



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Andreia Patrícia Teixeira Ponte da Rocha Cardoso

**Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Apoptose celular induzida pelo peptídeo beta-amiloide na Doença de Alzheimer” referentes à Unidade Curricular “estágio”, sob a orientação da Professora Doutora Maria Celeste Fernandes Lopes e do Dr. Nélío Oliveira, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.**

Setembro de 2020



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Andreia Patrícia Teixeira Ponte da Rocha Cardoso

Relatório de Estágio e Monografia intitulada "Apoptose celular induzida pelo peptídeo beta-amiloide na Doença de Alzheimer" referentes à a Unidade Curricular "Estágio" do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, sob a orientação do Dr. Nélio Oliveira e da Professora Doutora Maria Celeste Fernandes Lopes, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2020

Eu, Andreia Patrícia Teixeira Ponte da Rocha Cardoso, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2014201442, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Apoptose celular induzida pelo peptídeo beta-amiloide na Doença de Alzheimer” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 23 de setembro de 2020.

---

(Andreia Patrícia Teixeira Ponte da Rocha Cardoso)

## AGRADECIMENTOS

Como em qualquer etapa significativa da vida, também nesta fase a meta só é alcançada com o apoio daqueles que nos são mais próximos. Assim, quero expressar, de forma sucinta, a minha gratidão a todos aqueles que direta ou indiretamente permitiram que me fosse possível chegar aqui:

À Professora Doutora Maria Celeste Fernandes Lopes, orientadora desta monografia, por toda a paciência, interesse e disponibilidade dispensadas.

À Dra. Anabela Mascarenhas, por me acolher na sua farmácia e permitir a realização do meu estágio na mesma e por todo o apoio durante todo o percurso.

Ao Dr. Nélio Oliveira, por toda a orientação, acompanhamento e ensinamentos ao longo do estágio.

A toda a equipa da Farmácia Saúde da Figueira da Foz, pela boa disposição, por toda a aprendizagem e por estarem sempre dispostos a ajudar e me permitirem crescer enquanto futura profissional de saúde.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional a todos os níveis e por serem os pilares sem os quais nada disto seria possível.

Aos amigos e colegas, pela disponibilidade e apoio prestados ao longo deste período.

A todos o meu MUITO OBRIGADO!

***“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”***

- Charles Chaplin

## INDICE

### PARTE I - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>8</b>
<b>1 - Enquadramento</b> .....	<b>9</b>
<b>2 - A farmácia</b> .....	<b>10</b>
<b>3 - Análise SWOT</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1 Pontos Fortes</b> .....	<b>10</b>
Constituição da equipa da farmácia .....	10
Dimensão da farmácia e da equipa .....	11
Localização da farmácia .....	11
Promoção de formação constante .....	11
Variedade de serviços prestados pela farmácia .....	12
Sistematização da aprendizagem do estagiário .....	12
Proposta de trabalhos e atividades extra .....	13
Preparação de Medicamentos Manipulados .....	13
Diversidade de produtos de veterinária .....	14
<b>3.2 Pontos Fracos</b> .....	<b>14</b>
Falta de alguns conhecimentos laboratoriais .....	14
Falta de confiança no atendimento .....	14
Falta de informação prática sobre algumas categorias de produtos .....	15
Descrédito do estagiário por parte da comunidade .....	15
<b>3.3 Oportunidades</b> .....	<b>15</b>
SARS-CoV2 – agir sob pressão/ <i>stress</i> .....	15
Solicitação de Medicamentos Sujeitos a Receita Médica - (re)educação para a saúde .....	16
<b>3.4 Ameaças</b> .....	<b>16</b>
Impacto da pandemia no processo de aprendizagem .....	16
Menos oportunidades de formação devido à pandemia .....	17
<b>4 - Casos Práticos</b> .....	<b>18</b>
4.1 Caso I .....	18
4.2 Caso II .....	18
4.3 Caso III .....	19
<b>5 - Considerações Finais</b> .....	<b>20</b>
<b>6 - Anexos</b> .....	<b>21</b>
Anexo I .....	21
Anexo II .....	25
<b>Bibliografia</b> .....	<b>29</b>

### PARTE 2 - “Apoptose celular induzida pelo peptídeo beta-amiloide na Doença de Alzheimer”

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>31</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>32</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>32</b>
<b>1 - Introdução</b> .....	<b>33</b>
<b>2 - Etiologia e fisiopatologia da Doença de Alzheimer</b> .....	<b>34</b>
Doença de Alzheimer Familiar .....	36

Doença de Alzheimer Esporádica .....	36
<b>3 - O processo apoptótico .....</b>	<b>36</b>
<b>4 - Vias de apoptose celular.....</b>	<b>38</b>
Apoptose fisiológica.....	39
Apoptose patológica.....	40
<b>5 - O peptídeo beta-amiloide: origem e funções biológicas.....</b>	<b>40</b>
<b>6 - Vias de síntese do peptídeo amiloide .....</b>	<b>41</b>
Via não-amiloidogénica.....	42
Via amiloidogénica.....	42
<b>7 - Mecanismos de formação dos agregados amiloides.....</b>	<b>43</b>
Mecanismo de agregação das moléculas de peptídeo amiloide em fibrilhas .....	43
Mecanismo de agregação das moléculas de peptídeo amiloide em oligómeros.....	44
<b>8 - Ação patológica do peptídeo amiloide na Doença de Alzheimer .....</b>	<b>45</b>
Mecanismos moleculares de neurotoxicidade .....	45
<b>Indução de stress oxidativo por parte do peptídeo amiloide .....</b>	<b>46</b>
<b>Disfunção sináptica e interação do peptídeo amiloide com recetores sinápticos.....</b>	<b>47</b>
- Recetores do ácido N-metil-D-aspartico.....	47
- Recetores do ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico .....	48
- Recetores colinérgicos.....	49
<b>Disfunção mitocondrial.....</b>	<b>50</b>
<b>Interação do peptídeo amiloide com membranas celulares .....</b>	<b>51</b>
<b>Interferência do peptídeo amiloide em vias de sinalização e interação com recetores não sinápticos.....</b>	<b>52</b>
- Via Wnt/beta-catenina.....	52
- Recetores de insulina.....	53
- Proteínas cinases ativadas por mitogénios.....	53
- Recetores do tipo <i>toll</i> .....	53
<b>Reentrada dos neurónios no ciclo celular.....</b>	<b>54</b>
<b>9 - Substâncias naturais inibidoras da apoptose beta-amiloide induzida .....</b>	<b>55</b>
Salidroside.....	55
Icariina.....	55
Licopeno .....	56
<i>Nelumbo nucifera</i> .....	56
<i>Abelmoschus esculentus</i> .....	56
<b>10 - Fatores endógenos com função neuroprotetora na Doença de Alzheimer .....</b>	<b>57</b>
Humanina.....	57
Clusterina .....	58
<b>11 - Fármacos inibidores da apoptose celular na Doença de Alzheimer .....</b>	<b>58</b>
Memantina.....	59
Butilftalida.....	59
<b>12 - Considerações Finais .....</b>	<b>60</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>62</b>

# Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária



**Farmácia Saúde**

Figueira da Foz

Direção Técnica: Dra. Anabela Mascarenhas

Orientador de Estágio: Dr. Nélio Oliveira

## Lista de Abreviaturas

ANF – Associação Nacional das Farmácias

DGS – Direção Geral de Saúde

FS – Farmácia Saúde

MSRM – Medicamento sujeito a receita médica

RCM – Resumo das Características do Medicamento

TAF – Técnico Auxiliar de Farmácia

TF – Técnico de Farmácia

## I - Enquadramento

A Farmácia Comunitária é o ramo mais visível da profissão do Farmacêutico (Ordem dos Farmacêuticos) e o que permite uma maior proximidade à população.

A Farmácia é, muitas vezes, o primeiro contacto do utente com um profissional de saúde. Este facto salienta-se ainda mais na atual conjuntura do país, em que a generalidade da população receia e evita ao máximo deslocar-se aos Hospitais, Unidades de Saúde Familiar ou Centros de Saúde, devido à Pandemia que atravessamos. Por outro lado, a Farmácia pode também ser interpretada como sendo a última interação que o utente tem com um profissional de saúde antes de ter contacto direto com o medicamento. Isto é, o Farmacêutico é o último interveniente e o intermediário entre o utente e o medicamento, o que reforça a importância do papel do Farmacêutico no aconselhamento e indicação farmacêutica para com o utente.

Contudo e, infelizmente, ainda prevalece na mente de uma parte da população, a ideia errónea de que o Farmacêutico apenas tem como função a venda de produtos relacionados com a saúde. Existe muita desvalorização do papel do Farmacêutico numa Farmácia, das suas capacidades e do impacto que este pode ter no utente. No entanto, a complexidade implicada numa Farmácia e naquele que pode ser interpretado como mais um mero atendimento, vai muito além do que os olhos do outro lado do balcão conseguem ver. O Farmacêutico Comunitário assume-se cada vez mais como “uma unidade imprescindível para o funcionamento completo e sustentável do sistema de saúde” (APEF) através do conjunto de conhecimentos, capacidades e serviços prestados no âmbito de uma Farmácia e, como tal, é nosso dever tentar mudar a perspetiva da comunidade.

Um estágio não pode ser visto como o culminar da formação de um estudante, mas sim o início da formação de um profissional. É no estágio que existe o primeiro contacto com o mundo que é uma Farmácia e só no estágio é que consegue perceber-se que, efetivamente, o trabalho de um farmacêutico vai muito para além de “aviar receitas”.

O meu Estágio Curricular foi realizado na Farmácia Saúde (FS) da Figueira da Foz, sob a Direção Técnica da Dra. Anabela Mascarenhas. O estágio teve a duração de 810h tendo como Orientador o Dr. Nélio Oliveira.

## 2 - A farmácia

A Farmácia Saúde presta serviços à comunidade Figueirense desde 1960, encontrando-se atualmente no Centro Comercial E. Leclerc (*Quem Somos | Farmácia Saúde*).

A FS está aberta todos os dias. O seu horário normal de funcionamento é das 9h às 20h, nos dias úteis, das 9h às 20h aos sábados e das 9h às 13h aos domingos. No entanto, este horário sofreu alterações face à Pandemia de SARS-CoV-2 e considerando a Norma da Direção Geral de Saúde (DGS) nº 003/2020 de 19/03/2020 atualizada a 22/03/2020, passou a funcionar, durante o Estado de Emergência decretado pelo Governo, de segunda-feira a sábado das 9h às 13h e das 14h às 19h, mantendo apenas o horário de domingo (*Norma 003/2020*). Este horário voltou a sofrer alterações com a saída do Estado de Emergência, retornando a um horário semelhante ao normal.

A equipa que constitui a farmácia é vasta, composta por profissionais extremamente capacitados e dinâmicos, todos possuidores de um grande leque de conhecimentos abrangentes, mas tendo, individualmente, um conhecimento mais aprofundado em áreas mais específicas.

## 3 - Análise SWOT

O acrónimo SWOT tem a sua origem nos termos ingleses *Strengths*, *Weaknesses*, *Opportunities* e *Threats*, em português: Forças, Fraquezas, Oportunidades e Ameaças. Esta ferramenta analítica tem vindo a ser muito utilizada como forma de diagnóstico estratégico para empresas por forma a definir objetivos futuros, no entanto este tipo de análise também tem aplicabilidade a outros níveis, como é o presente caso.

As Forças e as Fraquezas, seguidamente designadas de Pontos Fortes e Pontos Fracos, respetivamente, têm por vista uma análise do impacto de fatores internos no meu estágio, enquanto que as Oportunidades e Ameaças resumem o impacto de fatores externos.

### 3.1 Pontos Fortes

#### **Constituição da equipa da farmácia**

A equipa da FS é constituída por um número elevado de elementos, englobando tanto farmacêuticos, como Técnicos de Farmácia (TF) e Técnicos Auxiliares de Farmácia (TAF). Este aspeto, a meu ver, foi o que mais contribuiu para a heterogeneidade de informação e conhecimentos que me foram transmitidos ao longo do meu estágio, pois permitiu-me

contactar com vários profissionais com diferentes formações, opiniões e pontos de vista, o que possibilita uma maior e mais diversificada troca de ideias. O facto de haver um número elevado de profissionais com conhecimentos complementares entre si, permite que haja sempre alguém com um conhecimento mais aprofundado numa determinada área, com o qual se possa tirar dúvidas mais específicas.

### **Dimensão da farmácia e da equipa**

A FS é uma farmácia com dimensões acima do normal da generalidade das farmácias. Isto permite à farmácia albergar praticamente todo o tipo de produtos e uma série de gamas de cada categoria. Isto é uma mais-valia para qualquer estagiário, pois dá a oportunidade de contactar com uma quantidade e variedade de produtos, facto que possivelmente noutra farmácia de menores dimensões, não aconteceria.

Considero que a dimensão da equipa da FS também foi de extrema importância durante o meu estágio, uma vez que, sendo constituída por um grande número de profissionais, permitiu que houvesse sempre alguém disponível para ajudar e tirar dúvidas, mesmo nas horas de maior movimento da farmácia.

### **Localização da farmácia**

A localização privilegiada da FS, num Centro Comercial e numa zona em que não existem mais farmácias, faz com que haja, diariamente, um elevado afluxo populacional. Este facto teve um grande peso no meu estágio, pois permitiu uma diversidade de situações e casos com os quais tive de lidar e aconselhar, influenciando, conseqüentemente, o leque de medicamentos e produtos com os quais pude contactar mais pormenorizadamente e com mais frequência comparativamente a outros.

### **Promoção de formação constante**

Durante todo o estágio foram surgindo inúmeras oportunidades de realizar formações promovidas por alguns laboratórios e marcas, tanto presencialmente (antes da pandemia) como online (durante a pandemia), bem como formações na própria farmácia com profissionais da equipa, e ainda formações dadas por delegados acerca de alguns produtos comercializados. Todas as formações foram bastante enriquecedoras pois permitiram um contacto mais próximo com alguns produtos, melhorando assim a capacidade de aconselhamento e argumentação para com o utente acerca dos mesmos.

### **Variedade de serviços prestados pela farmácia**

Este aspeto está inevitavelmente interligado às dimensões da farmácia e da equipa, pois só nestas condições é que existe possibilidade de implementar um leque tão variado de serviços. Durante o meu estágio tive a oportunidade de acompanhar os serviços de: Preparação Individualizada da Medicação, medições de pressão arterial, glicémia, INR, colesterol total e perfil lipídico, teste rápido de urina (urisis), preparação de medicamentos manipulados, preparação de medicação para os lares com protocolo com a FS, consulta farmacêutica, entrega de medicamentos hospitalares e troca de seringas através do Programa de Troca de Seringas “Diz Não a Uma Seringa em Segunda Mão”. Adicionalmente e, por a FS pertencer ao grupo das Farmácias Abem, tive também oportunidade de contactar com este programa, que permite “aos beneficiários (...) aceder aos medicamentos do mesmo modo que qualquer cidadão comum, assegurando toda a qualidade de serviço e dignidade no atendimento” (Dignidade).

### **Sistematização da aprendizagem do estagiário**

A FS tem uma planificação definida para o percurso dos estagiários durante o estágio. A meu ver, esta organização é essencial e sinto que beneficiei imenso da mesma. No primeiro mês de estágio, acompanhei todo o processo de receção de encomendas e reposição de *stock*, o que acho ser fundamental para contactar com os produtos, conhecer nomes comerciais e começar a associar estes aos princípios ativos. Para além disso, considero também ter sido a melhor forma de interagir pela primeira vez com o sistema informático SIFARMA2000<sup>®</sup> e me adaptar à organização da farmácia e aos sistemas e formas de arrumação dos produtos. Nas duas semanas seguintes, tive oportunidade de acompanhar, apenas numa perspetiva observadora, todos os elementos da equipa da farmácia nos seus atendimentos, o que me permitiu começar a perceber o funcionamento do SIFARMA2000<sup>®</sup> no que diz respeito ao módulo de atendimento, e, principalmente, possibilitou-me começar a ver aplicadas, na prática, algumas questões de indicação farmacêutica e farmacologia, com as quais apenas estava habituada a lidar na teoria até então. Após esses 15 dias a acompanhar atendimentos dos vários profissionais da FS, iniciei-me, sob supervisão, no atendimento e, aos poucos, fui ganhando alguma autonomia. Saliento novamente que, para mim, este percurso faseado é o mais lógico, mais sensato, e o que me permitiu melhor organização mental de toda a informação nova com a qual me deparei ao chegar pela primeira vez ao *BackOffice* de uma farmácia.

### **Proposta de trabalhos e atividades extra**

Durante o meu estágio, a Dra. Anabela Mascarenhas propôs a realização de dois trabalhos escritos, disponíveis para consulta na secção dos Anexos deste relatório. O primeiro trabalho proposto teve por objetivo a elaboração de uma tabela/resumo da informação científica disponível acerca da toma de antibióticos orais com ou sem alimentos, tendo por base os Resumos das Características dos Medicamentos (RCM), para tornar esta informação mais acessível e agilizar a sua consulta. O segundo trabalho proposto foi a realização de um resumo da informação fornecida na Ação de Formação “Coronavírus 2019-nCov - Ameaça sem Fronteiras”, realizada no dia 13/02/2020 a cargo da Delegação do Centro da Associação Nacional das Farmácias (ANF), com o objetivo de fazer chegar posteriormente essa informação a todos os elementos da equipa. Esta iniciativa da Dra. Anabela foi mais uma forma de enriquecer o meu estágio, pois permitiu-me atualizar e sistematizar os meus conhecimentos, no caso do trabalho de pesquisa, e, em relação ao segundo trabalho, obter informação fiável acerca do novo coronavírus, numa fase bastante crítica, o início da pandemia, o que teve uma importância acrescida, tendo em conta que toda a informação foi bastante útil para saber como lidar com o público em relação a este assunto delicado e melindroso, na altura de maior incertezas e inquietudes.

Para além da realização dos trabalhos propostos, a Diretora Técnica permitiu, ainda, que os estagiários participassem ativamente na recolha de dados para realização de um inquérito interno da farmácia. Considero esta experiência relevante e positiva dado que me permitiu começar a interagir com alguns utentes da FS ainda numa fase inicial do meu estágio, e me ensinou a saber abordá-los de uma forma menos académica. Esta oportunidade de contactar com os utentes antes de começar a atender ao balcão, fez com que fosse mais fácil a minha transição para os atendimentos, uma vez que eu já tinha tido um primeiro contacto com algum público antes.

### **Preparação de Medicamentos Manipulados**

A Farmácia Saúde tem, na sua constituição, um laboratório destinado à preparação de medicamentos manipulados que, apesar das suas pequenas dimensões, permite dar resposta à procura crescente desta alternativa terapêutica personalizada, vinda tanto da comunidade como de unidades de saúde como o Hospital Distrital da Figueira da Foz. Esta peculiaridade da FS, que a distingue das outras farmácias do concelho, permitiu-me acompanhar e participar na preparação de fórmulas como cápsulas, maioritariamente de minoxidil, com recurso ao encapsulador semi-automático e ao manual; álcool a 70%; sabões sólidos; cremes e soluções de iodo.

### **Diversidade de produtos de veterinária**

A Farmácia Saúde tem a possibilidade de trabalhar com diversos produtos e gamas direcionadas à saúde animal, tendo também um profissional com formação mais aprofundada nesta área. Estas características possibilitaram-me, durante o meu estágio, aprender diferenças e peculiaridades dos produtos disponíveis na FS, fortalecendo o meu aconselhamento dos mesmos para com o utente e, principalmente, permitiu-me adquirir conhecimentos de produtos de uso veterinário úteis na prática farmacêutica, que vieram complementar a vertente teórica abordada na faculdade.

### **3.2 Pontos Fracos**

#### **Falta de alguns conhecimentos laboratoriais**

Tendo tido o privilégio de estagiar numa farmácia com um serviço de preparação de manipulados em constante crescimento, constatei que a minha formação nesta área é muito geral e pouco abrangente. Possivelmente pelo facto de ser uma vertente um pouco por desenvolver no nosso país, e pouco abraçada pela generalidade das farmácias, por diversos motivos, a formação académica no que toca à manipulação de produtos pelo farmacêutico é um tanto restrita e desenvolvida em poucas unidades curriculares, tendo em conta que há cada vez mais uma maior tendência para a individualização e personalização da medicação.

#### **Falta de confiança no atendimento**

A falta de confiança foi, possivelmente, o ponto fraco com mais impacto no meu percurso de estagiária. No atendimento ao balcão, o farmacêutico é confrontado, diariamente, dezenas de vezes com as mais variadíssimas situações e uma diversidade e heterogeneidade de utentes com questões, pedidos de ajuda e solicitações de opiniões sobre os mais distintos casos, factos perante os quais a resposta e ação do farmacêutico têm de ser quase imediatas. Enquanto estagiária, principalmente nos primeiros atendimentos sozinha, senti uma grande insegurança devida à inexperiência. Apesar de julgar ser normal toda esta insegurança de principiante, senti que as minhas hesitações e incertezas foram muitas vezes, mesmo que de forma involuntária, transmitidas para os utentes, o que dificultou a tarefa de atendimento. Com o tempo fui adquirindo mais confiança, apesar de persistir sempre o receio de cometer algum erro que implicasse alguma consequência para a pessoa do outro lado do balcão.

### **Falta de informação prática sobre algumas categorias de produtos**

Durante os meses de estágio constatei que, apesar de, enquanto farmacêuticos, termos uma formação académica bastante abrangente, falta-nos um pouco a abordagem prática de determinadas matérias. Duas das áreas nas quais senti que me faltavam conhecimentos com utilidade a nível do dia-a-dia de uma farmácia foram a área da suplementação e a área dos produtos de uso veterinário. Apesar de ambos os temas terem sido abordados durante os vários anos do curso, foi feita uma abordagem essencialmente teórica e muito pouco prática. Com o auxílio de todos os profissionais da FS fui ganhando alguns conhecimentos mais práticos nestas e noutras áreas, o que me permitiu contornar esta falha.

### **Descrédito do estagiário por parte da comunidade**

Uma questão que acaba por ocorrer de uma forma um pouco recorrente é o facto de alguns utentes menosprezarem o papel do estagiário. Com maior frequência do que o desejado, surgiram utentes na farmácia que, pelo facto de ser “uma cara nova” ao balcão, ou até por verem a identificação de estagiário, adotaram uma postura logo à partida de defesa e apreensão, mesmo antes de iniciado o atendimento. Muitas outras vezes surgiram manifestações de desconfiança durante o atendimento devido ao rótulo de “estagiário”, interpretado de uma forma pejorativa. Considero estas reações dos utentes um ponto fraco do meu estágio, na medida em que, pela postura adotada, não me permitiram exercer as minhas funções de farmacêutica-estagiária, já que todo o aconselhamento ou indicações dadas por mim eram postas em causa ou até interrompidas por solicitação de “um farmacêutico a sério” no atendimento.

## **3.3 Oportunidades**

### **SARS-CoV2 – agir sob pressão/stress**

A grande evolução da pandemia em que nos encontramos ocorreu na altura em que eu estava a iniciar-me de forma autónoma no atendimento ao balcão. Com o medo instaurado na comunidade, houve a “corrida às farmácias” antes de ser declarado o Estado de Emergência, pelo que foram dias de enorme agitação e confusão na farmácia. Apesar de toda a situação avassaladora e do receio de estar a atender ao público sozinha, sinto que, de certa forma, foi uma maneira de aprender a agir sob pressão, quer pelo facto de a farmácia ter muitos utentes para serem atendidos, quer pelo facto de, enquanto profissionais de saúde, termos de demonstrar e transmitir segurança à comunidade, principalmente na altura descrita (início da pandemia). Assim, considero que, se há algo a retirar de positivo dessa altura tão atribulada, é

a questão de ter ganho alguma capacidade de lidar com o stress mantendo uma postura profissional.

### **Solicitação de Medicamentos Sujeitos a Receita Médica - (re)educação para a saúde**

A frequência com que chegam utentes à farmácia a solicitar MSRM para os quais não têm receita médica, é assustadora. Esta questão sucedeu-se inúmeras vezes com diversas classes de fármacos incluindo, entre outros, benzodiazepinas, antibióticos, analgésicos opioides e corticosteroides. As ausências de receita originavam principalmente de dois fatores: o utente estar habituado a levantar a medicação solicitada noutras farmácias sem receita e, como tal, achar não ser necessário uma prescrição médica, ou, por outro lado, assumir que, por ser um medicamento sem comparticipação, não havia necessidade de apresentar receita (afirmação que muitas vezes era, inclusive, transmitida pelo próprio médico). Apesar do grave problema de ética farmacêutica aqui exposto, considero que esta questão foi uma oportunidade para mim durante o meu estágio, uma vez que, como tive possibilidade de aprender as normas e procedimentos corretos, me permitiu aprender a saber lidar com este tipo de situações e com as reclamações dos utentes, permitindo-me igualmente contribuir, ainda que de forma diminuta e insignificante, para a educação dos mesmos.

## **3.4 Ameaças**

### **Impacto da pandemia no processo de aprendizagem**

Ameaça mais do que evidente, mas que não podia deixar de ser mencionada. A pandemia provocada pelo novo coronavírus foi, sem dúvida, a maior ameaça que tive de enfrentar no meu estágio, na medida em que senti que foi o aspeto que mais condicionou a minha aprendizagem. Apesar dos esforços realizados pela Direção Técnica e por toda a equipa da FS para tentarem minimizar as consequências da pandemia, o facto de o estágio ter sofrido uma interrupção de quase 2 meses teve um impacto bastante negativo na consolidação dos conhecimentos adquiridos até à data da suspensão devido ao Estado de Emergência, uma vez que esta se sucedeu no momento em que eu senti que estava a ganhar alguma autonomia e independência nos atendimentos, que só são conseguidas com a prática contínua e repetição de casos. Mesmo após a retoma do estágio, como qualquer outro serviço, a FS estava igualmente a funcionar com rotatividade de equipas, o que dificultou a recuperação da prática que ficou em suspenso devido à interrupção do estágio, e, da mesma forma, dificultou também a aquisição e consolidação de novos conhecimentos, uma vez que nas semanas em que a equipa

em que eu estava inserida não estava a trabalhar, sucediam-se muitas coisas das quais era difícil estar a par quando retomávamos o trabalho na semana seguinte.

### **Menos oportunidades de formação devido à pandemia**

Como já referido anteriormente, a FS possibilita a toda a equipa, incluindo os estagiários, a constante formação em diversas áreas e aprofundamento dos conhecimentos acerca de determinados produtos e gamas. Contudo, e, mais uma vez, devido à pandemia, sinto que, apesar de tanto a farmácia como os formadores unirem esforços para tentar minimizar o impacto também a este nível, não usufruí destas formações como poderia ter usufruído numa situação normal, uma vez que as formações passaram a ser *online* e, muitas delas, em horário laboral, o que não se sucedia no período pré-pandemia, pois existiam formações presenciais em horário pós-laboral.

De referir ainda que as formações online em determinadas plataformas mais restritas dificultavam ainda o acesso às mesmas por exigirem o número da Carteira Profissional. Estas plataformas, ao estarem disponíveis apenas no momento da formação, tornavam quase impossível a tarefa de contornar esta questão de acesso com o auxílio de um farmacêutico a tempo de assistir à formação por completo.

Pontos Fortes	Pontos Fracos	Oportunidades	Ameaças
<ul style="list-style-type: none"><li>•Características da farmácia e da equipa;</li><li>•Promoção de formação;</li><li>•Variedade de serviços;</li><li>•Sistematização da aprendizagem;</li><li>•Proposta de trabalhos/atividades extra;</li><li>•Preparação de manipulados;</li><li>•Diversidade de produtos veterinários.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>•Falta de conhecimentos laboratoriais;</li><li>•Falta de confiança;</li><li>•Falta de informação prática;</li><li>•Descrédito do estagiário.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>•Agir sob pressão;</li><li>•Solicitação de MSRM - (re)educação para a saúde.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>•Impacto da pandemia na aprendizagem;</li><li>•Menos oportunidades de formação.</li></ul>

Figura I - Esquema resumo da análise SWOT.

## 4 - Casos Práticos

### 4.1 Caso I

Senhora na casa dos 70 anos, dirige-se à farmácia com uma receita onde vinham incluídos um inalador pressurizado e câmara expansora. Após questionar a utente se necessitava de uma explicação sobre a utilização da câmara, esta demonstrou muita preocupação e receio de não saber manusear o novo dispositivo. A utente referiu também que o médico lhe tinha prescrito a câmara expansora por ela sentir dificuldade em fazer uma inspiração lenta e profunda.

Com autorização da senhora, desempacotei a câmara expansora e o inalador, que era igual ao já utilizado, e expliquei todo o procedimento necessário para uma inalação eficaz: sentada ou, preferencialmente de pé, retirar a tampa do inalador, agitar e colocar na câmara, garantindo que o inalador se mantém na posição “L”; expirar o máximo que conseguir e posteriormente selar o bocal da câmara com os lábios; administrar uma dose (um “*puff*”) e respirar normalmente durante, pelo menos, 10 segundos; retirar o inalador da câmara e colocar a tampa e limpar o bocal da câmara.

Após a explicação, a utente perguntou se os dois “*puffs*” que o médico indicou eram para fazer seguidos, ao que eu expliquei que, se tinha que fazer dois “*puffs*”, tinha que repetir todo o processo explicado duas vezes, com um intervalo de 30 segundos entre inalações, e agitando novamente o inalador antes da segunda administração.

A utente pediu ainda para eu repetir a explicação de todo o procedimento para o marido ouvir e ser capaz de acompanhar as inalações em casa. Ao explicar novamente na presença do marido, constatámos que a utente, para além da dificuldade em efetuar uma inspiração lenta e profunda, como tinha mencionado, estava também a realizar uma técnica inalatória errada, uma vez que realizava a expiração inicial para dentro do inalador.

Após todos os esclarecimentos, informei ainda que poderiam dirigir-se de novo à farmácia se surgisse alguma dúvida, e, caso sentissem necessidade, a utente poderia, inclusive, realizar uma inalação no gabinete de atendimento, na presença de um profissional de saúde, para verificar se toda a técnica inalatória estaria a ser executada corretamente.

### 4.2 Caso II

Senhora, cerca de 30 anos, grávida, dirige-se à farmácia para pedir Aerius®. Perguntei à utente se tinha alguma receita, pois o medicamento solicitado é MSRM ao que ela informou que não. Após conversar com a utente verifiquei que ela estava apenas de passagem, pelo que também não iríamos ter nenhum histórico da medicação pedida no sistema informático. A senhora demonstrou grande surpresa por eu lhe ter pedido uma receita, uma vez que nunca se tinha

sucedido em compras anteriores. Para além de o Aerius<sup>®</sup> ser MSRM, o seu uso deve ser evitado na gravidez, por precaução (EMA), motivo que reforça ainda mais a supervisão de um médico para a toma deste medicamento, e nunca a cedência sob a responsabilidade de um farmacêutico. Apesar da admiração, a senhora aceitou que eu lhe facultasse uma alternativa. Após consulta da informação científica dos anti-histamínicos de venda livre (cetirizina e loratadina) bem como do website E-Lactancia, verifiquei que, apesar de haver baixo risco na toma destes anti-histamínicos durante a gravidez, a prescrição em mulheres grávidas deve ser feita com cautela (INFARMED, 2019) e o seu uso deve ser evitado (INFARMED, 2018), à semelhança do que se sucede com o Aerius<sup>®</sup>. Assim, por forma a salvaguardar a saúde e segurança da utente e do bebé, foi-lhe cedido o medicamento homeopático Coryzalia<sup>®</sup>, tradicionalmente utilizado no tratamento de constipações e rinites, e com o qual não são esperados efeitos adversos na gravidez, tendo em conta as elevadas diluições das substâncias homeopáticas (INFARMED, 2018).

### **4.3 Caso III**

Senhora, cerca de 50 anos, desloca-se à farmácia para levantar a medicação do marido, com uma receita por mensagem telefónica. A receita possuía várias unidades do inalador Trelegy Ellipta<sup>®</sup>, composto por Furoato de fluticasona + Brometo de umeclidínio + Vilanterol. Ao perguntar à utente se era a primeira vez que o marido iria utilizar aquele inalador, a senhora não reconheceu o nome. Enquanto a utente telefonava ao marido para lhe perguntar que inalador andava a fazer, consultei a ficha do senhor, pois ele era nosso utente, e verifiquei que o inalador prescrito apenas tinha sido usado por um curto tempo, tendo sido alterado para outro inalador, o Anoro Ellipta<sup>®</sup>, composto por Brometo de umeclidínio + Vilanterol (EMA), em março, sendo o inalador utilizado até ao presente (finais de Junho), após confirmação com o marido da utente. A senhora referiu ainda que o marido não se deu bem com o Trelegy Ellipta<sup>®</sup> por lhe provocar muita tosse, um dos efeitos secundários frequentes deste inalador (EMA). Questionei à senhora se o médico prescritor da receita tinha alertado para a alteração do inalador, ao que a utente esclareceu que a receita foi enviada automaticamente pelo sistema informático dos Serviços Partilhados do Ministério da Saúde, medida em vigor na altura do confinamento, não tendo havido consulta nem qualquer contacto com o médico. Após avaliação da situação e exposição dos factos aos farmacêuticos presentes para obtenção de uma segunda opinião, cedi numa venda suspensa o inalador Anoro Ellipta<sup>®</sup>, uma vez que era a medicação praticada e não houve qualquer informação do médico acerca da troca do inalador.

## 5 - Considerações Finais

Fazendo o balanço do meu percurso na Farmácia Saúde, constato sem dúvida que o estágio foi o momento de aprendizagem mais importante de todo o meu percurso universitário. Após vários anos a ouvir falar dos diversos papéis que o farmacêutico pode desempenhar nas mais distintas áreas albergadas pela sua formação, tive a prova presencial, ao longo destes últimos meses que, efetivamente, um farmacêutico é uma figura de extrema importância na rede de cuidados de saúde da população, já que pode intervir a vários níveis para a saúde e bem-estar da sua comunidade, e é essencial que a classe farmacêutica faça por ver reconhecido o devido valor.

Cada dia do meu estágio contribuiu de uma forma desmedida para a minha aprendizagem e crescimento enquanto aluna e futura profissional, e só graças a esta experiência, e às pessoas e profissionais que me proporcionaram, é que pude vivenciar a complexidade do mundo real de um farmacêutico e das suas diversas valências.

Resta-me demonstrar novamente o meu sincero agradecimento à Dra. Anabela Mascarenhas, ao Dr. Nélio Oliveira e a todos os elementos da grande equipa que é a Farmácia Saúde, por me terem proporcionado um estágio tão enriquecedor a todos os níveis.

## 6 - Anexos

### Anexo I

Resumo da Ação de Formação "**Coronavírus 2019-nCov - Ameaça sem Fronteiras**", realizada no dia 13/02/2020 a cargo da Delegação do Centro da ANF. Trabalho elaborado a pedido da Direção Técnica da FS, para posterior divulgação à restante equipa.

(Trabalho realizado pelas estagiárias: Ana Cardoso, Andreia Cardoso e Marta Matias)

### CORONAVÍRUS

#### O que é?

Vírus com o maior ANR simples conhecido na natureza. Semelhante em, aproximadamente, 79% ao SARS-CoV e aproximadamente 50% com o MERS-CoV.

Site para consultar a evolução dos casos: Johns Hopkins CSSE

CoVID-19 – doença

SARS-CoV-2 – vírus causador do CoVID-19

#### Transmissão

Gotículas respiratórias ( $>5 \mu\text{m}$ ) => não ficam suspensas no ar, depositam-se nas superfícies. Supõe-se que o vírus resista aproximadamente 3h em meio seco e muito mais em meio húmido.

O único caso em que se formam partículas (que ficam suspensas no ar durante longos períodos e percorrem longas distâncias) é nas aspirações das secreções realizadas a nível hospitalar.

#### Meios de transmissão:

- Pessoa a pessoa (principal);
- Outros observados, mas por confirmar: fecal-oral, fómites e transmissão vertical.

Ainda não se sabe se a transmissão ocorre através de pessoas assintomáticas.

**Número médio de novos casos originados a partir de um caso primário (R0): 2-3.**

É expectável que este valor vá sendo atualizado ao longo do tempo e depende de vários fatores.

**Período de incubação:** 3-7 dias, máximo 14 (o valor de 24 dias que se fala foi baseado num estudo não fiável tendo em conta os métodos matemáticos usados)

## Categorias da doença

- Ligeira
- Pneumonia
- Pneumonia grave

Nas crianças a doença poderá ter um quadro ligeiramente diferente.

Um dos problemas é a possibilidade de os doentes poderem contrair uma infeção secundária bacteriana.

## Evolução da doença



ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome) em 18-20% dos casos.

Necessidade de internamento na UCI em 25% dos casos.

Um estudo estima a letalidade em 18% para casos diagnosticados em Hubei e de 1.2-5.6% em viajantes fora da China continental, com um valor geral para todas as infeções (assintomáticas e sintomáticas) de aproximadamente 1% (IC 95% - 0,5-4%).

## Definição de caso suspeito

Vai variar sempre.

A DGS adotou a definição da OMS.

Caso suspeito segundo OMS (e DGS)

Doente com infeção respiratória aguda grave (febre, tosse, e que necessite de admissão hospitalar)

**E** Sem outra etiologia que explique a apresentação clínica **E** Com história de viagem ou residência na china nos 14 dias que antecederam o início de sintomas

**OU**

Um doente com qualquer doença respiratória aguda **E** Pelo menos um dos seguintes critérios presentes nos 14 dias que antecederam o início dos sintomas:

A – tenha tido contacto próximo com um caso confirmado ou suspeita de infeção por SARS-CoV-2 **OU**

B – tenha trabalhado ou visitado uma unidade de prestação de cuidados de saúde onde estavam a ser tratados casos confirmados ou provados de doença respiratória aguda por SARS-CoV-2.

### **Caso suspeito segundo a ECDC**

Doentes com infeção respiratória aguda (início súbito de pelo menos um dos seguintes: tosse, odinofagia, dispneia) com necessidade, ou não, de hospitalização,

**E** Nos 14 dias que antecederam o início dos sintomas, tenham tido pelo menos uma das seguintes ligações epidemiológicas: contacto próximo com um caso confirmado ou provável de infeção por SARS-CoV-2 **OU** tenham viajado para áreas com transmissão de SARS-CoV-2 **OU** tenham trabalhado ou visitado unidades de prestação de cuidados de saúde onde estavam a ser tratados doentes com infeção por SARS-CoV-2.

### **Definição de “contacto próximo” – ECDC**

- Pessoa que coabite com caso infetado por SARS-CoV-2;
- Pessoa com contacto cara-a-cara ou que tenha partilhado ambientes fechados com caso de 2019-nCov;
- Profissional de saúde ou outra pessoa prestadora de cuidados diretos a caso confirmado de 2019-nCov, ou trabalhadores laboratoriais que lidem com amostras biológicas de SARS-CoV-2;
- AVIÕES – pessoas que tenham estado sentadas até 2 lugares (em qualquer direção) ao lado de um caso confirmado de SARS-CoV-2. Pessoas que tenham prestado cuidados ou membros da companhia aérea que tenham servido na secção do avião onde o caso índice se encontrava sentado. Se a gravidade de sintomas ou deslocação do caso índice do avião justificarem, todas as pessoas a bordo do avião podem ser consideradas contacto próximo.

### **Testes de Diagnóstico**

Diagnóstico na China: deixou de ser laboratorial e passou a ser clínico → levou a um crescimento abrupto do do nº de casos de um dia para o outro - 20000 casos num dia.

### **Critérios de Diagnóstico clínico:**

Pneumonia visível em raio-X com sintomas: febre, dispneia, infiltrados pulmonares bilaterais, tosse seca.

Atualmente, em Portugal, os testes são feitos no Instituto Nacional Ricardo Jorge, mas já há instituições privadas a realizá-los. Em Portugal o diagnóstico ainda se baseia em testes laboratoriais. Segundo a OMS deve ser feita colheita de amostra quer do trato respiratório superior (nasofaringe e/ou orofaringe) e trato respiratório inferior (expectoração espontânea, aspirado endotraqueal ou lavado brônquico/broncoalveolar) e pesquisa do SARS-CoV-2 por RT-PCR.

### **Tratamento**

O tratamento baseia-se em tratamento de suporte e prevenção e tratamento de complicações. Tratamento etiotrópico: não existe evidência a partir de estudos clínicos randomizados controlados que resulte na recomendação do uso de tratamentos antivíricos específicos para infeções pelo SARS-CoV-2.

Existem vários antivíricos com atividade in-vitro:

- a) uso isolado ou combinação de interferão, ribavirina e inibidores da protease;
- b) remdesivir (um pró fármaco de um antivírico de largo espectro análogo nucleosídico que inibe a ARN polimerase ARN dependente)

## **NECESSIDADE URGENTE DE ENSAIOS CLÍNICOS DE DIMENSÃO E QUALIDADE SUFICIENTE!**

### **Prevenção**

É essencial conhecer a dinâmica da transmissão do SARS-CoV-2 para adaptar as medidas de prevenção e controlo da infeção.

#### **Formas de prevenção:**

Redução de contactos: quarentena, recolher obrigatório e/ou fecho de escolas.

Diminuir a eficácia dos contactos: máscaras, EPI, higiene e isolamento.

Diminuir o número de susceptíveis: vacinação.

Reduzir o tempo de infecciosidade: antivirais, antibióticos e/ou quarentena/isolamento.

### **Risco**

ECDC declarou que neste momento o risco na EU + Reino Unido é **BAIXO**.

Há aproximadamente 200 casos confirmados na Europa e quase não há casos graves.

## Anexo II

Trabalho proposto pela Diretora Técnica da FS: elaboração de uma tabela/resumo sobre a toma de antibióticos com ou sem alimentos

(Trabalho realizado pelas estagiárias Andreia Cardoso e Marta Matias)

Classes Antibióticas	Antibiótico Princípio Ativo	Formulação	Administração		Observações	
			Alimentos			
			Jejum	Com		
Penicilinas	Aminopenicilinas	Pó para suspensão oral	X	X		
		Cápsulas				
		Comprimidos				
		Comprimidos dispersíveis				
	Isoxazolilpenicilinas	Flucloxacilina	Pó para suspensão/solução oral	X		
			Cápsulas	X		
Amidinopenicilinas	Pivmecilinam	Comprimidos (R)		X		
Cefalosporinas	1ª geração	Cefatrizina	X	X		
		Cefradina	Pó para suspensão oral	X	X	
	Cápsulas					
	Comprimidos (R)					
	2ª geração	Cefaclor	Pó/Granulado para suspensão oral	X	X	“O Cefclor é bem absorvido após administração oral, em indivíduos em jejum. A absorção total não se altera na presença de alimentos; no entanto os níveis de pico no plasma ficam reduzidos em cerca de metade e o pico é atrasado.” (in RCM)
			Cápsulas			
Comprimidos de L.M.			X		“O CECLOR RETARD é administrado por via oral, sendo bem absorvido quer tomado durante ou fora das refeições. Contudo, a absorção é aumentada quando administrado com	

						alimentos. Os comprimidos de CECLOR RETARD não devem ser partidos, esmagados ou mastigados.” (in RCM)
		Cefeprozil	Pó para suspensão oral	X	X	
			Comprimidos			
		Cefuroxima	Granulado para suspensão oral		X	A absorção aumenta com alimentos.
			Comprimidos (R)			
	3ª geração	Cefixima	Pó para suspensão oral	X	X	
			Comprimidos (R)			
Associações de penicilinas com inibidores das lactamases beta		Amoxicilina + Ácido Clavulânico	Pó para suspensão oral		X	Sempre que possível no <b>início da refeição</b> .
			Comprimidos dispersíveis			
			Comprimidos (R)			
Tetraciclina		Doxiciclina	Comprimidos dispersíveis		X	
			Cápsulas de L.M.		X	
		Minociclina	Cápsulas	X		“A absorção das formulações orais de Minociclina é <b>afetada pelos alimentos</b> , leite e outros produtos alimentares.” (in RCM)
			Comprimidos (R)			
Aminoglicosídeos		Bacitracina + Neomicina	Comprimidos		X	
Macrólidos		Azitromicina	Pó para suspensão oral	X		
			Comprimidos (R)	X	X	
		Claritromicina	Granulado para suspensão oral	X	X	
			Comprimidos (R)	X	X	
			Comprimidos L.M. ou L.P.		X	

	Eritromicina	Granulado para suspensão oral	X	X	
		Comprimidos (R)			
	Espiramicina	Comprimidos (R)	X	X	“A absorção da espiramicina é rápida (tempo de semiabsorção = 20 minutos) mas incompleta. Não é alterada pela ingestão de alimentos.” (in RCM)
Sulfonamidas e suas associações	Sulfadiazina	Comprimidos		X	“Tomar Labdiazina com alimentos e bebidas. Não são conhecidas quaisquer interações da sulfadiazina com alimentos ou bebidas.” (in FI)
	Sulfametoxazol + Trimetoprim	Xarope		X	“O xarope deve tomar-se de preferência à noite, após a última refeição ou ao deitar.” (in RCM)
		Comprimidos		X	Preferencialmente após as refeições.
Quinolonas	Ciprofloxacina	Comprimido (R)	X	X	“Podem ser tomados independentemente da hora das refeições. Se forem tomados com o estômago vazio, a substância ativa é absorvida mais rapidamente.” (in RCM) “O cálcio dietético, como parte integrante de uma refeição normal, não afeta significativamente a absorção. No entanto, a administração concomitante de apenas produtos lácteos ou bebidas suplementadas com minerais (ex. leite, iogurte, sumo de laranja suplementado com cálcio) com ciprofloxacina deve ser evitada, uma vez que a absorção da ciprofloxacina pode ser reduzida.” (in RCM)
		Cápsulas			
	Levofloxacina	Comprimidos (R)	X	X	“Os comprimidos de Levofloxacina devem ser tomados pelo menos 2 horas antes ou após a administração de sais de ferro, sais de zinco, antiácidos com magnésio ou alumínio, didanosina (apenas formulações de didanosina com alumínio ou magnésio e com um tampão) e sucralfato, dado que pode ocorrer uma redução da absorção.”
	Moxifloxacina	Comprimidos (R)	X	X	
	Norfloxacina	Comprimidos (R)	X		Atenção! Antiácidos, sucralfato, multivitamínicos ou suplementos contendo ferro, zinco, magnésio ou alumínio devem ser tomados 2 horas antes ou depois da administração de Norfloxacina. Não administrar junto! (in Drugs.com)

	Ofloxacina	Comprimidos (R)	X	X	“ O cálcio dietético, como parte integrante de uma refeição normal, não afeta significativamente a absorção. No entanto, a administração concomitante de apenas produtos lácteos ou bebidas suplementadas com minerais (ex. leite, iogurte, sumo de laranja suplementado com cálcio) com ciprofloxacina deve ser evitada, uma vez que a absorção da ciprofloxacina pode ser reduzida.” (in RCM)
	Prulifloxacina	Comprimidos (R)	X		
Outros Antibacterianos	Ácido Fusídico	Comprimidos (R)		X	
	Clindamicina	Cápsulas	X	X	
	Fosfomicina	Granulado para solução oral	X		Recomenda-se a administração depois de ter esvaziado a bexiga.
	Metronidazol	Comprimidos (R)		X	“Os doentes devem ser advertidos no sentido de não ingerirem álcool durante o tratamento com metronidazol e durante pelo menos um dia após o concluírem, devido à possibilidade de uma reação tipo dissulfiram (efeito antabus: rubor, cólicas abdominais, vômitos e taquicardia).” (in RCM)
	Rifaximina	Comprimidos (R)	X	X	
	Subcitrato de bismuto potássico + Metronidazol + Tetraciclina	Cápsulas		X	Ver Metronidazol.
Antituberculosos	Etambutol	Comprimidos		X	“Tende-se em regra a dar a dose diária de uma só vez, depois do pequeno-almoço.” (in RCM)
	Pirazinamida	Cápsulas			???
	Rifampicina	Suspensão oral	X		
Cápsula					

(R) – Comprimidos revestidos ou revestidos por película; L.M. – Liberação Modificada; L.P. – Liberação Prolongada

## Bibliografia

APEF - **Farmácia Comunitária – APEF** [Consult. 18 ago. 2020]. Disponível em: <http://apef.pt/farmacia-comunitaria/>

DIGNITUDE, Abem - **Farmacias abem – Abem Dignitude** [Consult. 29 ago. 2020]. Disponível em: <https://abem.dignitude.org/farmacias-abem/>

EMA - **Resumo das Características do Medicamento (RCM) Aerius** [Consult. 11 ago. 2020]. Disponível em: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/aerius-epar-product-information\\_pt.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/aerius-epar-product-information_pt.pdf)

EMA - **Resumo das Características do Medicamento (RCM) Anoro Allipta** [Consult. 11 ago. 2020]. Disponível em: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/anoro-ellipta-epar-product-information\\_pt.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/anoro-ellipta-epar-product-information_pt.pdf)

EMA - **Resumo das Características do Medicamento (RCM) Trelegy Eliipta** [Consult. 11 ago. 2020]. Disponível em: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/trelegy-ellipta-epar-product-information\\_pt.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/trelegy-ellipta-epar-product-information_pt.pdf)

INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento (RCM) Claritine**, atual. 2018. [Consult. 11 ago. 2020]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>

INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento (RCM) Coryzalia**, atual. 2018. [Consult. 11 ago. 2020]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>

INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento (RCM) Zyrtec**, atual. 2019. [Consult. 11 ago. 2020]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>

**Norma 003/2020** - [Consult. 24 abr. 2020]. Disponível em: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0032020-de-19032020-pdf>

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Farmácia Comunitária - Áreas Profissionais - Ordem dos Farmacêuticos** [Consult. 18 ago. 2020]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/>

**Quem Somos | Farmácia Saúde** - [Consult. 24 abr. 2020]. Disponível em: <https://farmaciasaude.pt/quem-somos/>

# Monografia

## “Apoptose celular induzida pelo peptídeo beta-amiloide na Doença de Alzheimer”

Orientadora: Professora Doutora Maria Celeste Fernandes Lopes

## Lista de Abreviaturas

- Akt - proteína cinase B
- AMP - adenosina monofosfato
- AMPA<sub>r</sub> - recetor do ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
- APAF-1 - apoptotic protease activating factor 1
- ApoE4 - apolipoproteína E
- APP - amyloid precursor protein/proteína precursora amiloide
- ATP - adenosina trifosfato
- A $\beta$  - amyloid-beta/ beta-amiloide
- Bax - Proteína X associada a Bcl-2
- Bcl-2 - linfoma de células B
- BID - BH3 interacting-domain death agonist
- DA - Doença de Alzheimer
- DAE - Doença de Alzheimer Esporádica
- DAF - Doença de Alzheimer Familiar
- DNA - ácido desoxirribonucleico
- FADD - Fas-associated death domain protein
- JNK - c-Jun N-terminal kinases
- LTD - long-term depression/depressão a longo-termo
- MAPK - proteínas cinases ativadas por mitogénios
- Met35 - resíduo de metionina na posição 35
- MOMP - mitochondrial outer membrane permeabilization
- mPTP - poro de transição de permeabilidade mitocondrial
- mRNA - RNA mensageiro
- NFT - neurofibrillary tangles/emaranhados neurofibrilares
- NMDA - ácido N-metil-D-aspártico
- NMDA<sub>r</sub> - recetor do ácido N-metil-D-aspártico
- PSEN1 - presenilina 1
- PSEN2 - presenilina 2
- RE - retículo endoplasmático
- ROS - espécies reativas de oxigénio
- SNC - sistema nervoso central
- TNF - fator de necrose tumoral

## Resumo

A Doença de Alzheimer é uma patologia neurodegenerativa com uma incidência crescente na população moderna. Clinicamente, esta doença manifesta-se através do declínio gradual da memória e de outras funções cognitivas, em consequência de danos provocados por variados fatores, salientando-se como um dos mais preponderantes a deposição de placas neuríticas a nível intracelular e extracelular. À escala fisiológica, este aglomerado proteico gera uma série de vias de neurotoxicidade que culminam com a indução apoptótica neuronal, mecanismo responsável pelos sintomas neurológicos característicos desta patologia. Desta forma, a inibição da apoptose celular na Doença de Alzheimer apresenta-se como um alvo promissor no que diz respeito à diminuição da sintomatologia e retardamento da progressão da doença, com consequente melhoria da qualidade e esperança média de vida do paciente.

**Palavras-chave:** Alzheimer, beta-amiloide, apoptose, inibição, demência.

## Abstract

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease with an increasing incidence in the modern population. Clinically, this pathology manifests itself through the gradual decline of memory and other cognitive functions, damage caused by various factors, with the deposition of beta-amyloid peptide plaques at the intracellular and extracellular level being one of the most prevalent. At the physiological scale, this protein aggregates generate a series of neurotoxicity mechanisms that culminate in neuronal apoptotic induction, the origin for the neurological symptoms characteristic of this pathology. Thus, the inhibition of cell apoptosis in Alzheimer's Disease presents itself as a promising target to decreasing the symptoms and delaying the progression of the disease, with a consequent improvement in the quality and average life expectancy of the patient.

**Keywords:** Alzheimer, amyloid-beta, apoptosis, inhibition, dementia.

## I - Introdução

A Doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência e constitui cerca de 50% a 70% da totalidade dos casos, sendo uma das patologias deletérias neurodegenerativas cada vez mais incidente na população geriátrica. Apresenta-se como uma ameaça preocupante nos países desenvolvidos, onde a esperança média de vida tende a crescer, aumentando a probabilidade de novos casos desta doença e os custos anuais nos sistemas de saúde (Obulesu e Lakshmi, 2014). Decorrente tanto de causas genéticas como ambientais (Dorszewska *et al.*, 2016), esta patologia caracteriza-se maioritariamente pela acumulação no cérebro de placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares (NFTs) de proteína tau hiperfosforilada. Estas modificações fisiológicas estão associadas à perda da função sináptica e neurodegeneração, que conduzirão eventualmente à alteração da memória e restantes funções cognitivas (Gu *et al.*, 2018) como a atenção, concentração, linguagem e pensamento. Assim, esta deterioração irá afetar o comportamento, personalidade e capacidade funcional da pessoa, dificultando a realização das suas atividades diárias e pondo em causa a sua autonomia e qualidade de vida.

Apesar de a DA ter vindo a ser estudada desde 1906, as suas causas exatas e mecanismos fisiopatológicos permanecem por clarificar (Liu *et al.*, 2020). Estima-se que cerca de 30 milhões de indivíduos sejam afetados globalmente, e que pelo ano de 2050 este número exceda as 1,315 milhões de pessoas (Alzheimer's Association, 2015). Este dado, acrescentado ao facto de não haver nenhum tratamento efetivo contra a progressão da DA, potenciam a necessidade urgente da compreensão mecanística desta doença progressiva e incurável (Müller *et al.*, 2008). De notar ainda que, retardando a idade de início da DA, seria possível diminuir o número de casos totais num valor de 9 milhões, pelo ano 2050. Assim, é imperativo aumentar os esforços no que toca a estratégias terapêuticas e preventivas, não só para curar, como também para retardar o surgimento da patologia (Vélez *et al.*, 2019).

A apoptose, processo biológico essencial na fisiologia normal e renovação celular, é uma forma de morte celular impulsionada pela ativação de um programa intrínseco deliberadamente invocado pela célula, em resposta a sinais ambientais ou associados ao próprio desenvolvimento. Este mecanismo, quando sob a influência de determinados fatores, sendo um exemplo o peptídeo beta-amiloide, conduz a desordens deletérias neurodegenerativas como a DA.

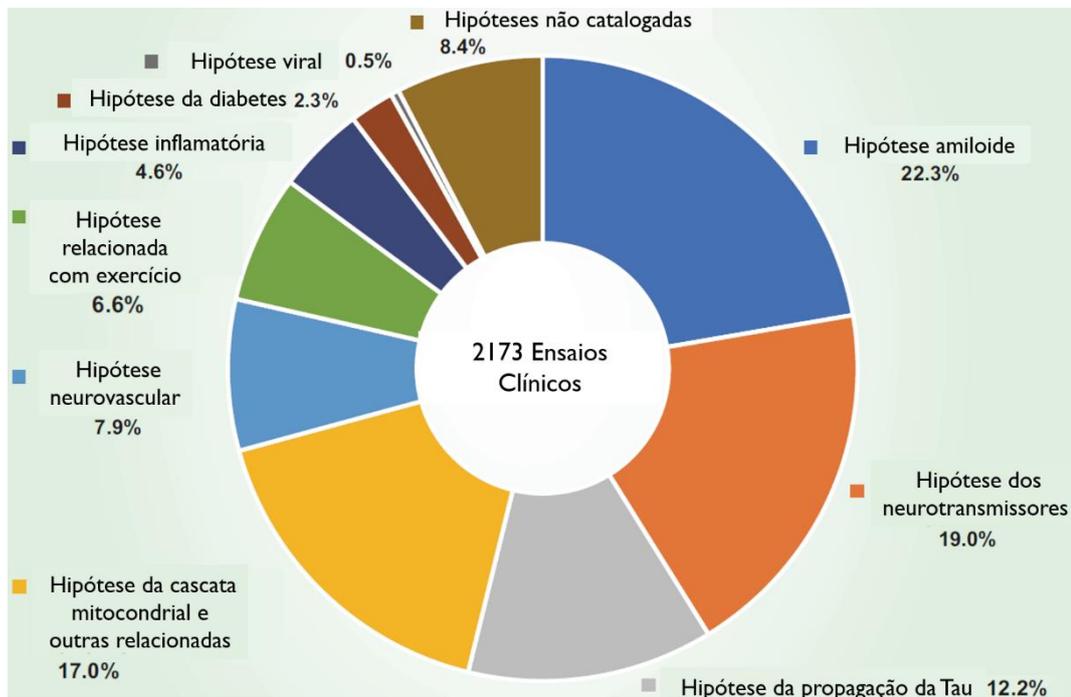
Estudos recentes realizados em linhas celulares de neurónios expostos ao peptídeo beta-amiloide, o componente maioritário das placas neuríticas, mostraram que estes sofrem morte

celular apoptótica, o que sugere novamente que o mecanismo de apoptose é um dos mecanismos conducentes à neurodegeneração na DA (Zhao *et al.*, 2016).

## 2 - Etiologia e fisiopatologia da Doença de Alzheimer

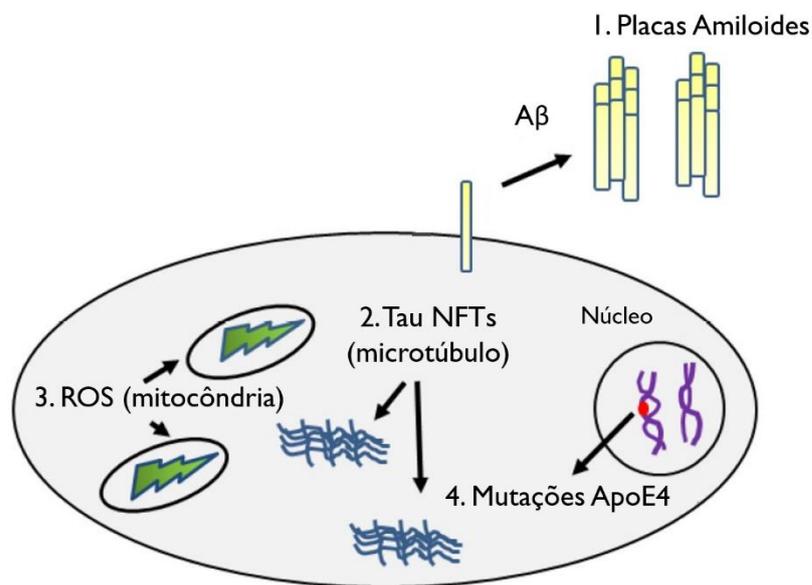
A Doença de Alzheimer é uma doença multifatorial clinicamente caracterizada por deterioração cognitiva progressiva incluindo memória, discernimento e fala (Lindeboom and Weinstein, 2004). Ao perceber um compromisso da independência na realização de atividades diárias, que inicialmente podem cingir-se a exemplos como falhar compromissos agendados ou problemas em recordar onde são colocados objetos pessoais, concomitantemente com a perda de memória em maior escala do que a esperada para a idade e educação do indivíduo, está a atravessar-se a barreira da demência/DA (Shea *et al.*, 2020). Clinicamente, considera-se a perda de memória como o sintoma mais proeminente, estando este correlacionado com a perda neuronal na região do hipocampo. Com o avançar da patologia, esta perda de células neuronais surge também no córtex frontal e outras regiões corticais e subcorticais, contribuindo para a severidade da doença (Chi, Chang e Sang, 2018). Em alguns pacientes os primeiros sintomas podem ser atípicos e manifestar-se a nível da perceção visual e espacial, dificuldade em encontrar palavras, défice da memória de trabalho e problemas comportamentais. Para além dos efeitos na memória, podem desenvolver-se sinais como desorientação espacial, apraxia (incapacidade de executar determinado movimento, independentemente da vontade e habilidade do executor), disfagia e perda de apetite, alterações de humor, irritabilidade, agitação, confusão, perturbações do sono e apatia (Shea *et al.*, 2020).

Têm vindo a ser estudadas várias hipóteses para a etiologia da DA. Até 2019 realizaram-se 2173 ensaios clínicos com o objetivo de testar um total de 10 categorias de hipóteses, sendo elas, por ordem decrescente de percentagem de estudos: hipótese amiloide, hipótese dos neurotransmissores, hipótese da cascata mitocondrial e outras relacionadas, hipótese da propagação da Tau, hipóteses não catalogadas, hipótese neurovascular, hipótese relacionada com exercício, hipótese inflamatória, hipótese da diabetes e hipótese viral (Liu *et al.*, 2019).



**Figura 1** - Percentagem de ensaios clínicos para as várias hipóteses da Doença de Alzheimer. Adaptado de (Liu et al., 2019).

De uma perspectiva geral, a etiologia desta doença envolve stress oxidativo, deposição cerebral extracelular e intracelular de placas neuríticas e de emaranhados neurofibrilares intracelulares (NFTs) de formas hiperfosforiladas de proteína tau, neurotoxicidade mediada por metais, mutações nos genes e apoptose (Obulesu e Lakshmi, 2014). Decorrente destas alterações fisiológicas dá-se o processo de degeneração sináptica e morte de certas populações de células nervosas. Para além disso, estas mudanças são frequentemente acompanhadas de inflamação pronunciada das regiões cerebrais afetadas.



**Figura 2** - Esquema de alterações celulares implicadas na Doença de Alzheimer. ROS – espécies reativas de oxigénio; ApoE4 – apolipoproteína E; NFT's – emaranhados neurofibrilares; Aβ – peptídeo beta-amiloide. Adaptado de (Deshpande, Gogia e Singh, 2019).

A DA possui causas genéticas (70%) e ambientais (30%), como dieta, exposição toxicológica e fatores hormonais. Entre os fatores genéticos existem genes associados a história familiar (Doença de Alzheimer Familiar - DAF) e doença esporádica (Doença de Alzheimer Esporádica - DAE) (Dorszewska *et al.*, 2016).

### **Doença de Alzheimer Familiar**

A Doença de Alzheimer Familiar é a forma menos comum da doença. A fisiopatologia da DAF pode ser explicada com base na ativação da cascata amiloide, que se acredita ser causada por mutações nos genes das proteínas APP (proteína precursora amiloide), PSEN1 (presenilina 1) e PSEN2 (presenilina 2).

Parece que a presença de mutações nestes genes pode ser associada, na maioria dos casos, a uma produção anormal do peptídeo amiloide, apesar de algumas mutações influenciarem também a sua clearance e agregação (Dorszewska *et al.*, 2016).

### **Doença de Alzheimer Esporádica**

A Doença de Alzheimer Esporádica é a forma mais comum da DA. Uma das causas prováveis da DAE pode dever-se a alterações a nível molecular como metilação e stress oxidativo em certos genes (*ABCA7, BIN1, CASS4, CELF1, CD33, CD2AP, CELF1, CLU, CRI, DSG2, EPHA1, FERMT2, HLA-DRB5/DBRI, IL1RAP, INPP5D, MEF2C, MS4A6A/MS4A4E, NME8, PCDH11X, PICALM, PLD3, PTK2B, TREM2, TRIP4, TRPC4AP, SLC24H4-RIN3, SORLI, ZCWPW1*) que, na ausência de um sistema de reparação eficiente pode aparecer na forma de doença neurodegenerativa. A desregulação do metabolismo do colesterol no cérebro, afetado, por exemplo, pela ApoE4 (apolipoproteína E) é também uma causa provável para esta forma da doença, no entanto, o mecanismo mais conhecido envolvido na DAE é comum à DAF e corresponde à cascata amiloide (Dorszewska *et al.*, 2016).

## **3 - O processo apoptótico**

Todos os organismos multicelulares são detentores de vias altamente reguladas que asseguram o equilíbrio entre a proliferação e a eliminação celular contribuindo para a homeostase da célula. Como mecanismo central responsável pela eliminação celular encontra-se a apoptose, que se define como sendo a morte autoprogramada da célula após receção de um estímulo definido. A particularidade que este mecanismo de suicídio celular detém é a capacidade de remoção dos resíduos dos constituintes celulares sem originar inflamação nos tecidos circundantes.

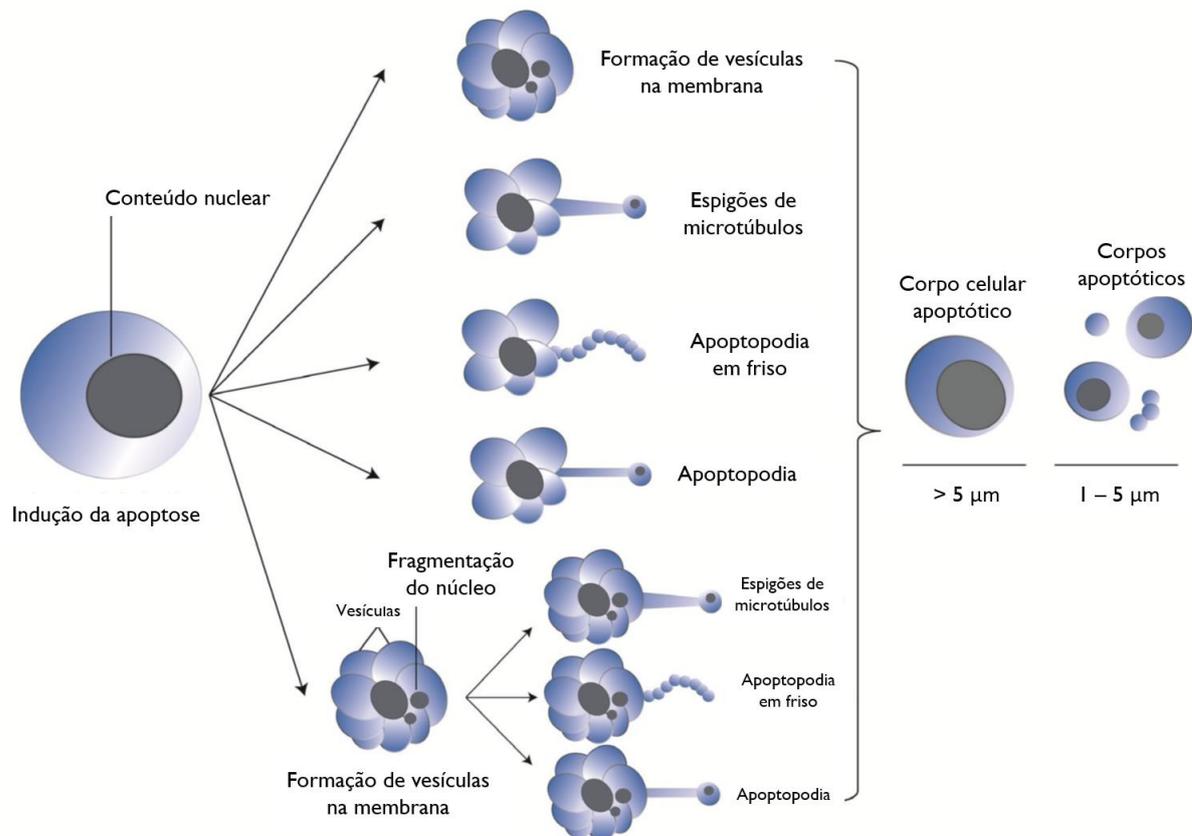
A morte celular é induzida quando a célula já não é necessária ou possui danos significativos. O estímulo que inicia este processo pode ter origem externa, com a diminuição de um fator de crescimento crítico ou hormona, assim como através de interações com recetores específicos de apoptose à superfície da célula (exemplo: proteína Fas expressa na membrana celular), ou provir de um estímulo interno resultante da exposição a radiação ou toxinas, ou decorrente de respostas a perturbações metabólicas ou do ciclo celular. O ponto de iniciação é sucedido pela sinalização que ativa a via da morte celular (Fleisher, 1997).

A mitocôndria, sendo a principal influente na síntese de adenosina trifosfato (ATP), está ativamente relacionada na integração e implementação de vários estímulos conducentes à morte celular (Obulesu e Lakshmi, 2014).

Apesar do progresso significativo na investigação relacionada com os mecanismos apoptóticos, não há ainda uma estratégia terapêutica para travar ou abrandar de forma substancial este processo quando este provém de uma situação patológica.

As seguintes alterações morfológicas são observadas na maioria dos tipos de células quando a apoptose é induzida:

- (1) contração do volume celular e condensação da cromatina, mantendo estável a morfologia dos organelos intracelulares como a mitocôndria;
- (2) aparecimento de protuberâncias na membrana citoplasmática;
- (3) fragmentação do núcleo, conduzindo a uma eventual fragmentação celular;
- (4) fagocitose dos corpos apoptóticos (Obulesu e Lakshmi, 2014).



**Figura 3** - Padrões de apoptose e tipos de alterações celulares formadas. Adaptado de (Xu, Lai e Hua, 2019).

## 4 - Vias de apoptose celular

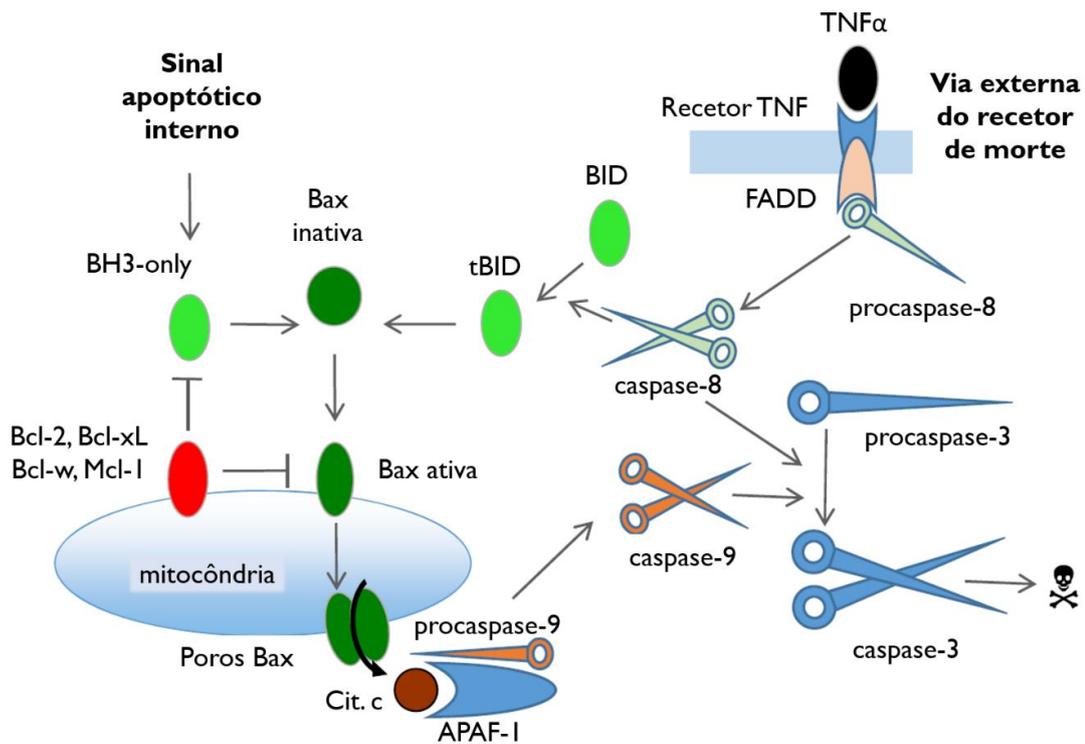
A apoptose pode seguir uma de duas vias principais:

### Via intrínseca/mitocondrial

A via mitocondrial é desencadeada no interior da célula por estímulos como, por exemplo, danos no DNA (Chi, Chang e Sang, 2018). Esta via provém da expressão ou ativação das proteínas BH3-only, pertencentes à família de proteínas Bcl-2, com propriedades de regulação da permeabilidade da membrana externa da mitocôndria, podendo ter uma ação pré-apoptótica ou pró-apoptótica. Estas proteínas ativam as proteínas pró-apoptóticas Bax e/ou Bak em algumas células, que promovem a formação de poros na membrana mitocondrial externa. Isto conduz à libertação de citocromo C que liga a APAF-1 (apoptotic protease activating factor 1), o que vai ativar a caspase-9, que cliva e ativa outras caspases que degradarão as proteínas celulares. Ou seja, é uma via centrada na regulação da permeabilização da membrana mitocondrial externa (mitochondrial outer membrane permeabilization – MOMP) pela família de proteínas Bcl-2.

### Via extrínseca/recetor de morte

Esta via é despoletada no exterior da célula, pela ligação do fator de necrose tumoral (TNF) aos recetores da superfície da célula. Esta ligação vai conduzir a uma série de eventos envolvendo o domínio proteico Fas-associated death domain (FADD) e as proteases caspases, nomeadamente a caspase-8. Esta protease irá ativar outras proteases a jusante por clivagem direta ou conduzir à clivagem indireta das proteínas BID da família das BH3-only, ativando a via mitocondrial. Nesta via, quando apenas ocorre a clivagem direta das caspases por parte da caspase-8, as proteínas Bcl-2 atuam como proteínas anti-apoptóticas, mantendo inativas as proteínas Bax ou BH3-only, ficando inativa a via mitocondrial (Fricker *et al.*, 2018).



**Figura 4** - representação esquemática das duas vias de apoptose: via intrínseca e via extrínseca. Adaptado de (Fricker *et al.*, 2018).

### **Apoptose fisiológica**

A morte fisiológica das células é um mecanismo essencial que contribui para o crescimento e manutenção do corpo humano e é provocada por uma série de mediadores proteicos, caspases e fatores de indução ou inibição apoptótica. Sendo uma morte celular programada geneticamente, desempenha um papel central no normal desenvolvimento do organismo, homeostase tecidual, eliminação de células infetadas ou defeituosas e envelhecimento. A morte de neurónios que não conseguem integrar devidamente o sistema nervoso é um exemplo de apoptose fisiológica (Obulesu e Lakshmi, 2014).

## **Apoptose patológica**

Existem diversas causas patológicas que causam perturbações na estase celular e consequentemente afetam a sua apoptose. Este impacto tanto pode ser a nível da inibição ou diminuição da apoptose, podendo desencadear, por exemplo, uma facilitação da ocorrência de doenças autoimunes, como através da promoção exacerbada dos mecanismos apoptóticos, dando origem a características típicas de doenças neurodegenerativas, como a DA (Xu, Lai e Hua, 2019).

Dado que a acumulação do peptídeo beta-amiloide é uma propriedade comum aos dois tipos de DA descritos anteriormente, será dado mais ênfase à indução apoptótica provocada por esta alteração fisiológica.

## **5 - O peptídeo beta-amiloide: origem e funções biológicas**

O peptídeo amiloide ( $A\beta$ ) é um produto natural do metabolismo celular da proteína precursora amiloide (APP). Esta proteína precursora é sintetizada no retículo endoplasmático (RE), sendo depois transportada para o complexo de Golgi, onde termina a sua maturação, após a qual é direcionada para a membrana plasmática. A APP é, portanto, uma proteína membranar expressa em diversos tecidos, nomeadamente nas sinapses dos neurónios, desempenhando um papel central na patogénese da DA (Chen *et al.*, 2017).

O peptídeo amiloide e os seus agregados extracelulares e intracelulares são exemplos de particularidades que automaticamente associamos à DA. Todavia, muitos estudos demonstram uma correlação inconsistente entre os aglomerados de proteínas aberrantes e os sintomas clínicos. Exames realizados *post-mortem* revelaram depósitos significantes de peptídeo amiloide tanto em portadores de DA como indivíduos idosos saudáveis. Adicionalmente, descobriu-se que a carga da proteína amiloide a nível do hipocampo era igualmente semelhante quer em pacientes com DA, quer em pessoas saudáveis de idades semelhantes. Contudo, resultados de *immunoblotting* mostraram existir diferenças nos tipos de peptídeos amiloides entre estas duas classes de indivíduos (Chi, Chang e Sang, 2018), e pensa-se que daí advenha a patogenicidade.

A estrutura da APP consiste num domínio transmembranar singular, uma grande porção N-terminal extra-celular glicosilada e uma porção C-terminal citoplasmática mais pequena. A

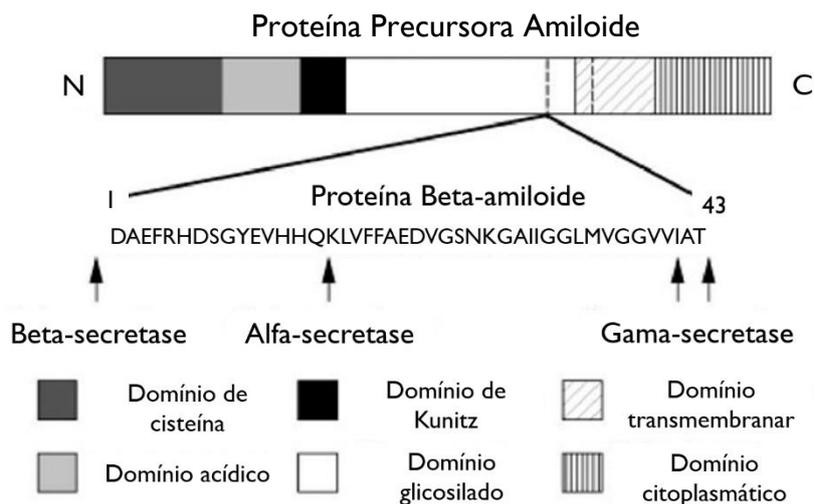
função da APP baseia-se na regulação e reparação na formação das sinapses, no transporte neuronal anterógrado (em direção à terminação axónica) e exportação de ferro.

Existem diversas isoformas da APP, que variam na quantidade de aminoácidos, podendo ter entre 695 e 770. A isoforma mais comum no cérebro humano é a APP695, enquanto que as isoformas APP751 e APP770 são maioritariamente expressas na superfície das células periféricas e plaquetas (Chen *et al.*, 2017).

## 6 - Vias de síntese do peptídeo amiloide

Os peptídeos amiloides são produzidos maioritariamente na região sub-celular, a partir da APP, através de processamentos sucessivos executados pelas enzimas secretases alfa, beta e gama.

A proteína A $\beta$  recém-formada pode variar de tamanho, tendo entre 37 a 49 resíduos (Campos-Pea e Antonio, 2014). Por norma, a APP é clivada pela alfa-secretase e gama-secretase, originando um peptídeo de baixa massa molecular. Contudo, se a APP for clivada pela beta-secretase e gama-secretase, geram-se monómeros amiloides, como A $\beta$ 42, mais propícios a agregação e acumulação (Deshpande, Gogia e Singh, 2019).



**Figura 5** - Composição da Proteína Precursora Amiloide e diagrama de formação da isoforma A $\beta$ 43 do peptídeo beta-amiloide pela ação das enzimas secretases. Adaptado de (Xia, W. (Ed.), Xu, 2004).

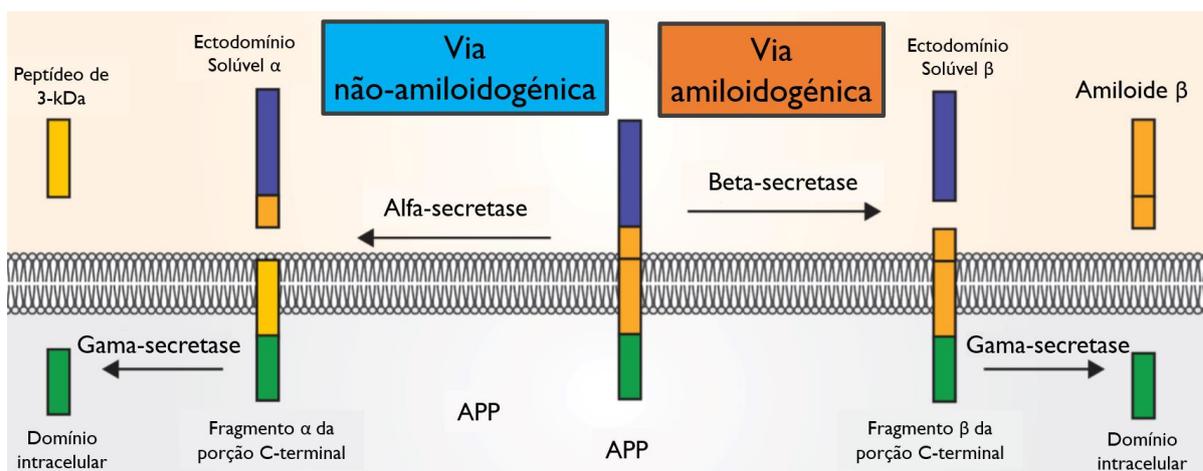
Esta diferença a nível das enzimas efectoras justifica-se com a existência de duas vias de processamento da APP, a via não amiloidogénica e a via amiloidogénica (Zhou *et al.*, 2018).

## Via não-amiloidogénica

Numa fase inicial a APP é clivada pela alfa-secretase, libertando um ectodomínio solúvel e um fragmento da porção C-terminal intracelular. Ocorre depois uma segunda clivagem deste fragmento, mediada pela gama-secretase, originando um peptídeo de 3-kDa e um domínio intracelular. Esta via ocorre maioritariamente na membrana citoplasmática (Zhou *et al.*, 2018).

## Via amiloidogénica

Nesta via, que se desenrola sobretudo nos endossomas, a alfa-secretase é substituída pela beta-secretase. Forma-se igualmente um ectodomínio solúvel e um fragmento da porção C-terminal intracelular, mas ambos com constituição diferente dos gerados na via anterior, o que faz com que na segunda clivagem a gama secretase origine a libertação da A $\beta$  (Zhou *et al.*, 2018).

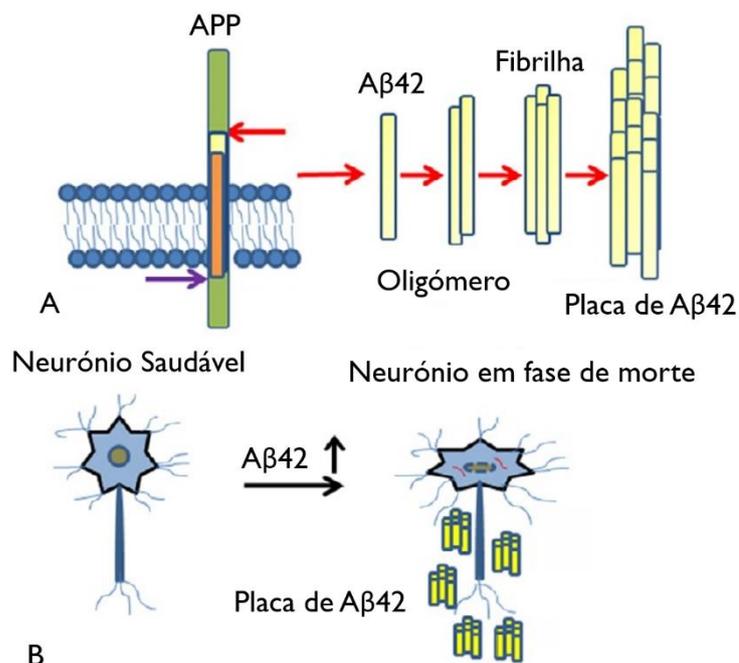


**Figura 6** - Duas vias de síntese do peptídeo amiloide: via amiloidogénica e via não-amiloidogénica. Adaptado de (Zhou *et al.*, 2018).

Após a sua síntese, esta proteína pode ser libertada para o espaço extracelular por exocitose (Campos-Pea e Antonio, 2014), ou manter-se associada à membrana plasmática em domínios lipídicos específicos (Chen *et al.*, 2017). Uma vez secretada, a A $\beta$  pode depositar-se ou reentrar na célula por endocitose através de interação com vários transportadores e recetores de membrana como o recetor de acetilcolina e o recetor do ácido N-metil-D-aspartico (NMDAr) (Campos-Pea e Antonio, 2014).

Os monómeros de A $\beta$  libertados podem agregar-se formando oligómeros, protofibrilhas e fibrilhas amiloides. Estas últimas são maiores e insolúveis e podem, posteriormente, agrupar-se originando placas neuríticas. Por outro lado, os oligómeros são solúveis e podem espalhar-se pelo cérebro, dado que podem ligar-se a um vasto número de moléculas do espaço

extracelular, onde se incluem recetores de superfície celular, metais e membranas celulares (Chen *et al.*, 2017).



**Figura 7** - Neurodegeneração provocada pela acumulação de placas da isoforma 42 do peptídeo amiloide. Adaptado de (Deshpande, Gogia e Singh, 2019).

Apesar da sua ação patogénica, a A $\beta$  também desempenha funções a nível da regulação sináptica (Müller *et al.*, 2008). Os efeitos positivos deste peptídeo são, por norma, postos de parte, pois é dada primazia ao estudo dos seus mecanismos de toxicidade (Carrillo-Mora, Luna e Colín-Barenque, 2014). Em circunstâncias normais, a proteína amiloide executa funções de regulação, tendo influência na transmissão excitatória e na plasticidade e estrutura sinápticas (Gulyaeva *et al.*, 2017).

## 7 - Mecanismos de formação dos agregados amiloides

A existência de uma multiplicidade de modalidades de agregação desta proteína suporta e evidência da ocorrência de diversos fenótipos da Doença de Alzheimer (Fede, Di *et al.*, 2018).

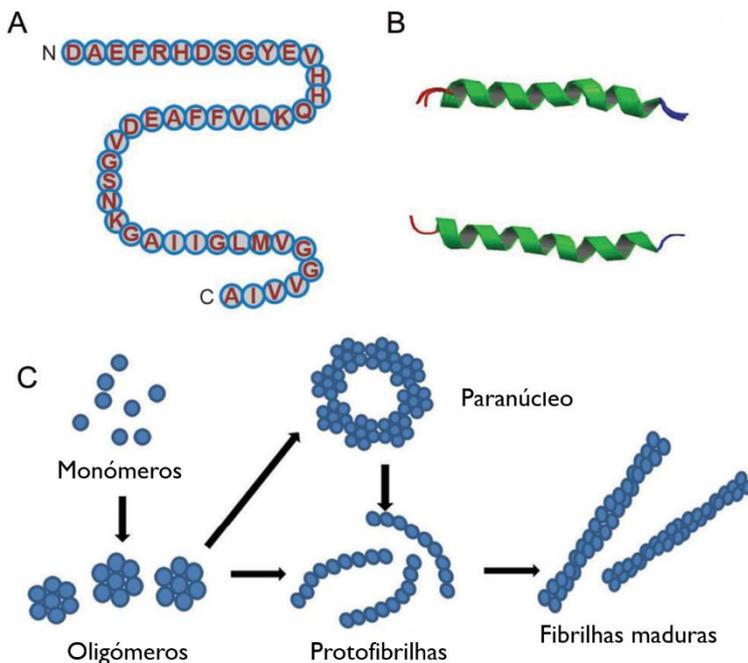
### **Mecanismo de agregação das moléculas de peptídeo amiloide em fibrilhas**

A hipótese mais antiga para este processo é a da Cascata Amiloide, que propõe que a agregação dos peptídeos A $\beta$  em fibrilhas conduz à neurotoxicidade e demência, através de efeitos citopáticos que contribuem para a patogénese da DA. As fibrilhas são as estruturas de maiores dimensões resultantes da agregação, que antecedem a posterior deposição em placas que formam lesões histológicas características da DA. Apesar de o peptídeo amiloide se

agregar rapidamente formando os depósitos de placas, estudos mais recentes demonstraram que não existe uma relação direta entre a existência destas placas e a perda de sinapses e neurónios em cérebros de doentes com DA (Chen *et al.*, 2017).

### Mecanismo de agregação das moléculas de peptídeo amiloide em oligómeros

Os oligómeros, por serem estruturas solúveis, possuem uma dimensão de distribuição muito heterogénea. Os oligómeros podem formar arranjos de maior ordem, desde oligómeros de baixo peso molecular, incluindo dímeros, trímeros, tetrâmeros e pentâmeros, a estruturas de peso molecular intermédio como hexâmeros, nonâmeros e dodecâmeros, até protofibrilhas e fibrilhas. Comparativamente com as fibrilhas, o conhecimento atual destas estruturas carece ainda de muita informação, uma vez que os seus estados oligoméricos são mais transitórios do que as fibrilhas, o que dificulta a preparação de populações homogéneas de oligómeros para estudo. Este obstáculo pode ser ligeiramente aliviado com o uso de detergentes estabilizadores (Chen *et al.*, 2017). Estas formas solúveis possuem ainda a particularidade de poderem ser produzidas dentro de organelos celulares, tais como o RE e a mitocôndria, dificultando ainda mais a análise dos seus efeitos patológicos (Campos-Pea e Antonio, 2014).



**A** – sequência primária de 42 aminoácidos que formam a isoforma Aβ42;

**B** – diagrama do peptídeo Aβ, que forma uma estrutura alfa-hélice que pode ser convertida na estrutura folha-beta;

**C** – proposta de via de conversão dos monómeros Aβ em estruturas de maior ordem e peso molecular.

**Figura 8** - Estrutura dos monómeros, fibrilhas e oligómeros de peptídeo amiloide. Adaptado de (Chen *et al.*, 2017).

## 8- Ação patológica do peptídeo amiloide na Doença de Alzheimer

A toxicidade neuronal mediada pelo peptídeo amiloide tem vindo a ser documentada *in vivo* e *in vitro* (Campos-Pea e Antonio, 2014). Os primeiros estudos realizados acerca da neurotoxicidade presente na DA, com consequente morte celular e perda de memória, definiam como agente neurotóxico as fibrilhas e posteriores placas neuríticas – hipótese da cascata amiloide – (Chen *et al.*, 2017). Esta hipótese baseia-se nas seguintes premissas:

- 1- A $\beta$  é o principal componente das placas neuríticas;
- 2- A deposição das placas ocorre previamente aos restantes eventos patológicos;
- 3- Peptídeos sintéticos de A $\beta$  induzem morte celular *in vitro* (Niikura, Tajima e Kita, 2006).

A localização da deposição das placas neuríticas não é aleatória, uma vez que as placas tendem a depositar-se em maior concentração junto das terminações nervosas colinérgicas (Gulyaeva *et al.*, 2017).

Nas últimas duas décadas e com o decorrer das investigações sugeriu-se que as formas oligoméricas ou pré-fibrilares do peptídeo amiloide são as espécies que causam mais dano a nível neuronal. Nesses estudos propôs-se que os oligómeros de A $\beta$  podem afetar diversos organelos intracelulares e mecanismos. Estas formas induzem disfunção mitocondrial e stress oxidativo nos neurónios (Chen *et al.*, 2017), promovem a ativação da microglia e a neuroinflamação (Cline *et al.*, 2018), resultando num influxo massivo de cálcio e toxicidade neuronal. Adicionalmente propôs-se que as estruturas oligoméricas solúveis causam toxicidade através da sua ligação a diversos recetores (Chen *et al.*, 2017). Apesar destas últimas descobertas e da relevância que as formas oligoméricas aparentam ter, não se descarta de forma alguma o papel dos agregados fibrilares na patogenicidade da DA, pois estas formas continuam a contribuir pelo menos para a manutenção dos danos a nível das sinapses (Carrillo-Mora, Luna e Colín-Barenque, 2014).

### **Mecanismos moleculares de neurotoxicidade**

Importa salientar que o tema aqui abordado apresenta-se ainda sob grande investigação, existindo múltiplos estudos contraditórios e, de uma forma generalizada, carece-se de conclusões assertivas. Assim, todos os mecanismos descritos assentam numa base de dados cruzados e baseiam-se nas conclusões que, até ao momento, parecem ser as que melhor descrevem este assunto. É de reforçar, igualmente, que os mecanismos de ação a nível

molecular não são de forma alguma independentes entre si, mas sim vastamente interligados, acabando por atuar em simultâneo, visto que alguns mecanismos servem de ignição a outros, como irá constatar-se seguidamente.

Apesar da constante investigação neste campo, ainda está por clarificar se as falhas a nível sináptico são causadas maioritariamente por apenas um indutor, sendo esse a A $\beta$ , os oligómeros ou as placas, ou se estes defeitos nas sinapses são causados por uma combinação destes múltiplos fatores (Chi, Chang e Sang, 2018). Está também por consolidar o conhecimento incidente nas diferenças entre a toxicidade da A $\beta$  a nível intracelular e extracelular, mas começam a surgir evidências de que os mecanismos patológicos deste peptídeo se devem maioritariamente à sua ação dentro da célula (Carrillo-Mora, Luna e Colín-Barenque, 2014).

A nível molecular, a proteína amiloide provoca stress nos neurónios através de múltiplas vias, estando relacionada com anomalias a nível pré e pós sináptico. Um estudo *in vitro* mostrou que neurónios do hipocampo expostos a culturas de A $\beta$ 40 ou A $\beta$ 42 exibiram um decréscimo de 30% na capacidade elástica da sua membrana celular. Estas alterações biomecânicas podem estar correlacionadas com o vasto leque de alterações funcionais provocadas por este peptídeos, incluindo alterações a nível do transporte de vesículas e da atividade dos canais iónicos (Chi, Chang e Sang, 2018).

### **Indução de stress oxidativo por parte do peptídeo amiloide**

Este mecanismo de ação tem vindo a ser verificado especialmente nos estágios iniciais da DA (Campos-Pea e Antonio, 2014).

A A $\beta$  possui uma metionina localizada na posição 35 (Met35), que se pensa ser a mediadora da redução dos iões Cu<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> a Cu<sup>+</sup> e Fe<sup>2+</sup>, respetivamente, através da oxidação do seu grupo sulfido. Isto vai permitir ao oxigénio molecular reagir com estes metais reduzidos, dando origem ao anião superóxido, que por sua vez vai reagir com dois átomos de hidrogénio, formando peróxido de hidrogénio. Este peróxido de hidrogénio pode posteriormente reagir com outro ião metálico reduzido, originando o radical hidroxilo pela reação de Fenton. Esta hipótese da Met35 como fonte de redução dos iões metálicos ainda está por averiguar, uma vez que já se verificou a ocorrência de oxidação de neurotransmissores, aquando da sua exposição à A $\beta$ , estando este resíduo ausente. Adicionalmente, a proteína amiloide, na sua

forma radical, pode extrair prótons dos lípidos e proteínas circundantes, gerando peróxidos lipídicos e carbonilos, respetivamente (Carrillo-Mora, Luna e Colín-Barenque, 2014).

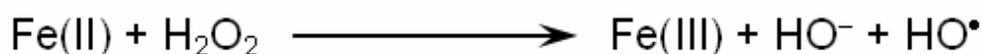


Figura 9 - Reação de Fenton. Adaptado de (Barbusiński, 2009).

Paralelamente ao mecanismo da Met35, pondera-se a existência de um redutor externo, como a dopamina ou o ascorbato, visto que esta hipótese permitiria o início dos ciclos redox dos íons metálicos sem necessidade da auto-oxidação do peptídeo.

Existe ainda geração de oligómeros de A $\beta$  devido à formação de radicais tirosil a partir da tirosina, que estão envolvidos na ligação *cross-bridge* ditirosina entre duas moléculas do peptídeo (Carrillo-Mora, Luna e Colín-Barenque, 2014).

Estas espécies reativas de oxigénio (ROS) e restantes radicais, terão um impacto negativo nas proteínas membranares e citoplasmáticas, DNA mitocondrial e lípidos, contribuindo ainda para o dano vascular observado em pacientes com DA e, conseqüentemente, promovendo a morte celular (Campos-Pea e Antonio, 2014).

### **Disfunção sináptica e interação do peptídeo amiloide com recetores sinápticos**

Alguns autores sugerem que o dano sináptico desenvolvido ao longo de todo o curso da doença é produzido pelas formas solúveis do peptídeo A $\beta$ , pelo facto de, teoricamente, a probabilidade de interação dinâmica das formas fibrilares já depositadas, com recetores ou proteínas localizadas nos terminais sinápticos, ser inferior. Todavia, e como já mencionado anteriormente, os agregados fibrilares demonstraram desempenhar um papel fundamental ao nível da persistência do dano causado a nível sináptico (Carrillo-Mora, Luna e Colín-Barenque, 2014).

Uma das grandes vias de atuação da proteína amiloide é através da interação com o sistema glutamatérgico, por meio da interação com recetores responsáveis pela homeostase do glutamato (Campos-Pea e Antonio, 2014).

#### **- Recetores do ácido N-metil-D-aspartico**

Este recetor ionotrópico é o mais importante e mais estudado até à data. Desempenha funções a nível da sinaptogénese, plasticidade sináptica, aprendizagem e memória. O influxo de cálcio

através do NMDAr modela tanto condições fisiológicas como patológicas (Campos-Pea e Antonio, 2014).

A atividade do peptídeo amiloide neste recetor é complexa e contraditória. Para ocorrer internalização e acumulação da proteína amiloide, por forma a que esta possa manifestar os seus mecanismos de toxicidade a nível intracelular, como se julga ser a via de patogenicidade maioritária, é necessário o funcionamento deste recetor, pois foi demonstrado que a utilização de antagonistas NMDAr levaram a uma redução da internalização da A $\beta$ .

Sabe-se que a estimulação do NMDAr promove a síntese de A $\beta$  por impelir a atividade das secretases, mas apenas a nível extra-sináptico. Esta ativação do recetor é executada mediante a depressão a longo-termo (LTD), ou seja, uma atenuação persistente na eficiência da transmissão neuronal, nos neurónios do hipocampo, tendo como resultado uma diminuição da reabsorção de glutamato e o aumento da concentração deste a nível extracelular, pela diminuição do seu *uptake* por parte dos seus transportadores presentes nos astrócitos (Campos-Pea e Antonio, 2014) (Carrillo-Mora, Luna e Colín-Barenque, 2014). A acumulação contínua de glutamato nas fendas sinápticas causa alterações na neurotransmissão mediada por este neurotransmissor, ativando recetores e induzindo a despolarização de neurónios, que terá como consequência um aumento massivo do influxo de cálcio e sódio (Campos-Pea e Antonio, 2014) e da sua concentração a nível citoplasmático, bem como stress a nível da mitocôndria (Ettcheto, Busquets e Camins, 2019). Esta série de eventos conduz à exocitose de mais glutamato e, simultaneamente à morte neuronal pelo excesso de iões a nível intracelular (Campos-Pea e Antonio, 2014).

Por outro lado, o peptídeo amiloide pode diminuir o número destes recetores nos neurónios por meio de mecanismos como endocitose e redução da expressão de algumas subunidades. Supõe-se que estas diferenças no modo de atuação se devam à existência de subpopulações de NMDAr, em que, diferentes subtipos implicam interações diferentes por parte da proteína amiloide (Carrillo-Mora, Luna e Colín-Barenque, 2014).

#### **- Recetores do ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico**

Os recetores AMPAr são de uma importância vital em praticamente todas as funções cerebrais (Cuestas Torres e Cardenas, 2020). Em relação à interação da proteína amiloide com este recetor, têm vindo a ser reportadas diminuições tanto da sua ativação, como da quantidade existente a nível pós-sináptico, decorrentes da exposição ao peptídeo. Neste recetor, os efeitos causados derivarão, em grande peso, de alterações a nível das fosforilações.

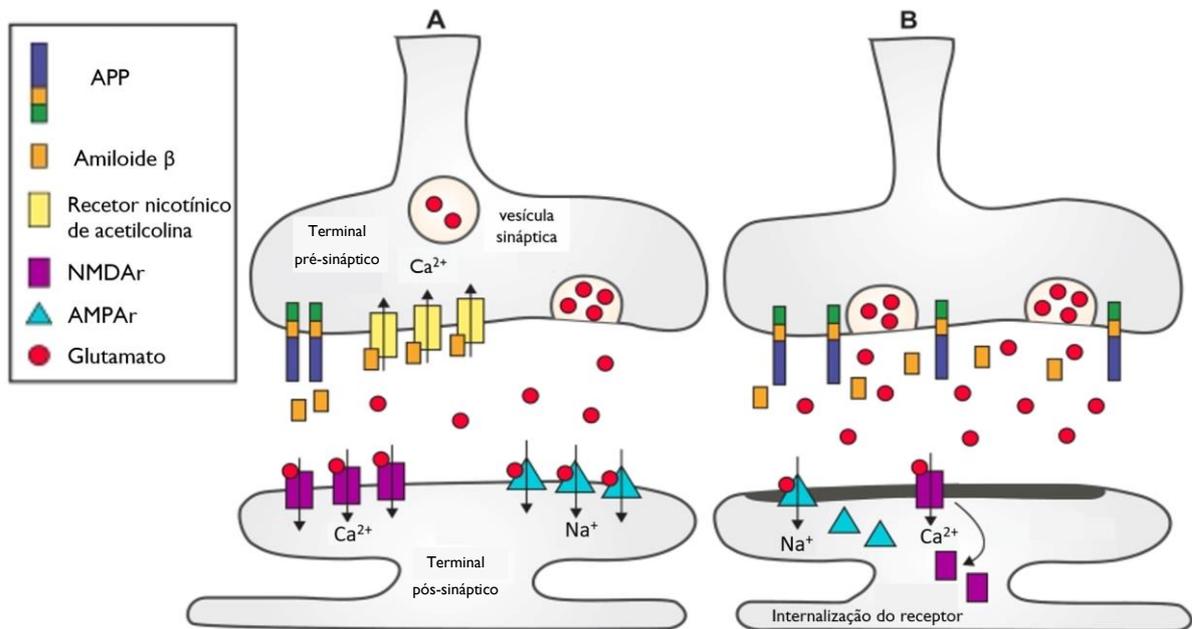
Acredita-se que as modificações no desempenho do recetor sejam repercussões das seguintes ações da proteína:

- Aumento dos níveis da caspase 3, que possui atividade proteolítica sobre este recetor;
- Inibição da autofosforilação da CAMKII (proteína cinase  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina II dependente), que por sua vez fica impedida de fosforilar o AMPAr, inibindo a sua atividade;
- Indução direta da fosforilação da subunidade GluR2, promovendo a endocitose do recetor;
- Endocitose do AMPAr por ativação da sinalização envolvendo LTD;
- (possível) estimulação dos recetores NMDAr localizados a nível extra-sináptico, via que pode ser acoplada à anterior;
- (possível) hipótese de as vias de sinalização ativadas pela inflamação produzida pelo peptídeo, convergirem também na LTD (Carrillo-Mora, Luna e Colín-Barenque, 2014).

Todas estas vias de interação com o AMPAr levando à sua inibição, provocam uma acumulação do glutamato na fenda sináptica que, como já mencionado anteriormente, conduzem à excitotoxicidade neuronal e apoptose.

#### **- Recetores colinérgicos**

É já de conhecimento público o facto de algumas isoformas da proteína amiloide terem grande afinidade para os recetores  $\alpha 7$ -nicotínicos, e estima-se que este acontecimento possa intervir na internalização e acumulação da  $\text{A}\beta$  nos neurónios colinérgicos, local onde a concentração de placas é mais proeminente. Assim, prevê-se que a presença destes recetores seja, por si só, um fator desencadeante de toxicidade seletiva, uma vez que promovem a deposição de formas amiloides a nível intracelular e, naturalmente, o desenrolar dos diversos mecanismos patológicos interferentes na homeostase da célula e conducentes, em última fase, à morte neuronal (Carrillo-Mora, Luna e Colín-Barenque, 2014).



**Figura 10** - Transmissão sináptica regulada pela proteína amiloide. APP: proteína precursora amiloide; NMDAr: recetor do ácido N-metil-D-aspartático; AMPAR: recetor do  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico. Adaptado de (Zhou *et al.*, 2018).

### Disfunção mitocondrial

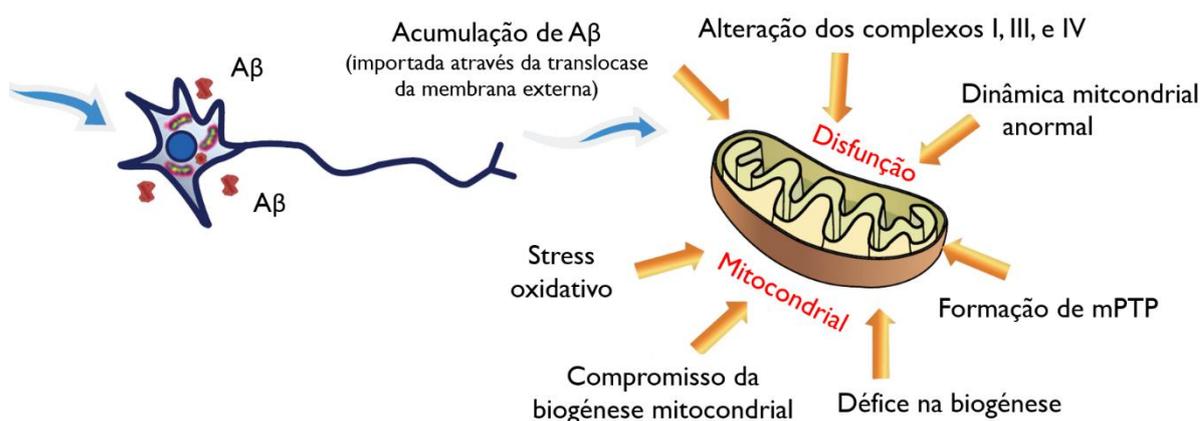
A correta funcionalidade da mitocôndria é a base para o fornecimento energético, processos de desintoxicação e homeostase do cálcio (Cuestas Torres e Cardenas, 2020). Dada a relevância que tem vindo a ser dada à ação da A $\beta$  a nível intracelular, pesquisas recentes depararam-se com a presença deste peptídeo nas membranas dos organelos celulares, nomeadamente RE, complexo de Golgi, lisossomas, endossomas e membrana interna e matriz mitocondriais. Apesar destas descobertas, a origem da A $\beta$  mitocondrial permanece incerta. Supõe-se que possa advir da existência de APP na membrana externa desta estrutura intracelular, no entanto sabe-se igualmente, pelo menos até à data, que apenas existe a enzima gama-secretase ativa nesta localização (Carrillo-Mora, Luna e Colín-Barenque, 2014).

Na DA, a função deste organelo pode ser afetada a três níveis: dinâmico, bioenergético e transporte, estando todos inevitavelmente interligados.

A presença do peptídeo amiloide causa um desequilíbrio nos fenómenos de fusão e fissão mitocondriais, interferindo, desta forma, na sua biogénese. Isto indica que a A $\beta$  pode comprometer os processos sinápticos através de mecanismos de dano da dinâmica mitocondrial (Cuestas Torres e Cardenas, 2020).

Neurónios do hipocampo de ratos expostos ao peptídeo amiloide demonstraram uma redução significativa no transporte anterógrado mitocondrial, conjuntamente com um

decréscimo na expressão da proteína pré-sináptica sinaptofisina (Cuestas Torres e Cardenas, 2020). Este facto pode ser explicado pela abertura de poros de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP), que leva a uma diminuição do potencial de membrana (Picone *et al.*, 2014), comprometendo a função respiratória por aumento do stress oxidativo e alteração dos complexos I, III e IV, resultando numa diminuição significativa da produção de ATP, especialmente desencadeada pela elevada acumulação de ROS (Cuestas Torres e Cardenas, 2020). Estes eventos promovem a libertação do citocromo C existente na mitocôndria, que é responsável pela ativação das caspases e, portanto, pela apoptose neuronal (Picone *et al.*, 2014).



**Figura 11** - Disfunção mitocondrial induzida pelo peptídeo amiloide. Adaptado de (Picone *et al.*, 2014).

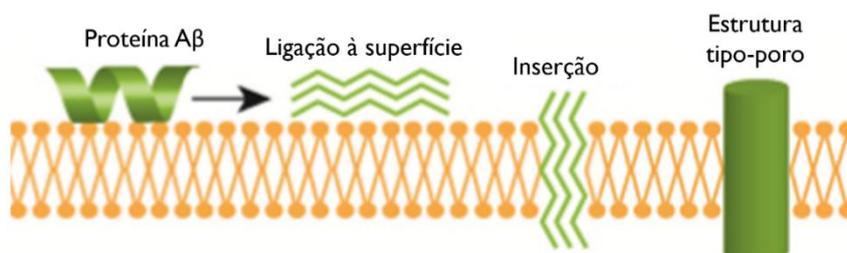
### **Interação do peptídeo amiloide com membranas celulares**

Foi comprovado por fluorescência que a Aβ se liga fortemente e de forma rápida a todas as membranas celulares (Carrillo-Mora, Luna e Colín-Barenque, 2014). Para além disso, observou-se que os oligómeros possuem capacidade de destabilização da membrana plasmática, formando poros, influenciando o fluxo normal de iões (Campos-Pea e Antonio, 2014). Assim, sugere-se que existam duas formas de interação do peptídeo com os fosfolípidos membranares:

- Ligação à superfície da membrana, que, por compressão e distorção da sua forma, faz com que fique mais fina, podendo levar à sua rutura e, logicamente, à morte celular. Esta ligação promove, também, a aceleração da amiloidogénese. Através de diversos estudos com múltiplos tipos de sistemas para mimetizar as membranas naturais, concluiu-se haver maior afinidade de ligação a lípidos negativos do que a positivos, sugerindo que a bicamada fosfolipídica acídica ou aniónica é essencial para ocorrer este tipo de interação (Niu *et al.*, 2018).

- Inserção membranar com formação de uma estrutura tipo-poro, levando ao enfraquecimento da membrana que, associado ao maior influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , promovido por esta nova entrada na célula, induz a sua morte (Campos-Pea e Antonio, 2014).

De notar que estes dois processos não são totalmente separados e dependem do rácio lípidos/proteína (L/P). A ligação à superfície membranar ocorre quando o rácio L/P é maior, e forma a estrutura tipo-poro à medida que este rácio diminui (Niu *et al.*, 2018).



**Figura 12** - Tipos de interação do peptídeo amiloide com membranas. Adaptado de (Niu *et al.*, 2018).

### **Interferência do peptídeo amiloide em vias de sinalização e interação com recetores não sinápticos**

Para além dos variados efeitos tóxicos, o peptídeo amiloide demonstra também a possibilidade de ativação de diversas vias de sinalização no interior da célula, ao ligar-se a uma série de recetores. Estas vias participam no dano neuronal presente na DA, representando um elo entre vários fatores desencadeantes desta doença. Seguidamente serão descritas apenas algumas das vias de sinalização em que a A $\beta$  intervém (Carrillo-Mora, Luna e Colín-Barenque, 2014).

#### **- Via Wnt/beta-catenina**

A via Wnt é reconhecida como sendo fundamental para o desenvolvimento embrionário, sendo especialmente notória pelo seu desempenho a nível da oncogénese (Carrillo-Mora, Luna e Colín-Barenque, 2014). Adicionalmente, esta via tem sido descrita, recentemente, como tendo um papel importante na origem de algumas patologias neurodegenerativas como a DA, uma vez que efetua uma função protetora relativamente à toxicidade do peptídeo amiloide e intervém na neurogénese em indivíduos adultos (Vallée e Lecarpentier, 2016). Esta via possui três ramos principais de sinalização intracelular: ramo da beta-catenina/ramo canónico, ramo da polaridade da célula plana, que envolve a cinase JNK e várias modificações do citoesqueleto e ramo da Wnt/cálcio, sendo que o impacto da proteína amiloide é mais significativo no ramo canónico. Neste ramo, ocorre a estabilização da proteína beta-catenina citosólica, por forma a ocorrer a entrada desta no núcleo e posterior ligação a fatores de transcrição, influenciando

a transcrição genética. Na ausência desta via de sinalização, a beta-catenina é fosforilada, levando à sua ubiquitinação e subsequente degradação pelo proteossoma. Existe evidência de que a toxicidade exercida pelas formas solúveis de A $\beta$  podem afetar esta via tanto de forma direta, pela influência na sua sinalização intracelular, como indireta, pela sua ligação aos domínios extracelulares do recetor responsável pela inicialização deste ramo (Carrillo-Mora, Luna e Colín-Barenque, 2014). Assim, a inibição desta via de sinalização contribui para o aumento dos outros mecanismos de toxicidade do peptídeo amiloide, levando a um incremento da apoptose neuronal.

#### **- Recetores de insulina**

Vários estudos permitiram constatar o compromisso dos recetores de insulina provocado pela DA. Este compromisso pode manifestar-se pela diminuição da sua expressão, dessensibilização ou alterações nas vias de sinalização intracelulares. A sinalização destes recetores inicia-se com a ligação de um ligando que ativa a autofosforilação dos resíduos de tirosina, ação que desencadeia duas vias intracelulares: a via fosfatidilinositol 3-cinase/Akt (proteína cinase b) e a via da MAPK (proteína cinase ativada por mitogénios). A primeira via é fundamental para o metabolismo e sobrevivência neuronais, e, portanto, a sua inativação aumenta a percentagem de morte neuronal, como consequência do aumento do stress oxidativo e excitotoxicidade. Verificou-se *in vitro* que, neurónios incubados com oligómeros amiloides demonstraram vários sinais de compromisso dos recetores de insulina, nomeadamente a fosforilação da Akt (Carrillo-Mora, Luna e Colín-Barenque, 2014), pondo em causa a via do fosfatidilinositol 3-cinase/Akt, que, como já referido, é essencial para a homeostase neuronal.

#### **- Proteínas cinases ativadas por mitogénios**

A ativação das proteínas desta família (MAPK) está normalmente associada à indução da apoptose celular. Um estudo realizado em porções de hipocampo demonstrou que a exposição aos peptídeos amiloides aumentou a ativação de cinases da família MAPK reguladas por sinais extracelulares, evidenciando, ainda, que esta modulação foi mediada pelo efeito da A $\beta$  sobre os recetores nicotínicos (Carrillo-Mora, Luna e Colín-Barenque, 2014).

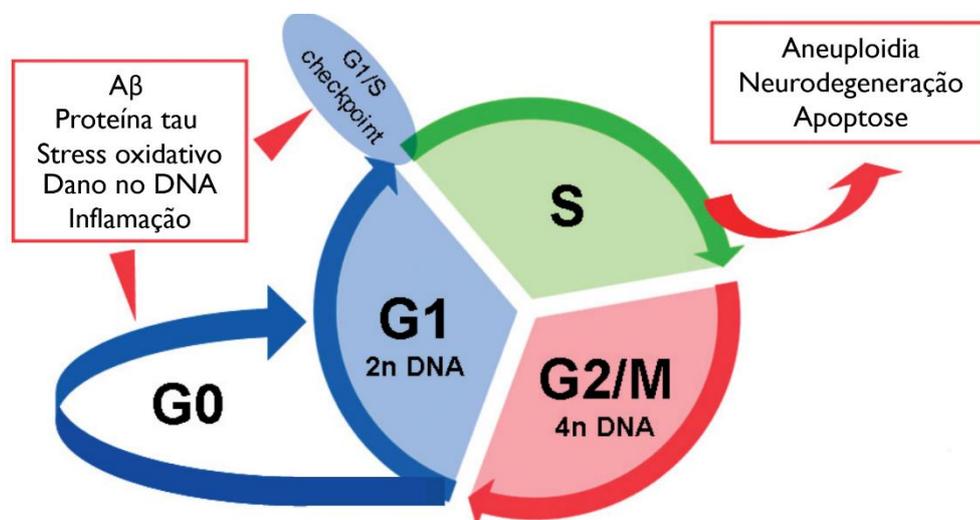
#### **- Recetores do tipo toll**

Os recetores do tipo *toll* estão envolvidos na imunidade inata. Estudos realizados em culturas de neurónios mostraram um aumento da expressão destes recetores derivado da exposição

à proteína amiloide, facto que foi associado à presença de apoptose neuronal mediada por JNK (cinase da família das MAPK) (Carrillo-Mora, Luna e Colín-Barenque, 2014).

### Reentrada dos neurónios no ciclo celular

No passado considerava-se que todos os neurónios maduros estavam estagnados na fase G0 do ciclo celular. No entanto, relatórios recentes demonstraram que no caso de algumas patologias como a DA, alguns neurónios possuem marcadores moleculares que sugerem a reativação do seu ciclo celular, sendo que alguns podem mesmo completar a fase S e, como tal, finalizar a síntese do seu material genético. Na Doença de Alzheimer, esta reentrada no ciclo celular precede a degeneração do neurónio. Este indicador de morte celular foi verificado em neurónios incubados com oligómeros de A $\beta$ , não sendo visível em neurónios incubados com as formas monoméricas nem fibrilares (Carrillo-Mora, Luna e Colín-Barenque, 2014). Fenómenos de stress oxidativo e presença de ROS são os mais associados à fragmentação do DNA e subsequente reentrada da célula no seu ciclo, ativando os mecanismos de morte celular programada. Por outro lado, as formas oligoméricas, que, como referido anteriormente, são as que mostram indícios de induzir apoptose, evidenciaram capacidade de ligação ao DNA e remodelação e/ou quebra desta molécula. Esta alteração por si só já é propensa a desencadear a ativação das vias de morte celular, no entanto, estas falhas a nível do material genético conduzem, igualmente, a perturbações ao nível do controlo de outros mecanismos de toxicidade, como a proteção contra o stress oxidativo e reparação do DNA, derivadas da incorreta expressão de proteínas essenciais à homeostase da célula (Zekanowski e Wojda, 2009).



**Figura 2** - Causas e consequências da reentrada de neurónios maduros no ciclo celular. Adaptado de (Zekanowski e Wojda, 2009).

## 9 - Substâncias naturais inibidoras da apoptose beta-amiloide induzida

A Doença de Alzheimer prevalece, quase na sua totalidade, em doentes numa faixa etária cuja probabilidade de polimedicação é significativa. Esta premissa pode, muitas vezes, condicionar ao recurso a terapias mais naturais, na medida em que o doente, ou respetivos familiares/acompanhantes, especialmente as gerações atuais, as quais possuem um acesso ilimitado a fontes de informação, (nem sempre fidedignas) e sobre as quais surge cada vez mais interesse pelas terapias alternativas, podem não querer introduzir mais medicação farmacológica para além da já praticada, o que faz com que a procura por substâncias não sintéticas seja de um interesse cada vez mais relevante. Por outro lado, a questão da possível polimedicação deve ser tida sempre em conta e analisar o rácio risco/benefício da introdução de um produto natural que possa vir a interagir com fármacos pré-existentes, principalmente dada a possibilidade de a população interpretar uma substância de origem natural como inócua, podendo este facto conduzir a um consumo irracional e não supervisionado da mesma.

Seguidamente são explanadas algumas substâncias que têm vindo a ser estudadas como possíveis vias de prevenção e/ou terapêutica da DA, tendo como mecanismo de ação a inibição da apoptose neuronal induzida pelo peptídeo amiloide.

### **Salidroside**

Sendo o principal componente ativo extraído da *Rhodiola rosea* (raiz de ouro), é vastamente empregue na medicina tradicional Chinesa, havendo relatos de efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e anti-autofágicos. Está descrito na literatura que o salidroside apresenta efeitos terapêuticos numa série de patologias, incluindo doenças cerebrovasculares, maioritariamente devido à sua capacidade de captura de radicais livres e ação anti-apoptótica. Apesar de os mecanismos de ação e proteção desta substância a nível da DA ainda não estarem devidamente definidos, conseguiu demonstrar-se que o salidroside promove a sobrevivência e proliferação celular e inibe os efeitos tóxicos da proteína amiloide, através da ativação de vias de sinalização extracelular reguladas por cinases (Liao *et al.*, 2019).

### **Icariina**

Zhang *et al.* (2015) realizaram um estudo com vista a analisar a neuroproteção da icariina, um glicosídeo de flavonol isolado de várias plantas como a *Epimedium Sagittatum*, relativamente à toxicidade neuronal provocada pela A $\beta$ . Verificou-se uma diminuição da apoptose e aumento

da viabilidade das células pré-tratadas com icariina, pela ativação da via fosfatidilinositol 3-cinase/Akt através da fosforilação da Akt, que, como já descrito anteriormente, é fundamental para o metabolismo e manutenção celulares (Zhang *et al.*, 2015).

### **Licopeno**

Licopeno é conhecido por ser um antioxidante protetor do dano celular causado por stress oxidativo. Este carotenóide, cujas duas maiores fontes de obtenção são o tomate e o mamão, tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica graças à sua natureza lipofílica. Hwang, Lim e Kim (2017) investigaram o efeito inibitório do licopeno sobre a apoptose celular, verificando que este, através de um efeito dose-dependente, reduziu as ROS e inibiu a disfunção mitocondrial. Estas conclusões foram extraídas através da determinação dos níveis de caspase-3, expressão da p53 e do rácio Bax/Bcl-2 numa situação de tratamento com licopeno, comparando com uma situação de não exposição a este componente. Este estudo vem corroborar a ideia pré-existente de este carotenóide ser um potencial futuro suplemento para a prevenção da DA (Hwang, Lim e Kim, 2017).

### ***Nelumbo nucifera***

*Nelumbo nucifera*, vulgarmente conhecida como flor de lótus, é uma planta rica em flavonoides. Na medicina tradicional, esta planta é usada regularmente como sedativo, antipirético e agente hemostático, o que indica que a sua ação possa ser a nível do SNC. As suas sementes parecem possuir atividade hepatoprotetora e de captação de radicais, efeito anti-proliferativo e anti-inflamatório, havendo descrições de supressão da progressão do ciclo celular em alguns tipos de células e da expressão genética de citocinas. Num estudo realizado por Kumaran, Ho e Hwang (2018) as frações ativas obtidas de embriões de sementes de *nelumbo nucifera*, contendo flavonoides, demonstraram um elevado poder antioxidante pela grande capacidade de eliminação de radicais, sendo, assim, uma forte fonte de inibição da apoptose neuronal induzida pela toxicidade do peptídeo amiloide na DA (Kumaran, Ho e Hwang, 2018).

### ***Abelmoschus esculentus***

Este fruto, comumente conhecido como quiabo, possui um consumo tradicional com vista à obtenção de efeitos antidiabéticos. Num estudo executado por Huang *et al.*, (2019), foram utilizadas duas amostras de *Abelmoschus esculentus*, uma rica em glucósidos de quercetina e ésteres triterpénicos (fração 1) e outra contendo uma quantidade substancial de polissacarídeos e hidratos de carbono (fração 2) por forma a comprovar a prevenção da apoptose induzida pelo peptídeo amiloide. Verificou-se que a fração 1 diminui a expressão da

caspase 3, enquanto que a fração 2 atenua a expressão desta mesma caspase, essencial ao processo apoptótico. Para além disso, observou-se também uma diminuição da fosforilação do fosfatidilinositol-3-fosfato e da proteína cinase AMP-ativada, associada à cascata das caspases. Assim, este estudo permitiu concluir que desenvolvimentos mais aprofundados destas subfrações de *A. Esculentus* poderão ser uma ferramenta promissora de proteção neuronal nas doenças neurodegenerativas como a DA (Huang et al., 2019).

**Tabela 1-** Tabela-resumo dos mecanismos de ação inibidores da apoptose das substâncias analisadas.

<b>Matéria</b>	<b>Mecanismo</b>
<b>Salidroside</b>	Ativação de vias de sinalização extracelular reguladas por cinases
<b>Icariina</b>	Fosforilação do fosfatidilinositol-3-fosfato/Akt
<b>Licopeno</b>	Diminuição das ROS e inibição da disfunção mitocondrial
<b><i>N. nucifera</i> (flor de lótus)</b>	Eliminação de radicais livres
<b><i>A. esculentus</i> (quiabo)</b>	Inibição da caspase 3 e da fosforilação do fosfatidilinositol-3-fosfato e proteína cinase AMP-ativada

## 10 – Fatores endógenos com função neuroprotetora na Doença de Alzheimer

### **Humanina**

A humanina é um polipeptídeo de 24 aminoácidos (Charunontakorn et al., 2016) que foi descoberta por se constatar que existem determinadas áreas cerebrais mais propensas à perda neuronal, como o hipocampo e o lobo parietal, em contraste com o lobo occipital, que permanece praticamente intacto. Niikura, Tajima e Kita, (2006) especularam que esta diferença na incidência da neurodegeneração poderia advir da presença de certas moléculas neuroprotetoras nas regiões menos afetadas. Após realizar vários estudos constataram que existe efetivamente um peptídeo neuroprotetor cuja própria sequência serve de peptídeo sinalizador para se autotransportar para o meio extracelular. Contrariamente aos outros fatores neuroprotetores já conhecidos, possui capacidade de antagonizar todos os mecanismos de toxicidade inerentes à presença e acumulação da proteína amiloide. Por este

motivo, a humanina é o fator de proteção neuronal com maior amplitude de ação. Pensa-se que o seu mecanismo de ação consiste na sua ligação extracelular a um recetor hipotético, ativando cascatas de sinalização intracelulares, levando à inibição da cinase JNK. A humanina intracelular liga-se às proteínas Bax, inibindo a apoptose mediada por estas (Niikura, Tajima e Kita, 2006).

### **Clusterina**

A Clusterina é uma glicoproteína multifuncional que, maioritariamente devido aos papéis dicotómicos das suas isoformas, tem gerado grande controvérsia. Esta molécula está associada a diversos estados fisiológicos e patológicos, entre eles a DA (Garcia-Aranda, Serrano e Redondo, 2018). A Clusterina possui uma função proeminentemente de chaperona extracelular, mas existem outros papéis que lhe têm vindo a ser atribuídos, como o transporte lipídico, modulação imunológica e envolvimento em vias de stress oxidativo, stress proteotóxico e implicação na sobrevivência e morte celular. Em situações de stress esta proteína pode existir a nível intracelular, apesar de ainda não estar definida a sua origem neste meio. O estudo da interligação da clusterina com a proteína amiloide tem tido um grande interesse, pois esta glicoproteína aparenta alterar a agregação e/ou clearance da A $\beta$ . Em estudos mais recentes, a clusterina tem sido identificada como um mediador da toxicidade do peptídeo amiloide, uma vez que demonstrou in vivo diminuir a deposição de placas neuríticas, apesar de existirem resultados contraditórios (Foster *et al.*, 2019).

## **II - Fármacos inibidores da apoptose celular na Doença de Alzheimer**

Em Portugal estão disponíveis dois grandes grupos de fármacos para o alívio dos sintomas da DA e melhoria da qualidade de vida dos indivíduos portadores desta patologia: os fármacos inibidores da acetilcolinesterase e os antagonistas do NMDAr (*Associação Alzheimer Portugal*). Neste segundo grupo de fármacos, insere-se a memantina, à qual será dada maior relevância de seguida, devido à sua ação a nível do sistema glutamatérgico.

A nível internacional existem ainda outros fármacos em processo de avaliação de eficácia como terapêutica em patologias neuronais, incluindo a DA, entre os quais se destaca a butilftalida que, por possuir um mecanismo de ação com incidência na inibição apoptótica, será abordada seguidamente.

## **Memantina**

A memantina é um fármaco com uso autorizado em casos de DA moderada e severa (McShane *et al.*, 2019). Este fármaco é um antagonista do NMDAr e tem como objetivo reduzir a neurotoxicidade envolvida na DA. Atua bloqueando o recetor, prevenindo assim a ativação em excesso deste canal, permitindo a sua atividade normal. Em suma, o seu efeito de bloqueio evita um sistema glutamatérgico hiperativo, que é o que está na base de toda a toxicidade inerente à DA (Mayeux e Stern, 2012).

## **Butilftalida**

A butilftalida é novo fármaco obtido por racemização artificial contendo a mesma estrutura que o composto leve encontrado naturalmente no aipo. Esta nova molécula possui um efeito neuroprotetor e é usado na China no tratamento de acidentes vasculares cerebrais isquémicos. Em estudos que têm vindo a ser realizados nos últimos anos, a butilftalida demonstrou ter efeito terapêutico em modelos animais de DA, apesar de o seu mecanismo de ação ainda não estar clarificado. Song *et al.*, (2017) analisaram os níveis de expressão do mRNA das MAPK e verificaram uma redução significativa no grupo de animais expostos ao fármaco. Dados os resultados, os investigadores sugeriram que os efeitos inibitórios da butilftalida na apoptose se devem à inibição da transcrição e tradução das MAPK, proteínas responsáveis pela indução apoptótica (Song *et al.*, 2017). Este mecanismo de ação da butilftalida tem vindo a ser estudado em outras patologias neuronais, tal como Enfarte Cerebral, onde este fármaco demonstrou igualmente capacidade de inibição das MAPK, reforçando assim as conclusões retiradas acerca do seu efeito neuroprotetor (Liao *et al.*, 2019).

## 12 - Considerações Finais

Estima-se que a prevalência global da Doença de Alzheimer, descrita atualmente como estando na ordem dos 30 milhões, venha a duplicar a cada 20 anos até, pelo menos, o ano 2040. Considerando que a população mundial é cada vez mais envelhecida, o risco e a probabilidade de desenvolver uma patologia neurodegenerativa como a DA aumenta (Mayeux e Stern, 2012). A agregação de moléculas de proteína amiloide é um dos principais eventos característicos da DA. Devido à pluralidade de mecanismos de toxicidade daí advindos e subsequentes interações em diversos níveis do sistema nervoso, que culminam na ocorrência de apoptose neuronal, estas vias de neurotoxicidade apresentam um interesse significativo. Este interesse espelha-se no facto de que as vias mencionadas poderão ser alvos pertinentes em futuras terapias sintomáticas e de retardamento da patologia, em pacientes que não estejam a responder como esperado às terapêuticas existentes.

A realização de estudos detalhados acerca da agregação e propriedades de sedimentação da proteína amiloide, com base na identificação de agregados macromoleculares distintos, pode conduzir a uma nova classificação da DA, o que poderá permitir uma abordagem terapêutica mais individualizada e específica, aumentando, desta forma, a taxa de sucesso da redução da sintomatologia (Fede, Di *et al.*, 2018).

O recurso a componentes naturais com propriedades neuroprotetoras poderá ser uma abordagem apelativa no que toca à redução dos sintomas da DA, na medida em que as terapêuticas naturais possuem cada vez mais procura, tendo, muitas das vezes, melhor *compliance* que as terapêuticas farmacológicas, pela ideia ilusória de inocuidade, facto que poderá ser utilizado em prol do doente.

Fatores endógenos como a clusterina e a humanina poderão ter propensão para virem a integrar novos tratamentos preventivos de patologias neuronais como a Doença de Alzheimer, dado o seu carácter de proteção neuronal. A aplicação de terapêuticas baseadas na humanina, dada a sua abrangência neuroprotetora, em associação com outras, poderá ser a alternativa mais promissora de uma possível cura total da DA (Niikura, Tajima e Kita, 2006).

A memantina já possui benefício comprovado no alívio sintomático de casos de DA moderado e grave. Este fármaco poderá futuramente vir a ser associado a novas terapêuticas por forma a controlar melhor a progressão da patologia. A butilftalida possui, efetivamente, um efeito protetor cerebral nos ensaios realizados em animais com DA induzida, pelo que poderá vir a ser um novo fármaco a ser introduzido na terapêutica desta doença (Song *et al.*, 2017).

A Doença de Alzheimer ainda é um grande mistério no mundo científico, independentemente de todos os progressos e descobertas que têm vindo a ser feitos ao longo dos anos. Esta incógnita deriva da associação de aspetos como a dificuldade de diagnóstico assertivo, o desafio em identificar participantes para os estudos, adicionados ainda à sofisticação de todos os mecanismos hipotéticos para a etiologia desta doença (America's Biopharmaceutical Companies). Considerando toda esta problemática e conjugando com a complexidade e o tanto que ainda há por descobrir relativamente às particularidades do cérebro humano, local de instalação da patologia de Alzheimer, há ainda muita informação oculta que poderá ser a chave para, não só diminuir de forma mais vincada os sintomas clínicos, como para uma possível cura definitiva desta patologia.

## Bibliografia

AMERICA'S BIOPHARMACEUTICAL COMPANIES - **Why Has Research into Alzheimer's Disease Been So Hard?** | **Innovation.org** [Consult. 17 jul. 2020]. Disponível em: <https://innovation.org/diseases/neurological/alzheimers/why-has-research-into-alzheimers-disease-been-so-hard>

CAMPOS-PEA, Victoria; ANTONIO, Marco - Alzheimer Disease: The Role of A $\beta$  in the Glutamatergic System. Em **Neurochemistry**. [S.l.] : InTech, (2014)

CARRILLO-MORA, Paul; LUNA, Rogelio; COLÍN-BARENQUE, Laura - Amyloid beta: Multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. . ISSN 19420900. (2014).

CHARUNUNTAKORN, Savitree T. *et al.* - Potential Roles of Humanin on Apoptosis in the Heart. **Cardiovascular Therapeutics**. . ISSN 17555914. 34:2 (2016) 107–114.

CHEN, Guo Fang *et al.* - Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. **Acta Pharmacologica Sinica**. . ISSN 17457254. 38:9 (2017) 1205–1235.

CHI, Hao; CHANG, Hui Yun; SANG, Tzu Kang - Neuronal cell death mechanisms in major neurodegenerative diseases. **International Journal of Molecular Sciences**. . ISSN 14220067. 19:10 (2018).

CLINE, Erika N. *et al.* - The Amyloid- $\beta$  Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. **Journal of Alzheimer's Disease**. . ISSN 18758908. 64:s1 (2018) S567–S610.

CUESTAS TORRES, Diana Marcela; CARDENAS, Fernando P. - Synaptic plasticity in Alzheimer's disease and healthy aging. **Reviews in the Neurosciences**. . ISSN 03341763. 31:3 (2020) 245–268.

DESHPANDE, Prajakta; GOGIA, Neha; SINGH, Amit - Exploring the efficacy of natural products in alleviating Alzheimer's disease. **Neural Regeneration Research**. . ISSN 18767958. 14:8 (2019) 1321–1329.

DORSZEWSKA, Jolanta *et al.* - Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. **Current Alzheimer Research**. . ISSN 15672050. 13:9 (2016) 952–963.

ETTCHETO, Miren; BUSQUETS, Oriol; CAMINS, Antoni - Potential preventive disease-modifying pharmacological strategies to delay late onset Alzheimer's disease. **Neural Regeneration Research**. . ISSN 18767958. 14:10 (2019) 1721–1725.

- FEDE, Giuseppe Di *et al.* - Molecular subtypes of Alzheimer's disease. **Scientific Reports**. . ISSN 20452322. 8:1 (2018) 1–14.
- FLEISHER, T. A. - Apoptosis. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**. . ISSN 10811206. 78:3 (1997) 245–250.
- FOSTER, Evangeline M. *et al.* - Clusterin in Alzheimer's disease: Mechanisms, genetics, and lessons from other pathologies. **Frontiers in Neuroscience**. . ISSN 1662453X. 13:FEB (2019) 164.
- FRICKER, Michael *et al.* - Neuronal cell death. **Physiological Reviews**. . ISSN 15221210. 98:2 (2018) 813–880.
- GARCIA-ARANDA, Marilina; SERRANO, Alfonso; REDONDO, Maximino - Regulation of Clusterin Gene Expression. **Current Protein & Peptide Science**. . ISSN 13892037. 19:6 (2018) 612–622.
- GU, Cheng *et al.* - Long noncoding RNA EBF3-AS promotes neuron apoptosis in Alzheimer's disease. **DNA and Cell Biology**. . ISSN 15577430. 37:3 (2018) 220–226.
- GULYAEVA, N. V. *et al.* - Molecular and cellular mechanisms of sporadic Alzheimer's disease: Studies on rodent models in vivo. **Biochemistry (Moscow)**. . ISSN 16083040. 82:10 (2017) 1088–1102.
- HUANG, Chien Ning *et al.* - *Abelmoschus esculentus* subfractions attenuate beta amyloid-induced neuron apoptosis by regulating DPP-4 with improving insulin resistance signals. **PLoS ONE**. . ISSN 19326203. 14:6 (2019).
- HWANG, Sinwoo; LIM, Joo Weon; KIM, Hyeyoung - Inhibitory effect of lycopene on amyloid- $\beta$ -induced apoptosis in neuronal cells. **Nutrients**. . ISSN 20726643. 9:8 (2017) 1–15.
- KUMARAN, Alaganandam; HO, Cheng Chang; HWANG, Lucy Sun - Protective effect of *Nelumbo nucifera* extracts on beta amyloid protein induced apoptosis in PC12 cells, in vitro model of Alzheimer's disease. **Journal of Food and Drug Analysis**. . ISSN 10219498. 26:1 (2018) 172–181.
- LIAO, W. *et al.* - 3-N-butylphthalide inhibits neuronal apoptosis in rats with cerebral infarction via targeting P38/MAPK. **European review for medical and pharmacological sciences**. . ISSN 22840729. 23:3 (2019) 144–152.
- LIAO, Zheng Luan *et al.* - Salidroside protects PC-12 cells against amyloid  $\beta$ -induced apoptosis by activation of the ERK1/2 and AKT signaling pathways. **International Journal of Molecular Medicine**. . ISSN 1791244X. 43:4 (2019) 1769–1777.

LIU, Panwen *et al.* - Silibinin ameliorates STZ-induced impairment of memory and learning by up-regulating insulin signaling pathway and attenuating apoptosis. **Physiology and Behavior**. . ISSN 1873507X. 213:2020) 112689.

LIU, Pei-Pei *et al.* - History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. **Signal Transduction and Targeted Therapy**. . ISSN 2059-3635. 4:1 (2019).

MAYEUX, Richard; STERN, Yaakov - Epidemiology of Alzheimer disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. . ISSN 21571422. 2:8 (2012).

MCSHANE, Rupert *et al.* - Memantine for dementia. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. . ISSN 1469493X. 2019:3 (2019) 1–446.

MÜLLER, Thorsten *et al.* - The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-Relevance for Alzheimer's disease. **Progress in Neurobiology**. . ISSN 03010082. 85:4 (2008) 393–406.

NIIKURA, Takako; TAJIMA, Hirohisa; KITA, Yoshiko - Neuronal Cell Death in Alzheimers Disease and a Neuroprotective Factor, Humanin. **Current Neuropharmacology**. . ISSN 1570159X. 4:2 (2006) 139–147.

NIU, Zheng *et al.* - BBA - Biomembranes Interactions between amyloid  $\beta$  peptide and lipid membranes ☆. **BBA - Biomembranes**. . ISSN 0005-2736. 1860:9 (2018) 1663–1669.

OBULESU, M.; LAKSHMI, M. Jhansi - Apoptosis in Alzheimer's Disease: An Understanding of the Physiology, Pathology and Therapeutic Avenues. **Neurochemical Research**. . ISSN 15736903. 39:12 (2014) 2301–2312.

PICONE, Pasquale *et al.* - Mitochondrial Dysfunction: Different Routes to Alzheimer's Disease Therapy. **Oxidative medicine and cellular longevity**. 780179. 10.1155/2014/780179 (2014)

SHEA, Yat Fung *et al.* - Alzheimer's Disease. **Encyclopedia of Gerontology and Population Aging**. 10.1007/978-3-319-69892-2 (2020) 665-1.

SONG, Fuxia *et al.* - Brain cell apoptosis inhibition by butylphthalide in alzheimer's disease model in rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**. . ISSN 17921015. 13:6 (2017) 2771–2774.

**Tratamento | Associação Alzheimer Portugal** - [Consult. 23 jun. 2020]. Disponível em: <https://alzheimerportugal.org/pt/tratamento>

VALLÉE, Alexandre; LECARPENTIER, Yves - Alzheimer disease: Crosstalk between the

canonical Wnt/beta-catenin pathway and PPARs alpha and gamma. **Frontiers in Neuroscience**. . ISSN 1662453X. 10:OCT (2016).

VÉLEZ, Jorge I. *et al.* - Familial Alzheimer's Disease and Recessive Modifiers. **Molecular Neurobiology**. . ISSN 15591182. (2019).

XIA, W. (ED.), XU, H. Ed. .. - Amyloid precursor protein. Em **Amyloid Precursor Protein** [Consult. 20 mar. 2020]. Disponível em: <https://almerja.com/reading.php?idm=26673&fbclid=IwARINbhBjkx4ZqjSj9Hf8Wc-kQqsphmKOfA4GxblfwdMHoD7XF9XAUIGGcbM>>.ISBN 9780080552323

XU, Xuebo; LAI, Yueyang; HUA, Zi Chun - Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials. **Bioscience Reports**. . ISSN 15734935. 39:1 (2019).

ZĘKANOWSKI, Cezary; WOJDA, Urszula - Aneuploidy, chromosomal missegregation, and cell cycle reentry in Alzheimer's disease. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**. . ISSN 00651400. 69:2 (2009) 232–253.

ZHANG, Dongdong *et al.* - Icariin Prevents Amyloid Beta-Induced Apoptosis via the PI3K/Akt Pathway in PC-12 Cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. . ISSN 17414288. (2015).

ZHAO, Shengjie *et al.* - Increased apoptosis in the platelets of patients with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. **Clinical Neurology and Neurosurgery**. . ISSN 18726968. 143:(2016) 46–50.

ZHOU, Yixiu *et al.* - Alzheimer's disease : amyloid-based pathogenesis and potential therapies. **Cell Stress**. 2:7 (2018) 150–161.