.3.3. Verificação de prazos de validade e recolha

Com as validades introduzidas no momento de receção das encomendas, o Sifarma 2000® gera uma lista de produtos, por categoria, das validades dos 3 meses que se

aproximam. É uma tarefa delicada que despende de algum tempo, uma vez que é preciso encontrar os produtos, verificar o stock, retirar quando o prazo se aproxima e introduzir a nova validade. Em alguns casos, são feitas promoções em coisas que se gastam rapidamente e que à sua validade propriamente dita ainda têm a possibilidade de aguentarem um ano depois de abertos. Após a recolha dos produtos, estes são separados e devolvidos ao respetivo laboratório. Este processo é essencial para garantir a qualidade dos produtos vendidos.

3.1.3.4. Realização e regularização de devoluções

Todas as devoluções efetuadas através do Sifarma 2000[®] carecem de um motivo: embalagens danificadas, prazos de validade, erro no pedido (seja pela nossa parte ou por parte do utente), produto não faturado, circulares do IP, entre outros. Em termos burocráticos, para uma devolução é necessário fotocopiar a fatura do produto que se vai devolver, assim como a nota de devolução que é gerada em triplicado pelo sistema informático. Em suma, o distribuidor leva o produto com a cópia da fatura e o original e duplicado da nota de devolução, carimbadas e rubricadas. Assim que a devolução for aceite, é gerada e enviada uma nota de crédito, e na farmácia é feita a regularização desta. A nota de crédito tem um número da guia onde é procurado o produto que foi devolvido. Após término, é impressa a nota de devolução que é anexada à nota de crédito, ambas guardadas num dossier.

3.1.3.5. Preparação de medicamentos manipulados

A FLN recebe com alguma frequência pedidos de manipulados simples, os mais complexos são enviados para a Farmácia Barreiros, no Porto. Tive a oportunidade de preparar sob a supervisão dos colegas farmacêuticos: a) pomada salicilada a 40% com ureia (tratamento de uma verruga persistente); b) creme gordo com enxofre a 10% (tratamento da sarna humana); c) solução alcóolica de ácido bórico à saturação (antisséptico para a outite externa); d) vaselina salicilada a 10% (tratamento de calosidades). Para além destes, tive a possibilidade de fazer a ressuspensão de suspensões orais (antibióticos).

Para cada manipulado, o farmacêutico deve assegurar a qualidade da sua preparação, assim como verificar a segurança do medicamento no que diz respeito à(s) dose(s) da(a) substância(s) ativa(s) e questionar-se sobre as possíveis interações (Decreto-Lei nº 95/2004 de 22 de Abril [4]). Desta forma é preenchida a folha de preparação do manipulado onde são registadas as matérias-primas e respetivas quantidades, tal como procedimento a seguir. Por fim, é calculado o preço de venda ao público do produto final com base valor dos

honorários, no valor das matérias-primas, no valor do material de acondicionamento e iva (Portaria nº 769/2004, de 1 de Julho [5]).

Esta atividade permitiu-me fazer uma revisão à prática laboratorial e ao conhecimento adquirido em Farmácia Galénica, que será muito útil para o futuro próximo.

3.1.3.6. Atendimento ao público

Embora receosa, era a atividade que mais esperava desempenhar no estágio, pois é o momento de ação, em que o conhecimento teórico pode passar para a prática. Para além de ter de dominar toda a matéria, é importante dominar os produtos com que a farmácia lida e conjugar os dois, tornando-se um dos aspetos mais desafiantes do estágio.

O contacto inicial com a pessoa é fundamental, ouvir o que ela tem para nos dizer para depois podermos agir. Posteriormente perceber se vem com receita, interpretar os vários tipos de receita e dispensar os respetivos MSRM; ou se não tem receita e quer aconselhamento para prevenir ou tratar algum tipo de patologia, saber dispensar os MNSRM ou MNSRM-EF indicados para o caso. Tanto num caso como noutro, é indispensável falar da via de administração e posologia, alertar de determinados efeitos secundários, assim como medidas não farmacológicas. É de extrema importância que sejam reconhecidas situações em que o farmacêutico já não pode ajudar, mas sim o médico. Durante o atendimento devemos ir fazendo as perguntas que acharmos necessário à resolução do caso, pois quanto mais soubermos do utente, melhor será o nosso aconselhamento e mais satisfeita sairá a pessoa em causa. Para além de medicamentos, o farmacêutico tem que saber aconselhar outro tipo de produtos de saúde e bem-estar, assim como executar serviços declarados pela farmácia.

Após passar algum tempo a prestar atenção ao atendimento dos colegas, fui fazendo eu com a supervisão deles até ficar sozinha, por necessidade da farmácia mas também por ter dado motivos para confiarem no meu trabalho. A minha evolução foi graças à prática que ia adquirindo e principalmente à disponibilidade de toda a equipa para comigo.

3.1.3.7. Elaboração de montras, campanhas promocionais e lineares

Montras apelativas e campanhas promocionais na fachada envidraçada são duas maneiras de chamar a atenção dos utentes, principalmente daqueles que não têm intenção de comprar, mas acabam por entrar na farmácia para se informarem melhor. Esta estratégia aumenta o número de utentes da farmácia. As montras eram mudadas quinzenalmente, por mim e pelos colegas e elaboradas consoante uma temática relacionada com a época. As promoções, também no interior, eram elaboradas ou pelos laboratórios, ou por nós. A

elaboração de lineares permitiu-me rever conteúdos falados em Organização e Gestão Farmacêutica como as zonas frias/quentes e a importância da rotatividade dos produtos.

3.1.3.8. Serviços prestados aos utentes

Tem havido um esforço notório no aumento do número de serviços de saúde prestados pelas farmácias, pois cada vez mais há o reconhecimento da preocupação por parte do farmacêutico. No seguimento disto, foi feita uma alteração à Portaria n.º 1429/2007, de 2 de Novembro [6], onde são estabelecidos novos serviços. [7]

A FLN dispõe de uma sala de atendimento para a determinação de parâmetros bioquímicos, como a glicémia e o colesterol total, para a medição da pressão arterial e para consultas privadas. Também dispõe de uma balança que determina o peso, a altura e o Índice de Massa Corporal (IMC). Embora o tratamento de feridas não seja um dos serviços declarados pela farmácia, tive a oportunidade de acompanhar uma colega, com habilitação para tal, numa situação excepcional de uma senhora que apareceu com a perna ferida. Para além dos serviços anteriormente descritos que efetuei, também auxiliei utentes na administração de colírios e na colocação de emplastros medicamentosos. São também administrados medicamentos injetáveis e vacinas não incluídas no Plano Nacional de Vacinação (PNV) noutra gabinete, apenas por profissionais que completaram um curso da Ordem dos Farmacêuticos.

Foi uma atividade que me permitiu interagir mais com os utentes e ganhar confiança no meu trabalho. É importante que o utente esteja à vontade para expor as suas dúvidas assim como questioná-lo de dúvidas que temos em relação ao seu comportamento, assim como preveni-lo. É muito gratificante auxiliar os que mais necessitam!

3.1.3.9. Faturação dos organismos

Ao longo do mês e à medida que as receitas vão sendo corrigidas, vão sendo agrupadas pelos devidos organismos. Dentro de cada organismo são organizadas por número e por lote, sendo que um lote corresponde a 30 receitas.

A faturação começa no último dia do mês com a impressão do Verbete de Identificação do Lote que apresenta o resumo das receitas, conferindo-se se os valores apresentados batem certo com os valores das receitas. Estes verbetes são enviados juntamente com 2 cópias da Relação Resumo de Lotes e 2 faturas para a ANF (no caso do SNS) e para o Centro de Conferência e Faturas (CCF) na Maia (no caso dos outros

organismos). Todos os documentos são carimbados e a farmácia tem de aguardar o pagamento da comparticipação das duas partes.

É importante que nós, estagiários, acompanhemos um pouco das atividades burocráticas que se passam por trás do balcão, pois um dia poderá fazer parte das tarefas diárias e é mais fácil se já tivermos uma noção.

3.1.4. Formação contínua

As formações já são algo de comum para os farmacêuticos comunitários e durante o meu estágio tive a possibilidade de participar também. Podem ser dentro da farmácia, proporcionados pelos delegados de informação médica, ou fora (normalmente depois das 20h), proporcionadas pelos diversos laboratórios. Internamente, assisti a formações da GlaxoSmithKline (GSK) sobre o Flonaze[®], Vibrocil[®] e Fenistil[®]; da Vemedia sobre os vários Excilor[®], Valdispert[®], Valdispro[®] e RoterCysti[®]; da Bial sobre Dormidina[®] e Reumon[®]; e da Bayer sobre Advantix[®], Advocate[®], Drontal[®] e Seresto[®]. Externamente, fui às formações da LEO Pharma, sobre um novo produto para a psoríase; da Urgo, sobre o emplastro de eletroterapia; dos laboratórios Roche Posay, sobre proteção solar; da gama Vichy; do grupo Edol, sobre infeções fúngicas e olho vermelho; e do grupo Bausch+Lomb, sobre o olho seco. Para além destas, como a FLN pertence ao grupo Única Farma, participei em várias formações do evento organizado por eles.

As formações foram uma mais-valia no meu estágio, uma vez que me deu oportunidade de conhecer aprofundadamente muitos dos produtos que fazem parte do stock da farmácia, assim como produtos que desconhecia. Ao conhecê-los melhor, também fui capaz de melhorar o aconselhamento sobre os mesmos, o que é difícil quando existem vários produtos para o mesmo fim.

3.1.5. Única estagiária

A FLN aceita apenas um estagiário, o que se tornou muito vantajoso, pois tive sempre a atenção e disponibilidade por parte de todos para que pudesse aprender o máximo possível e terminar o estágio com uma grande lição.

3.1.6. Circulares do INFARMED (IP)

O INFARMED pode emitir alertas de segurança e alertas de qualidade sobre medicamentos de uso humano, dispositivos médicos e cosméticos. [8] Estes alertas podem levar à recolha do lote/produtos, mas também fornecer informações relevantes

relativamente aos mesmos. É de extrema importância a farmácia estar atenta a estas circulares de modo a resolver a situação e não prejudicar o utente.

3.2 Pontos fracos

3.2.1. Familiarização inicial com o espaço da farmácia

A FLN dispõe de um espaço relativamente grande para armazenar os medicamentos e os produtos que fazem parte do seu stock. Embora a primeira tarefa tenha sido rececionar a encomenda e a sua arrumação posterior, foi complicado atinar com o local devido das coisas. No entanto, com o tempo, foi um obstáculo que ultrapassei com a execução de outras tarefas: as constantes reposições e verificação dos prazos de validade. Foi também uma meta a atingir, pois só depois de estar familiarizada com os locais das coisas é que passei para o atendimento, garantindo assim um serviço com maior qualidade.

3.2.2. Insegurança no atendimento

Durante algum tempo acompanhei os colegas nos atendimentos que faziam. O objetivo era observar a maneira como trabalhavam: como lidavam com o Sifarma, os conselhos e as informações que davam; assim como conhecer os utentes da farmácia e ganhar alguma confiança da sua parte. Fui participando cada vez mais no atendimento; por vezes ia buscar os medicamentos solicitados, outras vezes participava no aconselhamento. No entanto, quando demonstrei estar familiarizada com a “rota”, comecei a atender as pessoas, muitas vezes com a supervisão dos colegas. O nervosismo fazia com que me atrapalhasse, o que também não era bom de observar (como utente). Por outro lado, sentia a necessidade de confirmar sempre as minhas respostas com um dos colegas, o que revelava falta de confiança nos meus conhecimentos. A minha principal dificuldade era no aconselhamento, e principalmente devido à grande diversidade existente na farmácia.

Com o tempo, fui desenvolvendo o conhecimento pelos produtos e melhorei muito as sensações que me acompanhavam, conseguindo ganhar confiança de muitos utentes, o que me deixava satisfeita.

3.2.3. Limitação em determinadas categorias

A insegurança no atendimento também se devia à limitação com determinadas categorias: veterinária, ortopedia e nos “bens essenciais” da farmácia.

Na localidade onde a FLN está inserida residem muitas pessoas com animais domésticos e que criam gado. A solicitação de desparasitantes internos e externos era muito

comum, o que me deu possibilidade de evoluir no aconselhamento com a proposta das várias opções. Também eram solicitadas vacinas para os coelhos, que inicialmente não conhecia. Ainda mais complicado foram situações de animais com patas partidas, constipados, com conjuntivite, entre outros, que tinha de pedir auxílio aos colegas. Assim, a disciplina de Produtos de Uso Veterinário (PUV) deve insistir na resolução de casos práticos para nos preparar melhor nesta vertente.

A aquisição de meias elásticas, meias de compressão, meias de descanso, cintas, colares cervicais, pulsos elásticos, acessórios para o calçado... é muito comum na farmácia. Mais uma vez, por não conhecer o stock, senti bastante dificuldade em saber responder às necessidades das pessoas.

Outra dificuldade foi com produtos simples considerados “bens essenciais” da farmácia como os vários pensos e tipos de adesivos, gases e compressas e material de ostomia.

3.2.4. Receitas manuais

A prescrição via manual é cada vez menos comum nos dias de hoje, ainda, assim, quando aparece, tem de ter uma justificação. [9] As dificuldades residiam na interpretação da caligrafia do prescriptor (qual o medicamento, qual a posologia) e na compreensão do plano de comparticipação associado ao utente, assim como portarias nos medicamentos.

Com este tipo de receitas é possível cometer-se alguns erros na cedência dos medicamentos, como tal, a atenção deve ser máxima. Como nunca me senti à vontade, preferi esclarecer sempre com um colega, de modo a não cometer nenhum erro que prejudicasse a segurança do doente. Na minha opinião, precisava de praticar um pouco mais deste tipo de receitas para não me sentir insegura.

3.2.5. Associação das marcas comerciais ao princípio ativo

Durante o percurso académico, estudamos as moléculas pela sua designação comum internacional (DCI) e, na minha opinião, faz todo o sentido ser assim. No entanto, as pessoas continuam a falar dos medicamentos pelos seus nomes comerciais, o que me dificultava o atendimento; ou porque não entendia o nome (e tinha de perguntar várias vezes ao utente ou perguntar aos colegas), ou não sabia qual era a forma farmacêutica ou até se era um MNSRM. Com a experiência ao balcão, ganhei a iniciativa de recorrer primeiro ao sistema informático para me auxiliar e dirigir ao local certo.

3.3. Oportunidades

3.3.1. Desenvolvimento de características para a profissão

Devido à diversidade de tarefas que desempenhei, acho que estou preparada para um dia vir a trabalhar numa farmácia comunitária. Saber lidar com os utentes, ser comunicativo, preocupado e ter paciência, assim como admitir que não temos razão são características que fui desenvolvendo no atendimento. Outras atividades no *backoffice* também me permitiram crescer como farmacêutica responsável pelos medicamentos e pela saúde da população.

3.3.2. Consolidação do funcionamento do Sifarma 2000®

O Sifarma 2000® não era novidade para mim, pois já tinha tido oportunidade de conhecer o sistema nos estágios de verão que realizei e nas formações proporcionadas pela faculdade. Ainda assim, conheci novas funções e aprendi a lidar melhor com outras, nomeadamente com as devoluções, rebate dos pontos do cartão Saúda, entre outras. Este sistema auxilia a farmácia no geral, mas principalmente por permitir um atendimento mais eficaz: responde a muitas das nossas dúvidas; chama-nos à atenção das interações, que têm de ser justificadas; e por outro lado, pede a confirmação antes de avançar para o ecrã de atendimento, o que evita erros na dispensa. Recentemente, incluiu uma nova função: de imprimir um talão com a posologia dos produtos em questão, o que é útil na nova medicação. Sem dúvida que este estágio me deu à vontade para trabalhar no sistema, no entanto, ficam sempre coisas por aprender melhor.

3.3.3. Desenvolvimento de estratégias de marketing

Tal como aprendido nas cadeiras de Organização e Gestão Farmacêutica e Marketing, as vendas nas farmácias podem aumentar com determinadas estratégias: *cross-selling* e *up-selling*. No estágio tive oportunidade de aprender a executar estes tipos de estratégias, que não só são importantes para a farmácia, mas também trazem benefícios para os utentes, pois tornam o aconselhamento mais completo e fazem com que os utentes sintam uma preocupação da nossa parte. As campanhas promocionais também são muito valorizadas.

3.3.4. Participação na atualização do Manual da Qualidade

O Manual da Qualidade é um documento que descreve a FLN na íntegra e refere todos os procedimentos adotados pela equipa para assegurar a qualidade adequada aos produtos fornecidos de modo a satisfazer os doentes/clientes. Este documento é revisto anualmente quanto à sua adequação, e pode ser alvo de inspeção por parte do INFARMED.

No estágio, tive a oportunidade de perceber melhor a sua função e de participar na sua atualização, ajudando na pesquisa de vários documentos de suporte do mesmo, assim como na elaboração de outros, principalmente de fluxogramas de dispensa de MSRM/MNSRM/manipulados.

3.4. Ameaças

3.4.1. Recusa da venda de MSRM

A recusa de MSRM por parte do farmacêutico é vista como um ato de crueldade pela maioria dos utentes. Sempre que este tipo de situações acontece, tenta-se explicar que na venda de medicamentos também há normas a cumprir e, que, inclusivamente, podemos ser multados com coimas altas. Embora as pessoas não se esforcem em compreender que há regras, a culpa também é atribuída às farmácias por facilitarem algumas vendas e habituarem os utentes, assim como da atualização constante do estatuto dos medicamentos. Durante o estágio, lidei com pedidos de nimesulidas, ibuprofeno 600 mg e antibióticos, em que tive de negar a dispensa e acabei por ouvir expressões arrogantes. Foi o que mais me intrigou no estágio e provavelmente no futuro, pois é um processo que carece de atenção e mudança, desde os médicos aos farmacêuticos.

3.4.2. Estabelecimentos de venda concorrentes

Esta ameaça não é como estagiária, mas sim como futura farmacêutica. Atualmente, os utentes são informados, autónomos e despachados e, como tal, a venda de MNSRM tem aumentado. Com o Decreto-Lei nº 134/2005, de 16 de Agosto [10], foi permitida a venda deste tipo de medicamentos em estabelecimentos que não a farmácia. Em primeiro lugar, penso que isto poderá ser um atentado à saúde pública, na medida em que qualquer pessoa pode vender e “aconselhar” medicamentos, quando os únicos especialistas são os farmacêuticos. Em segundo lugar, as farmácias tentam baixar as margens de lucro para estar ao nível do preço dos outros locais, mas sendo esta a categoria que mais rentabilidade trás, torna-se difícil a gestão do capital. Ainda assim, durante o estágio, tive a perceção que as pessoas optam por ir à farmácia primeiro para se informarem acerca do que querem comprar, no entanto, acabam por agradecer e dizer que depois compram... A opinião farmacêutica ainda permanece, e são precisos reforços para que as pessoas comprem as coisas certas nos locais certos.

4. Casos práticos

A) A mãe e o seu bebé de 14 meses dirigiram-se à FLN e a senhora pediu ajuda para tratar o rabinho do bebé que se encontra muito vermelho. Questionei a senhora se a pele se apresentava vermelha, enrugada e com alguma descamação (em forma de W – eritema da fralda) ou se para além deste vermelho apresentava pústulas (candidíase). A mãe afirmou que se tratava de uma assadura apenas. Como tal, aconselhei uma pasta de água para aplicar sempre que fosse mudada a fralda ao bebé e que esta devia permanecer até à vez seguinte. Logo de seguida, aproveitou para se queixar que o bebé se arranhava muito e mostrar umas lesões nas dobras dos braços e na testa. Ao observar as lesões com crostas associadas a uma pele seca (e prurido), afirmei que possivelmente se tratasse de dermatite atópica. Sendo assim, voltei atrás e decidi aconselhar uma gama de produtos da mesma marca para as várias situações: um creme muda fraldas da A-Derma, o Primalba, para aplicar como já tinha referido; e para a xerose do bebé, o bálsamo emoliente Exomega (para aplicar diariamente na pele limpa e seca) e o gel lavante Exomega (para aplicar no cabelo e no corpo durante o duche), ambos da A-Derma. Alertei a mãe para não utilizar os toalhetes e optar por compressas embebidas em água morna ou água micelar. Em relação ao ambiente lá de casa, falei no tipo de detergente que deveria ser hipoalergénico; os peluches deviam ser evitados, assim como carpetes e cortinados no quarto do bebé, etc. Se as lesões não melhorassem, aconselhei a ir a um dermatologista, pois poderia ser necessário algum tipo de corticóide tópico. A mãe, embora preocupada, saiu muito satisfeita com o aconselhamento.

B) Uma senhora com aproximadamente 40 anos dirigiu-se à FLN e solicitou um antibiótico porque desconfiava estar com uma infeção urinária e que ia para Lisboa entretanto. Explique-lhe que um antibiótico é um MSRM e como tal, apenas por prescrição médica é que o poderíamos dispensar. No entanto, questiono a senhora acerca dos sintomas. Ela refere que sente ardor ao urinar (disúria) e que tem vontade de ir à casa de banho muitas vezes. Os sintomas são típicos de uma infeção urinária. Dada a situação de pressa e de ver a senhora angustiada, optei por aconselhar um medicamento à base de plantas (e não um dos tradicionais suplementos alimentares), que me tinha sido dada formação sobre ele: RoterCysti. O RoterCysti é constituído pelo extrato seco da Uva Ursina que possui ação antibacteriana, anti-inflamatória e diurética. Este tratamento é de 5 dias, no primeiro dia devem ser tomados dois comprimidos de 6 em 6 horas para alívio imediato dos sintomas,

nos restantes 4 dias, dois comprimidos de 12 em 12 horas. Para complementar o tratamento aconselhei beber muita água.

C) Uma adolescente, acompanhada pela mãe, chega à FLN com a queixa de dores muito fortes na barriga. Perguntei qual era o local mais preciso da dor e se já tinha tomado alguma coisa, e ela respondeu que não tinha tomado nada e que a dor era “ao fundo da barriga”. De imediato questionei se estava com a menstruação e a menina afirmou que sim e que já tinha passado um ano desde a primeira. De seguida perguntei se a menstruação era irregular (o que era normal nos primeiros tempos) e se o fluxo estava mais abundante ou com odor desagradável. A rapariga disse que era irregular, mas que estava tudo normal. Tratava-se de uma dismenorreia. No momento de aconselhamento perguntei se ela era asmática e como a mãe disse que sim, aconselhei 1 comprimido (ou 2, caso necessário) de paracetamol 500 mg de 8/8h. Se as dores não melhorassem em três dias, o melhor era ir ao médico.

5. Considerações finais

Cada vez mais o farmacêutico comunitário segue na linha da frente como prestador de cuidados de saúde. [11] Além de toda a especialidade em volta do medicamento, o farmacêutico assume a responsabilidade no aconselhamento ao utente, promovendo o uso racional do mesmo. Todo o trabalho numa farmácia de oficina não se resume só aos medicamentos, mas também na promoção de estilos de vida saudáveis e identificação de sinais de alerta de algumas patologias. A profissão tem crescido e vai continuar a crescer com a devida valorização pelos utentes e pelos restantes profissionais de saúde.

Terminei o meu estágio surpreendida comigo mesmo, pois nunca pensei vir a gostar de farmácia de oficina. Logicamente que o ambiente em que se trabalha influencia bastante esta perceção, ainda assim, gostei muito do que aprendi, principalmente, de poder aconselhar os utentes e de ajudar a resolver algumas situações de saúde. Fazer um estágio de verão é enriquecedor, fazer um estágio curricular é desafiante e trabalhoso, mas estagiar num local onde somos tão bem acolhidos e acompanhados é sem dúvida desejoso. A FLN deixou de ser a farmácia perto de casa onde ia algumas vezes para passar a ser uma casa de colegas mestres farmacêuticos fantásticos.

Por fim, agradecer à Dra. Maria Cacilda e à sua equipa extraordinária por me receberem na farmácia com carinho, boa disposição, dedicação, paciência e por todos os ensinamentos que me proporcionaram, que me fizeram crescer enquanto pessoa e me tornaram mais competente e sábia enquanto profissional de saúde.

Referências Bibliográficas

1. Ordem dos Farmacêuticos. Farmácia Comunitária. [Acedido a 30 de Junho de 2018]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>
2. Ordem dos Farmacêuticos. Boas Práticas Farmacêuticas para a farmácia comunitária (BPF). Conselho Nacional da Qualidade, 3ª Edição, 2009. [Acedido a 30 de Junho de 2018]. Disponível em: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/boas_praticas_farmaceuticas_para_a_farmacia_comunitaria_2009_20853220715ab14785a01e8.pdf
3. Ordem dos Farmacêuticos. Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos. [Acedido a 30 de Junho de 2018]. Disponível em: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/codigo_deontologico_da_of_4436676175988472c14020.pdf
4. Decreto-Lei nº 95/2004, de 22 de Abril. Diário da República: Série I-A, nº 95, 2004. [Acedido a 30 de Junho de 2018]. Disponível em: <https://dre.pt/application/file/a/223294>
5. Portaria nº 769/2004, de 1 de Julho. Diário da República: Série I-B, nº 153, 2004. [Acedido a 30 de Junho de 2018]. Disponível em: <https://dre.pt/application/conteudo/517633>
6. Portaria nº 1429/2007, de 2 de Novembro. Diário da República: Série I, nº 211, 2007. [Acedido a 30 de Junho de 2018]. Disponível em: <https://dre.pt/application/conteudo/629418>
7. Portaria nº 97/2018, de 9 de Abril. Diário da República: Série I, nº 69, 2018. [Acedido a 30 de Junho de 2018]. Disponível em: <https://dre.pt/application/conteudo/115006162>
8. INFARMED. Alertas. [Acedido a 1 de Julho de 2018]. Disponível em: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/alertas>
9. INFARMED. Normas relativas à dispensa de medicamentos e produtos de saúde. [Acedido a 1 de Julho de 2018]. Disponível em: http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/Normas_Dispena/4c1aea02-a266-4176-b3ee-a2983bdf790
10. Decreto-Lei nº 134/2005, de 16 de Agosto. Diário da República: Série I-A, nº 156, 2005. [Acedido a 1 de Julho de 2018]. Disponível em: <https://dre.pt/application/conteudo/243692>

II. Associação Portuguesa de Estudantes de Farmácia (APEF). Farmácia Comunitária.
[Acedido a 2 de Julho de 2019]. Disponível em: <http://www.apef.pt/farmacia-comunitaria/>

Células Estaminais Pluripotentes Induzidas no Tratamento da Doença de Alzheimer

Abreviaturas

A β – *Amyloid- β protein* (Proteína β -amilóide)

AD – *Alzheimer's Disease* (Doença de Alzheimer)

AINEs – Anti-Inflamatórios Não Esteróides

AP - Fosfatase alcalina

apoE – Apolipoproteína E

apoE4 - alelo ϵ 4 da apoE

APP - *Amyloid Precursor Protein* (Proteína precursora amilóide)

ASCs – *Adult Stem Cells* (células estaminais adultas)

BACE1 – β -secretase

BDNF - *Brain Derived Factor Neurotrophic* (fator neurotrófico derivado do cérebro)

Bdph - *N-Butylidenephthalide*

bFGF – *basic Fibroblast Growth Factor* (fator de crescimento do fibroblasto básico)

BHE – Barreira hemato-encefálica

cAMP – *cyclic Adenosine Monophosphate* (monofosfato de adenosina cíclico)

Cdk – *Cyclin dependent kinase* (cinase dependente de ciclinas)

cDNA – DNA complementar

CLU – *Clusterin* (clusterina)

CNVs – *Copy Number Variations* (variações no número de cópias)

CRISPR/Cas9 - *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Caspase 9*

DIAD - *Dominantly Inherited Alzheimer's Disease* (Doença de Alzheimer hereditária autossômica dominante)

DHA – *Docosa-Hexaenoic Acid* (ácido docosa-hexaenóico)

DMR - *Differentially Methylated Regions* (regiões diferencialmente metiladas)

DS – *Down Syndrome* (Síndrome de Down ou Trissomia 21)

EpiSCs – *Epiblast-derived Stem Cells* (células estaminais derivadas do epiblasto)

FDA – *Food and Drug Administration*

FT – Fatores de transcrição

GSK3 β - *Glycogen Synthase Kinase 3* (Glicogénio Sintase Cinase 3)

GSMs – *Gamma Secretase Modulators* (moduladores da γ -secretase)

GWAS – *Genome Wide Association Study* (estudos de associação genómica)

(h)ESCs – *(human) Embryonary Stem Cells* (células estaminais embrionárias (humanas))

(h)iPSCs – (*human*) *induced Pluripotent Stem Cells* (células estaminais pluripotentes induzidas (humanas))

(h)NPCs – (*human*) *Neural Progenitors Cells* (células progenitoras neuronais (humanas))

IDE – *Insulin-Degrading Enzyme* (enzima de degradação da insulina)

IGF-I – *Insulin Growth Factor I* (fator de crescimento de insulina I)

iMGLs – *induced Microglia-Like cells* (células da microglia induzidas)

iNSCs – *induced Neural Stem Cells* (células estaminais neuronais induzidas)

LCR – Líquido cefalorraquidiano

MGEs – *Medial Ganglionic Eminence cells* (células da eminência ganglionar medial)

mRNA/iRNA – RNA mensageiro/RNA de interferência

MWM – *Morris Water Maze test* (teste do labirinto aquático de Morris)

NEP – *Neprilysin* (neprilina)

NGF – *Nerve Growth Factor* (fator de crescimento nervoso)

NMDA – *N-metyl-D-Aspartate* (N-Metil-D-Aspartato)

PAKs – *p21-Activated Kinases* (cinases ativadas por p21)

PSEN – *Presenilin* (presenilina)

RAGE - *Receptor for Advanced Glycation End products* (receptores para produtos finais de glicação avançada)

ROS – *Reactive Oxygen Species* (espécies reativas de oxigênio)

SAD – *Sporadic Alzheimer's Disease* (Doença de Alzheimer esporádica)

sgRNA - *synthetic single guide RNA* (RNA guia)

SNC – Sistema Nervoso Central

SNVs - *Single Nucleotide Variants* (variações de um único nucleótido)

SORLI - *Sortilin Related Receptor I* (receptor I relacionado com a sortilina)

STRs - *Short Tandem Repeats* (repetições curtas em tandem)

TALENs - *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* (nucleases efetoras semelhantes a ativadores de transcrição)

TGFβ – *Transforming Growth Factor β* (fator de transformação do crescimento β)

ZFNs - *Zinc-Finger Nucleases* (nucleases de dedo de zinco)

Resumo

Em 2006, dois investigadores demonstraram ser possível desdiferenciar células somáticas por um processo designado de reprogramação celular, levando-as a atingir de novo o estado pluripotente. O surgimento das células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs) causou um impacto extremamente relevante na comunidade científica devido ao facto de se superarem muitas das limitações que as células estaminais embrionárias e adultas apresentavam.

A Doença de Alzheimer (AD) é um distúrbio neurodegenerativo caracterizado pela perda de memória e de outras funções cognitivas. A falta de terapêuticas eficazes para prevenir ou reverter a doença constitui um problema grave de saúde pública, afetando cada vez mais a população idosa.

Esta monografia pretende abordar as principais aplicações das iPSCs na Doença de Alzheimer, seja na modelagem da patologia, no *screening* de novos fármacos para retardar a sua progressão e melhorar a qualidade de vida dos doentes, assim como a sua utilização como uma opção terapêutica individualizada.

Palavras-chave: células estaminais; células estaminais pluripotentes induzidas; Doença de Alzheimer; reprogramação celular.

Abstract

In 2006, two researchers demonstrated that it is possible to de-differentiate somatic cells by a process called cellular reprogramming, causing them to reach the pluripotent state again. The emergence of induced pluripotent stem cells (iPSCs) has had an extremely relevant impact on the scientific community due to the fact that many of the limitations of embryonic and adult stem cells were overcome.

Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by loss of memory and other cognitive functions. The lack of effective therapies to prevent or reverse the disease is a serious public health problem, affecting more and more the elderly population.

This monograph aims to address the main applications of iPSCs in Alzheimer's Disease, in the modeling of pathology, in the screening of new drugs to delay its progression and improve the quality of life of patients, as well as its use as an individualized therapeutic option.

Keywords: stem cells; induced pluripotent stem cells; Alzheimer's Disease; cellular reprogramming.

A. Introdução

I. Células Estaminais

I.1. Definição

As células estaminais são células indiferenciadas que possuem duas características únicas: a capacidade de auto-renovação e a possibilidade de se diferenciarem num ou mais tipos de células (Fig. 1). [1] A sua divisão é assimétrica, isto é, as células filhas podem gerar um conjunto de células com capacidade proliferativa ou continuarem a sua diferenciação. [2]

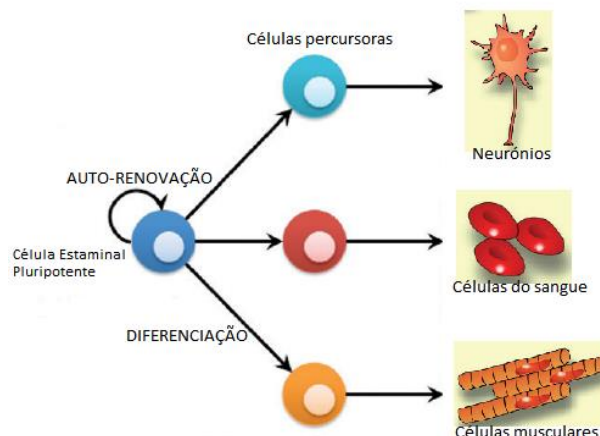


Figura 1. Propriedades das células estaminais. (Adaptada de Stem Cell Facts [1])

I.2. Tipos de células estaminais

A fecundação do oócito pelo espermatozóide origina o zigoto que, após divisões mitóticas, gera um aumento de células designadas de blastómeros (formam a mórula). Com as consequentes divisões celulares, os blastómeros são separados em duas partes (trofoblasto e botão embrionário ou massa celular interna) e forma-se assim o blastocisto. As células da massa interna do blastocisto pré-implantado podem ser isoladas e cultivadas *in vitro* e originar as células estaminais embrionárias (ESCs), que são pluripotentes [3]. O termo “células estaminais embrionárias humanas” (hESC) teve a sua origem em 1998 [4].

Após implantação do blastocisto, o trofoblasto dá origem aos tecidos extra-embrionários, enquanto as células do botão embrionário originam as células estaminais do epiblasto (EpiSCs), capazes de originar *per se* as três camadas germinativas: endoderme, mesoderme e ectoderme, das quais derivam os tecidos e os órgãos [5]. Este tipo de células também é pluripotente, ainda assim, diferente das ESCs no que refere à capacidade de colonização de um blastocisto hospedeiro, capacidade de formar teratomas e na expressão de genes e vias de sinalização necessárias para as manter pluripotentes em cultura.

Após o nascimento, existem alguns tecidos e sistemas de órgãos que possuem células estaminais adultas (ASCs), multipotentes, capazes de se auto-renovarem e com capacidade de se diferenciarem em linhagens de células específicas. Estas células estão localizadas em

nichos, ou seja, estruturas que formam microambientes e fornecem fatores extrínsecos que, em combinação com fatores intrínsecos influenciam o seu comportamento (Fig. 2). [3, 6]

As células estaminais dos tecidos fetais (neuronal, sangue do cordão umbilical ou líquido amniótico) têm propriedades intermédias entre as ESCs e as ASCs em termos de potência.

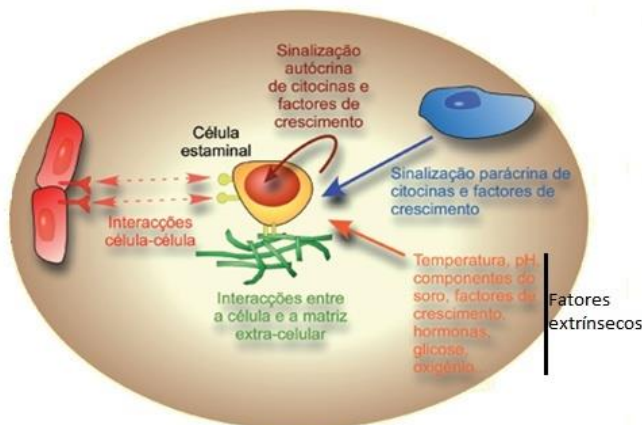


Figura 2. Interações no nicho das células estaminais adultas. (Adaptada de BRAGANÇA *et al.* [3])

1.3. Aplicações

Atualmente os esforços da investigação estão focados em duas estratégias principais: no isolamento, expansão *ex vivo* e transplante das células estaminais ou células progenitoras de volta ao órgão nativo; ou aumento do potencial reparador endógeno *in vivo* das células estaminais. [1-3] De facto, as estratégias de medicina regenerativa têm sido estudadas com as células estaminais no sentido de substituir ou reparar as células danificadas, dado o seu potencial de auto-renovação e proliferação. Por outro lado, podem ser usadas na produção *ex vivo* de tecidos, que posteriormente são transplantados. A terapia génica introduz material genético em células de um determinado tecido onde a expressão de um gene origina uma patologia. As propriedades das células estaminais tornam-nas vetores muito apetecíveis para esta aplicação. Por fim, e não menos importante, estas células podem servir para modelar doenças e para descobrir novos alvos terapêuticos.

1.4. Limitações

Devido ao grande potencial das células estaminais, têm sido feitos esforços para melhorar os protocolos relativos à sua obtenção, de modo a inseri-las numa crescente corrente de aplicações clínicas. Ainda assim, existem desvantagens que necessitam de serem ultrapassadas.

Comparativamente às ESCs, as ASCs possuem uma menor plasticidade e capacidade de proliferação, o que as limita na terapia celular. No entanto, também pode ser visto como

uma vantagem ao diminuir a probabilidade de formação de teratomas, problema comum nas células estaminais embrionárias. Ainda assim, há dificuldade no isolamento das células estaminais adultas, devido ao facto de serem uma população pequena (representam menos de 0,01% do número total de células [2]) e à sua localização anatómica interna.

As ESCs são consideradas o *standard gold* em termos de pluripotência, mas o facto de serem isoladas a partir de um embrião humano gera problemas éticos e políticos, que acabam por dificultar o estudo das mesmas. Em resposta a esta limitação, Klimanskaya *et al.* [7] conseguiram obter células pluripotentes a partir de uma biópsia, sem interferir com o desenvolvimento do embrião. Posteriormente, para que possam ser usadas clinicamente, é necessário o seu isolamento e a sua manutenção em condições de cultura adequadas (com os fatores de crescimento tumoral β – TGF β e de fibroblasto básico – bFGF), de modo a manterem o seu estado indiferenciado [8]. Dependendo da linhagem celular pretendida, é necessário induzir a sua diferenciação para que possam ser transplantadas no doente em causa. Durante esta expansão prolongada, as linhas ESCs podem adquirir cariótipos anormais ou amplificações genéticas [9] e levar ao desenvolvimento de determinadas patologias. A histocompatibilidade entre dador e recetor é outra limitação, com a possibilidade de rejeição imunológica do transplante das células ou de órgãos originados a partir delas [3]. Além disso, após um transplante, a terapêutica imunossupressora acompanhará o doente para o resto da vida. Em contrapartida, a possibilidade de efetuar o transplante com células estaminais adultas isoladas a partir do próprio doente (células autólogas) reduz essa limitação.

Devido aos diversos problemas apresentados, mas principalmente por razões éticas, em 2005, o Conselho Presidencial de Bioética dos Estados Unidos propôs a busca de fontes alternativas de células pluripotentes. [10] No ano seguinte, TAKAHASHI e YAMANAKA [11] surpreenderam o mundo ao reprogramarem células somáticas para a pluripotência, com um potencial de desenvolvimento semelhante ao das ESCs e sem a exigência de um embrião, criando uma nova tecnologia: células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs).

Nesta revisão, pretende-se explorar as iPSCs, desde a sua obtenção, através da reprogramação celular, até à sua diferenciação nos diversos tipos celulares, bem como a sua aplicação na Doença de Alzheimer, uma das doenças neurodegenerativas com maior prevalência atualmente.

2. Reprogramação Celular

2.1. Historial

O conceito de reprogramação celular já permanece há mais de 50 anos e foi sugerido pelas experiências de GURDON [12], e mais tarde de WILTON *et al.* [13]. Em ambas as experiências foram gerados clones, de rã e de ovelha (a famosa ovelha Dolly), respetivamente, onde se demonstrou que, introduzindo um núcleo de uma célula diferenciada num oócito anucleado, se gerava um organismo inteiro. Chegou-se à conclusão de que o citoplasma continha fatores específicos – fatores de reprogramação, que levavam a que as células somáticas assumissem um estado embrionário indiferenciado. Posteriormente, DAVIS *et al.* [10] realizaram experiências com DNA complementar (cDNA) e descobriram que a expressão sozinha do gene de diferenciação miogénica I (MYOD1) era suficiente para induzir a conversão de fibroblastos em mioblastos que expressam miosina.

Estes foram os trabalhos pioneiros destacados, entre outros, que permitiram desvendar os mecanismos celulares e moleculares subjacentes à reprogramação celular e aprofundar este conceito. Deste modo, a reprogramação celular pode definir-se como o conjunto de alterações celulares que permite que uma célula passe de um estado diferenciado para outro. Estas alterações celulares correspondem a mudanças nos padrões de expressão génica que incluem o silenciamento de genes que codificam fatores de transcrição (FT) importantes na manutenção da pluripotência, expressão de genes que induzem a diferenciação e alterações epigenéticas. [14] O facto de poder gerar várias linhagens celulares a partir de uma, torna a reprogramação celular uma tecnologia bastante atrativa para os investigadores e para as indústrias farmacêuticas.

2.2. Métodos de reprogramação celular

Atualmente permanecem 5 procedimentos tecnológicos capazes de gerar células pluripotentes [14, 15]:

- i) Transferência Nuclear das Células Somáticas: o núcleo de uma célula somática (diferenciada) é transferido para um oócito anucleado.
- ii) Utilização de extratos de células pluripotentes: extratos citoplasmáticos e nucleares de células indiferenciadas podem induzir a reprogramação, através da estimulação de genes de pluripotência.
- iii) Fusão celular: fusão de uma célula somática com uma célula estaminal embrionária, que possui fatores que auxiliam na desdiferenciação pela indução da expressão de genes de pluripotência.

- iv) Moléculas pequenas: uso de moléculas com adição de FT que promovem a reprogramação. Um estudo demonstrou que com 7 moléculas pequenas era possível reprogramar eficientemente fibroblastos de ratos, em que Oct4 foi dispensável. [16]
- v) Transdiferenciação ou Reprogramação direta: usa a sobreexpressão transitória de FT e de sinais celulares e moleculares, como fatores de crescimento e citocinas para reprogramar células somáticas em diversas linhas celulares ou em progenitores celulares sem passar pelo estágio de iPSC.

2.3. Papel dos fatores de reprogramação

Através das interações que estabelecem entre si, os fatores de reprogramação são responsáveis por induzir a expressão de genes de pluripotência e inibir a expressão de genes que promovem a diferenciação. Os seguintes fatores foram os utilizados pela primeira vez para gerar iPSCs:

- Oct4: a deficiência deste fator nos embriões é prejudicial, pois embora haja formação do trofoblasto, a massa celular interna não se desenvolve;
- Sox2: não é expresso apenas em células pluripotentes, mas também em fases mitóticas posteriores;
- Klf4: a sua função está relacionada com a inibição da p53 e com a neutralização da ação do c-Myc (induz a apoptose e a diferenciação);
- c-Myc: é um oncogene. Não é fundamental para a reprogramação celular, mas influencia fortemente a cinética e a eficiência desta, provavelmente pela indução de mudanças epigenéticas, quando adicionado aos outros 3 fatores. [17]

A adição de diferentes tipos de fatores de transcrição promove a aquisição de pluripotência pelas células, concomitantemente, direciona-as para linhagens celulares específicas, diferentes da linhagem parental.

2.4. Expressão sequencial dos marcadores de pluripotência

Uma dúvida científica associada à utilização dos fatores de reprogramação consiste no conhecimento se, os genes marcadores de pluripotência (por exemplo, AP, SSEA1, Sox2, Oct4 e Nanog para vetores virais) são ativados aleatoriamente ou sequencialmente e se existe duração mínima de expressão do transgene associada ao sucesso da reprogramação. O entendimento da ativação dos genes, assim como do silenciamento do transgene, é fundamental para o aprimoramento da técnica de reprogramação e para o desenvolvimento de vetores.

Com o objetivo de investigar esta questão, BRAMBRINK *et al.* [18] desenvolveram um sistema lentiviral para formar iPSCs, no qual os 4 fatores de transcrição são ativados a partir de um promotor induzido pela doxicilina. Os autores descobriram que AP é o primeiro gene a ser expresso, seguindo-se o SSEAI que marca um estado intermédio, e Oct4/Nanog são apenas detetados nas células totalmente reprogramadas. Os resultados também sugeriram que a expressão do transgene é crítica na formação das iPSCs, ou seja, uma expressão mais prolongada (de 12-16 dias) aumenta o número de colónias iPSCs totalmente reprogramadas.

Este estudo foi de extrema relevância para demonstrar que existem etapas no aparecimento dos marcadores de pluripotência, as quais são essenciais para distinguir células parcial de totalmente reprogramadas. Por outro lado, existe uma duração mínima para a expressão do transgene, pois se a expressão for reduzida, as células retornam ao estado original, o que apoia o envolvimento da epigenética na reprogramação.

2.5. Vetores

Para que os fatores de transcrição referentes à reprogramação sejam introduzidos nas células somáticas, é necessário o uso de vetores, que podem ser virais ou não virais e integrativos ou não integrativos. O vetor deve ser escolhido para cada tipo celular com base nas suas vantagens e desvantagens, de modo a não afetar significativamente a estabilidade e a qualidade das células, assim como a eficiência da reprogramação [14, 15, 19].

Vetores integrativos

Vetor	Vantagens	Desvantagens
Retrovírus	Clonagem de um grande número de fragmentos Alta eficiência	Integração genómica Infetam células apenas em divisão
Lentivírus	Infetam células quiescentes e em divisão	Integração genómica Menos eficiente que o retrovírus
Transposões (ex: piggy-Bac)	Fácil remoção do transgene Expressão génica a longo prazo Eficiente	Etapa de excisão complicada

Tabela 1. Vantagens e desvantagens dos vetores integrativos.

Vetores não integrativos

Vetor	Vantagens	Desvantagens
Adenovírus	Ausência de integração genómica	Expressão transitória Eficiência reduzida
Vírus Sendai	Ausência de integração genómica Alta eficiência	Difícil eliminar os transgenes
Plasmídeos	Ausência de integração genómica Reprodução fácil a nível laboratorial Baixo custo	Eficiência reduzida Expressão reduzida de fatores de transcrição
Proteínas mRNA, iRNA	Ausência de integração genómica Entrega facilitada	Eficiência reduzida Necessárias múltiplas transfeções

Tabela 2. Vantagens e desvantagens dos vetores não integrativos.

Moléculas pequenas

A utilização de moléculas pequenas tem sido impulsionada, tendo por objetivo aumentar a eficiência de reprogramação. O ácido valpróico, inibidor das desacetilases das histonas, tem demonstrado um potencial promissor na reprogramação de fibroblastos humanos usando apenas Oct4 e Sox2. [14]

2.6. Epigenética

Para que uma célula seja reprogramada é então necessário escolher a célula parental, a técnica de reprogramação, incluindo o tipo de vetor e o cocktail específico dos fatores de reprogramação, e a linhagem celular pretendida.

A epigenética explica o envolvimento do genoma com o meio ambiente, resultando em mudanças na regulação da expressão génica. [16] A reprogramação celular afeta a epigenética em quatro sentidos: modificação das histonas na cromatina; alteração da metilação do DNA; regulação de marcadores nos genes de pluripotência e genes específicos de cada linhagem que promovem a diferenciação; e em modificações pós-tradução.

Estudos recentes sugerem uma investigação mais aprofundada e focada na epigenética, sendo extremamente relevante a identificação de FT associados a determinadas linhagens celulares, o que permitirá esclarecer e definir protocolos de reprogramação altamente eficientes.

B. Células Estaminais Pluripotentes Induzidas

I. Caracterização

TAKAHASHI e YAMANAKA [11] demonstraram que ao introduzir os 4 fatores de transcrição em fibroblastos de murganhos, com um sistema retroviral e sob as condições de cultura de células estaminais embrionárias, era possível induzir um estado de pluripotência. Observaram também que as células pluripotentes induzidas se assemelhavam às ESCs na morfologia, propriedades de crescimento, genes marcadores de pluripotência e na formação de teratomas (com tecidos das três camadas germinativas).

As iPSCs são então uma colônia de células pluripotentes com uma marca epigenética reestruturada que resultou de uma reprogramação celular. Assemelham-se às ESCs nas suas propriedades únicas: capacidade de auto-renovação e de diferenciação nas várias linhagens celulares, no entanto, estas semelhanças não provam que são molecularmente e/ou funcionalmente equivalentes.

I.1. Avaliação da pluripotência

Durante a reprogramação celular poderão aparecer colônias de células não pluripotentes que têm de ser identificadas como tal. A observação da morfologia deve ser um dos critérios, embora não seja suficiente. Num estudo recente, foi desenvolvido um método automatizado quantitativo e não invasivo que auxilia na previsão da janela de tempo de seleção de colônias e na sua deteção. Nos resultados, houve diferenças significativas em termos de características biológicas em relação aos métodos tradicionais. [20] Como já referido anteriormente, consoante o estado de reprogramação, as células vão expressando determinados conjuntos de genes de pluripotência: as células totalmente reprogramadas expressam Oct4, Sox2 e Nanog e reativam a expressão do gene da telomerase, seguido do silenciamento do transgene usado para a reprogramação. Ao mesmo tempo, são expressos antigénios embrionários como SSEA3, TRA-1-60, TRA-1-81, DNMT3 β , REX1, entre outros. O grau de metilação dos genes promotores da manutenção da pluripotência e dos genes promotores da diferenciação é também um evento importante na avaliação da pluripotência. Outra marca de pluripotência é a reativação do cromossoma X: a sua inativação é importante no desenvolvimento embrionário e fetal, enquanto a sua reativação influencia o estado pluripotente. [22] Existem dois tipos de ensaios funcionais que avaliam a pluripotência: formação de quimeras e formação de teratomas. O primeiro teste avalia se, após transplante das iPSCs num blastocisto (normalmente de rato), ocorre desenvolvimento normal de um organismo inteiro. O segundo ensaio é o único disponível para o estudo de

células humanas e envolve a injeção de iPSCs via subcutânea ou intramuscular em ratos imunocomprometidos. Se as células forem pluripotentes formarão tumores que englobam células das três camadas germinativas. [9, 22] Um marcador potencial poderá ser o locus *Dlk1-Dio3* que não é silenciado nas iPSCs (pois se for silenciado, a probabilidade de formar quimeras é significativamente reduzida). [23]

1.2. Detecção de colónias iPSCs

A abordagem tradicional por imunofluorescência para detetar marcadores de pluripotência juntamente com a microscopia de fluorescência só pode ser aplicada em fases tardias de reprogramação, tornando-se necessário a descoberta de outros métodos eficazes para acompanhar a qualidade das iPSCs. Num estudo recente, foi desenvolvido um método quantitativo não invasivo que auxilia na deteção de colónias iPSCs e na previsão do tempo ideal.

1.3. Danos no DNA e mecanismos de reparação durante a reprogramação

Durante o processo de reprogramação, o aumento da taxa de proliferação celular requer maior energia que é fornecida através do metabolismo da glicose. Os eletrões libertados em excesso pelas moléculas que provêm do ciclo de krebs (NADH e FADH₂) podem ser acumulados na cadeia transportadora e, posteriormente, no citoplasma sob a forma de espécies reativas de oxigénio (ROS), responsáveis pelo stress oxidativo e danos no DNA. Defeitos em componentes envolvidos na reparação do DNA, como por exemplo, *LIG4*, *BRCA1*, *BRCA2*, impedem a formação de iPSCs. [24] Ao contrário do que se pensava, a reprogramação ativa mecanismos de reparação nas iPSCs, que possibilitam a reparação de danos no DNA e o sucesso da reprogramação.

1.4. Integridade do genoma

As variações genéticas das hiPSCs incluem instabilidade cromossómica, variações no número de cópias (CNVs) e variações de um único nucleótido (SNVs). Estas variações já são pré-existentes, ou são induzidas pela reprogramação ou posteriormente, pela diferenciação das iPSCs. Em geral, as hiPSCs e as hESCs partilham de uma instabilidade cromossómica semelhante, em que a trissomia 12 é a aberração predominante em ambas. As CNVs são normalmente adquiridas durante a cultura devido à pressão seletiva exercida pela adaptação às condições do meio, e, são observadas mais recorrentemente em hiPSCs do que em hESCs, embora muitas delas sejam comuns a ambas (como a amplificação de 20q11.21).

Existem também CNVs apenas detetadas em iPSCs que poderão ter origem somática, sendo vantajosas para a proliferação, semelhante ao que acontece nos tumores. Destaca-se a importância de silenciar os fatores de reprogramação no momento certo, a fim de evitar perturbações genómicas adicionais. A partir de vários estudos publicados, chegou-se à conclusão que as SNVs tanto podem derivar das células somáticas como acontecer inesperadamente durante, ou após a reprogramação, sugerindo que existem fontes celulares que poderão ser mais propícias a este evento. No geral, as hiPSCs e as hESC não são muito diferentes no que diz respeito à carga mutacional.

De uma forma resumida, pode-se afirmar que a cultura *in vitro* propicia a instabilidade genómica e diminui a capacidade de reparação. No entanto, as hiPSCs de baixa passagem são sujeitas a mais variações que as hiPSCs de alta passagem. [24] É necessário que o número de passagens seja bem controlado, uma vez que, passagens extensas geram maior estabilidade às iPSCs, aumentando a eficiência da diferenciação. [25] DEBOEVER *et al.* [26] observaram que, muitas CNVs comuns estão em regiões inter-génicas reguladoras e CNVs raras têm grande efeito sobre a expressão génica que, dependendo da localização em relação ao gene, pode ser positiva ou negativa. Mais estudos serão necessários para identificar variações que poderão ter consequências ao nível do fenótipo, nomeadamente para utilização na clínica.

1.5. Genética e epigenética: ESCs vs. iPSCs

A sequenciação do DNA das hiPSCs e das hESC indica que são semelhantes no geral, mas identifica diferenças. Vários estudos indicam que as diferenças podem ser atribuídas ao histórico genético (e célula de origem), à expressão latente dos FT e às condições do meio cultura que variam entre laboratórios. [27] MAREI *et al.* [28] analisaram o perfil de expressão génica e o potencial de diferenciação neuronal dos dois tipos celulares para identificar semelhanças, usando uma técnica não integrativa e partindo do mesmo tipo de células. Os resultados sugeriram que as hiPSCs e hESC são muito semelhantes e que as diferenças na expressão génica se devem a outros fatores que não o *background* genético. O potencial de diferenciação neuronal foi também idêntico, assim como o perfil de expressão génica durante a diferenciação, revelando equivalência entre os dois tipos.

Um estudo do ano corrente [29] destaca a importância de manter a identidade genética das iPSCs através de um processo barato e confiável: repetições curtas em tandem (STRs). STRs são repetições de 2-4 nucleótidos localizadas em regiões de sequência única, e apresentam uma variabilidade interindividual elevada, sendo a impressão digital de cada indivíduo. Para além da genética e epigenética, a genotipagem STR deve fazer parte das

análises, aumentando a robustez dos resultados relativos à identidade das iPSCs (importante nos dados).

As principais características epigenéticas das hESCs são também reproduzidas nas hiPSCs, mas há diferenças relacionadas com a memória epigenética, ou seja, com um padrão de metilação do DNA residual e expressão génica resultante da célula de origem. No entanto, existem regiões diferencialmente metiladas (DMR) e marcas na cromatina que são adquiridas na geração de iPSCs, não dependendo da origem. Durante a reprogramação existe uma metilação ineficiente em locais CpG, sendo esta aberração transmitida com frequência e observada em altas passagens. Estes factos sugerem que as passagens posteriores e a adição de DNA-metiltransferases poderão não ser suficientes para “apagar” as aberrações adquiridas, como se pensava inicialmente. A memória epigenética torna-se numa vantagem apenas na diferenciação para o mesmo tipo de célula de origem. [23]

1.6. Sistemas de edição de genes

As ferramentas de edição de genes consistem em técnicas de correção do genoma, substituindo, inativando ou eliminando genes que sofreram algum tipo de mutação. Funcionam com proteínas guias de modo a dirigirem-se ao local alvo. Existem três tipos de sistemas, que dependem do tipo de reparação e da nuclease envolvida: nucleases de dedo de zinco (ZFNs), nucleases efetoras semelhantes a ativadores de transcrição (TALENs) e, o mais recente, repetições palindrómicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas (CRISPR/Cas9). O CRISPR/Cas9 tipo II, o mais estudado, é constituído por dois componentes: a endonuclease Cas9, que possui dois domínios independentes responsáveis pela clivagem das cadeias complementar e não complementar do DNA, e um RNA guia (sgRNA) liga por complementariedade ao DNA alvo e à Cas9. [30]

Esta ferramenta pode ser usada para corrigir genes associados a doenças, tanto em zigotos como em linhas celulares humanas. É também útil na criação de modelos para o estudo da biologia celular e produção de novos fármacos, utilizando diferentes tipos de células somáticas associadas ou não a alguma patologia. Dadas as variações genéticas que vão ocorrendo na reprogramação de hiPSCs, esta ferramenta poderá corrigir as anomalias e/ou fornecer consequências fenotípicas. De reforçar que, a edição ex vivo de células somáticas recolhidas de um doente com uma determinada patologia, a sua reprogramação e diferenciação e posterior transplante poderá ser um marco histórico na medicina. [31]

2. Aplicações

Para além de muito semelhantes genética e funcionalmente, as iPSCs apresentam vantagens significativas em relação ao *standard gold*, permitindo diversas aplicações clínicas.

2.1. Criação de modelos de doenças

A criação de modelos de doença permite uma maior compreensão dos fatores que influenciam a doença humana em termos de suscetibilidade e prognóstico. Os modelos atualmente disponíveis podem ser *in vitro*, com tecidos vivos obtidos por colheitas invasivas ou *post-mortem*, ou *in vivo* com animais transgênicos ou modelos quiméricos. Estes possuem limitações relativamente à transposição de resultados para o organismo humano.

Graças à sua capacidade de auto-renovação e plasticidade, as iPSCs permitem estudar três tipos de doenças: genéticas, epigenéticas e ambientais. A recolha de células específicas do doente com uma determinada patologia permite criar um “modelo individual” e providenciar uma terapêutica direcionada. Em muitos casos, as iPSCs colhidas de um doente exibem uma prestação diferente de iPSCs colhidas de um indivíduo saudável, fornecendo pistas acerca da patologia. [15]

Acredita-se que a maioria das doenças monogénicas, ou seja, com uma mutação isolada num gene, sejam resultado de alterações da genética, epigenética ou até mesmo de fatores extrínsecos. Nas doenças epigenéticas, as iPSCs adquirem marcas epigenéticas que podem ser transitórias ou permanentes, podendo manifestar o fenótipo da doença. Como tal, o acompanhamento dos fenótipos é importante no estudo da doença e no *screening* de fármacos. As doenças ambientais, como por exemplo, o melanoma, manifestam-se por alterações na sequência do DNA ou na produção de proteínas. [16]

A criação recente de modelos 3D do cérebro humano permite uma maior proximidade à realidade, levando a uma maior compreensão dos mecanismos subjacentes às patologias, principalmente neurodegenerativas, cuja prevalência tem aumentado. [32]

2.2. Screening de fármacos

O desenvolvimento de um novo fármaco é um processo caro e moroso: de muitas moléculas-teste, são poucas as que chegam à fase final. Através da criação de modelos utilizando as iPSCs específicas de cada indivíduo bem caracterizadas, a melhor compreensão da fisiopatologia ajudará na identificação de moléculas mais eficientes e seguras para o tratamento das diversas patologias. Para tal, ainda são necessários ajustes nos protocolos de

reprogramação e diferenciação das iPSCs para que estas mantenham a sua qualidade e integridade genética. [15, 16]

2.3. Tratamento de doenças

Uma das maiores vantagens das iPSCs consiste na possibilidade de se executar um transplante autólogo, ou seja, colher as células de um indivíduo, reprogramá-las e diferenciá-las numa certa linhagem e transplantá-las de novo no mesmo indivíduo. Este processo elimina problemas de histocompatibilidade e de rejeição. Alternativamente, também é possível efetuar transplantes alogénicos, isto é, a colheita das células de um indivíduo, que, após o mesmo tratamento do processo anterior, são introduzidas noutra indivíduo. A rejeição imunológica torna-se novamente possível, no entanto, este processo é mais barato e menos demorado que o anterior. Se necessário, as células em cultura poderão ser corrigidas geneticamente.

As iPSCs também podem ser geradas *in vivo*, através da administração local dos fatores de reprogramação. Posteriormente são colhidas, diferenciadas *in vitro* na linhagem celular pretendida e reintroduzidas no indivíduo, no local afetado.

A engenharia de tecidos é outra aplicação potencial das iPSCs. A partir das iPSCs específicas de cada indivíduo, é possível gerar tecidos ou órgãos *in vitro*, sujeitos ou não a uma edição de genes, através de *scaffolds* (matrizes tridimensionais porosas) ou do *bioprinting* (construção de tecidos vivos em 2D ou 3D), que, posteriormente são transplantados para restabelecer uma função no organismo.

Existem técnicas que não envolvem a produção propriamente dita de iPSCs, mas necessitam de métodos de reprogramação/diferenciação eficazes e controlados, que podem ser desenvolvidos com a sua colaboração. O rejuvenescimento celular é uma técnica que pode ser realizada *in vitro* ou *in vivo*, e consiste em converter células em senescência em células jovens através de fármacos epigenéticos, sem afetar a especialização das mesmas. Embora ainda não esteja bem estabelecida, a transdiferenciação *in vivo* é uma técnica em que as células somáticas de uma linhagem são transformadas noutra linhagem diferente através de fatores de reprogramação, fatores de crescimento, entre outros. Permite que as células afetadas sejam transformadas em células saudáveis e administradas na pessoa em causa. [22]

Basicamente, estas técnicas são auxiliares preciosos na medicina regenerativa, seja na substituição, alteração ou reparação de células ou tecidos danificados ou com perda de função, apresentando um potencial de intervenção terapêutica infinita. A edição de genes torna-se essencial na reparação dos defeitos, acoplada às várias técnicas descritas. Ainda

assim, não é totalmente claro se as iPSCs resultantes dos vários processos escapam na totalidade a uma resposta imunológica, dada a sua manipulação. A escolha de um alvo apropriado numa doença e a identificação de fenótipos relevantes continua a ser um obstáculo a ultrapassar. Desta forma, torna-se extremamente importante otimizar os protocolos que envolvam a clínica das iPSCs, de modo a que estas sejam geradas com qualidade, em quantidade apropriada, de forma segura, para uma doença, especificamente num indivíduo.

C. Doença de Alzheimer

I. Caracterização e estado em Portugal

A Doença de Alzheimer (AD) é um distúrbio neurodegenerativo progressivo do sistema nervoso central (SNC) caracterizado pela perda de capacidades cognitivas, envolvendo a perda de memória a longo prazo, alterações no processamento de informações visuais e espaciais, dificuldade de raciocínio, distúrbios comportamentais e alterações na rotina do indivíduo afetado. Em termos fisiológicos, há perda de densidade neuronal acompanhada de alterações na rede neuronal e nas sinapses, levando a uma atrofia cerebral e alteração nos ventrículos. Os marcadores neuropatológicos são: as placas senis (acumulação de formas insolúveis do peptídeo β -amilóide ($A\beta$) no espaço extracelular), as tranças neurofibrilares (agregados de proteína tau hiperfosforilada), perda neuronal e gliose. [33] A doença exhibe três fases ao longo do tempo: 1) pré-clínico (fase silenciosa; início de alterações neuropatológicas); 2) défice cognitivo ligeiro (envolve problemas de memória, linguagem e na capacidade de decisão, mas não interfere com as atividades do quotidiano); e 3) demência. [34]

Existem dois tipos de Alzheimer: a Doença de Alzheimer esporádica (SAD) e a Doença de Alzheimer hereditária autossómica dominante (DIAD). A SAD é o tipo mais comum, de início tardio, resultante de vários fatores, em parte do perfil genético, e da sua interação com o meio ambiente, estando envolvida principalmente a apolipoproteína E (apoE). A DIAD afeta menos de 5% da população, possui início precoce e as principais causas são mutações que ocorrem nos genes da proteína precursora amilóide (APP), presenilina 1 (PSEN1) e presenilina 2 (PSEN2). Tal como conhecido, existem fatores de risco não modificáveis e modificáveis associados à patologia, sejam, respetivamente, idade, historial familiar, Síndrome de Down (DS), alelo $\epsilon 4$ da apolipoproteína E (apoE4); doença vascular, diabetes, obesidade, tabagismo, consumo de álcool. No geral, os dois tipos são comparáveis na progressão e nos biomarcadores. [34]

Com o envelhecimento registado a nível nacional e uma escala global, o número de casos de demência tem aumentado significativamente. A AD representa 50-70% dos casos de demência e tem tido um crescimento praticamente exponencial com o aumento da idade. A previsão de dados estima que em 2050 existirão em todo o mundo cerca de 115,4 milhões de pessoas com AD, um número cerca de três vezes maior ao estimado em 2010. [35] O relatório Health at a Glance 2017 coloca Portugal como o 4º país com mais casos por cada mil habitantes (19,9/1000). [36] Tendo em conta este panorama, a classe mais idosa terá menor qualidade de vida e os encargos com as despesas de saúde serão cada vez maiores, pelo que surge a necessidade extrema de combater a doença, através do estudo detalhado da sua fisiopatologia e da investigação de novos fármacos.

2. Fisiopatologia

Os peptídeos A β , principais constituintes das placas amilóides gerados por neurónios e outras células ao longo da vida, resultam da clivagem proteolítica da APP por secretases. A α e a β (BACE1) secretases clivam a APP em sequências diferentes, resultando α -APPs + C83 e β -APPs + C99. Da clivagem do C83 e C99 pela γ -secretase, são originados respetivamente peptídeos p3 (não tóxicos) e peptídeos A β 40 e A β 42 (tóxicos). [37]

Na SAD, para que A β se torne patológica é necessário que a sua produção esteja aumentada, ou, por outro lado, que haja um aumento do *misfolding* que favorece a agregação, e/ou que a sua eliminação esteja diminuída, estando também alterado o seu transporte através da BHE. A eliminação de A β do parênquima cerebral é essencial para evitar a sua acumulação e a formação de agregados. Para tal, quando formado, pode ser ou imediatamente degradado pela neprililina (NEP) ou pela enzima responsável pela degradação da insulina (IDE) ou, formar oligómeros que podem ser degradados pelas células da glia, e ainda atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE), através da sua ligação às proteínas LRPI e LRP2. A LRPI medeia o transporte de A β livre ou conjugado com outras proteínas e é inibido pelo alelo ϵ 4 da apoE4; a LRP2 transporta o A β ligado à clusterina (CLU). No sangue, é importante que sofra clearance por parte do fígado e dos rins. O transporte reverso para o cérebro também é possível se A β se ligar aos recetores RAGE da BHE. Dados recentes sugerem que os doentes com SAD têm uma clearance diminuída de A β , o que poderá envolver a apoE e a falha de células da glia e macrófagos. [38]

Na DIAD, mutações na APP implicam alterações no seu processamento, levando ao aumento de A β , principalmente da isoforma A β 42 que é mais propícia à agregação, alterando também o *ratio* A β 42/A β 40. Devido à alteração da clivagem da γ -secretase, as mutações na

PSEN1 e PSEN2 aumentam a produção de peptídeos A β mais longos, aumentando o *ratio* anteriormente referido. Segundo um estudo, tipo de mutação e a relação A β 42/A β 40 predizem a idade média de início da demência. Isto significa que existe uma via patológica comum apesar das diferentes mutações. Uma vez que o gene da APP se localiza no cromossoma 21, as pessoas com Síndrome de Down produzem mais A β que o normal e desenvolvem quadros semelhantes à AD cedo. [34] Uma mutação *missense* na APP resulta numa diminuição da clivagem pela BACE1 e, posteriormente, numa menor produção de A β , tendo os portadores menor risco de AD e de declínio cognitivo. [39]

Segundo a hipótese da cascata amilóide, a deposição de A β sob a forma de placas altera as sinapses e ativa uma resposta inflamatória por parte da glia gerando danos oxidativos e um desequilíbrio na homeostasia neuronal que alteram da atividade das cinases/fosfatases. Estes eventos propiciam a perda neuronal seletiva e depressão sináptica que leva à demência. O comprometimento de interneurónios inibitórios e a estimulação deficiente de recetores de glutamato pode resultar em excitotoxicidade, desencadeando um aumento na produção de A β , através de um ciclo vicioso, destabilizando ainda mais a rede. [40] Estudos recentes identificaram outros produtos resultantes da clivagem de APP e outros A β , que, aumentam os seus níveis quando são tratados por inibidores da BACE1, sugerindo que surgem a partir de protease(s) alternativa(s) que cliva(m) a APP. [39]

A apoE é uma proteína que possui três isoformas e é responsável pelo transporte dos lípidos, auxílio da remielinização dos axónios e pela modelagem de recetores de glutamato e plasticidade sináptica. Os astrócitos são a fonte primária desta proteína, aumentando a sua expressão durante o envelhecimento e em resposta ao estrogénio, por exemplo. Os neurónios expressam apoE em casos de stress ou lesões tecidulares. Uma observação relevante é que a fonte celular, a isoforma e a quantidade de apoE no SNC influenciam a deposição de A β e a degeneração neuronal. [33] Curiosamente, a presença do alelo ϵ 2 na apoE na população idosa está relacionada com uma redução do risco de demência, mas com um aumento da carga amilóide em relação ao alelo ϵ 3.

Estima-se que o alelo ϵ 4 da apoE seja responsável por 50% dos casos de SAD. CASTELLANO *et al.* [41], demonstraram que a apoE4 diminui acentuadamente a clearance de A β , prejudica a sinaptogénese e diminui a densidade da espinha dendrítica. Os níveis elevados de apoE4 em doentes com AD levou a um estudo onde se concluiu que, em resposta a danos cerebrais, a apoE é induzida para fins de remodelação, mas, concomitantemente, é clivada em fragmentos que levam à disfunção neuronal e mitocondrial. Por outro lado, nestes doentes, foi observado um decréscimo de GABA e somatostatina no

cérebro e no líquido cefalorraquidiano (LCR), maior do que a diminuição decorrente da idade, contribuindo para o déficit de memória e aprendizagem. A apoE4 está também relacionada com um menor metabolismo da glicose, contribuindo para o atrofio das mitocôndrias (em indivíduos saudáveis e doentes). Embora ainda não esclarecido, a apoE4 incompleta no terminal-C aumenta a fosforilação da tau, contribuindo para a formação de espécies neurotóxicas. [33] Assim, a apoE4 causa comprometimento dependente da idade, dos interneurónios GABAérgicos e da tau.

O transportador lipídico ABCA7, regulador do colesterol e da homeostasia de fosfolípidos, e expresso em neurónios, microglia e macrófagos, está também envolvido na doença: o seu *knock-out* diminui o estado de lipidação da apoE e duplica os níveis de A β insolúveis e de placas senis, sendo importante na clearance destes peptídeos. [40]

A proteína tau, conhecida pela estabilização dos microtúbulos, pode aumentar a neurotransmissão excitatória, no entanto, ao ser modificada (hiperfosforilada), prejudica o processo. [33] A hiperfosforilação ocorre diretamente devido à falta de regulação das cinases/fosfatases, alterações na tau; ou indiretamente devido à toxicidade mediada por A β , stress oxidativo, inflamação. A perda de função da tau despoleta instabilidade dos microtúbulos e compromete o transporte axonal. [42] As tauopatias resultam da agregação intracelular de proteína tau e estão associadas a muitas desordens neurodegenerativas. Estudos demonstraram que A β induz a hiperfosforilação e a acumulação pós-sináptica de tau. Desta forma, as mutações na APP e presenilinas, que alteram a produção de A β , para além de gerarem placas amilóides, geram também as tranças neurofibrilhaves, enquanto alterações na tau geram apenas as últimas, mas tornam os neurónios vulneráveis à A β . [39] A α -sinucleína é outra proteína envolvida na patogénese da AD, que também forma agregados (Lewy bodies) interferindo com organelos intracelulares. Tanto a tau como a α -sinucleína podem ser libertadas para o espaço extracelular e interagir com células. [33]

Mecanismos epigenéticos, alterações vasculares, o sistema imunitário e a reciclagem de vesículas endocíticas podem desempenhar um papel importante na patologia, necessitando de investigação adicional. [33, 39]

3. iPSCs na Doença de Alzheimer

Tal como referido anteriormente, os nichos desempenham um papel fundamental na neurogénese, compensando assim a neurodegenerescência envolvida na patologia. Uma estratégia endógena possível é a estimulação da neurogénese através da adição de fatores de crescimento, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento

nervoso (NGF), fator de crescimento de insulina I (IGF-I). No entanto, esta abordagem ainda defronta alguns desafios, uma vez que a neurogênese e a massa neuronal diminuem ao longo da idade, e não se consegue explicar o efeito da patologia neste processo. Estratégias exógenas passam pela utilização de células estaminais para compensar o ambiente e a degeneração neuronal, melhorando a função cognitiva. As diferentes classes de células estão associadas a diferentes mecanismos, envolvendo a modulação da inflamação, a resposta da microglia, proteção contra a toxicidade induzida por $A\beta$, suporte à neurogênese e às sinapses. A tecnologia das iPSCs permite gerar neurónios funcionalmente maduros e diferenciá-los em subtipos neuronais, relevantes no estudo da patologia *in vitro*. [43]

3.1. Estudo dos mecanismos celulares e moleculares na patologia e screening de fármacos

Em 2011, YAGI *et al.* [44] geraram iPSCs de fibroblastos com DIAD com mutação da PSEN1 (A246E) e PSEN2 (N121I), e diferenciaram-nas em neurónios. Como a diferenciação neuronal das iPSCs derivadas de fibroblastos com mutação teve o mesmo sucesso que a das iPSCs controlo, pode-se concluir que mutações nas PS não afetam a diferenciação neuronal. Tal como esperado, a produção de $A\beta$ foi significativamente maior nas iPSCs com mutação, e estas também respondem melhor aos inibidores da γ -secretase, sendo estes neurónios úteis para o desenvolvimento de fármacos. A presença de tauopatias é difícil de observar em períodos de cultura reduzidos, sugerindo que acontece numa fase mais avançada.

Em 2012, ISRAEL *et al.* [45] geraram iPSCs para estudar os fenótipos de SAD e DIAD. Em ambas as linhas foi observado o aumento da produção de $A\beta$ e da fosforilação da tau (com ativação de uma cinase da tau (GSK3 β)). A adição de inibidores de β e γ -secretase reduziu os níveis de $A\beta$, mas apenas o primeiro reduziu a quantidade de GSK3 β ativa e de tau fosforilada. A mesma equipa também observou um número superior de endossomas em neurónios resultantes de culturas de iPSCs de SAD e DIAD.

Em 2013, KONDO *et al.* [46] geraram iPSCs a partir de pacientes com AD com mutações na APP-E693 Δ e APP-V717L. Hipotisaram que a primeira mutação levava à AD de início precoce, mas sem deposição amilóide, enquanto a segunda aumentaria o $A\beta$ extracelular e o *ratio* $A\beta_{42}/A\beta_{40}$. As culturas foram enriquecidas com astrócitos e demonstraram que as da primeira mutação continham $A\beta$ intracelular, devido ao stress oxidativo. A adição de ácido docosa-hexaenóico (DHA) diminuiu o stress oxidativo e a geração de ROS, sem alterar os níveis de $A\beta$. O estudo sugere que o tratamento com DHA pode ser eficaz num subgrupo de doentes de AD.

XU *et al.* [47], a partir de neurónios diferenciados de iPSCs, demonstraram ser possível prevenir a toxicidade mediada por A β através da inibição de cinases dependentes de ciclinas (Cdk). As Cdk, em conjunto com ciclinas parceiras, regulam o ciclo celular, importante nos neurónios. Os autores utilizaram A β 1-42 para induzir apoptose neuronal e posteriormente, com inibidores e shRNAs contra Cdk2 e Cdk4, demonstraram que estes bloqueavam, parcialmente, os efeitos tóxicos mediados pelos peptídeos, diminuindo a morte neuronal.

FONG *et al.* [48] geraram iPSCs com uma mutação na tau-A152T. Através da utilização de ZFNs, criaram linhas isogénicas com a mutação e posterior correção. A mutação referida aumentou o número de fragmentos da tau pela caspase e a sua fosforilação, levando à degeneração axonal. A correção genética da mutação eliminou a proteólise da tau; aumentou 4 a 8 vezes o número de neurónios dopaminérgicos, o que sugere que este tipo de neurónios é extremamente vulnerável à toxicidade provocada pela tau; e modificou a morfologia anormal dos outros tipos de neurónios.

Em 2015, YOUNG *et al.* [49] utilizaram iPSCs derivadas de indivíduos com SAD para elucidar fenótipos associados à variação genética (alelos de risco ou proteção) no gene SORLI, que codifica um fator de tráfego vesicular cujos níveis modulam o processamento de APP. A perda de expressão de SORLI está associada a casos de SAD. [50] Os autores descobriram que os neurónios humanos portadores de variantes SORLI, ao serem tratados com BDNF ou cAMP, aumentaram a expressão de SORLI e diminuíram o processamento de APP. Para determinar se esta diminuição requer a expressão de SORLI, foi feito um *knockdown* do gene e um tratamento posterior com BDNF e cAMP. Observou-se que a diminuição de peptídeos A β foi basicamente anulada em neurónios com haplótipos P (alelos protetores), quando tratados com BDNF; os neurónios tratados com cAMP exibiram redução de A β , o que sugere que a expressão de SORLI é necessária para a diminuição de A β apenas no tratamento com BDNF. Este estudo sugere que o aumento da expressão de SORLI por BDNF pode reduzir o risco de SAD em indivíduos portadores do haplótipo P.

SHI *et al.* [51] dedicaram-se ao estudo de doentes com DS e, como tal, geraram iPSCs a partir destes indivíduos e iPSCs a partir de controlos. Observaram que a linha DS produziu mais A β 40 e A β 42 que a linha controlo e que ao fim de algum tempo de cultura foram detetados agregados de peptídeos, assim como tau fosforilada ao nível intracelular e extracelular apenas nessa linha. Em 2015, MURRAY *et al.* [52] criaram um modelo não integrativo e isogénico de envelhecimento acelerado para neurónios derivados de iPSCs de indivíduos com DS. Os autores relataram que tanto as linhas trissómicas como as de

controle geraram neurónios eletrofisiologicamente ativos, mas só nas primeiras houve um aumento da produção de A β e do número de agregados. Também detetaram aumento no número e no tamanho das mitocôndrias nos neurónios trissómicos, assim como um potencial de membrana mitocondrial diminuído e um aumento de ROS, o que é consistente com estudos anteriores que demonstraram perturbações neste organelo. No mesmo ano, CHANG *et al.* [53] demonstraram o efeito de um composto da *Angelica sinensis* (ginseng), N-Butylidenephthalide (Bdph), na redução de A β 40, nos níveis de tau e na sua fosforilação nos neurónios, sugerindo a sua utilização benéfica no tratamento da AD e DS.

GJONESKA *et al.* [54] demonstraram que os genes da resposta imune são sobre-regulados, em oposição aos genes envolvidos na plasticidade sináptica, aprendizagem e memória que são regulados negativamente na AD, em ratos e humanos. As iPSCs têm sido diferenciadas não só em neurónios, mas também nas várias células da glia de modo a estudar a sua influência na patologia de Alzheimer. OKSANEN *et al.* [55] geraram astrócitos a partir de iPSCs isogénicas de indivíduos com AD com mutação na PSI- $\Delta E9$. Os autores observaram nos astrócitos alguns *halmarks* da patologia, como o aumento da produção de A β , libertação alterada de citocinas, desregulação da homeostase do Ca²⁺, produção de ROS e disfunção mitocondrial. Desta forma, pode-se concluir que os astrócitos contribuem para a produção de A β e também diminuem a sua clearance. Por outro lado, a estimulação inflamatória levou à alteração da libertação de citocinas pelos astrócitos, que foi atenuada pela adição de inibidores da γ -secretase, sugerindo que a resposta inflamatória está relacionada com a patologia A β . A mutação referida fez com que os astrócitos aumentassem a sua função respiratória (aumento de ROS), e diminuíssem a atividade glicolítica, reduzindo a produção de lactato, essencial para a memória e energia dos neurónios. EDSEL *et al.* [56] geraram células da microglia derivadas a partir de iPSCs (iMGLs) com o objetivo de estudar de que forma estímulos externos envolvidos na AD influenciam a fisiologia destas células. As iMGLs libertam uma variedade de citocinas em resposta a estímulos inflamatórios, influenciando ainda mais o ambiente pró-inflamatório do SNC. As próprias placas de A β aumentaram a expressão de genes apoE, TREM2, CD33 e apoJ, implicados na modulação da fagocitose e na clearance de A β . O estudo também demonstrou que as iMGLs fagocitam os peptídeos A β , os oligómeros de tau e terminais sinápticos, sugerindo que as microglias alteradas se tornam ineficazes. Estudos de associação genómica (GWAS) identificaram genes expressos pela microglia que estão associados ao risco de desenvolver DIAD, como o TREM2 e o CD33. São necessários estudos que gerem oligodendrócitos a partir de iPSCs de indivíduos com AD, dado que a disfunção deste tipo celular devido ao ambiente inflamatório

e toxicidade mediada pelos peptídeos A β e pelas tranças neurofibrilares poderá relacionar-se com a perda de mielina, necessária à condução nervosa [57, 58].

Em 2016, BALEZ *et al.* [59] geraram iPSC de indivíduos com SAD e DIAD para avaliar a potencial atividade da apigenina, uma flavona abundante na natureza. Após a adição de apigenina, esta demonstrou atividade neuroprotetora devido à diminuição da frequência de sinais espontâneos de Ca²⁺, à redução significativa de apoptose mediada por caspases e ainda à sua atividade anti-inflamatória, diminuindo a liberação de citocinas e óxido nítrico em células inflamatórias. Este composto apresenta um potencial promissor na terapêutica da AD.

BIRNBAUM *et al.* [60] demonstraram, a partir de células neuronais derivadas de iPSCs de indivíduos com SAD, que a produção de ROS não estava relacionada com os níveis de A β e tau. Isto significa que a função mitocondrial poderá já estar alterada no início da doença, devido a uma sobre-regulação dos complexos da cadeia respiratória, que foi observada nestes doentes.

BROWNJOHN *et al.* [61], através do screening fenotípico de iPSCs, identificaram compostos anti-helmínticos, as avermectinas, que reproduzem os efeitos dos moduladores da γ -secretase (GSMs) sem agir diretamente na enzima. Isto resulta na produção de mais fragmentos curtos de A β , reduzindo assim o número de formas tóxicas. Os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) foram os primeiros GSMs.

Em 2014, ZHANG *et al.* [62] foi um dos grupos pioneiros a demonstrar a utilidade de modelos 3D ao mimetizarem respostas na AD que não eram abordadas em modelos 2D. Através de neurónios diferenciados de iPSCs, os autores elucidaram o envolvimento das cinases P21 (PAKs), associadas a vias de transdução que se refletem na dinâmica do citoesqueleto, na regulação de proteínas da família da actina, como a debrina e a cofilina. Neste modelo, a debrina, importante na morfogénese das espinhas, mostrou-se diminuída, as PAKs demonstraram estar sobre-estimuladas e a produção de A β induziu a sua redistribuição (e da debrina), eventos que não seriam detetados nos modelos convencionais. Em 2015, KIM *et al.* [63] geraram células progenitoras neuronais humanas (hNPCs) num sistema de cultura 3D (matrigel), a partir de uma linhagem de DIAD. Este modelo foi capaz de demonstrar os mecanismos moleculares subjacentes à produção, acumulação e deposição de agregados extracelulares de A β , bem como a hiperfosforilação da tau e sua agregação. Por outro lado, este modelo não fornece informação sobre a microglia, inflamação e danos sinápticos e neuronais. Também não foi “desenhado” para regiões específicas do cérebro mais afetadas na AD como o hipocampo. Ainda assim, o modelo criado conseguiu identificar

os estágios iniciais e mais tardios da doença, o que *per si* já constitui um progresso relevante. Será de extrema importância que os sistemas 3D incluam elementos como a BHE, vascularização e resposta imune, os quais influenciam a doença e, conseqüentemente, a terapêutica.

Recentemente, ESPUNY-CAMACHO *et al.* [64] criaram um modelo quimérico através do transplante de precursores neuronais derivados de hiPSCs num rato com DIAD, com mutações na APP e PSEN1. Os autores observaram uma perda neuronal de 50%, provocada pelas neurites e sinapses aberrantes que rodeiam as placas de A β . Esta degeneração neuronal ocorreu na ausência de emaranhados de tau, que só se formaram posteriormente. Também notaram regulação positiva de genes relacionados com a mielinização e regulação negativa de genes associados à memória, cognição, transmissão sináptica e projeção axonal. Esta abordagem *in vivo* demonstra a importância dos mecanismos fisiopatológicos associados à patologia, constituindo mais um progresso científico.

3.2. Tratamento da patologia

Atualmente existem dois grupos de fármacos disponíveis e aprovados pela Food and Drug Administration (FDA): os inibidores da acetilcolinesterase (donepezilo, rivastigmina e galantamina) e os antagonistas dos recetores N-metil-D-aspartato do glutamato (NMDA) (memantina). Os primeiros aumentam os níveis de acetilcolina nas fendas sinápticas, estimulando a comunicação entre os neurónios, o que melhora os sintomas de demência; os segundos evitam que o glutamato se ligue aos respetivos recetores, impedindo a entrada excessiva que cálcio nas células que provoca toxicidade. Fármacos como os antipsicóticos, antidepressivos e ansiolíticos são associados à terapêutica para melhorar outros sintomas. [34] Surge uma necessidade extrema de terapias eficazes para retardar a doença. Existem vários alvos a atingir: os peptídeos A β , diminuindo a sua produção (inibidores das secretases) ou aumentando a sua clearance; a apoE, diminuindo a sua expressão e bloqueando a sua clivagem e interação com A β ; a tau, inibindo a sua fosforilação, acetilação (diminui o tempo de vida) e agregação; a neuroinflamação; a cascata mitocondrial; e o stress oxidativo. A utilização clínica das iPSCs na AD permite gerar novas células que tenham sido eliminadas ou adquirido uma função anormal durante a progressão da doença, ou ainda servir de vetor para a administração de fármacos, ultrapassando a barreira principal, a BHE.

Foi demonstrado em ratos com oligómeros A β mutantes, mas sem placas, que a estimulação da neurogênese no hipocampo com antagonistas dos recetores de glutamato

metabotrópicos tipo 2/3 evitava défices de comportamento, sendo uma opção terapêutica válida para determinados grupos de doentes. [65]

As hNPCs podem ser diferenciadas em neurónios, astrócitos, microglia e oligodendrócitos maduros e funcionais. Os novos neurónios integram-se na rede neuronal, resgatando as funções cognitivas e melhorando a sinaptogénese. Além disso, a edição de iPSCs permite que possa ser reduzida a expressão de secretases, diminuindo a produção de $A\beta$ e posteriormente a patologia da tau, controlando assim a neuroinflamação. No entanto, este transplante deverá ser efetuado em fases precoces, pois estudos referem que uma neurodegenerescência significativa poderá dificultar a sua sobrevivência. [66] Estudos realizados em ratos sugeriram que o transplante das NPCs melhorou as suas capacidades cognitivas no teste do labirinto aquático de Morris (MWM). O mesmo acontece com as células da glia; estudos com iPSCs sugerem que são os astrócitos mais antigos a produzir citocinas neurotóxicas que agravam a inflamação e induzem a apoptose. A diferenciação em células da glia diminuirá a inflamação na patologia. [67] Outras células importantes envolvidas na inflamação são os macrófagos. Se estes forem derivados a partir das iPSCs, podem expressar também enzimas que degradam o $A\beta$ e controlam o ambiente pró-inflamatório.

As células da eminência ganglionar medial (MGEs) representam uma estrutura onde se localizam e desenvolvem os interneurónios, neurónios que apresentam deficiências em muitos modelos de AD. O seu transplante demonstrou melhorias na aprendizagem e memória em ratos sem expressão de apoE4, representando uma possível terapêutica para alguns indivíduos. [40]

As células estaminais neuronais induzidas (iNSCs) podem ser derivadas de tecidos primários, adultos, ou de ESCs e iPSCs. Estudos demonstraram a sua diferenciação e sobrevivência superior a 6 meses após transplante. Dada a falta de informação relativa a mudanças no comportamento, são necessários mais estudos com este tipo de terapia celular. As iNSCs podem servir de vetores para fornecer agentes terapêuticos, como por exemplo a neprilisina, enzima que degrada $A\beta$, entre outros; ou estimular a libertação de fatores neurotróficos, ajudando a retardar a progressão da doença. [40]

Uma das grandes vantagens das iPSCs consiste na possibilidade de se poder realizar uma terapêutica individualizada e mais dirigida. A intervenção deverá ser diferente consoante a fase clínica da patologia e deverá ter em conta o genótipo de apoE, idade, género, estilo de vida, historial médico e ainda dados resultantes de estudos genómicos, biomarcadores e *brain imaging*. Por exemplo, fármacos em que o alvo é a apoE, podem agir de maneira

diferente em indivíduos com o alelo 4. Desta forma, a partir dos modelos individuais criados com iPSCs específicas, a terapêutica e as atividades não farmacológicas serão ajustadas. [68]

3.3. Ensaios clínicos na Doença de Alzheimer

Os ensaios clínicos realizados em doentes com Alzheimer têm sido efetuados com vários tipos de células estaminais numa abordagem alogénica. O desafio futuro consistirá em realizar abordagens autólogas, através do transplante de iPSCs ou de células derivadas a partir destas.

Atualmente decorrem 17 ensaios clínicos com células estaminais na AD. Apenas 1, na fase de recrutamento, pretende gerar iPSCs a partir de indivíduos com transtornos neurológicos para o estudo dessas doenças e para o desenvolvimento de novas terapias. [69]

O número crescente de ensaios clínicos com células diferenciadas ou progenitoras deverá ser acompanhado com o desenvolvimento de métodos não invasivos para rastrear as células transplantadas e técnicas de imagem precisas que garantam a visualização da sua entrega e o seu acompanhamento ao longo do tempo. A técnica de imagem ideal deverá ser sensível o suficiente para rastrear até uma célula e capaz de quantificar as células em regiões específicas do cérebro, com segurança para os doentes. [65]

O avanço dos ensaios clínicos depende fortemente de uma contínua investigação focada nos mecanismos celulares e moleculares ainda por esclarecer na Doença de Alzheimer, assim como sobre a terapia celular com iPSCs e sua aplicação. Questões como a idade, fase da doença e o tipo celular mais adequado a transplantar em cada caso permanecem por elucidar, embora a genotipagem individual já seja um grande auxílio nesta temática.

D. Limitações, perspetivas futuras e conclusão

Os problemas éticos e técnicos associados às células estaminais limitam a investigação e o desenvolvimento de métodos para a sua aplicação clínica. Relativamente ao *standard gold*, as ASCs são acompanhadas de algumas desvantagens, dadas as suas capacidades inferiores de proliferação e diferenciação, bem como a dificuldade no seu isolamento. Ainda assim, as células estaminais do sangue do cordão umbilical têm sido uma opção crescente em doentes sem dadores de medula óssea, pela sua plasticidade e baixa imunogenicidade, pelo que, estão a ser armazenadas em bancos de criopreservação. [3]

A possibilidade de reprogramar células somáticas em iPSCs, bem como programar a sua diferenciação numa outra linhagem celular supera as desvantagens já referidas das ESCs,

facultando os tratamentos autólogos. As iPSCs representam, sem dúvida, um futuro promissor na compreensão e tratamento de doenças, bem como um auxílio insubstituível no *screening* de fármacos. No entanto, existem ainda uma série de obstáculos que urgem ser explorados e ultrapassados para que as iPSCs se assumam como uma opção terapêutica. Em primeiro lugar, será muito importante desenvolver protocolos laboratoriais universais de obtenção de iPSCs, isto é, a partir da linhagem celular que melhor produz estas células (as células da pele têm demonstrado taxas de reprogramação mais eficientes), escolher o método de reprogramação adequado, incluindo um tempo de cultura reduzido e os fatores de transcrição necessários, e isolar as células totalmente reprogramadas, através da morfologia e marcadores de pluripotência. Como tal, devem ser desenvolvidas técnicas avançadas de detecção e estudados marcadores de pluripotência para que a detecção seja sensível e rápida. Em segundo, a escolha do vetor influencia a eficiência de reprogramação; os vetores integrativos devem ser substituídos por vetores não integrativos, com ou sem o uso de moléculas pequenas, que devem ser explorados de modo a aumentar a eficiência. Em terceiro lugar, as iPSCs devem ser bem caracterizadas (epi)genética e funcionalmente. É necessário uma maior compreensão dos fatores que induzem um aumento da instabilidade genética durante a reprogramação e a cultura das células, bem como a identificação de mutações prejudiciais ao seu desempenho. Abordagens “ômicas” permitem delinear a epigenética, fornecendo pistas que possam melhorar a conversão celular e, até mesmo, desenvolver estratégias que possam controlar algumas das marcas adquiridas. O desenvolvimento de técnicas que gerem iPSCs sem mutações que causem perturbações genéticas, assim como a correção de linhagens celulares de iPSCs através das técnicas de edição de genes, fazem parte do futuro destas células. Em quarto lugar, é importante descodificar se as iPSCs modificadas podem sofrer alguma transformação maligna não visível antes ou depois da diferenciação. Em último lugar, para que as iPSCs sejam transplantadas, é necessário escolher um vetor e uma via/local de administração, consoante o destino terapêutico. É essencial que os investigadores apostem nestas células para que se estabeleçam protocolos seguros, eficazes e com qualidade, desde a escolha do tipo celular para a sua geração até à célula diferenciada pretendida, incluindo a sua administração e manutenção no indivíduo alvo.

Relativamente à AD, é fundamental que se cumpram alguns requisitos para que as iPSCs possam avançar para os ensaios clínicos e, posteriormente, sejam aprovadas como uma opção terapêutica. A criação de modelos com iPSCs continua a ser uma ferramenta útil na AD para o estudo da doença e desenvolvimento de fármacos, dado que ainda se

desconhecem vários mecanismos fisiopatológicos e os fármacos disponíveis são muito pouco eficazes. Os modelos devem ser uma ilustração o mais próxima possível da realidade, através das técnicas tridimensionais, e devem ser completos, de modo a ter em conta o ambiente envolvente, as células que possam interferir na patologia e todos os processos físico-químicos envolvidos. Para o tratamento da doença, a criação de *haplobanks* de iPSCs seria uma boa iniciativa, isto é, um banco de linhas celulares especificamente escolhidas, idealmente tipadas por antígenos leucocitários humanos (HLA), que correspondam ao máximo de destinatários, o que diminuiria a possibilidade de rejeição nos transplantes. A principal vantagem deste banco é a uniformização dos protocolos de obtenção de iPSCs, uma vez que existem diferenças devido aos diversos métodos utilizados nos vários laboratórios. [70] O desenvolvimento de coleções de células de indivíduos afetados com os dois tipos de AD e com as várias predisposições genéticas também auxiliarão na pesquisa de biomarcadores específicos para cada caso, possibilitando a categorização de respondedores e não respondedores, otimizando a terapêutica. A partir da genotipagem individual, é necessário escolher o tipo celular em que as iPSCs devem ser diferenciadas: células progenitoras neuronais, neurónios ou células da glia, estabelecendo protocolos únicos de cultura, técnicas de administração e de rastreamento das células por imagem. Desafios como o armazenamento, distribuição e disponibilização do tratamento, devem ser considerados. Para que o conhecimento científico gerado até ao momento seja transposto para a realidade clínica, para além de todo o esforço no estabelecimento dos vários processos, é necessário uma produção à escala industrial, o que envolveria recursos financeiros e humanos por parte das indústrias farmacêuticas. [65]

A descoberta científica das iPSCs abriu novas oportunidades para os investigadores e a sua transposição para a clínica das várias doenças poderá constituir um marco na história da humanidade, por possibilitar tratamentos até hoje nunca imaginados. A Doença de Alzheimer necessita urgentemente de novas opções terapêuticas capazes de diminuir o número de novos casos e de travar a progressão da doença, pelo que as iPSCs se apresentam como uma estratégia muito promissora.

Referências Bibliográficas

1. Stem Cell Facts. International Society for Stem Cell Research. [Acedido a 2 de Abril de 2018]. Disponível em: <http://www.closerlookatstemcells.org/docs/default-source/patient-resources/stem-cell-facts.pdf?sfvrsn=4>
2. GEPSTEIN, L., SKORECHI, K. - Regenerative Medicine, Cell, and Gene Therapies. In: GOLDMAN, L., SCHAFER, A., Goldman-Cecil Medicine. New York: Elsevier, Inc., 2016, ISBN 978-1-4557-5017-7, 203-213.
3. BRAGANÇA, J., TAVARES, A., BELO, J. – Células estaminais e medicina regenerativa, um admirável mundo novo. Revista da Sociedade Portuguesa de Bioquímica, Canal BQ, 7, 2010.
4. HU, M., TEVLIN, R., WAN, D., LORENZ, H., GURTNER, G., LONGAKER, M. – Stem cells and regenerative medicine. In: GURTNER, G., NELIGAN, P., Plastic Surgery. United States of America: Elsevier, Inc., (2017), ISBN 978-0-3233-5694-7, p. 143-164.
5. TESAR, P.; CHENOWETH, J.; BROOK, F.; DAVIES, T.; EVANS, E.; MACK, D.; GARDNER, R.; MCKAY, R. - New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. Nature. 448 (2007) 196-199.
6. LIU, S., LI, C., XING, Y., TAO, F. – Effect of transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitor cells on adult neurogenesis in aged hippocampus. Am J Stem Cells. 3 (2014) 21-26.
7. KLIMANSKAYA, I., CHUNG, Y., BECHER, S., LU, SJ., LANZA R. - Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. Nature. 444 (2006) 481–485.
8. YU, J., THOMSON, J. - Pluripotent stem cell lines. Genes Dev. 22 (2008), p. 1987-1997.
9. PURI, M., NAGY, A. - Concise Review: Embryonic Stem Cells Versus Induced Pluripotent Stem Cells: The Game Is On. Stem Cells. 30 (2012) 10-14.
10. DAVIS, RL., WEINTRAUB, H., LASSAR, AB. – Expressions of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. Cell. 24 (1987) 987-1000.
11. TAKAHASHI, K., YAMANAKA, S. – Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 126 (2006) 663-676.
12. GURDON, JB. – The cloning of a frog. Development. 140 (2013) 2446-2448.
13. WILMUT, I., SCHNIEKE, A.E, MCWHIR, J., KIND, A.J., CAMPBELL, K.H. – Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature. 385 (1997) 810-813.
14. CHAPARRO, O., BELTRÁN, O. – Reprogramación Nuclear y Células Pluripotentes Inducidas. Revista Med. 17 (2009) 252-263.

- 15.** ANDARGIE, A., TADESSE, F., SHIBBIRU, T., ABABA, A. – Review on Cell Reprogramming: Methods and Applications. *Journal of Medicine, Physiology and Biophysycs.* (2016) 1-10.
- 16.** KANHERKAR, R., BHATIA-DEY, N., MAKAREV, E., CSOKA, A. – Cellular reprogramming for understanding and treating human disease. *Front Cell Dev Biol.* 67 (2014) 1-21.
- 17.** WERNING, M., MEISSNER, A., CASSADY, J.P., JAENISH, R. – c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell.* 2 (2008) 10-12.
- 18.** BRAMBRINK, T., FOREMAN, R., WELSTEAD, G., LENGNER, C., WERNIG, M., SUH, H., JAENISCH, R. – Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell.* 2 (2008) 151-159.
- 19.** HU, K. - All Roads Lead to Induced Pluripotent Stem Cells: The Technologies of iPSC Generation. *Stem Cells Dev.* 23 (2014) 1285-1300.
- 20.** NAKANICHI, M., OTSU, M. – Development of Sendai Virus Vectors and their Potential Applications in Gene Therapy and Regenerative Medicine. *Curr Gene Ther.* 12 (2012) 410-416.
- 21.** FAN, K., ZHANG, S., ZHANG, Y., LU, J., HOLCOMBE, M., ZHANG, X. - A Machine Learning Assisted, Label-free, Non-invasive Approach for Somatic Reprogramming in iPSC Colony Formation Detection and Prediction. *Scientific Reports.* 7 (2017) 1-9.
- 22.** ROBINSON, D., DALEY, G. - The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature.* 481 (2013) 295-305. *Stem Cells Dev.* 23 (2014) 1285-1300.
- 23.** BILIC, J., BELMONTE, J. - Concise Review: Induced Pluripotent Stem Cells Versus Embryonic Stem Cells: Close Enough or Yet Too Far Apart? *Stem Cells.* 30 (2012) 33-41.
- 24.** TURINETTO, V., ORLANDO, L., GIACHINO, C. - Induced Pluripotent Stem Cells: Advances in the Quest for Genetic Stability during Reprogramming Process. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 1-18.
- 25.** KOEHLER, K., TROPEL, P., THEILE, J., KONDO, T., CUMMINS, T., VIVILLE, S., HASHINO, E. - Extended passaging increases the efficiency of neural differentiation from iPSC. *BMC Neuroscience.* 12 (2011) 1-14.
- 26.** DEBOEVER, C., LI, H., BENAGLIO, P., REYNA, J., OLSON, K.M., HUANG, H., BIGGS, W., SANDOVAL, E., D'ANTONIO, M., JEPSEN, K., MATSUI, H., ARIAS, A., REN, B., NARIAI, N., SMITH, E.N., D'ANTONIO-CHRONOWSKA, A., FARLEY, E.K., FRAZER, K.A. - Large-Scale Profiling Reveals the Influence of Genetic Variation on Gene Expression in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 20 (2017) 533-546.

- 27.** PURI, M., NAGY, A. - Concise Review: Embryonic Stem Cells Versus Induced Pluripotent Stem Cells: The Game Is On. *Stem Cells*. 30 (2012) 10-14.
- 28.** MAREI, H., ALTHANI, A., LASHEN, A., CENCIARELLI, C., HASAN, A. - Genetically unmatched human iPSC and ESC exhibit equivalent gene expression and neuronal differentiation potential. *Scientific Reports*. 7 (2017) 1-13.
- 29.** SARAFIAN, R., MORATO-MARQUES, M., BORSOI, J., PEREIRA, L. – Monitoring cell line identity in collections of hiPSCs. *Stem Cell Research*. 28 (2018) 66-70.
- 30.** WU, M., LIU, S., GAO, Y., BAI, H., MACHAIRAKI, V., LI, G., CHEN, T., CHENG, L. – Conditional gene knockout and reconstitution in human iPSCs with an inducible Cas9 system. *Stem Cell Research*. 29 (2018) 6-14.
- 31.** HOCKEMEYER, D., JAENISCH, R. – Induced pluripotent stem cells meet genome editing. *Cell Stem Cell*. 18 (2016) 573-586.
- 32.** GITLER, A., DHILLON, P., SHORTER, J. – Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope. *Dis Model Mech*. 10 (2017) 499-502.
- 33.** HUANG, Y., MUCKE, L. – Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Cell*. 148 (2012) 1204-1222.
- 34.** MASTERS, C., BATEMAN, R., BLENNOW, K., SPERLING, RA., CUMMINGS, J. – Alzheimer’s disease. *Nat Rev Dis Primers*. 15056 (2015) 1-18.
- 35.** SANTANA, I., FARINHA, F., FREITAS, S., RODRIGUES, V., CARVALHO, A. – Epidemiologia da Demência e da Doença de Alzheimer em Portugal: Estimativas da Prevalência e dos Encargos Financeiros com a Medicação. *Acta Med Port*. 28 (2015) 182-188.
- 36.** Health at a Glance 2017: OECD Indicators. Paris, 2017. ISBN: 978-92-64-28040-3. [Acedido a 1 de Agosto de 2018]. Disponível em: https://read.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/health-at-a-glance-2017_health_glance-2017-en#page21
- 37.** LAFERLA, F., GREEN, K., ODDO, S. – Intracellular amyloid-beta in Alzheimer’s disease. *Nat Rev Neurosci*. 8 (2007) 499-509.
- 38.** ZLOKOVIC, BV. – Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer’s disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci*. 12 (2011) 723-738.
- 39.** SELKOE, DJ., HARDY, J. – The amyloid hypothesis of Alzheimer’s disease at 25 years. *EMBO Mol Med*. 8 (2016) 595-608.
- 40.** TONG, LM., FONG, H., HUANG, Y. – Stem Cell therapy for Alzheimer’s Disease and related disorders: current status and future perspectives. *Exp Mol Med*. 47 (2015) 1-8.

41. CASTELLANO, J.M., KLIM, J., STEWART, F.R., JIANG, H., DEMATTOS, R.B., PATTERSON, B.W., FAGAN, A.M., MORRIS, J.C., MAWUENVEGA, K.G., CRUCHAGA, C., GOATE, A.M., BALES, K.R., PAUL, S.M., BATEMAN, R.J., HOLTZMAN, D.M. – Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Sci Transl Med.* 3 (2011) 1-21.
42. BALLATORE, C., LEE, V.M., TROJANOWSKI, J.Q. – Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev. Neurosci.* 8 (2007) 663-672.
43. DUNCAN, T., VALENZUELA, M. – Alzheimer's disease, dementia, and stem cell therapy. *Stem Cell Res Ther.* 8:111 (2017) 1-9.
44. YAGI, T., ITO, D., OKADA, Y., AKAMATSU, W., NIHEI, Y., YOSHIZAKI, T., YAMANAKA, S., OKANO, H., SUZUKI, N. – Modeling Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Human Molecular Genetics.* 23 (2011) 4530-4539.
45. ISRAEL, M., YUAN, S., BARDYM C., REYNA, S., MU, Y., HERRERA, C., HEFFERAN, M., VAN GORP, S., NAZOR, K., BOSCOLO, F., CARSON, C., LAURENT, L., MARSALA, M., GAGE, F., REMES, A., KOO, E., GOLDSTEIN, L. – Probing sporadic and familiar Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature.* 482 (2012) 216-220.
46. KONDO, T., ASAI, M., TSUKITA, K., OHSAWA, Y., IMAMURA, K., EGAWA, N., YAHATA, N., OKITA, K., TAKAHASHI, K., ASAKA, I., AOI, T., WATANABE, K., KADOYA, C., NAKANO, R., WATANABE, D., MARUYAMA, K., HORI, O., HIBINO, S., CHOSCHI, T., NAKAHATA, T., HIOKI, H., NAITOH, M., YOSHIKAWAKI, S., SUZUKI, S., HATA, R., UENO, S., SEKI, T., KOBAYASHI, K., TODA, T., MURAKAMI, K., IRIE, K., KLEIN, W.L., MORI, H., ASADA, T., TAKAHASHI, R., IWATA, N., YAMANAKA, S., INOUE, H. – Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell.* 12 (2013) 487-496.
47. XU, X., LEI, Y., LUO, J., WANG, J., ZHANG, S., YANG, X.J., SUN, M., NUWAYSIR, E., FAN, G., ZHAO, J., LEI, L., ZHONG, Z. – Preventions of β -amyloid induced toxicity in human iPS cell-derived neurons by inhibition of Cyclin-dependent kinases and associated cell cycle events. *Stem Cell Res.* 10 (2013) 213-227.
48. FONG, H., WANG, C., KNOFERLE, J., WALKER, D., BALESTRA, M., TONG, L., LEUNG, L., RING, K., SEELEY, W., KARYDAS, A., KSHIRSAGAR, M., BOXER, A., KOSIK, K., MILLER, B. – Genetic Correction of Tauopathy Phenotypes in Neurons Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 1(2013) 226-234.

49. YOUNG, J.E., BOULANGER-WEILL., J., WILLIAMS D.A., WOODRUFF, G., BUEN, F., REVILLA, A.C., HERRERA, C., ISRAEL, M.A., YUAN, S.H., EDLAND, S.D., GOLDSTEIN, L.S. – Elucidating molecular phenotypes caused by the SORLI Alzheimer's disease genetic risk factor using human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 16 (2015) 373-385.

50. SOLDNER, F., JAENISCH, R. – Dissecting Risk Haplotypes in Sporadic Alzheimer's Disease. *Cell Death Dis*. 6 (2015) 1-13.

51. SHI, Y., KIRWAN, P., SMITH, J., MACLEAN, G., ORKIN, S.H., LIVESEY, F.J. – A human stem cell model of early Alzheimer's disease pathology in Down syndrome. *Sci Transl Med*. 4:124 (2012) 1-23.

52. MURRAY, A., LETOURNEAU, A., CANZONETTA, C., STATHAKI, E., GIMELLI, S., SLOAN-BENA, F., ABREHART, R., LIM, S., BALDO, C., DAGNA-BRICARELLI, F., HANNAN, S., MORTENSEN, M., BALLARD, D., SYNDERCOMBE, C.D., FUSAKI, N., HASEGAWA, M., SMART, T.G., BISHOP, C., ANTONARAKIS, S.E., GROET, J., NIZETIC, D. – Brief report: isogenic induced pluripotent stem cell lines from an adult with mosaic down syndrome model accelerated neuronal ageing and neurodegeneration. *Stem Cells*. 33 (2015) 2077-2084.

53. CHANG, C.Y., CHEN, S.M., LU, H.E., LAI, S.M., LAI, P.S., SHEN, P.W., CHEN, P.Y., SHEN, C.I., HARN, H.J., LIN, S.Z., HWANG, S.M., SU, H.L. – N-butylidenephthalide Attenuates Alzheimer's Disease-Like Cytopathy in Down Syndrome Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons. *Scientific Reports*. 8755 (2015) 1-7.

54. GJONESKA, E., PFENNING, A.R., MATHYS, H., QUON, G., KUNDAJE, A., TSAI, L.H., KELLIS, M. – Conserved epigenomic signals in mice and humans reveal immune basis of Alzheimer's disease. *Nature*. 518 (2015) 365-369.

55. OKSANEN, M., PETERSEN, A.J., NAUMENKO, N., PUTTONEN, K., LEHTONEN, S., GUBERT, M., SHAKIRZYANOVA, A., LESKELA, S., SARAJARVI, T., VIITANEN, M., RINNE, J.O., HILTUNEN, M., HAAPASALO, A., GINIATULLIN, R., TAVI, P., ZHANG, S.C., KANNINEN, K.M., HAMALAINEN, R.H., KOISTINAHO, J. – PSEN1 Mutant iPSC-Derived Model Reveals Severe Astrocyte Pathology in Alzheimer's Disease. *Stem Cell Reports*. 9 (2017) 1885-1897.

56. ABUD, E., RAMIREZ, R., MARTINEZ, E., HEALY, L., NGUYEN, C., NEWMAN, S., YEROMIN, A., SCARFONE, V., MARSH, S., FIMBRES, C., CARAWAY, C., FOTE, G., MADANY, A., AGRAWAL, A., KAYED, R., GYLYS, K., CAHALAN, M., CUMMINGS, B., ANTEL, J., MORTAZAVI, A., CARSON, M., POON, W., BLURTON-JONES, M. – iPSC-

derived human microglia-like cells to study neurological diseases. *Neuron*. 94 (2017) 278-293.

57. CAI, Z., XIAO, M. – Oligodendrocytes and Alzheimer's disease. *Int J Neurosci*. 126 (2016) 97-104.

58. EHRlich, M., MOZAFARI, S., GLATZA, M., STAROST, L., VELYCHKO, S., HALLMANN, A.L., CUI, Q.L., SCHAMBACH, A., KIM, K.P., BACHELIN, C., MARTEYN, A., HARGUS, G., JOHNSON, R.M., ANTEL, J., STERNECKERT, J., ZAEHRES, H., SCHOLER, H.R., BARON-VAN EVERCOOREN, A., KUHLMANN, T. – Rapid and efficient generation of oligodendrocytes from human induced pluripotent stem cells using transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 114 (2017) E2243-E2252.

59. BALEZ, R., STEINER, N., ENGEL, M., MUÑOZ, S., LUM, J., WU, Y., WANG, D., VALLOTTON, P., SACHDEV, P., O'CONNOR, M., SIDHU, K., MUNCH, G., OOI, L. – Neuroprotective effects of apigenin against inflammation, neuronal excitability and apoptosis in an induced pluripotent stem cell model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*. 31450 (2016) 1-16.

60. BIRNBAUM, J.H., WANNER, D., GIETL, A.F., SAAKE, A., KUNDIG, T.M., HOCK, C., NITSCH, R.M., TACKENBERG, C. – Oxidative stress and altered mitochondrial protein expression in the absence of amyloid- β and tau pathology in iPSC-derived neurons from sporadic Alzheimer's disease patients. *Stem Cell Res*. 27 (2018) 121-130.

61. BROWNJOHN, P., SMITH, J., PORTELIUS, E., SERNEELS, L., KVARTSBERG, H., DE STROOPER, B., BLENNOW, K., ZETTERBERG, H., LIVESEY, F. – Phenotypic Screening Identifies Modulators of Amyloid Precursor Protein Processing in Human Stem Cell Models of Alzheimer's Disease. *Stem Cell Reports*. 4 (2017) 870-882.

62. ZHANG, D., PEKKANEN-MATTILA, M., SHAHSAVANI, M., FALK, A., TEIXEIRA, A., HERLAND, A. - A 3D Alzheimer's disease culture model and the induction of P21-activated kinase mediated sensing in iPSC derived neurons. *Biomaterials*. 35 (2014) 1420-1328.

63. KIM, Y.H., CHOI, S.H., D'AVANZO, C., HEBISCH, M., SLIWINSKI, C., BYLYKBASHI, E., WASHICOSKY, K.J., KLEE, J.B., BRUSTLE, O., TANZI, R.E., KIM, D.Y. – A 3D human neural cell culture system for modeling Alzheimer's disease. *Nat Protoc*. 10 (2015) 985-1006.

64. ESPUNY-CAMACHO, I., ARRANZ, A.M., FIERs, M., SNEllINX, A., ANDO, K., MUNCK, S., BONNEFONT, J., CORTHOuT, N., OMODHO, L., VANDEN, E., RADAELLI, E., TESSEUR, I., WRAY, S., EBNETH, A., HARDY, J., LEROY, K., BRION, J.P.,

VANDERHAEGHEN, P., DE STROOPER, B. - Hallmarks of Alzheimer's Disease in Stem-Cell-Derived Human Neurons Transplanted into Mouse Brain. *Neuron* 93 (2017) 1066-1081.

65. HUNSBERGER, J.G., RAO, M., KURTZBERG, J., BULTE, J.W.M., ATALA, A., LAFERLA, F.M., GREELY, H.T., SAWA, A., GANDY, S., SCHNEIDER, L.S., DORAISWAMY, P.M. – Accelerating stem cells trials for Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 15 (2016) 219-230.

66. YANG, J., LI, S., HE, X.B., CHENG, C., LE, W. – Induced pluripotent stem cells in Alzheimer's disease: applications for disease modeling and cell-replacement therapy. *Molecular Neurodegeneration.* 11:39 (2016) 1-11.

67. DEVINENI, A., TOHME, S., KODY, M., COWLEY, R.A., HARRIS, B. – Stepping back to move forward: a current review of iPSCs in the fight against Alzheimer's disease. *Am J Stem Cells.* 5 (2016) 99-106.

68. PENG, X., XING, P., LI, X., QIAN, Y., SONG, F., BAI, Z., HAN, G., LEI, H. – Towards Personalized Intervention for Alzheimer's Disease. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics.* 5 (2016) 289-297.

69. ClinicalTrials.gov. U.S. National Library of Medicine. [Acedido a 10 de Agosto de 2018].
Disponível em:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Alzheimer&term=stem+cell&cntry=&state=&city=&dist=&Search=Search>

70. BARRY, J., HYLLNER, J., STACEY, G., TAYLOR, C., TURNER, M. – Setting Up a Haplobank: Issues and Solutions. *Curr Stem Cell Rep.* 1 (2015) 110-117.