



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Sofia Febras Fragoso Carmona

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Terapia Génica na Doença de Alzheimer: uma nova abordagem terapêutica” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Cláudia Silvestre, da Dra. Beatriz Costa e da Professora Doutora Maria Teresa da Teixeira Cruz Rosete apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2021



UNIVERSIDADE D COIMBRA

Sofia Febras Fragoso Carmona

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Terapia Génica na Doença de Alzheimer: uma nova abordagem terapêutica” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Cláudia Silvestre, da Dra. Beatriz Costa e da Professora Doutora Maria Teresa da Teixeira Cruz Rosete apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2021

Eu, Sofia Febras Fragoso Carmona, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2015249682, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Terapia Génica na Doença de Alzheimer: uma nova abordagem terapêutica” 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 informação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos, legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 7 de setembro de 2021.

Sofia Febras Fragoso Carmona

(Sofia Febras Fragoso Carmona)

AGRADECIMENTOS

Aos meus Super-Pais, os meus exemplos de vida e, sem dúvida os meus melhores amigos. Obrigada por todos os conselhos sábios durante estes 5 anos de curso e por me deixarem sonhar e ser feliz.

Aos meus avós, pelo carinho, pelos sorrisos e por estarem sempre presentes. Um grande obrigada.

Ao meu irmão que nunca me deixou cruzar os braços e incentivou-me diariamente a lutar pelos meus sonhos.

Ao Diogo, por todo o carinho, amor, paciência e dedicação e por ter tido um papel crucial nesta minha conquista. Sem ti não teria sido possível!

À Kelly, à Rita, à Sara, à Daniela, à Mariana, por tudo, ou quase tudo, na verdade. Serão sempre a família que escolhi.

À minha orientadora Professora Doutora Maria Teresa da Teixeira Cruz Rosete por ser o exemplo de docente e por todo o apoio, disponibilidade e dedicação. Um sincero agradecimento que, certamente, nunca será suficiente.

À Dra. Cláudia Silvestre e restante equipa técnica da Farmácia de Celas por todos os conhecimentos transmitidos, pela amizade e por todo o carinho e disponibilidade demonstradas durante o meu estágio.

À BasePoint por todo o apoio transmitido durante o estágio e pela experiência enriquecedora e fundamental para o meu futuro.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, incluindo corpo docente e não docente, um sincero agradecimento, por me terem acolhido tão bem nesta jornada.

E, por último, a ti Coimbra por me teres ensinado o verdadeiro significado de “saudade”.

ÍNDICE

Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

1	LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
2	INTRODUÇÃO	8
3	ANÁLISE SWOT	9
3.1	PONTOS FORTES (<i>STRENGTHS</i>)	9
3.1.1	Localização da Farmácia	9
3.1.2	Estruturação do Plano de Estágio	9
3.1.3	Preparação de Medicamentos Manipulados	11
3.1.4	Integração na Equipa Técnica.....	11
3.1.5	Serviços Farmacêuticos	11
3.2	PONTOS FRACOS (<i>WEAKNESSES</i>)	12
3.2.1	Plano de Estudos do MICF	12
3.2.2	Sazonalidade do Estágio	12
3.3	OPORTUNIDADES (<i>OPPORTUNITIES</i>).....	12
3.3.1	Formação Complementar.....	12
3.3.2	Novo Módulo de Atendimento.....	13
3.3.3	Dinamização e Gestão do Espaço.....	13
3.4	AMEAÇAS (<i>THREATS</i>).....	14
3.4.1	Medicamentos Esgotados.....	14
3.4.2	Pontos de Venda de MNSRM	14
3.4.3	Impacto do COVID-19 no Poder Económico dos Utentes	14
4	CONCLUSÃO	15
5	BIBLIOGRAFIA	16
6	ANEXOS.....	18

Parte II – Relatório de Estágio em Assuntos Regulamentares

1	LISTA DE ABREVIATURAS.....	23
2	INTRODUÇÃO	24
3	ANÁLISE SWOT	24
3.1	PONTOS FORTES (<i>STRENGTHS</i>)	25
3.1.1	Formações Internas.....	25
3.1.2	Integração na Equipa Técnica.....	25
3.1.3	Autonomia e Responsabilidade	26
3.1.4	Competências técnicas desenvolvidas	26
3.2	PONTOS FRACOS (<i>WEAKNESSES</i>)	27
3.2.1	Fundamentação de alegações.....	27
3.2.2	Duração do Estágio.....	27
3.3	OPORTUNIDADES (<i>OPPORTUNITIES</i>).....	27
3.3.1	Estágio curricular em diversas áreas	27
3.3.2	Aplicação de conhecimentos teóricos.....	28
3.4	AMEAÇAS (<i>THREATS</i>).....	28
3.4.1	Trabalho dependente de clientes.....	28
3.4.2	Formação Base de Ciências Farmacêuticas	28

4	CONCLUSÃO	29
5	BIBLIOGRAFIA	30
Parte III – Monografia “Terapia Génica na Doença de Alzheimer: uma nova abordagem terapêutica”		
1	LISTA DE ABREVIATURAS	34
2	INTRODUÇÃO	36
3	DOENÇA DE ALZHEIMER	37
	3.1 EPIDEMIOLOGIA.....	37
	3.2 ETIOLOGIA.....	37
	3.3 FISIOPATOLOGIA.....	38
	3.4 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER.....	46
4	TERAPIA GÉNICA.....	47
	4.1 COMPLEXIDADE DO SNC	48
	4.2 ESCOLHA DO GENE TERAPÊUTICO	48
	4.3 SELEÇÃO DO VETOR.....	48
	4.4 PROTOCOLO DE APLICAÇÃO	51
5	POTENCIAIS ALVOS.....	53
	5.1 METABOLISMO DE AB	53
	5.2 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS	54
	5.3 METABOLISMO DO COLESTEROL.....	55
	5.4 TAU	58
	5.5 NEUROTROFINAS	59
	5.6 INFLAMAÇÃO	62
	5.7 HOMEOSTASE PROTEICA- AUTOFAGIA.....	66
6	CONCLUSÃO	67
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
8	ANEXO I.....	83

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

I LISTA DE ABREVIATURAS

CHUC – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

PNV – Plano Nacional de Vacinação

PVP – Preço de Venda ao Público

SNS – Serviço Nacional de Saúde

SWOT – *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*

2 INTRODUÇÃO

Em Portugal, a existência do farmacêutico remonta ao século XV. Nessa época, conhecidos como boticários, as suas tarefas estavam, essencialmente, relacionadas com a preparação oficial de medicamentos ou de substâncias medicamentosas. Porém, ao acompanhar a evolução científica da última década, a prática farmacêutica começou a focar-se cada vez mais no cidadão e em princípios sustentados quer no uso racional do medicamento quer na salvaguarda da sua dispensa com a máxima qualidade, segurança e eficácia.¹

A Ordem dos Farmacêuticos refere que, “A Farmácia Comunitária é a face mais visível da profissão.” Efetivamente, corresponde ao primeiro local onde, maioritariamente, a população recorre por problemas de saúde.¹ Deste modo, ao ser uma unidade indispensável para o funcionamento sustentável e integrado do Serviço Nacional de Saúde (SNS)², é na Farmácia Comunitária que o farmacêutico se apresenta não só como um mero especialista do medicamento como também um agente de saúde pública.³

Ao fim de quatro anos e meio de intensa formação teórica e prática, o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) administrado pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), concede aos seus estudantes a possibilidade de ingressar numa última unidade curricular, o Estágio em Farmácia Comunitária, para uma abordagem prática e articulada com a dinâmica real. Esta oportunidade pretende consolidar os conhecimentos já adquiridos durante o curso, mas, sobretudo, a sua correta e atenciosa aplicação em *prol* do bem-estar dos utentes. Enquanto estudantes, este estágio é muito mais do que um exame final, é uma experiência que permite adquirir princípios e valores fulcrais para que, no futuro, nos tornemos farmacêuticos perfeitamente dedicados e competentes, pautados por confiança, disponibilidade e proximidade ao utente.

O presente relatório tem como objetivo retratar o Estágio Curricular em Farmácia Comunitária por mim experienciado, o qual teve início a 11 de janeiro e subsequente conclusão a 30 de abril de 2021, com uma duração total de 670 horas, na Farmácia de Celas em Coimbra, sob orientação da Dra. Cláudia Silvestre.

3 ANÁLISE SWOT

Tal como consta nas “Normas Orientadoras de Estágio do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas”,⁴ este relatório encontra-se sob a forma de análise SWOT, um acrónimo das palavras derivadas do inglês *Strengths*, *Weaknesses*, *Opportunities* e *Threats*. Este instrumento, desenvolvido nos anos 60 num contexto empresarial,⁵ possibilita uma análise crítica quer da minha prestação quer da minha experiência profissional como estagiária mediante um processo de avaliação profunda e sustentada em duas grandes dimensões: a interna, revelando os pontos fortes e fracos para a minha formação; a externa, evidenciando as oportunidades cedidas e as ameaças vivenciadas no decorrer deste estágio.

3.1 PONTOS FORTES (STRENGTHS)

3.1.1 Localização da Farmácia

A Farmácia de Celas abriu portas em 1957 na Rua António José D’Almeida como a antiga “Farmácia Montes Claros”. Atualmente, localiza-se na Estrada de Coselhas, junto à circular interna e externa, com grande proximidade ao Centro Hospitalar Universitário de Coimbra (CHUC) e a outras unidades de saúde.⁶ Apresenta-se não só como uma farmácia local para os utentes habituais, como também uma farmácia de passagem para todos os utentes ocasionais provenientes do meio hospitalar e/ou das restantes unidades de saúde que se encontram na proximidade.

É notório que na Farmácia de Celas encontramos um público-alvo bastante heterogéneo e, por isso, tive o privilégio de contactar com vários tipos de utentes, de diferentes estratos socioeconómicos e faixas etárias associados a distintos quadros clínicos. Deste modo, considero a localização como um ponto forte do meu estágio uma vez que permitiu que realizasse atendimentos diversificados e personalizados. Todos os dias foram de constante aprendizagem tanto a nível pessoal como profissional.

3.1.2 Estruturação do Plano de Estágio

A farmácia de Celas sujeita os seus estagiários ao verdadeiro e intenso ritmo de trabalho que um farmacêutico comunitário exerce e, nesse sentido, oferece uma preparação prática incomparável e altamente diferenciadora. Considero que a estruturação do plano de estágio foi prévia e cuidadosamente delineada. Houve uma preocupação para que os estagiários, numa fase inicial do estágio, se familiarizassem com as tarefas do *back-office* antes de iniciarem a fase de atendimento ao público. De seguida, abordo detalhadamente algumas das tarefas desempenhadas.

A gestão de encomendas e arrumação dos produtos foi uma das primeiras tarefas atribuídas enquanto estagiária. Nesta fase tive a oportunidade de rececionar, conferir e criar encomendas (encomendas diárias, encomendas instantâneas e encomendas diretas aos laboratórios). De realçar que os produtos rececionados só eram armazenados depois de verificar e atualizar o prazo de validade no sistema informático, confirmar os Preços de Venda ao Público (PVPs), confirmar o número de embalagens bem como o valor total da encomenda (salvo os medicamentos com condições especiais de conservação que de forma a salvaguardar a sua estabilidade e qualidade eram de imediato rececionados e armazenados). Por outro lado, quando identificava alguma irregularidade na receção como a existência de produtos faturados e não enviados ou não faturados e enviados ou produtos danificados, atuava de imediato no sentido de reclamar e/ou devolver. A arrumação dos produtos foi também uma tarefa essencial porque permitiu que me familiarizasse com os vários produtos, associar nomes comerciais aos princípios ativos e relembrar as indicações terapêuticas. Para além disso, esta tarefa permitiu que me habituasse aos locais de armazenamento dos diversos produtos e, desta forma, facilitar a sua procura no atendimento.

A gestão comercial apresenta-se como uma tarefa crucial para a devida valorização da Farmácia. Por um lado, a gestão do *stock* é uma tarefa que deve ser efetuada com extrema prudência de modo a prevenir a perda de vendas por falta de produtos e/ou a perda de produtos por rutura de *stock*. Nesta função é fundamental selecionar criteriosamente os produtos de acordo com os desejos da população nas diferentes estações do ano para alcançar uma maior rentabilidade da farmácia. Por outro lado, a escolha quer dos fornecedores quer dos estabelecimentos de contratos exige uma procura infundável das melhores oportunidades.

O atendimento ao público foi talvez a tarefa mais desafiante e mais enriquecedora do meu estágio. Esta fase iniciou-se de forma gradual com um carácter meramente observacional com vista a me familiarizar com a imprevisibilidade no atendimento. Posteriormente, efetuei atendimentos devidamente acompanhada por um membro da equipa técnica sendo que todas as minhas falhas foram reconhecidas e progressivamente ultrapassadas. Graças à equipa técnica foi possível não só ganhar alguma confiança como também aprender a aplicar e a interligar conhecimentos teóricos da Farmacologia, Farmácia Clínica e Indicação Farmacêutica. Neste sentido, a interação com a população fomentou o desenvolvimento de competências essenciais como a autonomia, espírito crítico, destreza informática e ajuste dos termos técnicos às diversas realidades que iam surgindo no ato da dispensa.

3.1.3 Preparação de Medicamentos Manipulados

Atualmente a preparação de medicamentos manipulados é cada vez menos frequente em virtude da evolução tecnológica na Indústria Farmacêutica. No entanto, a farmácia de Celas continua a oferecer este serviço aos seus utentes. Nesse sentido, tive o privilégio de proceder à preparação de um medicamento manipulado que se justifica em casos muito específicos de personalização de terapêutica, preenchimento de lacunas ou quando a forma farmacêutica em causa não existe no mercado. Considero esta tarefa crucial, uma vez que me permitiu colocar em prática alguns conhecimentos previamente adquiridos nas disciplinas de Farmácia Galénica e Tecnologia Farmacêutica. Evidencio a preparação de uma pomada de enxofre a 10% para o tratamento da escabiose humana (sarna), cuja ficha de preparação vem apresentada no ANEXO I.

3.1.4 Integração na Equipa Técnica

A Farmácia de Celas data de um amplo histórico de aceitação de estagiários, evidenciando um elevado grau de respeito, amabilidade e consideração no seu acolhimento. A equipa técnica é constituída por 5 colaboradores que se distinguem dos demais não só pelos seus longos anos de experiência e notável profissionalismo bem como pela sua dedicação ao bem-estar dos seus utentes. De realçar que consegui superar as dificuldades e aperfeiçoar as tarefas por mim desempenhadas graças ao acompanhamento diário que me proporcionaram. Toda a equipa técnica contribuiu para o enriquecimento da minha formação académica, colmatando lacunas referentes à componente prática do plano de estudos do MICF. Aprendi, por isso, que para o sucesso são essenciais qualidades como humildade, amizade e entreaajuda.

3.1.5 Serviços Farmacêuticos

A Farmácia de Celas é uma farmácia que prioriza o bem-estar e salvaguarda a saúde dos seus utentes. Desta forma, dispõe de um conjunto de serviços diferenciados como a administração de medicamentos injetáveis e de vacinas não incluídas no Programa Nacional de Vacinação (PNV), a determinação de parâmetros bioquímicos e fisiológicos (colesterol total, glicémia e pressão arterial), consultas de nutrição, de podologia, preparação de manipulados, testes rápidos de antígeno para o SARS-CoV-2 entre outros.

Dos serviços supracitados tive a oportunidade de medir a pressão arterial de vários utentes e contribuir para a consciencialização da importância da adoção de estilos de vida saudáveis e de medidas não farmacológicas. Como estes serviços são prestados num gabinete privado fomentam uma relação de maior proximidade e confiança com o utente. Considero este tópico como um ponto forte do meu estágio pelo facto de ter sido confrontada com

situações reais onde tive a oportunidade de realizar medições e analisar os respetivos resultados bem como comunicar em privado com os utentes.

3.2 PONTOS FRACOS (WEAKNESSES)

3.2.1 Plano de Estudos do MICF

Importa realçar que o MICF dispõe de um plano de estudos bastante diversificado e abrangente, com uma marcada componente teórica, delineado para formar profissionais multifacetados e aptos a ingressar em qualquer área do campo farmacêutico. Contudo, com o decorrer do meu estágio experienciei algumas lacunas que devem ser colmatadas, especialmente, relacionadas com a parte prática. Como exemplo, destaco a dificuldade que senti no aconselhamento nas áreas das afeções oftalmológicas, suplementação, veterinária e dispositivos médicos, tendo sido necessário recorrer ao apoio e conhecimento dos colaboradores. Desta forma, realço a importância de alargar e especificar conhecimentos nas áreas supracitadas, sendo interessante resolver casos práticos que retratem a realidade diária nas farmácias comunitárias.

3.2.2 Sazonalidade do Estágio

Como supracitado, o meu estágio decorreu entre 11 de janeiro e 30 de abril de 2021, compreendendo, essencialmente, meses pertencentes à época do inverno. Por conseguinte, os medicamentos mais frequentemente procurados pelos utentes resumiam-se a antigripais, descongestionantes nasais, anti-histamínicos, pastilhas para a dor de garganta e xaropes para a tosse. Neste sentido, não foi possível contactar, de forma detalhada, com os produtos vendidos, por exemplo, nas estações do ano mais quentes, tais como protetores solares e cremes pós-solares, repelentes de insetos, entre outros.

3.3 OPORTUNIDADES (OPPORTUNITIES)

3.3.1 Formação Complementar

Como a formação técnico-científica é uma constante na profissão farmacêutica, a Farmácia de Celas concedeu-me a oportunidade de participar em algumas formações internas com o propósito de aprender novos conhecimentos e consolidar outros já adquiridos. Geralmente de curta duração, estas decorriam no período de funcionamento da farmácia, em regime *online* devido à pandemia, e eram facultadas por delegados de propaganda médica. Destinavam-se, essencialmente, à divulgação quer das indicações terapêuticas quer das vantagens dos produtos já comercializados ou quase a serem lançados no mercado e, ainda, à apresentação de algumas técnicas de venda. Deste modo, tive a oportunidade de assistir a 3

formações internas que englobaram, essencialmente, a área da dermocosmética, o que facilitou imenso o meu aconselhamento ao público.

3.3.2 Novo Módulo de Atendimento

Considero que o contacto com o novo sistema informático - Novo Módulo de Atendimento - foi uma das grandes oportunidades do meu estágio. Durante esta experiência tive o privilégio de trabalhar quer com o SIFARMA2000® quer com o Novo Módulo de Atendimento, aprendendo desta forma a dominar as valências de ambos. Este novo sistema informático surge não só para simplificar alguns procedimentos no atendimento bem como torná-lo mais rápido e intuitivo. Todos os atendimentos que realizei foram efetuados neste programa informático que, na minha opinião, era muito mais fácil de operar e em termos visuais mais intuitivo. Este módulo apresenta determinadas vantagens face ao SIFARMA2000® como a possibilidade de criar campanhas promocionais internas, adicionar novos componentes em qualquer fase do atendimento, gerir mais facilmente documentos de faturação entre outras. Este novo módulo de atendimento ainda não está implementado em todas as farmácias portuguesas e o facto de estar presente como projeto piloto na farmácia de Celas constitui um aspeto diferenciador do meu estágio e uma mais-valia para o meu futuro como farmacêutica. Trabalhar com estes dois programas foi uma grande oportunidade visto que o SIFARMA2000® é o sistema informático mais comum nas farmácias e que no futuro será substituído pela Novo Módulo de Atendimento.

3.3.3 Dinamização e Gestão do Espaço

Todos os colaboradores da farmácia de Celas, para além de excelentes profissionais, procuram organizar a farmácia face à forte competitividade do mercado. Nesse sentido, empenham-se a criar um espaço acolhedor salvaguardando a visibilidade e sinalizam os vários setores, marcas e produtos. Por outro lado, a disposição dos produtos nos lineares e nas gôndolas bem como a montra são regularmente reformuladas atendendo às campanhas promocionais das diversas marcas, às datas comemorativas e, ainda, à sazonalidade das doenças mais frequentes. Encaro este tópico como uma oportunidade pelo facto de ter colaborado na elaboração dos lineares e gôndolas e recordar alguns conhecimentos previamente adquiridos nas unidades curriculares de Comunicação e Marketing e Organização e Gestão farmacêutica.

3.4 AMEAÇAS (THREATS)

3.4.1 Medicamentos Esgotados

A realidade dos medicamentos esgotados tem ganho proporções significativas em virtude da legalidade do *parallel trading*. Várias foram as situações que fui confrontada com a frustração e desagrado dos utentes perante a impossibilidade de lhes poder dispensar os medicamentos prescritos e, por vezes habituais, por se encontrarem esgotados e sem data prevista de chegada à farmácia.¹¹ Esta realidade não só coloca em causa a credibilidade da farmácia, como também dificulta o acesso dos utentes à sua medicação. No entanto, importa realçar que todos os colaboradores foram incansáveis na procura de alternativas terapêuticas igualmente viáveis com vista a suprimirem as necessidades do maior número possível de utentes pelo menos até à reposição da normalidade.

3.4.2 Pontos de Venda de MNSRM

O Decreto-Lei n.º 134/2005 de 16 de Agosto veio legalizar a comercialização de medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) fora das farmácias, uma vez que o Governo reconheceu vários benefícios aos consumidores.¹² É evidente que estes pontos de venda se têm vindo a multiplicar nos últimos tempos, especialmente nas grandes superfícies. A existência destes locais é inevitavelmente uma ameaça à profissão farmacêutica porque, para além de ter um impacto na viabilidade económica de uma farmácia, banaliza o estatuto do medicamento. De facto, as grandes superfícies têm a possibilidade de implementar preços de venda ao público inferiores visto que efetuam grandes volumes de compras. Além disso, há um apelo irracional à automedicação sem que haja um adequado aconselhamento e acompanhamento farmacoterapêutico ao utente que permita que o medicamento seja tomado com a maior segurança e pertinência.

3.4.3 Impacto do COVID-19 no Poder Económico dos Utes

Uma das consequências visíveis da pandemia de COVID-19 é o aumento do nível de desemprego. Esta infelicidade desencadeou uma evidente quebra do poder económico de muitas famílias que se viram obrigadas a implementar medidas para evitar gastos não prioritários. Como consequência, as vendas de produtos cosméticos e de bem-estar têm sido severamente afetadas. Por outro lado, também as tentativas de *cross-selling* e *up-selling* foram influenciadas de forma negativa.

4 CONCLUSÃO

Concluído o Estágio Curricular em Farmácia Comunitária, reconheço que estes quatro meses, repletos de aprendizagem, proporcionaram uma contínua preparação para a primazia e permitiram que encarasse o futuro a nível profissional com uma maior segurança e otimismo.

Após esta etapa do meu percurso académico, acredito que um farmacêutico competente será para todo o sempre um eterno estudante, um profissional preocupado e capaz de se enriquecer técnico-cientificamente com o propósito de satisfazer com plenitude as necessidades da comunidade. Para terminar, reforço a importância deste Estágio enquanto unidade curricular dado que prepara inquestionavelmente os alunos para o exercício da profissão farmacêutica. Por essa razão, congratulo a FFUC pela oportunidade que nos oferece enquanto estudantes finalistas e defendo a sua inclusão nos próximos anos letivos.

De salientar que deste estágio levo uma experiência absolutamente gratificante e da Farmácia de Celas um exemplo de excelência, profissionalismo e amizade do qual estarei eternamente grata.

5 BIBLIOGRAFIA

1. Ordem dos Farmacêuticos. Farmácia Comunitária - [Acedido a 11 de julho de 2021]. Disponível na internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/>
2. Associação Portuguesa de Estudantes de Farmácia. Farmácia Comunitária - [Consultado a 11 de julho de 2021]. Disponível na internet: <http://apef.pt/farmacia-comunitaria/>
3. Ordem dos Farmacêuticos. - Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos [Consultado a 11 de julho de 2021]. Disponível na internet: <http://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/a-ordem-dos-farmaceuticos/regulamentos/>
4. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. - Normas Orientadoras do Estágio Curricular. (2021).
5. Instituto de Desenvolvimento Educacional. - A Maneiras Mais Simples de Entender Análise SWOT [Consultado a 11 de julho de 2021]. Disponível na internet: <https://seculoxximinas.com.br/fgv/blog/planejamento/a-maneira-mais-simples-de-entender-analise-swot>
6. Farmácia de Celas. Farmácia de Celas-Início [Acedido a 12 de julho de 2021]. Disponível na internet: <https://www.farmaciadecelas.pt/>
7. VALORMED. - Quem Somos [Consultado a 12 de julho de 2021]. Disponível em: <http://www.valormed.pt/paginas/2/quem-somos/>
8. Serviços Partilhados do Ministério da Saúde. Programa de Troca de Seringas [Consultado a 15 de julho de 2021]. Disponível em: <http://spms.minsaude.pt/2014/05/programa-troca-de-seringas-relatorio-anual-2013/>
9. Fundação de Assistência Médica Internacional. Reciclagem de Radiografias [Consultado a 15 de julho de 2021]. Disponível em: <https://ami.org.pt/blog/21a-campanha-reciclagem-radiografias/>
10. Farmácias Portuguesas. Como funciona o Cartão Saúde? [Consultado a 15 de julho de 2021]. Disponível em: <https://www.farmaciasportuguesas.pt/sauda/como-funciona>
11. Silveira, J. - A verdade sobre os Medicamentos “Esgotados”. Público. 51453 (2012) 52.
12. Decreto-Lei n.º 134/2005 de 16 de agosto de 2005 do Ministério da Saúde, Diário da República, 1ª Série, n.º 156 de 16 de agosto de 2005.
13. Decreto-Lei n.º 176/2006 de 30 de agosto de 2006 do Ministério da Saúde, Diário da República, 1ª Série, n.º 167 de 30 de agosto de 2006.
14. Farmácia Nova da Maia. Farmácia Nova da Maia-Desconforto Urinário [Consultado a 16 de julho de 2021]. Disponível em: <https://farmacianovadamaia.pt/pt/desconforto-urinario/1263-advancis-uritabs-30comprimidos-5601653004428.html>
15. Guay, D. R. P. - Cranberry and Urinary Infections. Drugs. 69 (2009).

16. Johnson & Johnson. - Resumo das características do medicamento Imodium rapid 2mg comprimido orodispersível. 7 (2012).
17. INFARMED, I. P. - Resumo das Características do Medicamento - UL-250, 250 mg, cápsulas. (2018).
18. INFARMED. - Resumo das Características do Medicamento - Vomidrine 50 mg. 2-7 (2009).

6 ANEXO I - FICHA DE PREPARAÇÃO DO MEDICAMENTO MANIPULADO

(carimbo da Farmácia)

FICHA DE PREPARAÇÃO



Pomada de enxofre a 10%

N.º MANIPULAÇÃO(LOTE) [REDACTED]

MATÉRIAS-PRIMAS	Nº DO LOTE/VALIDADE	FUNÇÃO	BOLETIM DE ANÁLISE	QUANTIDADE PESADA
Enxofre	L: 181035-P-1 V: 09/2021	Antisséptico, fungicida	1123	20g
Vaselina sólida	L:201144-p-1 Val:01/09/2025	Veículo	1155	q.b.p.200g

PROCEDIMENTO DE MANIPULAÇÃO

Conforme método descrito em anexo.

AÇÃO FARMACOLÓGICA

Tratamento dermatológico/sarna

CONDIÇÕES DE CONSERVAÇÃO –

- Temperatura Ambiente
 Frio [2° - 5° C]
 Frasco de vidro bem fechado
 Agitar antes de usar
 Abrigo da luz
 Recipiente opaco e bem fechado

PRAZO DE UTILIZAÇÃO – 30 dias após preparação

NOME [REDACTED]

CONTACTO: [REDACTED]

MORADA – [REDACTED]

NOME DO PRESCRITOR – [REDACTED]

CONTROLO DO PRODUTO ACABADO

CARACTERÍSTICAS	RESULTADO
CARACTERES ORGANOLÉTICOS (COR, CHEIRO, ASPETO GERAL, ETC.)	V
PH	V
QUANTIDADE/ MASSA/ VOLUME CONFORME PRESCRIÇÃO	200g

ANEXOS

- RECEITA MÉDICA
 ANEXO COM MÉTODO DE PREPARAÇÃO
 OUTRO

Rótulo + Validação de pesagem

CÁLCULO DO PREÇO DE VENDA
MATÉRIAS – PRIMAS

MATÉRIAS-PRIMAS	EMBALAGEM EXISTENTE EM ARMAZÉM		PREÇO DE AQUISIÇÃO DE UMA DADA QUANTIDADE UNITÁRIAS (S/ IVA) (€)		QUANTIDADE A USAR	FATOR MULTIPLICATIVO	PREÇO DA MATÉRIA--PRIMA UTILIZADA NA PREPARAÇÃO
	QUANTIDADE ADQUIRIDA	PREÇO DE AQUISIÇÃO (S/ IVA)	QUANTIDADE UNITÁRIA	PREÇO			
Enxofre	1kg	8.89€	1g	0.0089	X 20	X 1,9	= [REDACTED]
Vaselina sólida	1kg	7,05€	1g	0.007	x 200	x 1.6	= [REDACTED]
					x	x	=
					x	x	=
					x	x	=
					x	x	=
					x	x	=
SUBTOTAL A							[REDACTED]

HONORÁRIOS DE MANIPULAÇÃO

	FORMA FARMACÉUTICA	QUANTIDADE	F (€)	FATOR MULTIPLICATIVO	VALOR
VALOR REFERENTE À QUANTIDADE BASE	Pomada propriamente dita	100	3	x 5.05	= [REDACTED]
VALOR ADICIONAL		100	0,01	X 5,05	= [REDACTED]
SUBTOTAL B					[REDACTED]

MATERIAL de Embalagem

MATERIAL DE EMBALAGEM	PREÇO DE AQUISIÇÃO (S/ IVA)	QUANTIDADE	FATOR MULTIPLICATIVO	VALOR
Recipiente unguentor 200	1.54	x 1	x 1,2	= [REDACTED]
		x	x 1,2	=
SUBTOTAL C				[REDACTED]

PREÇO DE VENDA AO PÚBLICO DO MEDICAMENTO MANIPULADO

(A + B + C) x 1,3

+ IVA

D

DISPOSITIVOS AUXILIARES DE ADMINISTRAÇÃO

DISPOSITIVO	PREÇO UNITÁRIO	QUANTIDADE	VALOR
E			[REDACTED]

Preço Final (D + E)

OPERADOR – _____

SUPERVISOR – _____

RUBRICA DIRETOR TÉCNICO	DATA
-------------------------	------

7 ANEXO II - CASOS PRÁTICOS

CASO I

A utente A, do sexo feminino e com cerca de 50 anos, dirige-se à farmácia com sintomas sugestivos de uma infeção urinária (vontade frequente e inesperada em urinar, não estando associada a dor nem a perda de sangue). Revelou que tinha acabado de tomar o antibiótico prescrito pelo médico e que as infeções eram bastante frequentes. A utente pretendia evitar uma nova infeção e, nesse sentido, aconselhei o dispositivo médico ADVANCIS URITABS constituído por extratos padronizados de Arando Americano e Uva-Ursina numa fórmula reforçada com frutooligosacáridos (FOS) indicado na prevenção das infeções urinárias, com a toma diária de uma cápsula, por um período de um mês.¹⁴ O seu principal mecanismo de ação baseia-se na inibição da aderência e, conseqüente, formação de biofilmes por bactérias como a *Escherichia coli* no epitélio urinário, o que impede a geração da infeção. Por outro lado, alertei a utente que o produto não seria eficaz numa infeção já instalada, dado que o Arando não demonstra eficácia na remoção de biofilmes já formados.¹⁵ Reforcei que caso os sintomas permanecessem e/ou piorassem, deveria consultar novamente um médico. Como medidas não farmacológicas, aconselhei a ingestão abundante de água, uma adequada higiene genital e, por último, que evitasse pensos diários e roupa interior sintética.

CASO II

O utente B, do sexo masculino e com cerca de 40 anos, dirigiu-se à farmácia, apressadamente queixando-se de desconforto abdominal e diarreia que durava há já alguns dias. Solicita-me uma solução urgente para a sua situação, apresentando motivos profissionais. Dado que a dispensa de fármacos antidiarreicos, numa primeira abordagem, ser desaconselhada, optei por garantir que o utente não apresentava outros sinais como febre, vômitos, dores de estômago e presença de sangue e/ou pus nas fezes. Na ausência destes sinais, dispensei, com autorização de uma farmacêutica, uma embalagem do MNSRM, Imodium Rapid®, contendo comprimidos orodispersíveis com 2 mg de loperamida - um agente obstipante que diminui o peristaltismo propulsivo, aumenta o tempo de trânsito intestinal e a reabsorção de água.¹⁶ Esclareci as particularidades associadas à sua toma, explicando que deveria tomar de imediato 2 comprimidos, seguidos de 1 comprimido após cada dejeção diarreica. Alertei para uma dose máxima diária de 4 comprimidos e uma duração máxima de tratamento de 48 horas.¹⁶ Por fim, dei ênfase às medidas não farmacológicas de hidratação e reposição regular de eletrólitos, recomendando o suplemento alimentar probiótico UL-250® constituído por *Saccharomyces boulardii*, com a toma de 1 cápsula, 3 vezes ao dia de modo a reestabelecer a flora intestinal.¹⁷

CASO III

A utente C, do sexo feminino e aproximadamente com 50 anos, dirige-se à farmácia solicitando algo para prevenir os enjoos e vômitos. Refere que vai fazer uma longa viagem de carro e tem tendência para enjoar. Na conversa que estabeleci com a utente, pretendi perceber se a utente sofria de algum tipo de doença ou se estava grávida ou em período de amamentação. E atendendo a que nenhuma destas situações se verificava, aconselhei o MNSRM, o Vomidrine® (dimenidrinato, 50 mg), um antiemético antagonista dos recetores H1 cedido em caso de vômitos associados ao movimento.¹⁸ Aconselhei a utente a tomar um comprimido meia hora antes de iniciar a viagem. Além disso, alertei para os possíveis efeitos secundários associados como sonolência, tonturas e zumbidos, à qual a utente referiu que não seria problema atendendo a que não era a condutora da viatura e que aproveitava para dormir durante a viagem. Por fim, propus algumas medidas não farmacológicas como evitar alimentos gordos e líquidos em excesso antes de viajar.

Parte II

Relatório de Estágio em Assuntos Regulamentares

I LISTA DE ABREVIATURAS

CIR – *Cosmetic Ingredient Review*

CPNP – *Cosmetic Products Notification Portal*

ECHA – *European Chemicals Agency*

MICF – *Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas*

PIF – *Product Information File*

SCCS – *Scientific Committee on Consumer Safety*

SWOT – *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*

2 INTRODUÇÃO

Ao longo destes quatro anos e meio desenvolvi competências em diversas áreas, sendo os Assuntos Regulamentares um dos setores que me suscitou mais curiosidade e interesse. O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) habilita-nos para o mercado de trabalho nas mais diversas saídas profissionais, graças à aquisição de uma grande variedade de conhecimentos e à consciencialização de que o farmacêutico pode enveredar em especialidades como análises clínicas, farmácia hospitalar, assuntos regulamentares ou indústria farmacêutica, para além da farmácia comunitária.¹

A Faculdade de Farmácia permite aos seus estudantes a melhor formação possível e, nesse sentido, é de louvar todo o trabalho realizado por esta instituição. A faculdade estabeleceu protocolos com várias entidades em diferentes áreas permitindo, desta forma, experienciar outros estágios curriculares. Enalteço este tipo de protocolos que permitem, por um lado, expandir conhecimentos e experiência e, por outro, o contacto com outras realidades possibilitando uma melhor compreensão do papel do farmacêutico nos diversos ramos de atuação.

Perante esta oportunidade, optei por realizar um estágio curricular numa empresa de consultoria, a *BasePoint Consulting Services* (BasePoint). Para além de corresponder ao meu interesse na área regulamentar, expandi os meus conhecimentos referentes aos produtos cosméticos, um dos principais focos da empresa.

O presente relatório tem como objetivo apresentar o Estágio Curricular em Assuntos Regulamentares por mim experienciado, o qual teve início a 3 de maio e, subsequente conclusão a 30 de julho de 2021 na consultora *BasePoint Consulting Services*, uma empresa sediada em Coimbra, sob orientação da Dra. Beatriz Costa.

3 ANÁLISE SWOT

Tal como consta nas “Normas Orientadoras de Estágio do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas”,² este relatório encontra-se sob a forma de análise SWOT, um acrónimo das palavras derivadas do inglês *Strengths*, *Weaknesses*, *Opportunities* e *Threats*. Este instrumento, desenvolvido nos anos 60 num contexto empresarial,³ possibilita uma análise crítica quer da minha prestação quer da minha experiência profissional como estagiária mediante um processo de avaliação profunda e sustentada em duas grandes dimensões: a interna, revelando os pontos fortes e fracos para a minha formação; a externa, evidenciando as oportunidades cedidas e as ameaças vivenciadas no decorrer deste estágio.

3.1 PONTOS FORTES (STRENGTHS)

3.1.1 Formações Internas

Previamente à realização das várias tarefas, assisti a formações internas ministradas pelos colaboradores que contribuíram para o meu sucesso diário. Valorizo toda a dedicação prestada pela equipa no decorrer do estágio, especialmente no primeiro dia e sempre que me era entregue uma nova tarefa ou apresentada uma nova área.

No primeiro dia de estágio assisti a uma formação sobre produtos cosméticos e esclarecimentos referentes ao Regulamento (CE) n.º 1223/2009⁴ do Parlamento Europeu e do Conselho, de 30 de novembro de 2009, por parte do Dr. David Costa. No decorrer da formação foi-me apresentada a estrutura de um *Product Information File* (PIF) assim como todos os relatórios e fichas técnicas imprescindíveis à sua elaboração. Foi-me também apresentado diversas bases de dados, como o *Cosmetic Ingredient Review* (CIR), o *Cosing*, o *European Chemicals Agency* (ECHA) e o *Scientific Committee on Consumer Safety* (SCCS) - ferramentas relevantes para a elaboração do dossiê técnico. Neste mesmo dia, presenciei uma formação acerca da avaliação de rotulagem de produtos cosméticos por parte do Dr. David Costa. Aprendi também a notificar um produto cosmético no portal adequado para o efeito - *Cosmetic Products Notification Portal* (CPNP). Dado que se trata de um portal europeu, a partir do momento que o produto cosmético é registado nesta plataforma, não é necessária uma notificação adicional noutro Estado-membro da União Europeia.

No decorrer do meu estágio presenciei uma outra formação acerca dos dispositivos médicos e explicações relativas ao novo Regulamento (UE) n.º 2017/745 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 5 de abril de 2017, por parte da Dra. Carmen Pinto. Durante a formação tive a oportunidade de assistir ao registo de um dispositivo médico na plataforma do INFARMED, o Sistema de Registo de DM/DIV.

Estas formações foram determinantes para alcançar o sucesso diário e ultrapassar todos os desafios sentidos no decorrer do estágio. Além disso, permitiram que compreendesse melhor os serviços prestados pela BasePoint e alcançar mais facilmente o êxito no estágio.

3.1.2 Integração na Equipa Técnica

A BasePoint é uma empresa de consultoria focada no setor dos Produtos Cosméticos, Suplementos Alimentares, Dispositivos Médicos e Biocidas. A empresa está sediada no Edifício Fernão Magalhães, em Coimbra, e é composta por uma equipa jovem, competente e dinâmica.

Como é uma empresa pequena tive o privilégio de trabalhar com a maioria dos colaboradores e de exercer diversas funções. Adaptei-me rapidamente à rotina da equipa e

cooperei com os colaboradores com vista a adquirir conhecimentos diversificados. Aproveitei também a experiência destes profissionais para esclarecer dúvidas e consolidar conhecimentos. Foi, de facto, um dos pontos fortes do meu estágio.

3.1.3 Autonomia e Responsabilidade

No decorrer do estágio, senti o incentivo e apoio constante por parte de toda a equipa na realização das tarefas atribuídas e que procurava desempenhar com autonomia. Apesar de sentir uma enorme responsabilidade nas tarefas que fiquei encarregue foi-me sempre prestado auxílio e supervisão das mesmas. Diariamente, era me questionado em que fase do trabalho estava, que dificuldades estava a sentir e se necessitava de algum tipo de ajuda. Quer a responsabilidade quer a autonomia foram competências que procurei adquirir durante o estágio, dado que as considero essenciais para o exercício da atividade farmacêutica.

3.1.4 Competências técnicas desenvolvidas

Com o decorrer do estágio, adquiri e fortaleci competências técnicas fundamentais para integrar, no futuro, o mundo do trabalho.

Primeiramente, destaco o domínio da língua inglesa que se refletiu essencial na realização de todos os trabalhos desempenhados na BasePoint. O conhecimento do inglês tornou-se crucial no momento da pesquisa bibliográfica, por exemplo, para elaborar o perfil toxicológico de um ingrediente ou para interpretar as fichas técnicas das matérias-primas e certificados de análise.

Paralelamente, destaco o meu aperfeiçoamento a nível de pesquisa em plataformas como o CIR, o SCCS e a ECHA como também no motor de busca PubMed.

Por outro lado, realço também as competências informáticas e todos os conselhos que me foram transmitidos que me possibilitaram economizar tempo de trabalho e, conseqüentemente, ser mais eficiente. Em virtude da constante utilização do computador, as minhas competências nas diversas ferramentas do Microsoft Office evoluíram, semanalmente, especialmente a nível do Microsoft Word®.

O facto de ter iniciado o estágio com conhecimentos nestas áreas permitiu que integrasse mais rapidamente o ambiente de trabalho. Todavia, tenho consciência que, finalizado o estágio, o meu domínio sobre estas vertentes e a sua adequação ao contexto real é consideravelmente maior e mais amplo. Todo o conhecimento adquirido durante o estágio acompanhar-me-á no futuro.

3.2 PONTOS FRACOS (WEAKNESSES)

3.2.1 Fundamentação das alegações

A fundamentação das alegações foi uma das tarefas onde senti maior dificuldade. O Regulamento n.º 655/2013 da Comissão de 10 de julho de 2013 determina critérios comuns que visam justificar as alegações. No entanto e, embora existam critérios que necessitam de ser respeitados, a avaliação do seu cumprimento depende da interpretação do avaliador de segurança. De facto, a experiência nesta tarefa é crucial para justificar ou recusar determinadas alegações nos produtos cosméticos.

3.2.2 Duração do Estágio

Um ponto fraco que destaco neste estágio foi a sua curta duração. A empresa BasePoint presta serviços nas áreas da Cosmética, Suplementos Alimentares, Dispositivos Médicos e Biocidas. Considerando a curta duração do mesmo, houve a necessidade de priorizar uma das áreas de atuação da empresa - a cosmética. Apesar de ter tido a oportunidade de realizar tarefas em todos os setores, a maioria foi dedicada aos cosméticos, o que conseqüentemente limitou a formação das restantes. Durante esta experiência e, dado que se apresenta como um estágio de cariz opcional, procurei ganhar competências neste setor, reter o máximo de conhecimento possível e compreender melhor a realidade profissional.

Desta forma, considero que um estágio mais duradouro numa empresa como a BasePoint, concederia a oportunidade de aprofundar conhecimentos em todas as áreas de atuação, fundamentar mais competências e inclusive preencher determinadas lacunas.

3.3 OPORTUNIDADES (OPPORTUNITIES)

3.3.1 Estágio curricular em diversas áreas

O MICF apresenta-se como um curso bastante amplo e com uma enorme polivalência. No entanto, há certas áreas que são pouco exploradas durante o curso como a área dos produtos cosméticos, suplementos alimentares e dispositivos médicos. Por exemplo, na unidade curricular de Dermofarmácia e Cosmética apenas adquirimos conhecimentos básicos referentes ao aconselhamento farmacêutico e desenvolvimento galénico.

O estágio realizado nesta empresa concedeu-me o privilégio de conhecer, de uma forma mais aprofundada, a área regulamentar dos produtos cosméticos. Tive também a oportunidade de compreender melhor a área regulamentar dos dispositivos médicos e suplementos alimentares, ainda que estes tenham sido de uma forma mais superficial

atendendo à curta duração do estágio. Deste modo, considero que consegui adquirir competências que me individualizam e destacam como futura profissional.

3.3.2 Aplicação de conhecimentos teóricos

O vasto plano deste curso facultou-me bases essenciais e conhecimentos nas mais diversas áreas científicas para o meu futuro enquanto farmacêutica. Conforme o trabalho desempenhado na BasePoint saliento a importância das áreas de assuntos regulamentares e da cosmética, exploradas nas unidades curriculares de Assuntos Regulamentares e Dermofarmácia e Cosmética, durante o 4º ano. Estas unidades curriculares proporcionaram-me um enquadramento geral bem como vários conhecimentos teóricos acerca destas áreas, tendo sido essenciais para facilitar a minha integração nas tarefas que desempenhei.

Na empresa tive oportunidade de aplicar conhecimentos teóricos a situações reais e, desta forma, atualizar-me. São áreas em constante evolução e, mesmo após concluir o MICE, é fundamental o farmacêutico manter-se atualizado, numa perspetiva de autorregulação.

3.4 AMEAÇAS (THREATS)

3.4.1 Trabalho dependente de clientes

O trabalho numa consultoria como a BasePoint está dependente dos serviços para os quais o cliente a requisita. Nesse sentido, as tarefas que desempenhei durante o estágio dependiam do trabalho solicitado pelo cliente que recorria aos serviços da empresa. Por exemplo, no âmbito dos cosméticos, apenas executei tarefas relativas a sabonetes e champôs, não tendo tido a oportunidade de contactar com outros tipos de produtos que seriam também do meu interesse.

Por outro lado, houve situações em que tive de iniciar trabalhos sem dispor de toda a informação necessária devido ao envio tardio da informação por parte do cliente. Como tal, as tarefas que executava ficavam inacabadas, com notas de rodapé respetivas à informação em falta e ainda com tópicos por preencher. No entanto, reconheço que este tipo de trabalho se revelou desafiante.

Por último, referir que o trabalho na empresa foi sempre muito bem organizado, discutido em equipa e que as situações supracitadas foram raras.

3.4.2 Formação Base de Ciências Farmacêuticas

Tendo em conta a curta duração do estágio na BasePoint, o foco do trabalho incidiu, essencialmente, sobre os produtos cosméticos. Para realizar as tarefas que me tinham sido entregues era necessário ter conhecimentos nas unidades curriculares de Assuntos Regulamentares do Medicamento e Dermofarmácia e Cosmética. Deste modo, considero que

estes conteúdos são extremamente importantes no plano de estudos do MICF. No entanto, o facto de não haver um grande aprofundamento destas acabou por se transformar numa desvantagem para mim.

A título de exemplo, saliento o facto de nunca ter analisado o Regulamento (CE) n.º 1223/2009⁴ relativo aos produtos cosméticos que me acompanhou diariamente e revelou ser essencial na área regulamentar. Tendo em conta que se trata de um regulamento europeu e que os produtos cosméticos podem circular livremente no mercado europeu, a sua análise é tão importante quanto a análise da legislação nacional. Deste modo, assegurar a conformidade destes produtos com a legislação do nosso país, Decreto-Lei n.º 189/20088,⁵ bem como com a legislação da União Europeia, é fundamental na rotina das empresas que legalizam estes produtos.

Neste sentido, espero que seja ponderada a possibilidade de incluir conteúdos da área regulamentar dos produtos cosméticos no plano de estudos do MICF com o propósito de adquirir um leque diversificado de conhecimentos e uma formação mais segura e abrangente do estudante para ingressar no mercado de trabalho desta área.

4 CONCLUSÃO

O estágio curricular na BasePoint tornou-se numa das experiências mais gratificantes e entusiasmantes do meu percurso académico. Apesar da sua curta duração tentei reter o máximo de conhecimentos demonstrando diariamente um profundo interesse pelo trabalho desempenhado pela empresa. Importa também referir que qualquer aspeto menos positivo que tenha surgido durante o meu estágio foi sempre superado e que constituiu aprendizagens e desafios que levarei comigo para o meu futuro. Assim, esta experiência foi extremamente enriquecedora e relevante para a minha formação, na qual fui preparada com o máximo de excelência. Todas as aprendizagens e conselhos adquiridos durante o estágio contribuirão para a minha futura entrada no mundo do trabalho.

Nesse sentido, congratulo, uma vez mais, a FFUC pela oportunidade que proporciona aos seus estudantes finalistas de realizarem estágios curriculares noutras áreas, para além da Farmácia Comunitária. Sem dúvida que este tipo de oportunidade destaca positivamente os seus estudantes perante outros futuros farmacêuticos, conferindo-lhes uma diferenciação profissional nas várias áreas do setor farmacêutico.

5 BIBLIOGRAFIA

1. Assembleia da República - Decreto-Lei n.º131/2015, de 4 de setembro, Diário da República: n.º173/2015, 1ª série, 2015. [Acedido a 15 de agosto de 2021]. Disponível em: <https://data.dre.pt/eli/lei/131/2015/09/04/p/dre/pt/html>
2. Faculdade De Farmácia Da Universidade De Coimbra. Normas Orientadoras do Estágio Curricular. (2021).
3. Instituto De Desenvolvimento Educacional. A Maneira Mais Simples de Entender Análise SWOT [Consultado a 20 de agosto de 2021]. Disponível na Internet: <https://seculoxximinas.com.br/fgv/blog/planejamento/a-maneira-mais-simplesde-entender-analise-swot>
4. União Europeia - Regulamento (CE) n.º1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de novembro de 2009 relativo aos produtos cosméticos. Jornal Oficial da União Europeia. L 342 (30.11.2009) 59-209.
5. Ministério Da Saúde - Decreto-Lei n.º 189/2008, de 24 de setembro, Diário da República: n.º 185/2008, 1ª série, 2008. [Acedido a 21 de março de 2021]. Disponível em: <https://data.dre.pt/eli/dec-lei/189/2008/09/24/p/dre/pt/html>

Parte III

Monografia

“Terapia Génica na Doença de Alzheimer: uma nova abordagem
terapêutica”

Resumo

A doença de Alzheimer (DA) é o distúrbio neurodegenerativo mais prevalente no mundo afetando cerca de 47 milhões de pessoas. É uma condição clínica caracterizada por perda de memória persistente e progressiva, défice cognitivo e mudança de personalidade. Na génese da doença existem, essencialmente, dois fatores responsáveis pelo aparecimento desta sintomatologia, as placas β -amilóides e os emaranhados neurofibrilares constituídos pela proteína tau. Todavia, estudos recentes demonstram que, para além destes dois *hallmarks* neuropatológicos, outras características patológicas podem ser identificadas no cérebro dos doentes, tais como neuroinflamação, excitotoxicidade, stresse oxidativo e défice de alguns neurotransmissores. Estes processos, isoladamente ou em conjunto, conduzem a uma neurodegeneração grave observada na DA.

Apesar dos fortes investimentos em programas de desenvolvimento de medicamentos, a terapêutica disponível para o tratamento da DA permite apenas a melhoria dos sintomas não contribuindo para modificar o curso da doença. Por conseguinte, esta condição clínica continua a ser um enfoque científico mundial, dado que é imperativo a identificação de estratégias terapêuticas novas e eficazes.

Devido à continua investigação nesta área e aprofundamento do conhecimento referente aos mecanismos moleculares e celulares responsáveis pelo desenvolvimento da DA, a terapia génica tem sido investigada como uma potencial estratégia terapêutica.

A análise dos resultados de ensaios pré-clínicos e clínicos revela que a DA poderá ser uma das patologias a ter disponível na prática clínica um tratamento baseado em terapia génica. Desta forma, prevê-se uma alteração do paradigma terapêutico desta patologia e consequente melhoria da condição clínica e qualidade de vida dos doentes.

Palavras-chave: doença de alzheimer, fisiopatologia, terapia génica, potenciais alvos moleculares.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent neurodegenerative disorder in the world affecting about 47 million people. It is a clinical condition characterized by persistent and progressive memory loss, cognitive impairment, and personality change. In the genesis of the disease there are essentially two factors responsible for the appearance of this symptomatology, the β -amyloid plaques and the neurofibrillary tangles made up of the tau protein. However, recent studies show that in addition to these two neuropathological hallmarks, other pathological characteristics can be identified in the brains of patients, such as neuroinflammation, excitotoxicity, oxidative stress, and a deficit of some neurotransmitters. These processes, alone or together, lead to the severe neurodegeneration seen in AD.

Despite heavy investments in drug development programs, the available therapies for the treatment of AD allow only the improvement of symptoms and do not contribute to modify the course of the disease. Therefore, this clinical condition remains a worldwide scientific focus as it is imperative to identify new and effective therapeutic strategies.

Due to the continued research in this area and the deepening of knowledge regarding the molecular and cellular mechanisms responsible for the development of AD, gene therapy has been investigated as a potential therapeutic strategy.

Analysis of the results of pre-clinical and clinical trials reveals that AD may be one of the diseases for which gene therapy-based treatment will be available in clinical practice. Thus, a change in the therapeutic paradigm of this pathology is expected, with a consequent improvement in the clinical condition and quality of life of patients.

Keywords: alzheimer's disease, pathophysiology, gene therapy, potential molecular targets.

I LISTA DE ABREVIATURAS

24S-OHC – Colesterol 24-Hidroxicolesterol

AAV – Vírus Adeno-associados

ACAT – Acil-CoA:colesterol aciltransferase

Ach – Acetilcolina

Ad – Adenovírus

AMPA – Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

ApoE – Apolipoproteína E

APP – Proteína Percursora Amilóide

ASO – Oligonucleotido Anti-Sense

A β – β -amilóide

BDNF – Fator Neurotrófico De Crescimento Derivado Do Cérebro

BHE – Barreira Hematoencefálica

CDK5 – Cinase 5 Dependente de Ciclina

cDNA – DNA complementar

ChAT – Colina Acetil Transferase

CLU – Clusterina

CRISPR – Repetições Palíndromas Regularmente Espaçados

DA – Doença de Alzheimer

EAAT – Transportadores de Aminoácidos Excitatórios

ECE – Enzima Conversora Da Endotelina

ERO – Espécies Reativas de Oxigénio

FAD – Doença de Alzheimer Familiar

GNDF – Fator Neurotrófico Derivado De Células Gliais

GSK3 β – Cinase Glicogénio Sintetase 3

HDL – Lipoproteínas De Alta Densidade

HSC – Células Estaminais Hematopoiéticas

HSV – Vírus Herpes Simplex

IGF2 – Fator de Crescimento 2 Semelhante à Insulina

iRNA – Sistemas De Interferência de RNA

LSD – Doença de Armazenamento Lisossomal

LTP – Potenciação A Longo Termo

LV – Lentivírus

mGluR – Recetores Metabotrópicos

NFT – Emaranhados Neurofibrilares

NGF – Fator Neurotrófico Neuronal

NMDA – N-metil-d-Aspartato

NO – Óxido Nítrico

PGRN – Progranulina

PSENI – Presenilina-1

PSEN2 – presenilina-2

SAD – Doença de Alzheimer Esporádica

siRNA – Pequenos RNA de Interferência

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Polimorfismo de Nucleótidos Únicos

SOAT – Esterol O-aciltransferase

TNF-RI – Recetor do Fator De Necrose Tumoral 1

TNF-RII – Recetor do Fator De Necrose Tumoral 2

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

TREM2 – *Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 2*

TrkA – Recetor Tropomiosina Cinase A

TrkB – Recetor Tropomiosina Cinase B

VGLUT – GluTs Vesiculares

2 INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é a causa mais comum de demência, a qual se caracteriza por perda de memória persistente e progressiva, défice cognitivo e mudança de humor.¹ A demência é considerada uma grande ameaça às sociedades modernas em virtude do aumento da prevalência da doença e dos enormes custos associados aos cuidados de prestação de saúde.² Além disso, os familiares assistem a uma decadência lenta dos seus entes queridos até estes serem incapazes de os reconhecer mais.³

Embora, a causa da doença seja multifatorial, é fundamental destacar as duas principais marcas histopatológicas que caracterizam a doença de Alzheimer: a existência de placas β -amilóide no espaço extracelular e os emaranhados neurofibrilares, acumulados intracelularmente, constituídos pela proteína tau hiperfosforilada.³ No entanto, outros sinais celulares e moleculares podem ser igualmente identificados no cérebro dos doentes, dando-se ênfase à neuroinflamação, excitotoxicidade, stresse oxidativo e défice de alguns neurotransmissores, nomeadamente a acetilcolina.⁴ Estes processos, separadamente ou em conjunto, conduzem a uma neurodegeneração grave que origina os sintomas clínicos.³

Apesar de décadas de estudo a investigar os mecanismos moleculares e celulares da DA e do empenho considerável por parte da indústria farmacêutica, não existe, até hoje, nenhuma terapia eficaz para curar a DA ou para inibir significativamente a progressão dos seus sintomas.¹ De facto, os medicamentos aprovados para o tratamento desta doença são limitados e, apenas incluem os inibidores da acetilcolinoesterase (donepezilo, rivastagmina, galantamina) e os antagonistas dos recetores N-metil-d-Aspartato (NMDA) (memantina). Os fármacos anteriormente citados somente melhoram o comportamento, o estado cognitivo e o estado clínico geral dos doentes.⁵ Todavia, a eficácia destes é bastante limitada e, por essa razão, é mandatório desenvolver estratégias terapêuticas mais eficazes que permitam um incremento da qualidade de vida e melhoria da condição clínica dos doentes que sofram desta patologia tão devastadora.

Assim, o objetivo principal desta dissertação é apresentar as potenciais abordagens, avaliadas em estudos pré-clínicos e clínicos, que possibilitaram a alteração dos níveis das proteínas responsáveis pela sobrevivência dos neurónios, inflamação, proteína β -amilóide, metabolismo da tau e metabolismo do colesterol através da terapia génica.

3 DOENÇA DE ALZHEIMER

3.1 EPIDEMIOLOGIA

À medida que a população envelhece, a incidência e a prevalência das doenças relacionadas com a idade aumentam, como é o caso da demência.⁶ A doença de Alzheimer é a demência mais prevalente na sociedade, sendo responsável por 50 a 70% dos casos.⁷ Sabe-se que a incidência da demência e a sua prevalência aumentam quase exponencialmente com a idade, duplicando a cada 5 anos após a sexta década de vida.⁸ É de salientar que, uma em cada três pessoas com mais de 85 anos, padece desta patologia.⁹

Mundialmente, estima-se que 24 milhões de pessoas sofram de demência.¹⁰ Como resultado do envelhecimento da população e do aumento da esperança média de vida, é expectável que os números de casos tripliquem,¹¹ prevendo-se que em 2050 se atinja o impressionante número de 130 milhões de pessoas com demência, dos quais 115 milhões com DA.^{12, 13}

Relativamente a Portugal, prevê-se que a prevalência da doença na população portuguesa com idade igual ou superior a 60 anos seja de 5,91% com um número presumível de afetados superior a 160000 indivíduos.⁸

De facto, a doença de Alzheimer tem um impacto deletério nas capacidades dos doentes, dado que estes perdem a sua autonomia e se tornam dependentes de terceiros, particularmente numa fase mais avançada da doença. Por outro lado, provoca uma elevada carga pessoal, social e económica e, como tal deve ser encarada como um problema de saúde pública.¹⁰

3.2 ETIOLOGIA

A doença de Alzheimer é o tipo mais comum de demência⁶ e pode subdividir-se em dois grandes grupos: a familiar (FAD) e a esporádica (SAD).¹⁴

A FAD é fruto de um gene dominante, possui um início precoce (<65 anos) e afeta 1-5% dos casos.¹⁵ Tem sido mencionado que este tipo de DA está principalmente correlacionado com fatores genéticos que afetam o metabolismo da proteína β -amilóide. Atualmente, considera-se que poderão estar envolvidos três genes diferentes em pelo menos 50% dos casos de FAD, nomeadamente, o gene *APP*, o gene *presenilina-1 (PSEN1)* e *presenilina-2 (PSEN2)*.¹⁴

Por outro lado, a forma esporádica verifica-se em 90-95% dos eventos e exhibe um início tardio (>65 anos).¹⁵ Contudo, neste caso, as causas subjacentes não são tão bem compreendidas.¹⁶ É referido que 70% se deve a fatores genéticos e 30% a outros fatores de risco. Este inclui variantes não modificáveis como o envelhecimento, género, hormonas e

variantes modificáveis como atividade física, padrões sociais, educação, saúde cardiovascular, obesidade, stresse entre outros.^{17,18,19,120,21} Além disso, a apolipoproteína E (ApoE) está fortemente associada à SAD.¹⁶ A ApoE é uma proteína expressa no Homem que desempenha um papel vital na neuroinflamação e neuroplasticidade.¹⁶ Esta proteína apresenta três alelos comuns, nomeadamente, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$.¹⁶ Contudo, pessoas que apresentam o alelo $\epsilon 4$ no locus da *APOE* têm um maior risco de vir a desenvolver esta patologia.¹⁶ Importa reforçar que indivíduos com esta variante não terão necessariamente a doença, mas apenas um maior risco.²² De salientar que os portadores heterozigotos da *APOE* $\epsilon 4$ são duas a três vezes mais predispostos a desenvolver a doença, ao passo que, os homozigotos têm um risco 10-15 vezes maior.¹⁶

Na realidade, foram já identificados mais de 20 genes responsáveis pelo desenvolvimento da DA em pessoas com mais de 65 anos.²³ A maioria desses genes podem-se agrupar em vias específicas, tais como o processamento da proteína precursora amilóide (APP), a patologia da TAU, a resposta imunológica, a migração celular, a endocitose e o transporte lipídico. Todas estas vias desempenham um papel importante na etiologia da doença de Alzheimer com início tardio.^{14,24}

3.3 FISIOPATOLOGIA

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa altamente complexa, multifatorial e progressiva.²⁴

Como citado anteriormente, as principais marcas histopatológicas que caracterizam a patogénese da doença são a presença de placas senis extracelulares constituídas por agregados filamentosos da proteína β -amilóide ($A\beta$) e massas neurofibrilares intracelulares, compostas essencialmente pela proteína tau hiperfosforilada. Essas placas e massas presentes no cérebro dos doentes estão localizadas, sobretudo, no hipocampo, nas amígdalas cerebelosas e no córtex entorrinal do lóbulo temporal, enquanto as porções frontais e parietais do córtex associativo são menos afetadas.²⁵ A Figura I mostra as regiões do cérebro mais afetadas na DA.

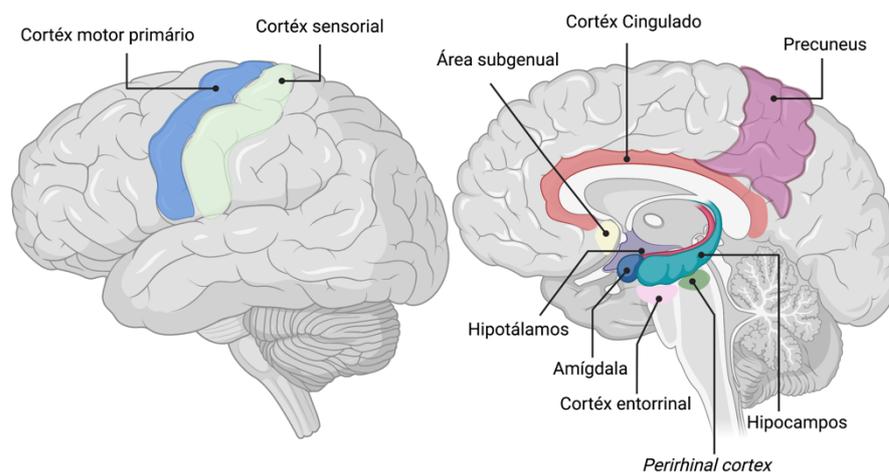


Figura 1: Principais regiões do cérebro afetadas na doença de Alzheimer. Reimpresso com algumas modificações de 26. [criado com www.BioRender.com]

Porém, outras características patológicas são igualmente observadas na DA. Como tal, podemos evidenciar o stress oxidativo, a neuroinflamação, a neurotoxicidade, a deficiência e distribuição alterada das mitocôndrias e a neurodegeneração.¹⁵

PRODUÇÃO DAS PLACAS B-AMILÓIDE

A APP é amplamente expressa nos mamíferos e apresenta-se como uma proteína transmembranar do tipo I.²⁷ É constituída por um domínio N-terminal extracelular glicosilado, um domínio transmembranar e um pequeno domínio C-terminal intracelular.²⁷ Embora, as funções fisiológicas que desempenha ainda não estejam totalmente esclarecidas, existe evidência de que auxilia a formação das sinapses, o crescimento detrítico e axonal e, ainda a sobrevivência neuronal.²⁸

Por ação de diferentes proteases¹⁶ - a *alfa* (α), *beta* (β) e *gama* (γ) - a APP sofre processamento proteolítico. Como resultado são formados vários peptídeos que exibem diferentes potenciais de agregação e, conseqüentemente, diferentes níveis de toxicidade.³⁰ De facto, a APP pode ser clivada mediante duas vias: via amiloidogénica e a via não-amiloidogénica (evidenciado na Figura 2). Ambas competem para o processamento da APP.³¹ A via não amiloidogénica é considerada a via secretora mais relevante para a maioria das células dado que, em condições fisiológicas, é responsável por 90-95% do processamento proteolítico da APP.³¹ Contudo, no cérebro dos doentes com DA, pensa-se que poderá existir um desequilíbrio entre estas duas vias, sendo favorecida a produção dos peptídeos A β .³¹ Importa referir que em concentrações fisiológicas, os peptídeos A β apresentam um papel relevante na plasticidade sináptica a nível do hipocampo, na formação de sinapses, sendo a sua presença

crucial para a formação e consolidação da memória.³² Desta forma, os peptídeos A β podem exercer efeitos neurotóxicos ou neurotróficos em função da sua concentração.³²

Via não amiloidogénica

Por esta via, a APP sofre uma clivagem constitutiva e regulada.²⁸ Por ação de duas secretases, a α -secretase e a γ -secretase, a APP é clivada originando um pequeno fragmento hidrofóbico, p3, que é solúvel. Embora, as funções fisiológicas deste fragmento ainda não se encontrem verdadeiramente elucidadas, considera-se que assume um papel crucial na sinalização sináptica. Por outro lado, o domínio intracelular da APP que resulta da atividade das duas enzimas supracitadas é libertado e translocado para o núcleo, sendo responsável por regular a expressão génica e facilitar a sinalização intracelular.^{28,33}

Em contrapartida, a APP pode apenas sofrer ação da α -secretase e, nesse caso, há a produção de um outro precursor solúvel e não patogénico que é o s-APP α . Este fragmento desempenha diversas funções cruciais, tais como a sinalização e plasticidade sináptica normal, aprendizagem, memória, comportamento emocional e sobrevivência neuronal.^{28,33}

Via amiloidogénica

Por esta via, a APP é segmentada de forma diferente culminando com a formação do peptídeo A β , composto por 39-42 aminoácidos.¹⁵ Neste caso, por ação da β -secretase há a formação do fragmento C99 que, por sua vez é clivado pela γ -secretase, nas posições 40 e 42, para produzir os monómeros A β ₁₋₄₀ e A β ₁₋₄₂.¹⁶ Embora, o primeiro fragmento seja o mais comum, atualmente considera-se que o segundo, mais hidrofóbico, apresenta um maior potencial amiloidogénico. Porém, ambos são capazes de se agregar originando oligómeros e, subsequentemente as placas β -amilóide insolúveis implicadas na degeneração neuronal e declínio cognitivo. É por isso imperativo a rápida remoção deste peptídeo A β .¹⁵

De facto, à medida que os peptídeos A β são formados, estes são removidos continuamente para a periferia, de forma a manter um equilíbrio entre os diferentes compartimentos celulares. A eliminação do A β no cérebro depende de vários processos que ocorrem em simultâneo: a sua degradação proteolítica por diversas proteases tais como a neprilisina,³⁴ as enzimas conversoras da endotelina do tipo 1 e 2,³⁵ a enzima que degrada a insulina,³⁶ a enzima conversora da angiotensina,³⁷ as metaloproteínases da matriz do tipo 2 e 9 e a catepsina B;³⁸ a sua depuração passiva mediada por células; e o seu transporte ativo através da barreira hematoencefálica.³⁹

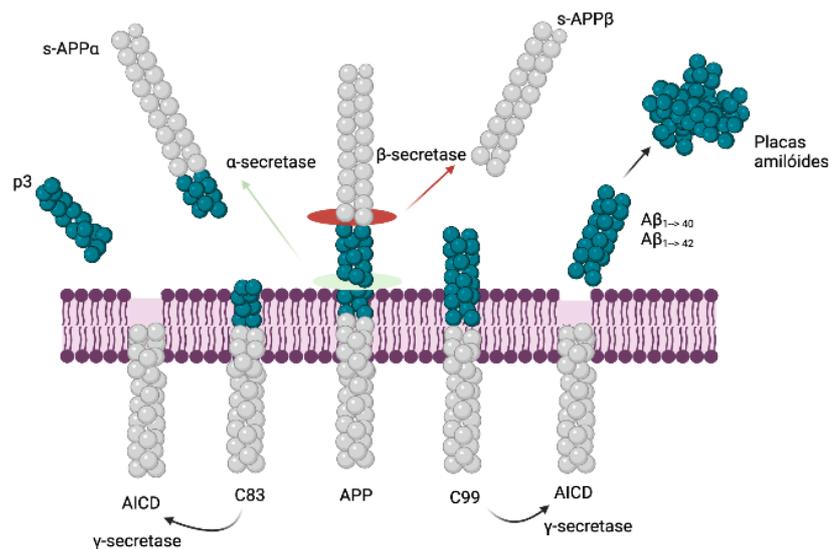


Figura 2: A acumulação do peptídeo β -amilóide na doença de Alzheimer. Reimpresso com pequenas modificações de 16. [Criado com www.BioRender.com]

FORMAÇÃO DOS EMARANHADOS NEUROFIBRILHARES

A formação destes emaranhados é explicada pela hiperfosforilação da proteína tau,⁴⁰ tal como é ilustrado na Figura 3. A tau é uma proteína essencial à formação e estabilização dos microtúbulos do citoesqueleto dos neurónios.¹⁶

Quando a proteína tau entra em contacto com as cinases é fosforilada. Como resultado desta hiperfosforilação, a proteína tau dissocia-se dos microtúbulos e agrega-se, no interior do neurónio, sob a forma de filamentos helicoidais insolúveis. Por conseguinte, há a formação de enormes massas de emaranhados neurofibrilhares (NFTs) no interior do neurónio e, em última instância, morte neuronal devido à perda da comunicação entre neurónios e processamento de sinais.^{28,41}

Embora, os eventos moleculares que levam à formação dos NFTs ainda não estejam bem documentados, considera-se que seja a acumulação da proteína β -amilóide o gatilho necessário para a ativação das cinases. Diversas cinases regulam a fosforilação da tau, tais como a cinase glicogénio sintetase 3 (GSK3 β) e a cinase 5 dependente de ciclina (CDK5). Apesar de GSK3 β e CDK5 serem as principais responsáveis pela hiperfosforilação da tau, outras cinases como a Proteína Cinase C, Proteína Cinase A, ERK2, uma serina/teronina cinase, caspase 3, e caspase 9 também têm papéis proeminentes, que podem ser ativados pela A β .^{28,42}

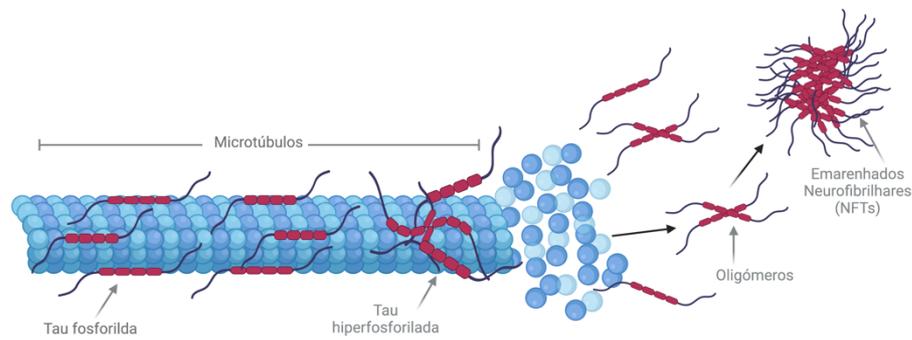


Figura 3: Formação dos emaranhados neurofibrilares na doença de Alzheimer. Reimpresso com pequenas modificações de I6. [Criado com www.BioRender.com]

BASES GENÉTICAS

Tal como referido previamente, pensa-se que poderão estar envolvidos três genes diferentes na DA, nomeadamente o gene *APP*, o *PSEN1* e *PSEN2*. As mutações encontradas nestes genes conduzem, principalmente, a uma produção, agregação ou depuração anormal da proteína β -amilóide.¹⁶

Relativamente ao gene *APP*, a maioria das mutações ocorrem nas proximidades dos locais de clivagem da α -, β - ou γ -secretase, o que fundamenta a correlação entre as mutações e a alteração do metabolismo de $A\beta$. De uma forma geral, uma maior produção dos fragmentos $A\beta_{42}$, pode iniciar um conjunto de reações inflamatórias que conduzem a uma deterioração agravada das funções cognitivas.⁴³ Por outro lado, no caso da trissomia 21, o cromossoma extra expressa o gene *APP* e, conseqüentemente, pessoas com esta patologia terão um gene *APP* adicional que culminará numa sobre-expressão da proteína *APP*.⁴⁴

Já no que se refere às mutações no gene *PSEN1* e *PSEN2*, estas têm tido um impacto funcional que se traduz num aumento da atividade da γ -secretase bem como um incremento da formação da $A\beta_{42}$, deslocando a razão $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ e alterando, em última análise, o processamento da *APP* pela γ -secretase.⁴³

Quanto ao comprometimento da depuração de $A\beta$, na DA, esta pode ser justificada pela presença de uma mutação no *Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 2* (*TREM2*).²⁸ *TREM2* é um recetor altamente expresso nas células da microglia que estão envolvidas na depuração fagocitária de detritos neuronais. Deste modo, estas mutações resultam numa incapacidade destes recetores eliminarem a $A\beta$ do sistema nervoso central (SNC) e, por conseqüência, a acumulação de $A\beta$ e maior intensificação da patogénese nestes doentes.⁴⁵

NEUROINFLAMAÇÃO

Nas últimas décadas, tem-se assistido a uma contínua investigação nesta área com o intuito de identificar tanto as vias da neuroinflamação como os tipos de células envolvidas na patologia.⁴⁶ Com esse propósito, é fundamental entender a dinâmica do sistema imunitário para compreender o seu contributo para a perda neuronal na doença.

O sistema imune é responsável pela defesa do organismo contra agentes agressores, através da imunidade inata e adaptativa. No SNC residem células da imunidade inata que expressam recetores de reconhecimento de padrões aptos a reconhecer moléculas associadas a patógenos e substâncias endógenas libertadas ou produzidas por meio de lesão tecidual. É o caso da microglia e astrócitos.^{48,49}

A microglia, fagócitos residentes do SNC, exercem um papel vital na manutenção da plasticidade neuronal e na remodelação da sinapse.⁵⁰ Estas células mieloides possuem a capacidade de remover o peptídeo A β que é produzido no cérebro por intermédio da sua exportação para o líquido cefalorraquidiano, para os vasos sanguíneos ou mediante degradação local. Esta degradação local pode ser realizada por absorção e degradação (fagocitose) ou por degradação extracelular graças à neprilisina.^{51,52,53} Além disso, estas células expressam um conjunto de recetores capazes de reconhecer o peptídeo A β dos quais se destacam os recetores necrófagos (SCARA-I, MARCO, SCARB-I, CD36 e RAGE), recetores do tipo toll-like (TLR2, TLR4, TLR6 e TLR9), integrina α 6 β 1, CD47. Após reconhecimento, a microglia induz a libertação de mediadores pró-inflamatórios como citocinas, das quais se destacam as interleucinas e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), radicais livres, neurotoxinas que medeiam a neuroinflamação e neurotoxicidade.^{54,46}

Todavia, na doença de Alzheimer, há um contacto constante com o peptídeo A β e, conseqüentemente, estas células mieloides são persistentemente ativadas. Como resultado, verifica-se um aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios e de espécies reativas de oxigénio (EROs) que diminuem a capacidade fagocítica da microglia e provocam uma neuroinflamação crónica.^{55,56} Por outro lado, as citocinas supracitadas podem ser produzidas quer por ativação da microglia quer por ativação dos astrócitos no SNC contribuindo diretamente para o processo de neuroinflamação. Entre as principais moléculas inflamatórias associadas à DA salientam-se as citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Em particular, a IL-1 β é uma das principais, contribuindo para a evolução da patologia dado que estimula a produção do peptídeo β -amilóide neurotóxico, hiperfosforilação da tau, a ativação da microglia e astrócitos, libertando uma maior quantidade de citocinas e de óxido nítrico.⁵⁶

Para além de todos estes fatores, acrescenta-se o stresse oxidativo resultante da produção de intermediários reativos de oxigénio e espécies reativas de nitrogénio que desempenham, igualmente, um papel fundamental na neuroinflamação. A produção abundante de radicais livres origina danos nas membranas neuronais com consequente peroxidação dos lípidos e oxidação das proteínas membranares, culminando na neurodegeneração.^{57,58}

Deste modo, podemos concluir que os astrócitos e a microglia são as principais células envolvidas no processo de neuroinflamação. A libertação de mediadores inflamatórios gera um processo cíclico de estímulo à neuroinflamação, culminando em níveis progressivamente maiores de lesão, degeneração e apoptose neuronal.⁵⁶

DISFUNÇÃO COLINÉRGICA

As sinapses colinérgicas são ubíquas no sistema nervoso central.⁶³ A sua alta densidade no tálamo, estriado, sistema límbico e neocórtex sugerem que a transmissão colinérgica é extremamente importante nos processos de aprendizagem, memória, atenção e outras funções cerebrais superiores.⁶³

A hipótese colinérgica foi a primeira hipótese evidenciada há mais de 35 anos, por Bartus e seus colaboradores, para explicar a etiologia desta doença. Esta hipótese defendia que o declínio cognitivo associado à DA era consequência primária da depleção da acetilcolina no cérebro destes doentes.⁶⁴ Esta hipótese é fortemente sustentada por estudos que demonstram que a perda de atividade colinérgica é um evento comum no cérebro dos doentes com DA⁶⁵ constatando-se uma acentuada redução de neurónios nos núcleos basais de Meynert e da atividade da enzima Colina Acetil Transferase (ChAT), responsável pela síntese da acetilcolina (ACh).⁶⁶ Além disso, sabe-se que a degeneração neurofibrilar no encéfalo frontal é a principal causa da disfunção e morte dos neurónios colinérgicos do encéfalo frontal dando origem a uma denervação colinérgica pré-sináptica generalizada.⁶³ Esta notável perda de neurónios colinérgicos está relacionada com o défice da atividade colinérgica, que afeta tanto os seus recetores⁶⁷ como as enzimas envolvidas na síntese e hidrólise da ACh.⁶⁸ Como resultado desta hipótese, vários compostos estimuladores do sistema colinérgico foram submetidos a estudos pré-clínicos e clínicos.⁵⁹ Apesar de limitados, os melhores resultados foram exibidos pelos inibidores das colinesterases, atualmente utilizados como terapêutica sintomática desta doença.⁵⁹ Todavia, o falhanço da abordagem colinomimética com o propósito de modificar o curso da doença, evidenciou que o défice colinérgico não é a única causa para a DA, como inicialmente proposto por esta hipótese. Contudo, nos últimos anos, esta teoria tem ressurgido alicerçada no pressuposto de que a DA é uma doença multifatorial cujo defeito colinérgico representa uma vertente da sua patogénese, contribuindo para a sua progressão.⁵⁹

DISFUNÇÃO GLUTAMATÉRGICA

O principal neurotransmissor excitatório do SNC é o glutamato.⁷³ Este assume um papel crucial na maioria das funções cerebrais tais como memória, aprendizagem, cognição, entre outras.⁷³

Em condições fisiológicas e mediante despolarização pré-sináptica, as vesículas contendo o glutamato fundem com a membrana do neurónio pré-sináptico possibilitando a libertação do glutamato.⁷³ O glutamato vai ligar-se aos recetores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) e aos recetores metabotrópicos (mGluR) promovendo a sua ativação. Posteriormente ativa os recetores NMDA estimulando a despolarização pós-sináptica através do influxo de catiões.⁷³ Para evitar a sobre-estimulação, o glutamato é removido pelos astrócitos e convertido em L-glutamina por ação da glutamina-sintetase.^{73,78} A glutamina é encontrada, essencialmente, no fluído extracelular e, ao contrário do glutamato, é uma molécula não tóxica desprovida da capacidade de ativar os recetores do glutamato.^{73,78} A glutamina é depois transferida de volta para o neurónio e é reciclada pela glutaminase ativada pelo fosfato e forma o L-glutamato.^{73,78} O L-glutamato é captado por transportadores vesiculares em vesículas sinápticas.^{73,78} Este tráfico de glutamato e glutamina entre astrócitos e neurónios é a via primária através da qual o glutamato pode ser reciclado.^{73,78,79} É graças aos transportadores de alta afinidade que é possível remover este neurotransmissor da fenda sináptica assegurando, desta forma, concentrações baixas e não tóxicas.^{73,79} Existem dois sistemas de transporte: os GluTs Vesiculares (VGLUT) e os Transportadores de Aminoácidos Excitatórios (EAAT). Os primeiros são importantes para o que o glutamato seja armazenado em vesículas sinápticas. Ao passo que, os segundos são responsáveis pelo transporte do glutamato em excesso para dentro dos astrócitos.⁷³

Nesta patologia, a disfunção glutamatérgica é resultado da acumulação do glutamato na fenda sináptica (ou por diminuição da sua recaptação ou por anormalidades no seu transportador devido à presença dos peptídeos A β) e também pela ativação exagerada dos recetores do NMDA pelos peptídeos A β .⁷³ Esta ativação persistente leva a um influxo crónico de cálcio que induz um estado de hiperpolarização e, conseqüentemente, inicia o processo de morte neuronal^{1,76} que se correlaciona com a perda da função de memória e da capacidade de aprendizagem em pacientes com DA.^{73,81} Assim, é crucial manter níveis extracelulares de glutamato adequados.⁷³ A despolarização crónica em neurónios vulneráveis é acompanhada por outras perturbações, tais como stresse oxidativo neuronal, danos mitocondriais e inflamação, presença de β -amilóide e, possivelmente da tau hiperfosforilada, o que pode eventualmente aumentar a sensibilidade do sistema glutamatérgico e resultar em disfunção neuronal e morte celular.^{73,82,81}

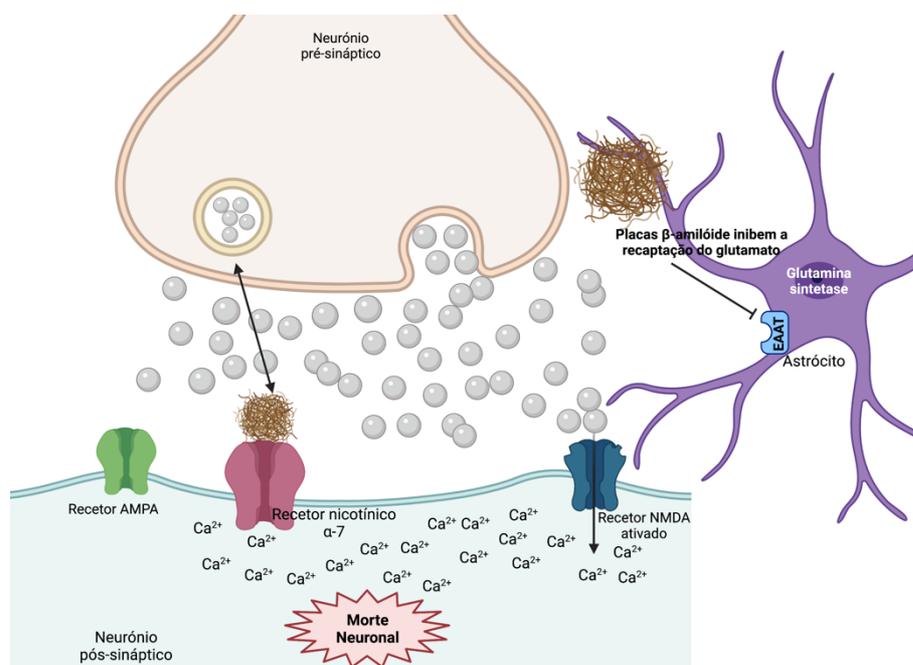


Figura 4: A Disfunção Glutamatérgica na doença de Alzheimer. VGlut (transportador vesicular de glutamato); EAAT (transportador de aminoácidos excitatórios); NMDA (N-metil-d-Aspartato); AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico). Reimpresso com pequenas modificações de 73. [Criado com www.BioRender.com]

3.4 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Apesar de décadas de estudo sobre a biologia básica da DA e da forte dedicação por parte da indústria farmacêutica, não existe ainda uma terapêutica que modifique o curso da doença ou que, idealmente, atue de forma preventiva.¹⁰

Na realidade, somente quatro fármacos estão aprovados e disponíveis para utilização na prática clínica. Porém, não há evidências claras de que algum destes medicamentos modifique os processos patológicos primários inerentes à doença. Ainda assim, parecem proporcionar um alívio sintomático e, normalmente, são administrados como terapêutica paliativa com o propósito de abrandar o declínio da qualidade de vida.¹⁰

Atualmente, a farmacoterapia disponível atua na neurotransmissão colinérgica (os inibidores da acetilcolinesterase) ou glutamatérgica (antagonistas dos receptores NMDA), possibilitando uma melhoria dos sintomas cognitivos. Por outro lado, antidepressivos, neurolépticos, ansiolíticos e antiepiléticos são também utilizados, visando melhorar os sintomas comportamentais e psiquiátricos.⁸³

Relativamente, aos inibidores da acetilcolinesterase, estes retardam a degradação metabólica da acetilcolina, otimizando a concentração deste neurotransmissor para a intercomunicação. Estes fármacos atrasam a progressão da disfunção cognitiva e poderão ser eficazes para alguns doentes nos estágios inicial e intermediário da patologia. Nesta classe, existem três medicamentos, aprovados pela Administração Federal de Alimentos e

Medicamentos americana (FDA - do inglês, *Food and Drug Administration*): donepezilo, rivastigmina e galantamina.¹⁰

No que concerne aos antagonistas dos recetores NMDA, o primeiro fármaco aprovado pela FDA para melhorar os sintomas da doença moderada a severa e, por enquanto, o único exemplar desta classe é a memantina. Este fármaco regula a atividade do neurotransmissor glutamato que é libertado pelas células danificadas em grandes quantidades.²⁸ Quando o glutamato atinge os recetores do tipo NMDA, na superfície das células, o cálcio flui livremente para o interior da célula e, conseqüentemente, desencadeia neurodegeneração. Este fármaco é dotado da capacidade de impossibilitar esta sequênci destrutiva.^{10,15}

Neste sentido, é necessário desenvolver estratégias terapêuticas mais eficazes que permitam um incremento da qualidade de vida e melhoria da condição clínica dos doentes que sofrem com esta condição clínica. E, de facto, o aprofundamento do conhecimento a respeito da fisiopatologia da doença permitiu visionar novas terapêuticas, das quais se destaca a terapia génica.

4 TERAPIA GÉNICA

No que concerne às doenças do SNC, a terapêutica farmacológica disponível em contexto clínico, não proporciona um tratamento eficaz em virtude do diagnóstico tardio, da complexidade do sistema nervoso e das barreiras físicas que comprometem a distribuição dos fármacos para o cérebro.⁸⁴

Assim, a terapia génica revela-se como uma poderosa estratégia para colmatar as necessidades médicas não preenchidas com a terapêutica tradicional. Esta nova abordagem apresenta a capacidade de corrigir direta e permanentemente defeitos genéticos evitando desta forma tratamentos repetidos.⁸⁴ De salientar que, tem havido um esforço e dedicação por parte dos clínicos e investigadores com o propósito de alcançar uma terapia génica eficaz orientada para o SNC.

A terapia génica engloba um conjunto de técnicas que possibilita a introdução de sequências de DNA ou RNA no interior de células-alvo com vista a modular os níveis de expressão das proteínas não funcionais.⁸⁵ De uma maneira geral, para se proceder à manipulação genética, várias estratégias poderão ser utilizadas, tais como: i) introduzir uma cópia funcional de um gene defeituoso; ii) silenciar um alelo mutante através de sistemas de interferência de RNA (iRNA); iii) introduzir um gene modificador da doença; ou iv) recorrer a métodos de edição genética.⁸⁴

Previamente à implementação da abordagem, vários fatores deverão ser cuidadosamente discutidos. Nesse sentido, destaca-se a seleção do gene terapêutico, a escolha

do vetor mais apropriado, barreiras físicas a considerar, o protocolo de terapia génica a seguir e qual a via de administração mais adequada.

4.1 COMPLEXIDADE DO SNC

Apesar da terapia génica ser particularmente atrativa para as perturbações neurológicas, algumas limitações e obstáculos têm de ser enfrentados e encarados como desafios para uma terapia génica eficaz direcionada para o SNC.⁸⁴ De facto, o acesso ao cérebro é limitado e protegido por barreiras físicas tais como a barreira-hematoencefálica (BHE) que dificulta não só o fornecimento de fármacos ao SNC como também impede a utilização de tratamentos sistémicos.⁸⁷ Por outro lado, no cérebro existem células de natureza pós-mitótica (neurónios) e outros tipos de células, bem como circuitos neuronais específicos, que desempenham funções críticas.⁸⁵ De salientar que o cérebro se apresenta como um órgão sensível a alterações volumétricas.⁸⁵

Todas estas características aliadas à complexidade da fisiopatologia das doenças neurodegenerativas justificam o porquê da grande maioria dos medicamentos e procedimentos cirúrgicos apresentarem-se como ineficazes no tratamento de doenças associadas ao SNC.⁸⁸

4.2 ESCOLHA DO GENE TERAPÊUTICO

No que se refere à DA, os seus potenciais alvos serão posteriormente abordados com maior detalhe. Da mesma forma, alguns ensaios pré-clínicos e clínicos serão discutidos visando elucidar a evolução desta estratégia tão promissora.

4.3 SELEÇÃO DO VETOR

De forma a providenciar uma terapia génica de sucesso é fundamental garantir uma transferência segura e eficiente do material genético para as células-alvo.⁸⁴

Um vetor ideal é dotado da capacidade de transportar transgenes de peso molecular diverso e apresentar baixo grau de imunogenicidade e citotoxicidade.^{84,85,90} Para além disto, deverá permitir uma expressão estável e com duração adequada do transgene, garantindo ao mesmo tempo uma transdução eficaz e sem efeitos *off-target*.^{84,85,90} Da mesma forma, a sua produção deverá ser simples, eficiente e possibilitar uma produção em larga escala.^{84,85,90} Até aos dias de hoje, não existe um vetor que obedeça a todas estas características ideais e, como tal, as vantagens e limitações de cada vetor deverão ser tidas em consideração com vista a escolher aquele que se enquadra melhor a cada condição clínica.⁸⁵

Na realidade, podemos distinguir dois tipos de vetores que são utilizados neste contexto de terapia génica: os vetores virais e os vetores não-virais. Todavia, são os vetores

virais os mais frequentemente utilizados graças ao elevado grau de eficiência de transdução que proporcionam.⁸⁵

VETORES VIRAIS

Este tipo de sistema de entrega apresenta a capacidade intrínseca de infetar células.⁸⁴ No entanto, os genes responsáveis pela replicação viral são substituídos pelos genes terapêuticos e são adicionados os promotores que regulam a expressão do transgene.⁸⁵ Dos vários vetores virais disponíveis para utilização destacam-se os adenovírus (Ad), lentivírus (LV), vírus herpes simplex (HSV) e os vírus adeno-associados (AAV).^{84,85}

Vetores virais de Adenovírus (Ad)

São vírus icosaédricos, sem envelope e de dupla cadeia de DNA. Apresentam uma enorme capacidade transgênica e de infetar vários tipos de células.⁹³ Quando infetam a célula-hospedeira introduzem o seu material genético, mas sem que este incorpore o genoma da célula-alvo.⁹³ Logo, possibilitam uma expressão transgênica transitória. Embora exibam um ótimo perfil de segurança, a presença das proteínas virais pode ocasionar uma resposta imunológica. Por conseguinte, as suas principais aplicações no contexto do SNC suportam-se no seu elevado grau de antigenicidade, sendo frequentemente utilizados com a finalidade de tratar tumores cerebrais.^{85,94}

Vetores virais do Herpes Simplex (HSV)

Estes são vírus envelopados de dupla cadeia de DNA com capacidade de transportar transgenes com um elevado peso molecular.^{85,94} O seu genoma é depositado na forma episomal e, portanto, há um baixo risco de mutagénese insercional.^{85,94} Tratam-se de vírus neurotrópicos e, portanto, conseguem infetar eficazmente os neurónios e outras células do SNC tal como a glia.⁸⁵ Todavia, a sua utilização é restrita, devido a problemas associados à expressão latente e imunogenicidade.^{85,94}

Vetores virais de Retrovírus

São vírus envelopados de cadeia simples de RNA e, curiosamente, foram os primeiros a serem usados em terapia génica.^{85,94,95} Quando infetam uma célula-alvo, introduzem não só o seu material genético como também outras enzimas.⁹⁶ Desta forma, conseguem produzir uma molécula de dupla cadeia de DNA complementar à molécula de RNA graças à transcriptase reversa.⁹⁶ Esta molécula de dupla cadeia de DNA é, então, integrada de forma aleatória no genoma da célula-alvo.^{85,94} No entanto, são vetores cuja aplicação está limitada, dado que apenas possuem a capacidade de transferir genes para células que se encontram em

divisão.^{85,94} Por outro lado, como ocorre uma integração do genoma na célula-alvo há um risco aumentado de mutagênese por inserção e genotoxicidade.^{85,94} Como tal, são vetores inadequados para a modificação genética de células diferenciadas e indivisíveis como é o caso dos neurónios.^{85,94}

Vetores Lentivirais (LV)

Tal como os retrovírus, são vírus que infetam as células mediante um processo de integração do genoma na célula-alvo.⁹⁶ Contudo, ao contrário do retrovírus, a integração do seu material genético ocorre em células quiescentes.⁹⁶ Apresentam uma expressão estável do transgene por longos períodos de tempo. Apesar de desempenharem um papel cada vez mais iminente na terapia génica orientada para o SNC, há risco de mutagênese insercional uma vez que integram o genoma da célula-alvo.⁹¹ Contudo, é graças a essa capacidade que são adequados para a terapia génica *ex vivo*.⁸⁷

Vetores de Vírus Adeno-Associados (AAV)

Estes vetores são vírus não patogénicos de cadeia simples de DNA não envelopados e derivados do parvovírus.^{94,87} Dentro dos vetores virais, são atualmente os mais utilizados em ensaios clínicos aplicados ao SNC.^{94,87} Efetivamente, são vetores seguros, não patogénicos e com capacidade de infetar eficazmente neurónios *in vivo*.⁸⁷ Apresentam tropismo serotipo-dependente, conforme a interação com recetores específicos em células-alvo.^{94,87} Na verdade, os serotipos mais estudados num contexto do SNC são os serotipos 1,2,5,8,9 e rhesus (rh).¹⁰ sendo que, o vetor AAV9 apresenta a capacidade de atravessar a BHE.^{94,87} Apesar de existir a possibilidade de desencadear uma resposta imunológica, tem sido observado pouca toxicidade associada ao seu uso.⁹⁴

Não obstante nenhum dos vetores disponíveis seja o ideal, os AAV surgem como os vetores de eleição para a terapia génica direcionada para o SNC e, em particular para as doenças neurodegenerativas.^{84,94,87} De facto, apresentam vantagens significativas relativamente às outras alternativas, como uma expressão estável e duradoura e ainda ausência de toxicidade.^{84,97} Contudo, a capacidade de empacotamento é restrita comparativamente aos Ad ou aos HSV.⁸⁵

VETORES NÃO-VIRAIS

Estes vetores de transferência génica são encarados como uma alternativa promissora graças aos seus métodos de produção simples, associados a baixos custos e elevado perfil de segurança.⁸⁴ Contudo, apresentam uma eficiência relativamente baixa e medeiam um efeito transitório, exigindo administrações repetidas com conseqüente risco de desencadear uma

resposta imunitária.⁸⁴ Assim, o uso destes vetores é geralmente insuficiente no tratamento de doenças neurodegenerativas crónicas.^{84,97} Podemos distinguir dois tipos de métodos de transferência génica não virais: métodos físicos e métodos químicos.⁸⁴

4.4 PROTOCOLO DE APLICAÇÃO

A escolha da via de administração é um aspeto fundamental a ter em consideração aquando da manipulação genética. Dispomos de duas abordagens diferentes: a terapia génica *in vivo* e a terapia génica *ex vivo* como evidenciado na Figura 5.

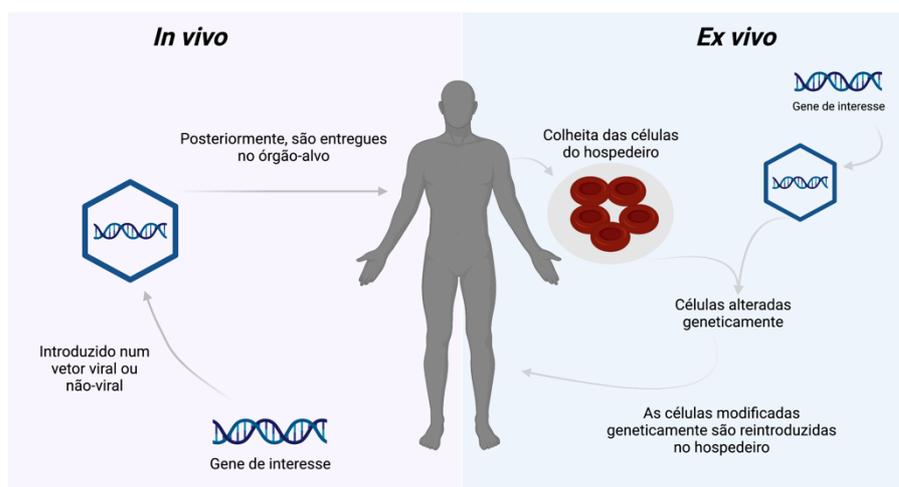


Figura 5: Abordagens disponíveis para a realização da terapia génica. Reimpresso com modificações de 98. [Criado com www.BioRender.com]

TERAPIA GÉNICA *IN VIVO*

Genericamente, a terapia génica *in vivo* implica a introdução direta do gene terapêutico na região-alvo recorrendo, para esse efeito, à utilização de vetores virais. Recentemente, este método foi expandido para incluir a edição direta de genes de células *in vivo* recorrendo a uma tecnologia de repetições palíndromas regularmente espaçadas (CRISPR).⁹⁹

Embora seja uma técnica relativamente simples, várias complicações podem surgir como consequência do uso de vetores virais *in vivo*, tais como, baixo grau de especificidade e de controlo da transferência genética, silenciamento genético, mutagénese de inserção no interior das células hospedeiras e, ainda respostas imunológicas direcionadas para o vetor.^{100,101} Além disso, a sua aplicação num contexto de doenças neurológicas exige frequentemente que as células do SNC em degeneração se mantenham ativas ao longo do tempo com vista a produzirem as moléculas terapêuticas pretendidas. Contudo, este acréscimo de atividade celular pode resultar num stress indesejável.¹⁰¹

Para a aplicação deste método, existe um leque variado de possibilidades para administração do vetor. Contudo, a escolha da forma de administração dever-se-á adequar à região que se pretende tratar, no caso da DA, o SNC. Nessa perspetiva, e de forma resumida,

existem disponíveis as seguintes opções: injeção intraparenquimatosa direta no parênquima cerebral afetado, injeção intracerebroventricular, intra-cisterna magna e a injeção intravascular.⁸⁴

TERAPIA GÉNICA EX VIVO

De um modo geral, para a realização desta abordagem, as células necessitam de ser modificadas geneticamente antes de serem introduzidas no paciente, a fim de poderem expressar o gene terapêutico.¹⁰³ As fontes celulares podem ser isoladas dos pacientes e reintroduzidas após manipulação genética por transplante autólogo.⁸⁷ Há, igualmente a possibilidade de se gerarem linhas celulares alogénicas modificadas que serão armazenadas para posteriormente se proceder a um transplante.¹⁰⁴

No contexto das perturbações neurológicas, é comum isolarem-se as células estaminais hematopoiéticas (HSCs), a partir do sangue ou da medula óssea do paciente e, após purificação, proceder-se à modificação genética.⁸⁷ Esta modificação pressupõe a utilização de vetores lentivirais para a realização da transdução *in vitro* e, posteriormente, procede-se ao transplante autólogo das células modificadas.⁸⁷ Estas células, ao serem reintroduzidas no paciente, irão integrar o compartimento das células estaminais da medula óssea.⁸⁷ Uma parte dessas células terá a capacidade de migrar em direção ao SNC e atravessar a BHE.¹⁰¹ Localmente, podem diferenciar-se em células de suporte essenciais do ponto de vista terapêutico, tais como microglia, astrócitos ou oligodendrócitos, ou podem fornecer uma proteína benéfica ou em falta.¹⁰⁵ A título de exemplo, destaca-se a possibilidade da microglia poder ser geneticamente modificada com vista a restaurar a função normal proporcionando efeitos benéficos aos neurónios, graças à produção de proteínas terapêuticas, fatores tróficos ou quimiocinas.¹⁰¹

Este tipo de abordagem permite, por um lado, a caracterização do produto celular geneticamente modificado antes da reintrodução no paciente e, por outro, possibilita a não exposição direta do paciente ao vetor utilizado na transferência genética.¹⁰⁶ Todavia, este é um método que exhibe uma baixa disponibilidade de células viáveis para transplante, reduzida taxa de sobrevivência das células transduzidas, possibilidade de terapêutica imunossupressora e o processo de preparação das células é altamente complexo e extremamente moroso.¹⁰⁶

5 POTENCIAIS ALVOS

5.1 METABOLISMO DE A β

Tal como anteriormente referido, o excesso de A β no cérebro é um dos fatores desencadeantes da doença de Alzheimer. Desta forma, uma intervenção direcionada para reduzir os níveis deste peptídeo tem surgido como uma abordagem clínica bastante atrativa.

APP

Considera-se que o peptídeo A β que resulta da clivagem da APP tenha a capacidade de formar oligómeros e, posteriormente, as placas β -amilóide insolúveis implicadas na neurodegeneração e declínio cognitivo. Nesse sentido, uma *downregulation* da expressão do gene *APP* representa uma possível estratégia terapêutica para a DA.³

A recente tecnologia baseada em pequenos RNA de interferência (siRNA) apresenta-se como uma estratégia viável para proceder à *downregulation* da síntese de APP.³ Nesse sentido, destaca-se um estudo que demonstrou que a utilização deste procedimento em murganhos que sobre-expressam a APP pelo HSV-shRNA reduz a patologia A β .^{3,108} Todavia, a APP apresenta uma diversidade de funções biológicas e, como tal, a sua completa eliminação provoca disfunções locomotoras e cognitivas em murganhos.¹⁰⁹ Por conseguinte, a completa eliminação não é exequível.^{3,110}

sAPP α

O APP ao ser clivado pela α -secretase produz um precursor solúvel e não patológico que é o sAPP α .^{28,33} Este fragmento desempenha diversas funções cruciais tais como a sinalização e plasticidade sináptica normal, aprendizagem, memória, comportamento emocional e sobrevivência neuronal.^{28,33} Dado que os pacientes com DA apresentam baixos níveis deste produto no líquido cefalorraquidiano, uma abordagem terapêutica direcionada para este fragmento assume-se como promissora.⁵ Todavia, uma *upregulation* da produção do sAPP α mediante indução da α -secretase poderá constituir um problema por afetar substratos implicados na tumorigénese.¹¹¹ Neste sentido, a terapia génica assume-se como uma potencial abordagem para melhorar, ou restaurar, os níveis deste fragmento.¹¹¹ Para avaliar o efeito da sobre-expressão do sAPP α pelo AAV procedeu-se a um estudo com modelos de murganhos transgénicos APP/PS1 E9 com doença bem estabelecida. Desta abordagem foi possível observar uma melhoria da plasticidade sináptica, aumento da densidade das espinhas dendríticas e, ainda, uma melhoria da memória espacial de referência.¹¹¹ Paralelamente, este estudo concluiu que a expressão AAV-sAPP α resulta em níveis moderadamente reduzidos de A β e uma significativa

melhoria da patologia.¹¹¹ Estas observações foram associadas à ativação da microglia e fagocitose das placas amilóides como consequência do aumento da IDE e TREM2.¹¹¹ Coletivamente, os resultados deste estudo sugerem que, mesmo em fases com deposição avançada das placas, o sAPP α pode atenuar os efeitos sinaptotóxicos induzidos pelo A β e melhorar a função cognitiva.¹¹¹

BACE1

A BACE1 assume um papel central na produção do peptídeo A β e, como tal, torna-se um alvo terapêutico bastante atrativo.⁵ Contudo, o local ativo desta enzima apresenta algumas especificidades que dificultam o desenvolvimento de pequenas moléculas pela química medicinal tradicional.¹¹² Assim, a terapia génica apresenta-se como uma alternativa bastante promissora a fim de suprimir a BACE1.¹¹²

Um dos estudos efetuados recorreu à utilização de vetores lentivíricos que expressavam siRNAs com vista a silenciar eficazmente a expressão da BACE1 nos neurónios de murganhos com DA.⁵ Com este estudo foi possível alcançar uma redução dos níveis de BACE1 e, conseqüentemente, uma diminuição quer da produção do peptídeo A β quer dos défices neurodegenerativos e comportamentais.⁵ Num outro estudo a diminuição dos níveis de BACE1 foi alcançada graças a uma estratégia que envolveu a utilização de exossomas auto-fabricados a partir de células dendríticas para entrega de siRNA no cérebro de modelos animais.³

No entanto, como resultado da eliminação da BACE1, surgem efeitos indesejáveis, quer a nível cognitivo, quer a nível sináptico. Efetivamente, para além dos efeitos neurotóxicos do peptídeo A β , existem evidências de que, a níveis fisiológicos, este é detentor de propriedades neuroprotetoras; conseqüentemente, a redução da BACE1 pode diminuir a produção endógena de A β , comprometendo as suas propriedades neurotrópicas e sinaptotróficas.⁵

5.2 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Como referido anteriormente, o peptídeo A β sofre constantemente metabolização no líquido cefalorraquidiano e o seu conteúdo depende do equilíbrio entre a sua produção e respetiva depuração. Constatou-se que os doentes com DA esporádica apresentam uma depuração deficiente do peptídeo A β . Neste contexto, o aumento dos níveis deste peptídeo pode ser consequência da elevada produção ou baixa degradação.¹

De facto, diversas enzimas residentes no cérebro são dotadas da capacidade de degradar o peptídeo A β , tal como a neprilisina.^{3,113,114} Estudos recentes demonstram que a

remoção desta enzima em modelos de murganhos está associada a um risco aumentando de desenvolvimento da patologia A β nestes animais.^{3,113} Neste sentido, uma *upregulation* por manipulação genética apresenta-se como uma forte estratégia para reduzir os níveis deste peptídeo na DA.³ De salientar que a validação pré-clínica *in vivo* demonstrou que a expressão da neprilisina por AAV¹¹⁵, lentivírus¹¹⁶ ou HSV¹⁰⁸ em modelos de murganho com sobre-expressão de APP, desencadeou uma diminuição dos níveis de A β e uma melhoria da patologia A β .³ Por essa razão, a transferência do gene da neprilisina apresenta o potencial de reduzir a patologia A β na DA.³

Para além da neprilisina, a enzima conversora da endotelina (ECE) pode igualmente degradar o peptídeo A β no cérebro.³ Na realidade, a transferência do gene da ECE para um modelo de murganho com DA reduziu a patologia A β .^{3,118}

5.3 METABOLISMO DO COLESTEROL

ApoE

O gene que codifica a ApoE apresenta-se como o fator genético de risco mais comum para o desenvolvimento da DA de início tardio.¹¹⁹ O gene que codifica esta apolipoproteína compreende três alelos principais: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$.¹²⁰ A existência do $\epsilon 4$ conduzirá à expressão da isoforma proteica ApoE4 que contribuirá para acelerar o processo de acumulação do peptídeo A β de uma forma dose-dependente, enquanto o $\epsilon 2$ terá uma ação contrária.¹¹⁹ Para além da ApoE4 desempenhar um papel crucial na deposição do peptídeo A β , dados recentes sugerem que também assume um papel importante na patologia de tau e na neurodegeneração mediada pela tau.¹¹⁹ Neste sentido, a redução dos níveis da ApoE4¹¹⁹ ou o aumento da expressão da ApoE2¹²⁰ apresentam-se como duas potenciais abordagens para o tratamento da DA.

De facto, um dos estudos realizados envolveu a administração de oligonucleotídeos anti-sense (ASOs) em modelos de murganhos P301S/ApoE4 a fim de avaliar os efeitos da redução dos níveis da ApoE4.¹¹⁹ Deste estudo concluiu-se que através desta estratégia é possível reduzir os seus níveis em cerca de 50%, o que proporciona uma significativa proteção contra a patologia tau e neurodegeneração associada, uma diminuição da neuroinflamação, sendo preservada a densidade sináptica.¹¹⁹ Também foi possível constatar que esta redução pode assumir efeitos neuroprotetores mesmo após o início da patologia tau.¹¹⁹ Assim, a redução dos níveis da ApoE4 deverá ser explorada como uma possível abordagem terapêutica em portadores da ApoE4 com taupatia, inclusive numa fase avançada da doença.¹¹⁹

Relativamente ao efeito da ApoE2, foi realizado um estudo que envolveu a administração intracerebral de AAV-ApoE4 seguida de administração de AAV-ApoE2 em modelos animais e concluiu-se que houve uma redução da deposição de A β . Estes resultados

sugerem que o aumento da expressão da ApoE2 poderá ser eficiente na redução da patologia A β .¹²⁰ Em virtude dos vários estudos realizados com base neste pressuposto foi possível agendar, para breve, um ensaio com a finalidade de testar a segurança da expressão AAV-ApoE2 em portadores da ApoE4 (data prevista de conclusão: dezembro de 2021).¹²⁰

Clusterina/ApoJ

Atualmente a clusterina (CLU), também conhecida como ApoJ, é o terceiro fator genético de risco mais significativo para o desenvolvimento da DA tardia.¹²¹ O gene que codifica a estrutura primária da CLU contém polimorfismos de nucleótidos únicos (SNPs) associados ao risco de DA tardia.¹²² Todavia, permanece uma grande lacuna na literatura sobre os papéis fisiológicos da CLU no cérebro normal e sobre os mecanismos patológicos conferidos por esses polimorfismos no início da SAD.¹²¹ Mais recentemente, tem sido sugerido que alguns dos SNPs conferem uma proteção contra a DA tardia, mas permanece por esclarecer o quão significativa é essa neuroproteção e quais os mecanismos subjacentes.¹²² De facto, constatou-se que a infusão de CLU no cérebro de murganhos sujeitos a traumatismo cerebral melhorou os parâmetros comportamentais e neuronais.^{3,123} No entanto, a utilização do oligonucleótido antisense OGX-011 como ferramenta genética tem sido empregue em alguns tratamentos para o cancro e tem como pressuposto silenciar a CLU. Esta tecnologia comprovou ser bem-sucedida nos vários ensaios de fase II.^{3,124} Contudo, não conseguiu traduzir-se na fase III, uma vez que a CLU tanto funciona como um supressor de tumores como um promotor.³ Portanto, o efeito tumorigénico da CLU pode ser uma grande preocupação no caso particular da DA.³

CYP46A1

Nas últimas décadas, a forte investigação em torno da fisiopatologia da DA, permitiu sugerir que o metabolismo do colesterol está intimamente relacionado com a progressão desta doença.⁵ De facto, através de ensaios envolvendo modelos animais concluiu-se que a alteração do metabolismo deste lípido assume um papel fulcral no desenvolvimento das placas amilóides e na patologia de tau.⁵

No cérebro, o colesterol é sintetizado *in situ*, essencialmente pelos astrócitos, sendo posteriormente transportado pelas lipoproteínas de alta densidade (HDL).⁵ Estas partículas ao serem internalizadas pelos neurónios fornecem-lhes o colesterol necessário. Dado que é fundamental manter níveis estáveis desta molécula, a biossíntese do colesterol é equilibrada pela sua eliminação.¹²⁵ Nesse sentido, o principal mecanismo de eliminação do excesso do colesterol é a conversão desta molécula no colesterol 24-hidroxicolesterol (24S-OHC) pela enzima neuronal colesterol 24-hidroxilase (CYP46A1).¹²⁵ Este metabolito tem a capacidade de

atravessar a BHE, ao contrário do colesterol, podendo rapidamente difundir-se para a circulação sistêmica ou para o LCR e, subsequentemente, sofrer degradação no fígado.¹²⁵

Atendendo a que na DA ocorre uma redução dos níveis da CYP46A1¹²⁵, a sobre-expressão desta enzima através da administração cerebral de vetores portadores do gene que a codifica parece ser uma estratégia eficaz.⁵ Com o propósito de avaliar o resultado desta possível estratégia, surgiu a primeira manipulação genética realizada em mamíferos.¹²⁵ Este estudo traduziu-se na administração de injeções corticais e hipocâmpais de AAVs portadores do DNA complementar (cDNA)⁵ da CYP46A1 em modelos de murganhos APP23 aos 3 meses de idade, antes do início dos depósitos amilóides.¹²⁶ Constatou-se que foi possível reduzir acentuadamente os níveis dos peptídeos A β e o número de depósitos amilóides aos 12 meses de idade.¹²⁶ Estes animais mostraram uma melhoria prévia da memória espacial aos 6 meses, antes do início do depósito de amilóides.¹²⁶ A sobre-expressão do CYP46A1 por injeção do mesmo vetor AAV no córtex e hipocampo dos murganhos APP/PS1, após o início dos depósitos amilóides, reduziu o número de placas amilóides 3 meses após a intervenção.⁵ Assim, a sobre-expressão neuronal do CYP46A1, antes ou depois do aparecimento das placas amilóides, permitiu reduzir a patologia A β em dois modelos diferentes de animais com a patologia DA.⁵

Este trabalho forneceu a primeira evidência experimental de que o CYP46A1 poderá ser um alvo terapêutico para a doença de Alzheimer, abrindo assim novas vias de tratamento.¹²⁵

ACATI

O colesterol apresenta-se como uma molécula lipídica essencial, presente nas membranas celulares dos mamíferos.¹²⁷ Todavia, o colesterol em níveis anormalmente elevados, especialmente o colesterol livre, é prejudicial para as células.^{127,128} Por essa razão, no interior de cada célula, a homeostase do colesterol celular é altamente regulada por vários mecanismos.^{127,129} Um desses controlos é assegurado pela enzima acil-CoA:colesterol aciltransferase (ACAT), também conhecida como esterol O-aciltransferase (SOAT).¹²⁷ Esta enzima é responsável por converter o colesterol livre em ésteres prevenindo, assim, a sua acumulação nas membranas celulares. A ACAT é expressa por dois genes diferentes, *ACAT1* e *ACAT2*, com diferentes padrões de expressão nos tecidos.¹²⁷ No ser humano, a expressão da *ACAT1* predomina sobre a *ACAT2*, exceto no intestino delgado.^{127,130}

Bryleva *et al.* desenvolveram uma abordagem genética removendo o gene *ACAT1* ou o gene *ACAT2* num modelo triplo-transgênico de murganho portador da patologia DA (3XTg-AD).^{127,131} Este modelo de murganho expressa, simultaneamente, as formas mutantes de APP

humano, PSI e tau, exibindo um fenótipo semelhante à DA humana.¹²⁷ Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que a ablação do gene *ACAT1*, mas não a do *ACAT2*, permitiu reduzir os níveis do peptídeo A β bem como a carga da placa amilóide, contribuindo para melhorar a função cognitiva dos murganhos aos 12 meses.¹³² Estes resultados demonstram que a inativação do gene *ACAT1* é suficiente para melhorar a patologia amilóide neste modelo animal.¹²⁷

Um outro estudo avaliou se a inibição da *ACAT1* poderia desencadear efeitos benéficos nos murganhos 3XTg-AD numa fase pós-sintomática.^{127,133} Com os dados desse estudo foi possível constatar que houve uma redução dos níveis da proteína APP e do peptídeo A β no cérebro destes animais.^{127,132} Verificou-se ainda que, após o início da DA, a inativação parcial da *ACAT1* (40%) no cérebro foi suficiente para causar uma diminuição dos níveis de A β nestes modelos animais.¹²⁷ Assim, estes estudos demonstraram que o bloqueio da *ACAT1* proporciona múltiplos efeitos benéficos na DA. Nessa perspectiva, esta molécula constitui um novo alvo terapêutico para o tratamento da DA.¹²⁷

5.4 TAU

Como explanado previamente, uma das marcas histopatológicas desta doença neurodegenerativa é a presença de emaranhados neurofibrilares intracelulares constituídos pela proteína tau hiperfosforilada.¹³⁴ A hiperfosforilação anormal da tau no cérebro destes doentes pode ser consequência do aumento da fosforilação por parte das cinases e/ou diminuição da desfosforilação por fosfatases.¹³⁴

Uma vez que a proteína tau desempenha um papel crítico na neurodegeneração, uma abordagem direcionada para a inibição da sua expressão constitui uma estratégia promissora para o tratamento desta doença.¹³⁴ Perspetivando reduzir a expressão da tau, poderão ser utilizados tanto os ASOs como os siRNA podem ser utilizados.¹³⁵ Contudo, até à data, os siRNAs ainda não foram investigados em ensaios clínicos para o tratamento da DA.^{134,136} Recentemente, os ASOs reemergiram como um valioso instrumento terapêutico nas doenças neurodegenerativas, das quais se inclui a DA.³ Para estudar os efeitos terapêuticos de uma redução total da tau, Ionis e colegas desenvolveram o BIIB080,¹³⁷ um ASO entregue por via intratecal que reduz a expressão total do gene da *TAU*.¹³⁷ Em murganhos transgênicos P301S que expressam a tau humana, a redução em 50% dos níveis do mRNA da *TAU* pelo BIIB080 inverteu a agregação da tau, com uma diminuição concomitante da taxa de atrofia hipocampal, perda neuronal e défices comportamentais.^{137,138} Estes resultados pré-clínicos encorajadores levaram à realização de ensaios clínicos de fase I/2 em 46 pacientes com DA leve, tratados

com BII080 durante 36 semanas (NCT03186989).¹³⁷ Logo, uma terapia baseada nesta estratégia poderá ser benéfica para pacientes diagnosticados com DA.

5.5 NEUROTROFINAS

As neurotrofinas são uma família de peptídeos estruturalmente relacionados que regulam o crescimento, a diferenciação e a sobrevivência dos neurónios.³ No contexto da DA, os estudos realizados focaram-se, essencialmente, em duas neurotrofinas: o fator neurotrófico neuronal (NGF) e o fator neurotrófico de crescimento derivado do cérebro (BDNF).^{3,139}

NGF

O NGF apresenta particular importância no tratamento da DA dado que é capaz de inverter a atrofia, prevenir a degeneração e estimular a função dos neurónios colinérgicos do encéfalo frontal.^{140,141} De enfatizar que a degeneração dos neurónios colinérgicos é um contribuinte precoce e proeminente do declínio cognitivo presente na DA.⁵

Mediante condições fisiológicas normais, os neurónios colinérgicos do encéfalo frontal desempenham um papel crucial na cognição ao inervarem a região do córtex e do hipocampo com acetilcolina.¹⁴² Os neurónios pós-sinápticos residentes nessas regiões libertam o precursor do NGF, o proNGF, que sofre processamento por uma protéase, a plasmina, o que resulta num NGF maturado, o mNGF.¹⁴² Como os neurónios colinérgicos necessitam de NGF para estimular o crescimento e a plasticidade, expressam à superfície recetores para esta neurotrofina, o recetor tropomiosina cinase A (TrKA) e o p75.¹⁴² O efeito neurotrófico induzido pelo NGF é conseguido após interação com o TrKA (mNGF mais potente que o proNGF).¹⁴² O NGF ao ser transportado retrogradamente dentro dos neurónios colinérgicos inicia várias cascatas de sinalização que incluem a sobrevivência celular, crescimento e libertação da acetilcolina através das projeções cortico-hipocampais.¹⁴² De notar que o proNGF é capaz, por si só, de induzir sinalização apoptótica ao interagir com o p75.¹⁴²

No contexto da DA, o sistema colinérgico é fortemente afetado devido a um conjunto de processos que incluem a alteração da maturação do NGF, alteração do rácio TrKa/p75, transporte e sinalização axonal ineficiente, resposta inflamatória induzida pela libertação dificultada de acetilcolina e citotoxicidade mediada pelo peptídeo A β .¹⁴³ O declínio da inervação colinérgica ao córtex e ao hipocampo é consequência de uma maturação ineficiente do NGF.¹⁴³ Isto tanto é atribuído à produção reduzida e à elevada depuração do mNGF como à redução dos níveis de recetores de TrkA, afetando o transporte retrógrado do NGF.¹⁴³ Assim, níveis elevados de proNGF induzem não só uma sinalização pró-apoptótica como também afetam a ligação do mNGF ao recetor e o seu transporte axonal, conduzindo a uma atrofia dos neurónios colinérgicos do encéfalo frontal. Por outro lado, a presença do peptídeo

A β impede a maturação do NGF e o NGF pode reduzir a formação de A β .¹⁴³ Os estudos científicos sugerem que, durante o envelhecimento, a alteração das vias de maturação e sinalização do NGF pode levar a um aumento da formação de A β e a uma redução do espaço livre.¹⁴³ Além de induzir a morte neuronal, o aumento dos níveis de A β pode conduzir a um aumento da inflamação e a deficiências na sinalização.¹⁴³ O A β pode também diminuir a recaptção de colina da fenda sináptica, afetando a produção de acetilcolina em neurónios pré-sinápticos, e alterar a libertação deste neurotransmissor, levando a défices cognitivos.¹⁴³ Dado que a acetilcolina modula as vias anti-inflamatórias colinérgicas na população glial, uma libertação de acetilcolina dificultada resulta no início da inflamação.¹⁴³ Todas estas alterações comprometem a disponibilidade do mNGF para os neurónios colinérgicos, o que por sua vez culmina com a inervação colinérgica obstruída ao córtex e às regiões hipocámpais do cérebro.¹⁴³

Neste sentido, o NGF tem sido proposto como um possível alvo terapêutico modificador da doença nos últimos anos.³ O primeiro estudo baseado na terapia génica em pacientes com DA foi publicado em 2005.¹⁴³ Neste estudo, o gene do NGF foi entregue em indivíduos diagnosticados com DA ligeira. A transferência do gene foi realizada através de fibroblastos autólogos geneticamente modificados que, posteriormente, foram implantados no cérebro basal. Os dados deste estudo mostraram um aumento significativo do metabolismo cerebral e os testes cognitivos sugeriram um potencial abrandamento do declínio cognitivo.¹⁴³

Recentemente foi publicado um ensaio clínico de fase I e II que recorreu à utilização de vetores AAV e incluiu 49 pacientes com DA, aleatoriamente selecionados para receberem as injeções intracerebrais de AAV-NGF. Do ensaio clínico de fase I, concluiu-se que a administração de AAV-NGF é segura e bem tolerada até 2 anos após a injeção, mantendo a bioatividade nas células transduzidas. Os resultados do ensaio clínico de fase II validaram que a administração de AAV-NGF é segura e bem tolerada, porém, sem diferença significativa no declínio cognitivo.¹⁴³

BDNF

O BDNF é uma neurotrofina dotada da capacidade de regular os processos de aprendizagem e memória.³ O BDNF é expresso e amplamente distribuído por todo o cérebro, especialmente nas regiões do córtex e hipocampo.^{3,144} É fundamental para a função e sobrevivência tanto dos neurónios dopaminérgicos como colinérgicos.^{3,145} O BDNF maduro regula a diferenciação e a plasticidade destes neurónios mediante ativação do seu recetor de alta afinidade TrkB e do seu recetor de baixa afinidade p75^{NTR}.^{3,145} O papel do BDNF na potenciação a longo termo (LTP) foi estabelecido em experiências com animais.^{3,146} Estes

estudos demonstraram que a LTP em neurónios hipocampais é reforçada pela sobre-expressão do TrkB enquanto a redução da sinalização de BDNF-TrkB leva a uma diminuição da memória.³ Na DA, para além da diminuição dos níveis corticais de BDNF, a sinalização do proBDNF através da ligação ao p75^{NTR} promove uma depressão neuronal a longo prazo.^{3,146} Sabe-se que o BDNF pode ter um efeito protetor contra a toxicidade induzida pelo peptídeo A β , tanto *in vivo* como *in vitro*, e prevenir a deficiência de LTP induzida pelo A β nas regiões do córtex e hipocampo.^{3,147}

À semelhança do que acontece com o NGF, as propriedades farmacocinéticas do BDNF não são adequadas para administração periférica, devido à fraca penetração na BHE e ao seu curto tempo de meia vida no plasma.³ Desta forma, as abordagens de terapia genética apresentam-se como uma potencial alternativa terapêutica.³ Foram observados resultados promissores da entrega do gene *BDNF* a murganhos transgênicos APP, mostrando uma redução da perda neuronal, melhoria da memória e diminuição da degeneração sináptica.^{3,148} É importante notar que a terapia genética recorrendo ao lentivírus para entrega do gene do *BDNF* em primatas demonstrou exercer o seu efeito terapêutico, invertendo atrofia neuronal e melhorando a cognição³, mas, curiosamente, o seu efeito benéfico não foi acompanhado por uma diminuição das placas amilóides.⁵ Estes estudos levaram ao início dos ensaios clínicos de fase I com BDNF.³

GDNF

Atualmente, o fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF) está a emergir como um poderoso fator neurotrófico, apresentando um potencial terapêutico contra uma diversidade de condições neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer.^{5,149} Foram utilizados vetores lentivirais para sobre-expressar o gene *GDNF* em astrócitos do hipocampo de murganhos 3xTg-AD *in vivo*.^{5,13} Após 6 meses de tratamento, os murganhos 3xTg-AD de 10 meses exibiram aprendizagem e memória preservadas. A terapia de *GDNF* não reduziu significativamente a patologia amilóide e patologia tau, mas antecipou a expressão de BDNF e a neuroproteção induzida.^{5, 1}

IGF1 e IGF2

O fator de crescimento 2 semelhante à insulina (IGF2) desempenha um papel crítico na consolidação da memória em murganhos e ratos. Nos doentes com DA, a expressão de IGF2 diminui no hipocampo. A administração de AAV-IGF2 no hipocampo de ratos do tipo selvagem envelhecidos melhora a memória e promove a formação de espinhas dendríticas.^{5,150}

A injeção de AAV-IGF2 ou AAV-IGF1 no hipocampo de murganhos APP Tg2576 mitiga défices comportamentais, promove a formação de espinhas dendríticas e restabelece a

transmissão sináptica. A injeção de IGF2, mas não de IGF1, proporciona uma redução significativa dos níveis da proteína amilóide.^{5, 150}

5.6 INFLAMAÇÃO

A microglia desempenha um papel crucial na homeostasia cerebral e na plasticidade neuronal. Além disso, proporciona uma neuroproteção para uma recuperação funcional de lesões traumáticas.^{151,152} Contudo, no processo patológico da DA, o peptídeo A β provoca a ativação da microglia com consequente libertação de um grande número de mediadores citotóxicos inflamatórios, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a IL-1 β , a IL-6 e mediadores relacionados com o stresse oxidativo, nomeadamente EROs, espécies de nitrogénio e óxido nítrico (NO).¹⁵¹ Por consequência, esta neuroinflamação crónica pode desencadear a perda de sinapses e neurogénese, a disfunção cognitiva/motora e, eventualmente, neurodegeneração.^{151,153} Deste modo, estratégias para prevenir a neuroinflamação apresentam-se como um alvo terapêutico alternativo para as doenças neurológicas, tais como a DA.¹⁵¹

TREM2

O *Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 2* (TREM2) foi recentemente identificado como um fator de risco para o desenvolvimento de DA.^{3,154} Como o próprio nome indica, trata-se de um recetor expresso por uma variedade de células mieloides incluindo a microglia, macrófagos, monócitos, osteoclastos, células detriticas e neutrófilos.¹⁵⁵ No cérebro, o TREM2 é expresso, preferencialmente, pela microglia- a principal célula imunitária do SNC.¹⁵⁶

O TREM2 medeia a fagocitose de A β pela microglia e regula a inflamação no SNC.¹⁵⁶ Porém, os mecanismos exatos destes eventos biológicos ainda não estão completamente clarificados. Uma das hipóteses sugere que a deposição anormal de A β ativa o recetor TREM2,¹⁵⁶ o qual, ao interagir com a sua proteína adaptadora, DAPI2, promove a fagocitose pela microglia.¹⁵⁷ Uma vez ativada, a microglia participa na fagocitose de A β evitando a sua deposição e consequente formação das placas amilóides.¹⁵⁶ Além disso, como resultado da ativação do TREM2, há uma sobre-regulação da expressão de IL-4, IL-10 e de outros mediadores anti-inflamatórios que reduzem a resposta inflamatória.¹⁵⁶ Todavia, como consequência de uma estimulação a longo prazo, a microglia adquire um fenótipo neurotóxico que se caracteriza pela sobreprodução de citocinas pró-inflamatórias, conduzindo, subsequentemente, a danos neuronais e sinápticos.¹⁵⁶

Novas evidências sugerem que as mutações homozigotas no gene do *TREM2* resultam em formas letais de demência progressivas, tais como a doença *Nasu-Hakola* e a demência fronto-temporal.¹⁵⁷ Do mesmo modo, uma rara mutação *missense* (substituição de R47H) está associada a um aumento substancial do risco de desenvolvimento de SAD.¹⁵⁷ Por conseguinte, sugere-se que a microglia necessita do *TREM2* para responder à deposição de A β e limitar a neurodegeneração.¹⁵⁷ Assim, estes estudos evidenciam que o *TREM2* pode desempenhar um papel protetor contra a neuroinflamação.¹⁵⁶

Para clarificar o interesse do *TREM2* como um potencial alvo na DA, recorreu-se ao uso de lentivírus como vetores para sobre-expressar o *TREM2* no cérebro de murganhos APP^{swe}/PS1^{dE9} de meia idade.³ Os dados desta abordagem permitiram concluir que houve uma significativa melhoria na neuropatologia relacionada com a DA³, incluindo a deposição de A β , neuroinflamação e neurodegeneração, a qual foi acompanhada por uma melhoria da função cognitiva espacial.^{156,158} No entanto, a sobre-expressão de *TREM2* em murganhos APP^{swe}/PS1^{dE9}, numa fase avançada da doença, não melhorou a neuropatologia amilóide nem diminuiu a neurodegeneração.^{3,159} Além disso, a sobre-expressão do *TREM2* não mitigou a deficiência cognitiva espacial nestes murganhos idosos com patologia similar à DA humana.³ Por consequência, a proteção mediada pelo *TREM2* depende parcialmente da fase da patologia, salientando assim a importância de uma intervenção precoce na doença de Alzheimer.³

ILs

As citocinas anti-inflamatórias representativas, tais como a IL-2, IL-4 e IL-10, são neuroprotetoras e, portanto, apresentam-se como um potencial alvo terapêutico no tratamento da DA e de outras doenças neurodegenerativas.¹⁵¹ Os estudos científicos sugerem que estas citocinas aumentam a degradação do peptídeo A β e, conseqüentemente, possibilitam a supressão da resposta pró-inflamatória.¹⁶⁰ Por conseguinte, a sinalização anti-inflamatória tem sido explorada em vários estudos com o propósito de avaliar os efeitos resultantes da terapia com ILs.

Um dos estudos realizados teve por base a administração no cérebro de murganhos APP/PS1^{dE9} de um vetor AAV que expressa o gene da *Il-2*, o qual aumentou a plasticidade sináptica,³ restaurou a densidade das espinhas dendríticas e aumentou a memória.^{3,161} Além disso, os resultados indicam que a administração de baixas doses de IL-2 é segura. Assim, destaca-se o seu potencial no tratamento da DA.³

Quanto aos tratamentos com IL-4 e IL-10 os resultados foram controversos. A introdução do gene *Il-4* no hipocampo através do vetor AAV em murganhos APP/PS1 suprimiu parcialmente a acumulação glial, a patologia A β e melhorou a neurogênese.^{3,162} Adicionalmente,

as injeções intracranianas de um vetor AAV expressando a *Il-4* no córtex frontal e hipocampo de murganhos transgênicos APP/PSI com três meses de idade reduziu o A β solúvel e insolúvel após três meses de tratamento.^{3,163} Estes estudos sugerem uma nova abordagem para o tratamento da DA através da modulação das cascatas de sinalização anti-inflamatórias.³ Contudo, um estudo anterior utilizou um vetor AAV semelhante para expressar a *Il-4* no hipocampo de murganhos transgênicos APP TgCRND8,¹⁶⁴ tendo sido verificado uma exacerbação da deposição amiloide, seis semanas após a injeção.^{3,164}

A expressão neuronal mediada por AAV do gene murino da *Il-10* no hipocampo dos murganhos APP/PSI demonstrou eficácia na supressão da astrogliose e na melhoria da disfunção cognitiva e da neurogênese.^{3,165} Em contraste, resultados recentes mostraram que a utilização de um sistema de entrega AAV2/1 diferente para a *Il-10* obteve resultados opostos, reportando um aumento da carga da placa amiloide, exacerbação do comprometimento da memória e redução das proteínas sinápticas em dois modelos transgênicos de APP, murganhos TgCRND8 e murganhos Tg2576.^{3,166} Os resultados divergentes poder-se-ão dever ao facto de os estudos terem recorrido a diferentes modelos animais ou a diferentes regimes posológicos.³

No conjunto, estes resultados sugerem que a IL-4 e a IL-10 podem representar possíveis alvos para o tratamento da DA. Todavia, são necessários mais estudos pré-clínicos para elucidar o tipo de intervenção, o seu tempo e qual o sistema de entrega.³

TNF- α

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória¹⁶⁷ produzida por diferentes tipos de células, tais como macrófagos, células linfóides, células endoteliais, neurónios e glia.³ Esta citocina desempenha um papel fisiopatológico no desenvolvimento da DA.³ De realçar que os doentes com DA apresentam níveis mais elevados de TNF- α e dos respetivos recetores, o recetor do fator de necrose tumoral 1 (TNF-RI) e o recetor do fator de necrose tumoral 2 (TNF-RII).³

O TNF- α aumenta a produção de outras citocinas inflamatórias que podem contribuir para o desenvolvimento do estado de inflamação crónica.¹⁶⁷ Além disso, foi demonstrado que em culturas primárias de astrócitos de rato o TNF- α estimula tanto a expressão da BACE1 como a atividade da γ -secretase, o que, consequentemente, provoca uma libertação de grandes quantidades do peptídeo A β .¹⁶⁷

Em estudos pré-clínicos, concluiu-se que a ablação do gene do *Tnf-rl* em murganhos APP23 e 3xTgAD resultou tanto numa diminuição da inflamação cerebral e da carga amiloide, como numa redução da patologia de tau.^{3,168} Portanto, esta estratégia permite inibir a amiloidogénese e reduzir a microgliose (no córtex e no hipocampo) prevenindo défices de

aprendizagem e de memória.¹⁶⁸ Desta forma, o TNF-RI é um potencial novo alvo terapêutico para o tratamento da DA.³ Por outro lado, a administração intraventricular de anticorpos monoclonais anti-TNF- α em murganhos APP/PS1 envelhecidos demonstrou uma redução da deposição da placa amilóide.³ Estes resultados sugerem que o TNF- α representa um alvo apropriado para promover a depuração amiloide e modular a microgliose.³ Além disso, a administração hipocampal de AAV expressando *Tnf- α* em murganhos 3XTgAD com 2 meses de idade melhorou a ativação local da microglia, aumentou os níveis intracelulares da patologia A β e da patologia tau e, subsequentemente, a morte de células neuronais.^{3,169} Pelo contrário, a expressão de TNF- α mediada pelo vetor AAV em murganhos TgCRND8 (quatro meses de idade) resultou numa atenuação da amiloidose.^{3,170} Estes resultados controversos podem ser devidos a diversos graus de ativação da resposta imunitária em diferentes modelos animais transgênicos.¹⁷¹ Portanto, são necessários estudos adicionais para clarificar o estado de inflamação e ativação em diferentes modelos animais e, conseqüentemente, o tempo de tratamento.³

PGRN

A progranulina (PGRN) é uma proteína multifuncional¹⁷² envolvida na embriogênese, crescimento celular, sobrevivência neuronal e inflamação.^{3,173} No cérebro, a PGRN é expressa principalmente pela microglia e pelos neurónios.^{172,174} Recentemente, diversos estudos científicos têm investigado a PGRN, devido à associação de mutações no gene que codifica esta proteína com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.¹⁷² Curiosamente, a primeira ligação entre a PGRN e a neurodegeneração¹⁷² ocorreu quando se demonstrou que as mutações heterozigotas e homozigotas no gene que codifica a PGRN (*GRN*) estão causalmente ligadas a formas familiares de demência frontotemporal (FTD) e à doença de armazenamento lisossomal (LSD).³ Desde então, foram identificadas mais de 113 mutações no *GRN*.¹⁷² O fenótipo clínico associado a estas mutações é muito variado e inclui características que se assemelham a outras doenças neurodegenerativas, incluindo a DA.^{172,174,175} Por conseguinte, a mutação no *GRN* é hoje considerada como um fator de risco para a DA.¹⁷² Coletivamente, estes estudos sugerem que a PGRN pode influenciar vários eventos da patologia da DA, incluindo a acumulação de A β , neuroinflamação e toxicidade.^{172,176} Assim, as estratégias para melhorar a expressão da PGRN no SNC apresentam-se como uma abordagem promissora para o tratamento da DA.¹⁷²

Nesse sentido, um estudo demonstrou que a expressão da PGRN mediada pelo lentivírus no murganho Tg2576 reduziu, significativamente, a deposição de placa amiloide, a inflamação no hipocampo e a perda da densidade sináptica.³ Um outro estudo demonstrou

que a sobre-expressão da PGRN mediada por lentivírus num modelo de murganho (5xFAD) não só reduziu a carga amiloide, como também preveniu a perda neuronal e défices de memória.³

Deste modo, estes resultados sugerem que a manipulação genética da PGRN pode levar a abordagens terapêuticas inovadoras para doenças neurodegenerativas, incluindo a DA.³

5.7 HOMEOSTASE PROTEICA- AUTOFAGIA

A autofagia representa uma via catabólica essencial e altamente conservada, que promove a degradação dos organelos danificados e agregados proteicos potencialmente tóxicos.³ O processo é iniciado com a formação de uma membrana lipídica em torno dos componentes citosólicos, denominada de fagóforo.¹⁷⁷ Esta membrana pode ser originada a partir da membrana citoplasmática, do retículo endoplasmático ou da membrana externa da mitocôndria.¹⁷⁷ A estrutura fechada com membrana dupla- autofagossoma- é formada em consequência da fusão que ocorre entre as extremidades do fagóforo.¹⁷⁷ Posteriormente, a membrana exterior do autofagossoma funde-se com um lisossoma, resultando no fagolisossoma. O conteúdo é, subsequentemente, degradado por enzimas lisossomais.¹⁷⁷

A autofagia representa um mecanismo de sobrevivência visando conservar o metabolismo celular. Contudo, nos últimos anos, tem sido implicada em várias doenças neurodegenerativas incluindo a doença de Alzheimer. Um conjunto crescente de estudos suportam a existência de uma disfunção autofágica no processo neurodegenerativo da DA.¹⁷⁸ Na realidade, esta disfunção influencia a secreção de A β e pode afetar diretamente a sua acumulação intracelular e a formação de placas extracelulares de A β .¹⁷⁸ De realçar que novas evidências sugerem que o aumento dos níveis de proteínas relacionadas com a autofagia pode ter um potencial interesse terapêutico.⁵ Todavia, a indução autofágica após a formação das placas e dos emaranhados não tem qualquer efeito benéfico na DA. Apenas é capaz de reduzir os níveis de A β solúvel se a indução for realizada antes do desenvolvimento da patologia.¹⁷⁸

Beclina-I

A beclina-I desempenha um papel crucial no processo de autofagia, atuando como uma proteína chave na etapa inicial da formação do autofagossoma.^{3,179} Nos doentes com DA, os níveis da proteína beclina-I encontram-se diminuídos nas regiões cerebrais afetadas pela doença.¹⁸⁰ Para corroborar esta observação procedeu-se à redução genética da beclina-I (*BECN1*) em murganhos transgênicos APP. Constatou-se que a autofagia neuronal diminuiu, provocando uma acumulação intracelular e extracelular de A β e, por último, a neurodegeneração.¹⁸⁰ Estas evidências científicas sugerem que o restauro da beclina-I e da

autofagia constituem uma nova abordagem para tratar a DA.⁵ Em concordância com este racional, um estudo recente demonstrou que a sobre-expressão da beclina-1, através de um vetor lentiviral, reduziu a patologia amiloide intracelular e extracelular em murganhos transgênicos APP.^{3,180} A ativação autofágica através da sobre-expressão da proteína evitou a morte das células neuronais e melhorou a eliminação dos agregados proteicos potencialmente tóxicos.¹⁷⁸ Esta constatação sugere que a ativação da autofagia, mediada pela beclina-1, pode melhorar a patologia A β na DA e ser um potencial alvo molecular para o tratamento da doença.^{3,180}

P62/SQSTM1

A p62/SQSTM1, codificada pelo gene *SQSTM1*¹⁸¹ apresenta-se como um recetor de carga ou adaptador que atua também como uma proteína seletora de substratos.¹⁸² A p62/SQSTM1 regula a entrega de organelos disfuncionais, proteínas agregadas ou mal enroladas e proteínas ubiquitinadas para a degradação através da autofagia ou do proteossoma.¹⁸² Nos últimos anos tem surgido como um potencial alvo para o tratamento de várias doenças, incluindo doenças neurodegenerativas como a DA.¹⁸¹

No contexto da DA, concluiu-se que os níveis de expressão da p62/SQSTM1 estão diminuídos.^{3,183} Para avaliar os efeitos da p62/SQSTM1 na DA, procedeu-se a um estudo com ratos *knockout* em p62/SQSTM1.^{3,184} Os resultados demonstraram uma acumulação progressiva da tau hiperfosforilada, NFT e neurodegeneração, evidenciando o papel crucial do p62/SQSTM1 na agregação proteica e sua degradação na DA.^{3,184}

Numa abordagem de terapia génica, a sobre-expressão de p62/SQSTM1 mediante injeções bilaterais de AAV nos ventrículos laterais em murganhos APP/PS1 permitiu diminuir os défices cognitivos,³ os níveis de A β e a formação de placas, salientando, assim, a primeira evidência *in vivo* do *turnover* de A β por p62/SQSTM1.³ No entanto, a janela temporal para a sobre-expressão de p62/SQSTM1 necessita de ser cuidadosamente considerada,³ uma vez que o aumento da indução da autofagia após a manifestação dos défices de depuração autofágica pode exacerbar a acumulação patológica de vesículas autofágicas com os consequentes efeitos tóxicos.³

6 CONCLUSÃO

Atualmente, a terapia genética é utilizada na clínica para tratar a Distrofia Muscular de Duchenne, a Atrofia Muscular Espinal e a *Leber's Congenital Amaurosis*, uma doença ocular rara causada por uma mutação no gene *RPE65*.³ Adicionalmente, estão em curso ensaios clínicos promissores visando o tratamento da adrenoleucodistrofia cerebral e da amiloidose

hereditária ATTR (hATTR) com polineuropatia, o que demonstra, claramente, o potencial da terapia genética para modificar o curso de doenças neurológicas.³

No que concerne à DA e atendendo ao impacto deletério desta doença, é crucial a existência de uma terapêutica que possibilite modificar o curso da doença ou, idealmente, que atue de forma preventiva. Todavia, a possibilidade de transformar uma doença fatal numa doença tratável e curável constitui ainda um grande desafio. No entanto, a melhoria do conhecimento acerca da fisiopatologia da DA tem permitido identificar novos alvos terapêuticos e alavancar novas estratégias terapêuticas. Nesse sentido, a terapia génica tem sido explorada na investigação pré-clínica e clínica perspetivando reverter os mecanismos fisiopatológicos subjacentes à DA. Esta terapia apresenta um elevado potencial para mitigar, de uma forma focada e personalizada, um ou vários *hallmarks* da DA e, assim, prevenir, ou até mesmo curar, esta doença tão debilitante. Tendo em conta os ensaios pré-clínicos e clínicos expostos nesta dissertação, a terapia genica apresenta um elevado potencial de originar um tratamento modificador da Doença de Alzheimer num futuro próximo.

Por último, é da responsabilidade da comunidade científica, perante os milhões de doentes que sofrem ou sofrerão desta doença devastadora, ser suficientemente corajosa para aprofundar outras linhas de investigação fora das atuais hipóteses conhecidas da doença e mergulhar em novas perspetivas promissoras capazes de tratar esta doença, atualmente incurável.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Graham, W. V., Bonito-Oliva, A. & Sakmar, T. P. Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annu. Rev. Med.* **68**, 413–430 (2017).
2. Winblad, B. *et al.* Defeating Alzheimer's disease and other dementias: A priority for European science and society. *Lancet Neurol.* **15**, 455–532 (2016).
3. Loera-Valencia, R. *et al.* Targeting Alzheimer's disease with gene and cell therapies. *J. Intern. Med.* **284**, 2–36 (2018).
4. Harris, M. E., Hensley, K., Butterfield, D. A., Leedle, R. A. & Carney, J. M. Direct evidence of oxidative injury produced by the Alzheimer's β -Amyloid peptide (1-40) in cultured hippocampal neurons. *Exp. Neurol.* **131**, 193–202 (1995).
5. Alves, S., Fol, R. & Cartier, N. Gene Therapy Strategies for Alzheimer's Disease: An Overview. *Hum. Gene Ther.* **27**, 100–107 (2016).
6. Shao, W., Peng, D. & Wang, X. Genetics of Alzheimer's disease: From pathogenesis to clinical usage. *J. Clin. Neurosci.* **45**, 1–8 (2017).
7. Hofman, A. *et al.* The prevalence of dementia in Europe: A collaborative study of 1980-1990 findings. *Int. J. Epidemiol.* **20**, 736–748 (1991).
8. Santana, I., Farinha, F., Freitas, S., Rodrigues, V. & Carvalho, Á. Epidemiologia da Demência e da Doença de Alzheimer em Portugal: Estimativas da Prevalência e dos Encargos Financeiros com a Medicação. *Acta Med. Port.* **28**, 182 (2015).
9. Anderson, W. F. Gene therapy. *Sci. Am.* **273**, 124–128 (1995).
10. Ferreira, S. & Massano, J. Terapêutica farmacológica na doença de Alzheimer: Progressos e esperanças futuras. *Arq. Med.* **27**, 65–86 (2013).
11. Bolognesi, M. L., Matera, R., Minarini, A., Rosini, M. & Melchiorre, C. Alzheimer's disease: new approaches to drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 303–308 (2009).
12. Kumar, S. & Reddy, P. H. Are circulating microRNAs peripheral biomarkers for Alzheimer's disease? *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1862**, 1617–1627 (2016).
13. Alberdi, A., Aztiria, A. & Basarab, A. On the early diagnosis of Alzheimer's Disease from multimodal signals: A survey. *Artif. Intell. Med.* **71**, 1–29 (2016).
14. Karch, C. M. & Goate, A. M. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol. Psychiatry* **77**, 43–51 (2015).
15. De Falco, A., Cukierman, D. S., Hauser-Davis, R. A. & Rey, N. A. Doença de Alzheimer: Hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. *Quim. Nova* **39**, 63–80 (2016).
16. Hanafy, A. S., Schoch, S. & Lamprecht, A. CRISPR/CAS9 delivery potentials in alzheimer's disease management: A mini review. *Pharmaceutics* **12**, 1–14 (2020).
17. McCartney, D. L. *et al.* Investigating the relationship between DNA methylation age

- acceleration and risk factors for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement. Diagnosis, Assess. Dis. Monit.* **10**, 429–437 (2018).
18. Tozzo, P., Zullo, S. & Caenazzo, L. Science runs and the debate brakes: Somatic gene-editing as a new tool for gender-specific medicine in Alzheimer's disease. *Brain Sci.* **10**, 1–11 (2020).
 19. Hasanpour, M. et al. The Dynamics of Neurosteroids and Sex-Related Hormones in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *NeuroMolecular Med.* **20**, 215–224 (2018).
 20. Caruso, A. et al. Stress as risk factor for Alzheimer's disease. *Pharmacol. Res.* **132**, 130–134 (2018).
 21. Medina, M., Khachaturian, Z. S., Rossor, M., Avila, J. & Cedazo-Minguez, A. Toward common mechanisms for risk factors in Alzheimer's syndrome. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **3**, 571–578 (2017).
 22. Yamazaki, Y., Painter, M. M., Bu, G. & Kanekiyo, T. Apolipoprotein E as a Therapeutic Target in Alzheimer's Disease: A Review of Basic Research and Clinical Evidence. *CNS Drugs* **30**, 773–789 (2016).
 23. Lambert, J. C. et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* **45**, 1452–1458 (2013).
 24. Van Cauwenberghe, C., Van Broeckhoven, C. & Sleegers, K. The genetic landscape of Alzheimer disease: Clinical implications and perspectives. *Genet. Med.* **18**, 421–430 (2016).
 25. Querfurth, H. W. & Laferla, F. M. Alzheimer's Disease. 329–344 (2018).
 26. Oostveen, W. & Lange, E. Imaging Techniques in Alzheimer's Disease: A Review of Applications in Early Diagnosis and Longitudinal Monitoring. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 2110 (2021).
 27. O'Brien, R. J. & Wong, P. C. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* **34**, 185–204 (2011).
 28. Tiwari, S., Venkata, A., Kaushik, A., Adriana, Y. & Nair, M. Alzheimer's Disease Diagnostics And Therapeutics Market. *Int J Nanomedicine* . Jul **2019**, 5541–5554 (2019).
 29. Capell, A. et al. Maturation and pro-peptide cleavage of β -secretase. *J. Biol. Chem.* **275**, 30849–30854 (2000).
 30. LaFerla, F. M., Green, K. N. & Oddo, S. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 499–509 (2007).
 31. Zhang, H., Ma, Q., Zhang, Y. W. & Xu, H. Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* **120**, 9–21 (2012).
 32. Puzzo, D. et al. Endogenous amyloid- β is necessary for hippocampal synaptic plasticity

- and memory. *Ann. Neurol.* **69**, 819–830 (2011).
33. Kimberly, W. T., Zheng, J. B., Guénette, S. Y. & Selkoe, D. J. The Intracellular Domain of the β -Amyloid Precursor Protein Is Stabilized by Fe65 and Translocates to the Nucleus in a Notch-like Manner. *J. Biol. Chem.* **276**, 40288–40292 (2001).
 34. Iwata, N. *et al.* Identification of the major $A\beta$ 1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: Suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat. Med.* **6**, 143–150 (2000).
 35. KELL, and PEX. *FASEB J.* **11**, 355–364 (2017).
 36. Kurochkin, I. V. & Goto, S. Alzheimer's β -amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett.* **345**, 33–37 (1994).
 37. Hu, J., Igarashi, A., Kamata, M. & Nakagawa, H. Angiotensin-converting Enzyme Degrades Alzheimer Amyloid β -Peptide ($A\beta$); Retards $A\beta$ Aggregation, Deposition, Fibril Formation; and Inhibits Cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **276**, 47863–47868 (2001).
 38. Nalivaeva, N. N., Beckett, C., Belyaev, N. D. & Turner, A. J. Are amyloid-degrading enzymes viable therapeutic targets in Alzheimer's disease? *J. Neurochem.* **120**, 167–185 (2012).
 39. Deane, R. & Zlokovic, B. Role of the Blood-Brain Barrier in the Pathogenesis of Alzheimers Disease. *Curr. Alzheimer Res.* **4**, 191–197 (2007).
 40. Eftekharzadeh, B. *et al.* Tau Protein Disrupts Nucleocytoplasmic Transport in Alzheimer's Disease. *Neuron* **99**, 925-940.e7 (2018).
 41. Council, M. R., Road, H. & Kingdom, U. Eurodegenerative auopathies. *Genetics* 1121–1161 (2001).
 42. De Strooper, B. & Woodgett, J. Alzheimer's disease: Mental plaque removal. *Nature* **423**, 392–393 (2003).
 43. Galimberti, D. & Scarpini, E. Neurodegenerative diseases: Clinical aspects, molecular genetics and biomarkers. *Neurodegener. Dis. Clin. Asp. Mol. Genet. Biomarkers* 1–407 (2018).
 44. Suzhen, D., Yale, D., Feng, G., Yinghe, H. & Zheng, Z. Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a re-evaluation of amyloid cascade hypothesis. *Transl. Neurodegener.* **1**, 18 (2012).
 45. Wang, Y. *et al.* TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell* **160**, 1061–1071 (2015).
 46. Webers, A., Heneka, M. T. & Gleeson, P. A. The role of innate immune responses and neuroinflammation in amyloid accumulation and progression of Alzheimer's disease. *Immunol. Cell Biol.* **98**, 28–41 (2020).

47. Ransohoff, R. M. & Brown, M. A. Innate immunity in the central nervous system Find the latest version : Review series Innate immunity in the central nervous system. *J. Clin. Invest.* **122**, 1164–1171 (2012).
48. Heneka, M. T., Kummer, M. P. & Latz, E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 463–477 (2014).
49. Frenkel, D., Trudler, D. & Farfara, D. Toll-like receptors expression and signaling in glia cells in neuro-amyloidogenic diseases: Towards future therapeutic application. *Mediators Inflamm.* **2010**, (2010).
50. Ji, K., Akgul, G., Wollmuth, L. P. & Tsirka, S. E. Microglia Actively Regulate the Number of Functional Synapses. *PLoS One* **8**, (2013).
51. Tarasoff-Conway, J. M. *et al.* Clearance systems in the brain - Implications for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* **11**, 457–470 (2015).
52. Scheuner, D. *et al.* Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.* **2**, 864–870 (1996).
53. Lee, C. Y. D. & Landreth, G. E. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J. Neural Transm.* **117**, 949–960 (2010).
54. Heneka, M. T. *et al.* Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* **14**, 388–405 (2015).
55. Hickman, S. E., Allison, E. K. & El Khoury, J. Microglial dysfunction and defective β -amyloid clearance pathways in aging alzheimer's disease mice. *J. Neurosci.* **28**, 8354–8360 (2008).
56. Machado, A. P. R., Carvalho, I. O. & Rocha Sobrinho, H. M. da. Neuroinflamação Na Doença De Alzheimer. *Rev. Bras. Mil. Ciências* **6**, (2020).
57. Gadoth N, G. H. Oxidative Stress and Free Radical Damage in Neurology. *Humana Press* (2011).
58. Couturier, J. *et al.* Inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase strongly decreases cytokine production and release in peripheral blood mononuclear cells from patients with Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **21**, 1217–1231 (2010).
59. Gabriel, S. Avaliação do sistema colinérgico na doença de alzheimer. (2019).
60. Gabuzda, D., Busciglio, J., Chen, L. B., Matsudaira, P. & Yankner, B. A. Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative. *J. Biol. Chem.* **269**, 13623–13628 (1994).
61. Markesbery, W. R. The role of oxidative stress in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **56**, 1449–1452 (1999).

62. Ichimura, H., Parthasarathi, K., Quadri, S., Issekutz, A. C. & Bhattacharya, J. Mechano-oxidative coupling by mitochondria induces proinflammatory responses in lung venular capillaries. *J. Clin. Invest.* **111**, 691–699 (2003).
63. Hampel, H. *et al.* The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain* **141**, 1917–1933 (2018).
64. Bartus RT, 3rd, D. R., B, B. & AS., L. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* vol. 217 408–417 (1982).
65. Davies, P. and A. J. M. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* **2**, 1403 (1976).
66. Whitehouse, P. J., Price, D. L., Clark, A. W., Coyle, J. T. & DeLong, M. R. Alzheimer disease: Evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann. Neurol.* **10**, 122–126 (1981).
67. Nordberg, A., Alafuzoff, I. & Winblad, B. Nicotinic and muscarinic subtypes in the human brain: Changes with aging and dementia. *J. Neurosci. Res.* **31**, 103–111 (1992).
68. Mesulam, M. The Cholinergic Lesion of Alzheimer's Disease: Pivotal Factor or Side Show? *Learn. Mem.* **11**, 43–49 (2004).
69. Haugaard, N., Levin, R. M. & Surname, F. Regulation of the activity of choline acetyl transferase by lipoic acid. *Mol. Cell. Biochem.* **213**, 61–63 (2000).
70. Abreu-Villaça, Y., Filgueiras, C. C. & Manhães, A. C. Developmental aspects of the cholinergic system. *Behav. Brain Res.* **221**, 367–378 (2011).
71. Wevers, A. Localisation of pre- and postsynaptic cholinergic markers in the human brain. *Behav. Brain Res.* **221**, 341–355 (2011).
72. H. Ferreira-Vieira, T., M. Guimaraes, I., R. Silva, F. & M. Ribeiro, F. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr. Neuropharmacol.* **14**, 101–115 (2016).
73. Campos-Pea, V. & Antonio, M. Alzheimer Disease: The Role of A β in the Glutamatergic System. *Neurochemistry* (2014).
74. Frisardi, V., Panza, F. & Farooqui, A. A. Late-life depression and Alzheimer's disease: The glutamatergic system inside of this mirror relationship. *Brain Res. Rev.* **67**, 344–355 (2011).
75. Revett, T. J., Baker, G. B., Jhamandas, J. & Kar, S. Glutamate system, amyloid β peptides and tau protein: Functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. *J. Psychiatry Neurosci.* **38**, 6–23 (2013).
76. Morrison, A. S. & Lyketsos, C. R. Review the Pathophysiology of Alzheimer's Disease. *Adv. Stud. Nurs.* **3**, 256–270 (2005).
77. Esposito, Z. *et al.* Amyloid β , glutamate, excitotoxicity in Alzheimer's disease: Are we

- on the right track? *CNS Neurosci. Ther.* **19**, 549–555 (2013).
78. Walton, H. S. & Dodd, P. R. Glutamate-glutamine cycling in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* **50**, 1052–1066 (2007).
 79. Dabnolt, N. . Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* **65**, 1–105 (2011).
 80. Gasparini, C. F. & Griffiths, L. R. The biology of the glutamatergic system and potential role in migraine. *Int. J. Biomed. Sci.* **9**, 1–8 (2013).
 81. Wenk, G. L., Parsons, C. G. & Danysz, W. Potential role of N-methyl-D-aspartate receptors as executors of neurodegeneration resulting from diverse insults: Focus on memantine. *Behav. Pharmacol.* **17**, 411–424 (2006).
 82. Danysz, W. & Parsons, C. G. Alzheimer's disease, β -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine - Searching for the connections. *Br. J. Pharmacol.* **167**, 324–352 (2012).
 83. Anand, P. & Singh, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Arch. Pharm. Res.* **36**, 375–399 (2013).
 84. Saraiva, J., Nobre, R. J. & Pereira de Almeida, L. Gene therapy for the CNS using AAVs: The impact of systemic delivery by AAV9. *J. Control. Release* **241**, 94–109 (2016).
 85. Costantini, L. C., Bakowska, J. C., Breakefield, X. O. & Isacson, O. Gene therapy in the CNS. *Gene Ther.* **7**, 93–109 (2000).
 86. Assembleia da República. Lei N° 12/2005. Informação genética pessoal e informação de saúde. (2005).
 87. Piguet, F., Alves, S. & Cartier, N. Clinical Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases: Past, Present, and Future. *Hum. Gene Ther.* **28**, 988–1003 (2017).
 88. Gardlík, R. et al. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med. Sci. Monit.* **11**, 110–121 (2005).
 89. Chen, W., Hu, Y. & Ju, D. Gene therapy for neurodegenerative disorders: advances, insights and prospects. *Acta Pharm. Sin. B* **10**, 1347–1359 (2020).
 90. Nardi, N. B., Teixeira, L. A. K., Ávila da Silva, E. F. Gene Therapy. *Cien. Saude Colet.* **7**, 109–116 (2002).
 91. Xuenong Bo, J. V. Gene Delivery and Therapy for Neurological Disorders. *Neuromethods* (2015).
 92. Mohammadinejad, R. et al. In vivo gene delivery mediated by non-viral vectors for cancer therapy. *J. Control. Release* **325**, 249–275 (2020).
 93. Vetrini, F. & Ng, P. Gene therapy with helper-dependent adenoviral vectors: Current advances and future perspectives. *Viruses* **2**, 1886–1917 (2010).
 94. Choudhury, S. R. et al. Viral vectors for therapy of neurologic diseases.

- Neuropharmacology* **120**, 63–80 (2017).
95. Escors, D., Breckpot, K., Aarce, F., Kochan, G., Stephenson, H. *Lentiviral Vectors and Gene Therapy*. (2012).
 96. Bonci, D. *et al.* 'Advanced' generation lentiviruses as efficient vectors for cardiomyocyte gene transduction in vitro and in vivo. *Gene Ther.* **10**, 630–636 (2003).
 97. O'Connor, D. M. & Boulis, N. M. Gene therapy for neurodegenerative diseases. *Trends Mol. Med.* **21**, 504–512 (2015).
 98. Tomatsu, S., Sawamoto, K., Chen, H.-H. & Mason, R. Gene therapy for mucopolysaccharidoses. *Mol. Genet. Metab.* **123**, S140 (2018).
 99. Savić, N. & Schwank, G. Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Transl. Res.* **168**, 15–21 (2016).
 100. Mingozzi, F. & High, K. A. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: Progress and challenges. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 341–355 (2011).
 101. Gowing, G., Svendsen, S. & Svendsen, C. N. Ex vivo gene therapy for the treatment of neurological disorders. *Prog. Brain Res.* **230**, 99–132 (2017).
 102. Maguire, C. A. *et al.* Microvesicle-associated AAV vector as a novel gene delivery system. *Mol. Ther.* **20**, 960–971 (2012).
 103. Choong, C. J., Baba, K. & Mochizuki, H. Gene therapy for neurological disorders. *Expert Opin. Biol. Ther.* **16**, 143–159 (2016).
 104. Barrett, R., Ornelas, L., Yeager, N., Mandefro, B., Sahabian, A., Lenaeus, L., Targan, S.R., Svendsen, C.N., Sareen, D. *Reliable generation of induced pluripotent stem cell from human lymphoblastoid cell lines*. (2014).
 105. Liu, Y. & Wang, D. A. Viral vector-mediated transgenic cell therapy in regenerative medicine: Safety of the process. *Expert Opin. Biol. Ther.* **15**, 559–567 (2015).
 106. Kawaja, M. D., Rosenberg, M. B., Yoshida, K. & Gage, F. H. Somatic gene transfer of nerve growth factor promotes the survival of axotomized septal neurons and the regeneration of their axons in adult rats. *J. Neurosci.* **12**, 2849–2864 (1992).
 107. Rosenberg, M. B. *et al.* Grafting genetically modified cells to the damaged brain: restorative effects of ngf expression. *Science (80-)*. **242**, 1575–1578 (1988).
 108. Hong, C. S., Goins, W. F., Goss, J. R., Burton, E. A. & Glorioso, J. C. Herpes simplex virus RNAi and neprilysin gene transfer vectors reduce accumulation of Alzheimer's disease-related amyloid- β peptide in vivo. *Gene Ther.* **13**, 1068–1079 (2006).
 109. Zheng, H. *et al.* B-Amyloid Precursor Protein-Deficient Mice Show Reactive Gliosis and Decreased Locomotor Activity. *Cell* **81**, 525–531 (1995).
 110. Senechal, Y., Kelly, P. H., Cryan, J. F., Natt, F. & Dev, K. K. Amyloid precursor protein

- knockdown by siRNA impairs spontaneous alternation in adult mice. *J. Neurochem.* **102**, 1928–1940 (2007).
111. Fol, R. *et al.* Viral gene transfer of APP α rescues synaptic failure in an Alzheimer's disease mouse model. *Acta Neuropathol.* **131**, 247–266 (2016).
 112. Singer, O. *et al.* Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat. Neurosci.* **8**, 1343–1349 (2005).
 113. Iwata, N. *et al.* Metabolic regulation of brain A β by neprilysin. *Science (80-)*. **292**, 1550–1552 (2001).
 114. Takaki, Y. *et al.* Biochemical identification of the neutral endopeptidase family member responsible for the catabolism of amyloid β peptide in the brain. *J. Biochem.* **128**, 897–902 (2000).
 115. Iwata, N. *et al.* Presynaptic Localization of Neprilysin Contributes to Efficient Clearance of Amyloid- β Peptide in Mouse Brain. *J. Neurosci.* **24**, 991–998 (2004).
 116. Marr, R. A. *et al.* Neprilysin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice. *J. Neurosci.* **23**, 1992–1996 (2003).
 117. Rose, J. B. *et al.* Neuropeptide Y fragments derived from neprilysin processing are neuroprotective in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **29**, 1115–1125 (2009).
 118. Carty, N. C. *et al.* Adeno-associated viral (AAV) serotype 5 vector mediated gene delivery of endothelin-converting enzyme reduces A β deposits in APP + PSI transgenic mice. *Mol. Ther.* **16**, 1580–1586 (2008).
 119. Litvinchuk, A. *et al.* Apolipoprotein E4 Reduction with Antisense Oligonucleotides Decreases Neurodegeneration in a Tauopathy Model. *Ann. Neurol.* **89**, 952–966 (2021).
 120. Husain, M. A., Laurent, B. & Plourde, M. APOE and Alzheimer's Disease: From Lipid Transport to Physiopathology and Therapeutics. *Front. Neurosci.* **15**, 1–15 (2021).
 121. Woody, S. K. & Zhao, L. Clusterin (APOJ) in Alzheimer's Disease: An Old Molecule with a New Role. *Updat. Dement.* (2016).
 122. Balcar, V. J. *et al.* Single Nucleotide Polymorphism rs11136000 of CLU Gene (Clusterin, ApoJ) and the Risk of Late-Onset Alzheimer's Disease in a Central European Population. *Neurochem. Res.* **46**, 411–422 (2021).
 123. Huang, Z. *et al.* Intraventricular apolipoprotein ApoJ infusion acts protectively in Traumatic Brain Injury. *J. Neurochem.* **136**, 1017–1025 (2016).
 124. Wilson, M. R. & Zoubeidi, A. Clusterin as a therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets* **21**, 201–213 (2017).

125. Petrov, A. M. & Pikuleva, I. A. Cholesterol 24-Hydroxylation by CYP46A1: Benefits of Modulation for Brain Diseases. *Neurotherapeutics* **16**, 635–648 (2019).
126. Sodero, A. O. 24S-hydroxycholesterol: Cellular effects and variations in brain diseases. *J. Neurochem.* 0–1 (2020).
127. Shibuya, Y., Chang, C. C. Y. & Chang, T. Y. ACAT1/SOAT1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Future Med. Chem.* **7**, 2451–2467 (2015).
128. Tabas, I. Consequences of cellular cholesterol accumulation. *J. Clin. Invest.* **110**, 905–911 (2002).
129. Chang, T. Y., Chang, C. C. Y., Ohgami, N. & Yamauchi, Y. Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 129–157 (2006).
130. Chang, T. Y., Li, B. L., Chang, C. C. Y. & Urano, Y. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **297**, 1–9 (2009).
131. Oddo, S. et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's Disease with plaques and tangles: Intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron* **39**, 409–421 (2003).
132. Bryleva, E. Y. et al. ACAT1 gene ablation increases 24(S)-hydroxycholesterol content in the brain and ameliorates amyloid pathology in mice with AD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 3081–3086 (2010).
133. Zhang, Y. et al. Cholesterol is superior to 7-ketocholesterol or 7 α -hydroxycholesterol as an allosteric activator for acyl-coenzyme A:Cholesterol acyltransferase I. *J. Biol. Chem.* **278**, 11642–11647 (2003).
134. Gu, J. lan & Liu, F. Tau in Alzheimer's Disease: Pathological Alterations and an Attractive Therapeutic Target. *Curr. Med. Sci.* **40**, 1009–1021 (2020).
135. Guo, T., Noble, W. & Hanger, D. P. Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol.* **133**, 665–704 (2017).
136. Zuckerman, J. E. & Davis, M. E. Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 843–856 (2015).
137. VandeVrede, L., Boxer, A. L. & Polydoro, M. Targeting tau: Clinical trials and novel therapeutic approaches. *Neurosci. Lett.* **731**, 134919 (2020).
138. DeVos, S. L. et al. Tau reduction prevents neuronal loss and reverses pathological tau deposition and seeding in mice with tauopathy. *Sci. Transl. Med.* **9**, (2017).
139. Allen SJ, Watson JJ, D. D. The neurotrophins and their role in Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol* **9**, 559–73 (2011).
140. Rodrigues, B. D. S., Kanekiyo, T. & Singh, J. Nerve Growth Factor Gene Delivery across the Blood-Brain Barrier to Reduce Beta Amyloid Accumulation in AD Mice. *Mol. Pharm.* **17**, 2054–2063 (2020).

141. Aloe, L., Rocco, M. L., Bianchi, P. & Manni, L. Nerve growth factor: From the early discoveries to the potential clinical use. *J. Transl. Med.* **10**, 1–15 (2012).
142. Mitra, S., Behbahani, H. & Eriksdotter, M. Innovative therapy for Alzheimer's disease— with focus on biodelivery of NGF. *Front. Neurosci.* **13**, 1–21 (2019).
143. Castle, M. J. *et al.* Postmortem analysis in a clinical trial of AAV2-NGF gene therapy for alzheimer's disease identifies a need for improved vector delivery. *Hum. Gene Ther.* **31**, 415–422 (2020).
144. Phillips, H. S., Hains, J. M., Laramée, G. R., Rosenthal, A. & Winslow, J. W. Widespread expression of BDNF but not NT3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons. *Science (80-)*. **250**, 290–294 (1990).
145. Ghosh, A., Carnahan, J. & Greenberg, M. E. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science (80-)*. **263**, 1618–1623 (1994).
146. Koponen, E. *et al.* Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor *trkB* exhibit increased activation of the *trkB*-PLC γ pathway, reduced anxiety, and facilitated learning. *Mol. Cell. Neurosci.* **26**, 166–181 (2004).
147. Kitiyanant, N., Kitiyanant, Y., Svendsen, C. N. & Thangnipon, W. BDNF-, IGF-1- and GDNF-secreting human neural progenitor cells rescue amyloid β -induced toxicity in cultured rat septal neurons. *Neurochem. Res.* **37**, 143–152 (2012).
148. Nagahara, A. H. *et al.* Early BDNF treatment ameliorates cell loss in the entorhinal cortex of APP transgenic mice. *J. Neurosci.* **33**, 15596–15602 (2013).
149. Revilla, S. *et al.* Lenti-GDNF Gene Therapy Protects Against Alzheimer's Disease-Like Neuropathology in 3xTg-AD Mice and MC65 Cells. *CNS Neurosci. Ther.* **20**, 961–972 (2014).
150. Pascual-Lucas, M. *et al.* Insulin-like growth factor 2 reverses memory and synaptic deficits in APP transgenic mice. *EMBO Mol. Med.* **6**, 1246–1262 (2014).
151. Kiyota, T. *et al.* AAV serotype 2/1-mediated gene delivery of anti-inflammatory interleukin-10 enhances neurogenesis and cognitive function in APPPS1 mice. *Gene Ther.* **19**, 724–733 (2012).
152. Streit, W. J. Microglial Response to Brain Injury: A Brief Synopsis. *Toxicol. Pathol.* **28**, 28–30 (2000).
153. Monje, M. L., Mizumatsu, S., Fike, J. R. & Palmer, T. D. Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nat. Med.* **8**, 955–962 (2002).
154. Rraklli, V., Södersten, E., Nyman, U., Hagey, D. W. & Holmberg, J. Elevated levels of ZAC1 disrupt neurogenesis and promote rapid in vivo reprogramming. *Stem Cell Res.* **16**, 1–9 (2016).

155. Jiang, T. *et al.* Upregulation of TREM2 ameliorates neuropathology and rescues spatial cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* **39**, 2949–2962 (2014).
156. Zheng, H. *et al.* TREM2 in Alzheimer's Disease: Microglial Survival and Energy Metabolism. *Front. Aging Neurosci.* **10**, 1–10 (2018).
157. Karanfilian, L., Tosto, M. G. & Malki, K. The role of TREM2 in Alzheimer's disease; evidence from transgenic mouse models. *Neurobiol. Aging* **86**, 39–53 (2020).
158. Buckley, C. D., Gilroy, D. W., Serhan, C. N., Stockinger, B. & Tak, P. P. The resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 59–66 (2013).
159. Arnardottir, H. H., Dalli, J., Colas, R. A., Shinohara, M. & Serhan, C. N. Aging Delays Resolution of Acute Inflammation in Mice: Reprogramming the Host Response with Novel Nano-Proresolving Medicines. *J. Immunol.* **193**, 4235–4244 (2014).
160. Chakrabarty, P. *et al.* Hippocampal expression of murine IL-4 results in exacerbation of amyloid deposition. *Mol. Neurodegener.* **7**, 1–12 (2012).
161. Wang, X. *et al.* Resolution of inflammation is altered in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* **11**, 40-50.e2 (2015).
162. Sirkis, D. W. *et al.* Rare TREM2 variants associated with Alzheimer's disease display reduced cell surface expression. *Acta Neuropathol. Commun.* **4**, 98 (2016).
163. Paloneva, J. *et al.* Mutations in two genes encoding different subunits of a receptor signaling complex result in an identical disease phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 656–662 (2002).
164. Guerreiro, R. J. *et al.* Using exome sequencing to reveal mutations in TREM2 presenting as a frontotemporal dementia-like syndrome without bone involvement. *Arch. Neurol.* **70**, 78–84 (2013).
165. Wang, X., Puerta, E., Cedazo-Minguez, A., Hjorth, E. & Schultzberg, M. Insufficient Resolution Response in the Hippocampus of a Senescence-Accelerated Mouse Model — SAMP8. *J. Mol. Neurosci.* **55**, 396–405 (2015).
166. Chakrabarty, P. *et al.* IL-10 Alters Immunoproteostasis in APP Mice, Increasing Plaque Burden and Worsening Cognitive Behavior. *Neuron* **85**, 519–533 (2015).
167. Decourt, B., Lahiri, D. K. & Sabbagh, M. N. Targeting Tumor Necrosis Factor Alpha for Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer Res.* **14**, 412–425 (2016).
168. Janelins, M. C. *et al.* Early correlation of microglial activation with enhanced tumor necrosis factor-alpha and monocyte chemoattractant protein-1 expression specifically within the entorhinal cortex of triple transgenic Alzheimer's disease mice. *J. Neuroinflammation* **2**, 1–12 (2005).

169. Janelins, M. C. *et al.* Chronic neuron-specific tumor necrosis factor- α expression enhances the local inflammatory environment ultimately leading to neuronal death in 3xTg-AD mice. *Am. J. Pathol.* **173**, 1768–1782 (2008).
170. Chakrabarty, P., Herring, A., Ceballos-Diaz, C., Das, P. & Golde, T. E. Hippocampal expression of murine TNF results in attenuation of amyloid deposition in vivo. *Mol. Neurodegener.* **6**, 1–10 (2011).
171. Schwab, C., Klegeris, A. & McGeer, P. L. Inflammation in transgenic mouse models of neurodegenerative disorders. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1802**, 889–902 (2010).
172. Van Kampen, J. M. & Kay, D. G. Progranulin gene delivery reduces plaque burden and synaptic atrophy in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* **12**, 1–22 (2017).
173. Jian, J., Konopka, J. & Liu, C. Insights into the role of progranulin in immunity, infection, and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **93**, 199–208 (2013).
174. Baker, M. *et al.* Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* **442**, 916–919 (2006).
175. Kelley, B. J. *et al.* Alzheimer disease-like phenotype associated with the c.154delA mutation in progranulin. *Arch. Neurol.* **67**, 171–177 (2010).
176. Minami, S. S. *et al.* Progranulin protects against amyloid β 2 deposition and toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Nat. Med.* **20**, 1157–1164 (2014).
177. Van Limbergen, J., Stevens, C., Nimmo, E. R., Wilson, D. C. & Satsangi, J. Autophagy: From basic science to clinical application. *Mucosal Immunol.* **2**, 315–330 (2009).
178. Esteves, A. R., Filipe, F., Magalhães, J. D., Silva, D. F. & Cardoso, S. M. The Role of Beclin-1 Acetylation on Autophagic Flux in Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.* **56**, 5654–5670 (2019).
179. Xie, Z. & Klionsky, D. J. Autophagosome formation: Core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1102–1109 (2007).
180. Pickford, F. *et al.* The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid β accumulation in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 2190–2199 (2008).
181. Chen, Y. *et al.* p62/SQSTM1, a Central but Unexploited Target: Advances in Its Physiological/Pathogenic Functions and Small Molecular Modulators. *J. Med. Chem.* **63**, 10135–10157 (2020).
182. Itakura, E. & Mizushima, N. p62 targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. *J. Cell Biol.* **192**, 17–27 (2011).
183. Manuscript, A. Implications for Alzheimer's Disease. *Power* **46**, 492–501 (2009).

184. Babu, J. R., Geetha, T. & Wooten, M. W. Sequestosome 1/p62 shuttles polyubiquitinated tau for proteasomal degradation. *J. Neurochem.* **94**, 192–203 (2005).
185. Alvarez-Erviti, L. *et al.* Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* **29**, 341–345 (2011).
186. Hudry, E. *et al.* Gene transfer of human ApoE isoforms results in differential modulation of amyloid deposition and neurotoxicity in mouse brain. *Sci. Transl. Med.* **5**, (2013).
187. Murphy, S. R. *et al.* Acat1 knockdown gene therapy decreases amyloid- β in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Ther.* **21**, 1497–1506 (2013).
188. Burlot, M. A. *et al.* Cholesterol 24-hydroxylase defect is implicated in memory impairments associated with alzheimer-like Tau pathology. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 5965–5976 (2015).
189. Hudry, E. *et al.* Adeno-associated virus gene therapy with cholesterol 24-hydroxylase reduces the amyloid pathology before or after the onset of amyloid plaques in mouse models of alzheimer's disease. *Mol. Ther.* **18**, 44–53 (2010).
190. Eriksdotter-Jönhagen, M. *et al.* Encapsulated cell biodelivery of nerve growth factor to the basal forebrain in patients with Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **33**, 18–28 (2012).
191. NCT00017940. Gene Therapy for Alzheimer's Disease Clinical Trial. <https://clinicaltrials.gov/show/NCT00017940> (2001).
192. Nagahara, A. H. *et al.* Long-term reversal of cholinergic neuronal decline in aged non-human primates by lentiviral NGF gene delivery. *Exp. Neurol.* **215**, 153–159 (2009).
193. Nagahara, A. H. *et al.* Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat. Med.* **15**, 331–337 (2009).
194. Jiang, T. *et al.* TREM2 Overexpression has No Improvement on Neuropathology and Cognitive Impairment in Aging APP^{swE}/PS1^{dE9} Mice. *Mol. Neurobiol.* **54**, 855–865 (2017).
195. Alves, S. *et al.* Interleukin-2 improves amyloid pathology, synaptic failure and memory in Alzheimer's disease mice. *Brain* **140**, 826–842 (2017).
196. Latta, C. H. *et al.* Determining the role of IL-4 induced neuroinflammation in microglial activity and amyloid- β using BV2 microglial cells and APP/PS1 transgenic mice. *J. Neuroinflammation* **12**, 1–13 (2015).
197. Kiyota, T. *et al.* CNS expression of anti-inflammatory cytokine interleukin-4 attenuates Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP+PS1 bigenic mice. *FASEB J.* **24**, 3093–3102 (2010).
198. Arrant, A. E., Onyilo, V. C., Unger, D. E. & Roberson, E. D. Progranulin gene therapy

improves lysosomal dysfunction and microglial pathology associated with frontotemporal dementia and neuronal ceroid lipofuscinosis. *J. Neurosci.* **38**, 2341–2358 (2018).

8 ANEXO I

Tabela I - Potenciais Alvos da Terapia Génica

ALVOS TERAPÉUTICOS	ESTUDO	REFERÊNCIA
APP	Pré-clínico	108, 111
BACE-I	Pré-clínico	112, 185
Neprilisina	Pré-clínico	108, 115, 116
ECE	Pré-clínico	118
ApoE	Pré-clínico	186
Clusterina/ApoJ	Pré-clínico	Não existem estudos científicos
SOATI	Pré-clínico	187
CYP46A1	Pré-clínico	188, 189
Beclin-1	Pré-clínico	180
NGF	Ensaio clínico (fase I e II)	190,191,192
BDNF	Pré-clínico	148, 193,192
TREM-2	Pré-clínico	155, 194
IL-2	Pré-clínico	195
IL-4	Pré-clínico	196,160, 197
IL-10	Pré-clínico	166, 151
TNF-	Pré-clínico	169, 170
PGRN	Pré-clínico	176,198
Tau	Pré-clínico	138