



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Ana Margarida Duarte Salgueiro

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Terapia génica da doença de Huntington” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Maria Helena Mendes de Sousa Pereira Homem e Sousa e do Professor Doutor Luís Fernando Morgado Pereira de Almeida, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Ana Margarida Duarte Salgueiro

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada "Terapia génica da doença de Huntington"  
referentes à Unidade Curricular "Estágio", sob a orientação da Dra. Maria Helena Mendes de  
Sousa Pereira Homem e Sousa e do Professor Doutor Luís Fernando Morgado Pereira  
de Almeida, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra,  
para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado  
Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2022

Eu, Ana Margarida Duarte Salgueiro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2017262269, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Terapia génica da doença de Huntington” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 5 de setembro de 2022.

Ana Margarida Duarte Salgueiro

(Ana Margarida Duarte Salgueiro)

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço, em primeiro lugar, ao Professor Doutor Luís Pereira de Almeida pelo apoio enquanto orientador e pela simpatia, disponibilidade e orientação científica prestada durante a escrita da monografia.*

*Às duas pessoas mais importantes da minha vida, os meus pais, que sem eles nada disto era possível. Pelo apoio incondicional em todas as etapas ao longo destes 5 anos, pelo esforço, pela paciência, pelo apoio, pela dedicação e por sempre acreditarem em mim.*

*Aos meus avós, pelo apoio incondicional durante esta etapa, e em especial, a minha avó Luísa pelas imensas rezas e velinhas antes dos exames.*

*À minha madrinha, a minha confidente, pelos imensos telefonemas às tantas da noite, pelos conselhos e pela presença tanto nos bons e maus momentos.*

*Ao meu Francisco, um dos homenzinhos da minha vida, por me encorajar a não estudar tanto e aproveitar a vida.*

*E à restante família, pelo apoio que me deram nestes 5 anos.*

*A toda a equipa técnica da Farmácia Mendes, pela amabilidade com que me receberam e pelas experiências e ensinamentos que partilharam comigo.*

*Ao David e ao Kevin, por me terem acolhido, pela paciência e ensinamentos disponibilizados, não irei esquecer. E a todos os profissionais do Centro de Neurociências de Coimbra com quem tive oportunidade de trabalhar, pela disponibilidade e pelos conhecimentos que partilharam comigo.*

*A todos os professores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por todo o conhecimento que me foi transmitido e pelo contributo na minha formação.*

*Às minhas amigas, que apesar da distância e falta de tempo, estiveram sempre presentes.*

*A Coimbra, a cidade que me acolheu e que me fez crescer.*

*A todos, o meu sincero obrigada!*

# ÍNDICE

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
<b>PARTE I - RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA</b>	
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Farmácia Mendes.....	11
2. ANÁLISE SWOT	
2.1. <i>Strenghts</i> (Forças)	
2.1.1. Equipa técnica.....	12
2.1.2. Plano de Estágio.....	13
2.1.3. Preparação de Medicamentos Manipulados.....	14
2.1.4. VALORMED.....	14
2.1.5. Proximidade com o utente.....	15
2.1.6. Sistema informático.....	15
2.2. <i>Weaknesses</i> (Fraquezas)	
2.2.1. Plano de estudos de MICF.....	16
2.2.2. Insegurança e receio na realização de atendimentos ao público.....	17
2.2.3. Aconselhamento de Dermocosmética.....	17
2.2.4. Sazonalidade do estágio.....	18
2.2.5. Dificuldade na associação dos nomes comerciais à nomenclatura DCI...	18
2.3. <i>Opportunities</i> (Oportunidades)	
2.3.1. Dispensa de medicamentos hospitalares.....	18
2.3.2. Dispensa de medicamentos estupefacientes e psicotrópicos.....	19
2.3.3. Procedimentos de fim do mês .....	20
2.4. <i>Threats</i> (Ameaças)	
2.4.1. Medicamentos esgotados.....	21
2.4.2. Estabelecimentos de venda de MNSRM (parafarmácia).....	22
2.4.3. Falta de confiança dos utentes nos estagiários.....	22
2.4.4. Receitas Manuais.....	22
3. CASOS CLÍNICOS	
3.1. Caso 1- Cansaço ocular.....	23
3.2. Caso 2- Tosse alérgica.....	24
3.3. Caso 3- Doença hemorroidária.....	25

3.4. Caso 4- Herpes zoster (zona).....	26
3.5. Caso 5- Desconforto urinário.....	26
4. CONCLUSÃO.....	27
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
6. ANEXO.....	32
<b>PARTE II - RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INVESTIGAÇÃO</b>	
LISTA DE ABREVIATURAS.....	38
1. INTRODUÇÃO.....	39
1.1. CNC- Centro de Neurociências e Biologia Celular.....	39
2. ANÁLISE SWOT	
2.1. <i>Strenghts</i> (Forças)	
2.1.1. Equipa e integração.....	40
2.1.2. Plano de estágio.....	40
2.1.3. Multidisciplinaridade da equipa.....	41
2.1.4. Horário flexível.....	42
2.2. <i>Weaknesses</i> (Fraquezas)	
2.2.1. Plano de estudos de MICF.....	42
2.2.2. Duração do estágio.....	43
2.3. <i>Opportunities</i> (Oportunidades)	
2.3.1. Formações.....	43
2.3.2. Participar semanalmente a reunião de grupo.....	44
2.4. <i>Threats</i> (Ameaças)	
2.4.1. Conhecimentos e experiência .....	44
3. CONCLUSÃO.....	45
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
<b>PARTE III – MONOGRAFIA “TERAPIA GÉNICA DA DOENÇA DE HUNTINGTON”</b>	
LISTA DE ABREVIATURAS.....	48
1. INTRODUÇÃO.....	50
2. DOENÇA DE HUNTINGTON	
2.1. Manifestações Clínicas da DH.....	51
2.2. Epidemiologia.....	53
2.3. Mecanismos patológicos da DH.....	53
2.4. Diagnóstico.....	55

2.5. Terapêutica da DH.....	56
2.6. Biomarcadores.....	57
3. TERAPIA GÊNICA.....	58
3.1. O gene.....	59
3.1.1. Polimorfismos do gene.....	59
3.2. Terapias.....	60
3.2.1. Estratégias direcionadas para o RNA	
3.2.1.1. Oligonucleótidos antisense.....	61
3.2.1.2. RNA interferência.....	63
3.2.2. Estratégias direcionadas para o DNA- edição de genes .....	64
3.3. Limitações/Desafios.....	65
4. ENSAIOS CLÍNICOS.....	67
5. CONCLUSÃO.....	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
7. ANEXOS.....	83

## RESUMO

O presente documento, redigido no âmbito da Unidade Curricular “Estágio Curricular” do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, consiste em dois relatórios de estágio e uma monografia.

No que respeita aos relatórios de estágio, estes seguem uma estrutura de análise SWOT (do inglês *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*) em que são abordados os pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças que decorreram durante o meu percurso enquanto estagiária. Estes relatórios incidem sobre os estágios realizados em Farmácia Comunitária, na Farmácia Mendes e em Investigação Científica, no Centro de Neurociências e Biologia Celular.

A segunda parte inclui a monografia, intitulada “Terapia génica da Doença de Huntington”. A Doença de Huntington é uma doença neurodegenerativa autossómica dominante, descrita pela primeira vez em 1872. Esta doença caracteriza-se pela repetição anormal do trinucleótido CAG no gene Huntingtina que resulta na produção uma proteína mutante que posteriormente resultam numa série de eventos patogénicos. Neste documento são revistos alguns assuntos pertinentes associados a Doença de Huntington, nomeadamente manifestações clínicas, epidemiologia, fisiopatologia, diagnóstico, terapêutica, biomarcadores e por último são apresentadas as principais terapias genéticas que estão a ser desenvolvidas, as limitações/desafios e ensaios clínicos que estão a decorrer.

Este documento marca o final de um ciclo de estudos com o trabalho que foi realizado durante o último semestre do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

**Palavras-Chave:** Farmácia Comunitária, Investigação Científica, Doença de Huntington, Terapia génica.

## **ABSTRACT**

This document, written within the "Curricular Internship" of the Integrated Master's Degree in Pharmaceutical Science of the Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, consists of two internship reports and a monograph.

Regarding the internship reports, they follow a SWOT analysis structure in which the strengths, weaknesses, opportunities and threats that occurred during my journey as an intern are addressed. These reports focus on the internships carried out in Community Pharmacy, in Mendes Pharmacy and in Scientific Research, at the Center for Neuroscience and Cell Biology.

The second part includes the monograph, entitled "Gene Therapy of Huntington's Disease". Huntington's disease is an autosomal dominant neurodegenerative disease, first described in 1872. This disease is characterized by the abnormal repetition of the CAG trinucleotide in the Huntingtin gene that results in the production of a mutant protein that subsequently results in a series of pathogenic events. This document reviews some pertinent issues associated with Huntington's Disease, namely clinical manifestations, epidemiology, pathophysiology, diagnosis, therapy, biomarkers and finally, the main gene therapies that are being developed, the limitations/challenges and ongoing clinical trials.

This document marks the end of a cycle of studies with the work that was carried out during the last semester of the Integrated Master in Pharmaceutical Sciences.

**Keywords:** Community Pharmacy, Scientific Research, Huntington's Disease, Gene Therapy.

# **PARTE I**

## **RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA**

Farmácia Mendes – Tramagal

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

- AFP-** Associação de Farmácias de Portugal
- DC-** Dermofarmácia e Cosmética
- DCI-** Denominação Comum Internacional
- DT-** Diretora Técnica
- EC-** Estágio Curricular
- EMA-** Agência Europeia do Medicamento
- FAS-** Farmacêutico Adjunto Substituto
- FC-** Farmácia Comunitária
- FM-** Farmácia Mendes
- MICF-** Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
- MNSRM-** Medicamento Não Sujeito a Receita Médica
- PUV-** Preparações de Uso Veterinário
- RM-** Receita Médica
- SWOT-** do inglês *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*
- UC-** Unidades Curriculares
- UV-** Radiação Ultravioleta

## **I. INTRODUÇÃO**

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), é um curso de 5 anos, lecionado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, e que contempla uma variedade de Unidades Curriculares (UC), com a finalidade de uma formação multidisciplinar em todas as diversas áreas do medicamento e das ciências da saúde.

No último semestre de MICF, surge então a UC denominada Estágio Curricular (EC), com a finalidade de consolidar e pôr em prática os conhecimentos adquiridos e adquirir novas experiências, uma vez que é o primeiro contacto que um estudante tem da profissão farmacêutica na Farmácia Comunitária (FC).

O farmacêutico é conhecido como o especialista do medicamento, pelo seu conhecimento único sobre estes, que desempenha um papel ativo nas várias fases do seu circuito, que começa na investigação e desenvolvimento e culmina no momento da dispensa. O farmacêutico é um profissional multifacetado, que tem um papel fundamental não só no uso racional e prudente dos medicamentos, na prevenção e gestão da doença, assim como na promoção de um estilo de vida saudável e de literacia em saúde.

As FC são um dos locais de atuação do farmacêutico, onde os utentes recorrem em primeiro lugar, quando necessitam de informações acerca de um problema de saúde e até mesmo de aconselhamento, dado à disponibilidade e proximidade que os farmacêuticos demonstram para com os utentes, evitando assim deslocações desnecessárias a unidades de saúde. Hoje em dia, as FC não são somente locais de dispensa de medicamentos são também locais que prestam uma grande variedade de serviços, como aconselhamento farmacêutico, acompanhamento farmacoterapêutico e promoção de literacia em saúde.

O meu EC, na Farmácia Mendes (FM), decorreu entre janeiro e maio de 2022, sob a orientação da Dra. Maria Helena. O presente relatório apresenta-se sob a forma de uma análise SWOT (do inglês *Strengths*, *Weaknesses*, *Opportunities*, *Threats*) em que são abordados os pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças que decorreram durante o meu percurso enquanto estagiária.

### **I.1. Farmácia Mendes**

A FM, farmácia centenária, localizada na vila do Tramagal, foi fundada em 1918, por Manuel de Oliveira Mendes. Situava-se na Rua do Cascalhos e mais tarde foi transferida para a Rua Dr. António Ferreira Bairrão, por ter uma localização mais central, local onde se encontra até aos dias de hoje. Manuel de Oliveira Mendes foi proprietário e responsável pela farmácia durante cinquenta e quatro anos até a sua morte.

Sucedeu-lhe então, Dra. Maria Manuela Corregedor Mendes, sua filha, licenciada em Farmácia. Foi responsável pela farmácia durante trinta e três anos. Após a sua morte, a sua filha Dra. Maria Helena Mendes de Sousa Pereira Homem e Sousa, assumiu o cargo de proprietária e Diretora Técnica (DT) da farmácia até aos dias de hoje.

A FM, única em Tramagal, tem um horário laboral fixo de segunda a sexta das 9h até às 13h e das 15h às 19h, e sábado das 9h às 13h, estando sempre em regime de disponibilidade, em que um farmacêutico está disponível para atender o utente em casos considerados urgentes, como estipulado no Decreto-Lei n.º 172/2012, de 1 de agosto, que regula o horário de funcionamento das farmácias de oficina.<sup>1</sup> A Farmácia faz parte da Associação de Farmácias de Portugal (AFP) e também do grupo das Farmácias Holon.

Os fornecedores da FM são a OCP Portugal e a Plural+Udifar, mas sempre que necessário alguns produtos, são encomendados diretamente a outros fornecedores ou laboratórios específicos, como é o caso da NovoNordisk®, da Abbott ou da Tilman.

Relativamente às instalações da farmácia, a FM obedece a todas as exigências decretadas no Artigo 29º do Decreto-Lei n.º 307/2007, de 31 de Agosto, referente ao Regime jurídico das farmácias de oficina.<sup>2</sup> Possuindo assim uma sala de atendimento ao público, constituída por dois postos de atendimento, um armazém para armazenamento de medicamentos, um laboratório, instalações sanitárias, um gabinete de atendimento personalizado, o gabinete da DT, um local para receção e gestão de encomendas, um local de arrumos e uma sala para a equipa técnica.

## **2. ANÁLISE SWOT**

### **2.1. Strengths (Forças)**

#### **2.1.1. Equipa técnica**

Em relação à equipa técnica da FM, esta é constituída pela DT e proprietária a Dra. Maria Helena Mendes de Sousa Pereira Homem e Sousa, que foi a orientadora do meu EC, pelo Farmacêutico Adjunto Substituto (FAS) o Dr. Rui Lopes, pelo Farmacêutico Rafael Martins e pela Técnica auxiliar de Farmácia Andreia Vilas Boas.

Desde o momento que entrei na farmácia que fui bem recebida e integrada na equipa, o que me permitiu ter confiança na realização das tarefas e não ter receio de pedir ajuda ou colocar qualquer dúvida ou questão, e assim adquirir e consolidar conhecimentos. Equipa dinâmica, empenhada e competente e profissional são alguns dos adjetivos que melhor se adaptam a equipa da FM.

A FM é reconhecida pela simpatia, disponibilidade e dedicação que tem pelos utentes, procurando sempre satisfazer as suas necessidades da melhor forma possível pensando sempre no bem-estar destes. É importante salientar a diversidade da equipa e o que isso me ajudou, aprendi tanto com o farmacêutico como com a técnica auxiliar de farmácia, apesar de terem estudos/aprendizagens diferentes cada um tem um conhecimento e experiências únicas.

A confiança que depositaram em mim e o incentivo à minha autonomia foram essenciais pois permitiram-me aplicar e consolidar os conhecimentos adquiridos, incentivar a aprender mais e a ultrapassar as minhas dificuldades o que é importante para o meu desenvolvimento enquanto futura farmacêutica.

### **2.1.2. Plano de Estágio**

Apesar de já ter realizado um estágio de Verão na FM, de um total de 160 horas, este foi o EC que me permitiu realizar atendimentos ao público de forma autónoma e assim desenvolver competências essenciais para a profissão farmacêutica.

O meu EC, em FC, foi dividido em duas partes, “*backoffice*” e “*front-office*”. O primeiro dia foi um dia de apresentação do espaço físico da farmácia e respetivas áreas de atendimento, armazenamento, receção de encomendas, laboratório e escritório/biblioteca e também de uma breve formação acerca do funcionamento do programa informático.

Posto isto, numa primeira fase, desenvolvi mais tarefas de *backoffice*, que consistiu no aprovisionamento, armazenamento e gestão de existências de medicamentos, outros produtos de saúde e puericultura, ou seja, comecei pela receção de encomendas e arrumação dos produtos nos respetivos locais seguindo a regra de “*first in, first out*”, em que deste modo, tive a possibilidade de conhecer os medicamentos, de associar o nome de marca ao princípio ativo e de saber onde este era armazenado, tarefas que me ajudaram, posteriormente, no atendimento. No decorrer deste período, tive também a oportunidade de realizar a reposições de *stock*, controlo de validades, temperaturas e humidades, realizar e resolver devoluções e observar a preparação e envio de encomendas.

A segunda fase consistiu na realização de tarefas de *front-office*, em que, primeiramente observei os atendimentos da equipa, e via como procediam tanto no sistema informático, como no aconselhamento, e posteriormente efetuei alguns atendimentos com auxílio de um membro da equipa para me familiarizar com as etapas de atendimento, e por fim realizei atendimentos de forma autónoma, sendo sempre supervisionada por um elemento da equipa.

No que diz respeito aos Serviços disponíveis na Farmácia, durante todo o meu EC, tive a oportunidade de realizar o controlo de parâmetros fisiológicos aos utentes, que assim pretendiam, nomeadamente, a tensão arterial, o peso e a altura.

Em conclusão, considero que o seguimento do meu plano de estágio foi muito vantajoso para mim, porque pude, de forma gradual e progressiva, ter contacto com a realidade da profissão farmacêutica realizando inúmeras tarefas que me permitiram pôr em prática o meu conhecimento e adquirir novas experiências.

### **2.1.3. Preparação de Medicamentos Manipulados**

Um medicamento manipulado, segundo o Decreto-Lei n.º 95/2004, de 22 de abril, é “qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico”.<sup>3</sup> A preparação de medicamentos manipulados é cada vez menos frequente nas FC, devido à industrialização farmacêutica e à evolução tecnológica.

Estes medicamentos são uma alternativa terapêutica quando no mercado não existem formulações que melhor se adequam ao perfil fisiopatológico do doente, proporcionando assim uma melhor abordagem terapêutica o que culmina num maior sucesso do tratamento.

No decorrer do EC tive a oportunidade de preparar e dispensar uma Solução Alcoólica de Ácido bórico à Saturação, atendendo a uma receita médica (RM) eletrónica para aplicação no ouvido num caso de infeção auricular. Este manipulado foi preparado de acordo com o Formulário Galénico Português. Todo o processo de preparação do manipulado foi supervisionado pelo FAS, o Dr. Rui Lopes e em seguida, verificados pela Dra. Maria Helena, a DT. Tive a oportunidade de preparar como também de preencher a ficha de preparação do manipulado, presente no Anexo I, registar os materiais e matérias-primas utilizadas, realizar a rotulagem e calcular o preço de venda. No momento da dispensa forneci informações fundamentais ao utente, tais como a posologia, o modo de administração, as condições de conservação e o prazo de validade.

### **2.1.4. VALORMED**

A VALORMED, é uma organização sem fins lucrativos, fundada em 1999, em que o seu principal foco de ação é a gestão dos resíduos de embalagens vazias e medicamentos fora de uso ou fora do prazo de validade através do Sistema Integrado de Gestão de Resíduos de Embalagens e Medicamentos. Funcionando as farmácias como pontos de recolha do VALORMED.<sup>4</sup>

O objetivo desta organização foi criar um sistema autónomo de gestão de resíduos de medicamentos, que permite a recolha e tratamento destes de forma segura, evitando assim que os medicamentos sejam tratados como resíduos urbanos, e assim haja preservação do meio ambiente e prevenção de problemas de saúde pública.<sup>4</sup>

O farmacêutico como agente de saúde pública, tem o dever de consciencializar as pessoas para os efeitos nefastos que o aumento da poluição causa na saúde da população e assim sensibilizar as pessoas a separarem os medicamentos e as suas embalagens que estão fora de uso ou fora de validade do lixo comum e assim entregar na farmácia para que possam ser colocados nos contentores de recolha apropriados.

A FM é parte integrante deste projeto, e no decorrer do meu EC pude observar que é uma prática habitual os utentes trazerem sacos contendo os resíduos, uma vez que há a divulgação do projeto por parte da equipa da FC. Quando os contentores estão cheios estes são fechados e no sistema informático, na parte da VALORMED, é lido o código de barras do contentor, colocado o fornecedor que o recolhe, e de seguida é gerado uma folha do comprovativo de entrega que é anexada ao contentor, processo que no decorrer do meu EC tive a oportunidade de realizar.

#### **2.1.5. Proximidade com o utente**

Sendo o Tramagal, uma vila pequena com cerca de 3000 habitantes, e sendo a FM a única farmácia na vila do Tramagal, a maior parte dos utentes são fidelizados, o que assim permite que a equipa técnica tenha uma relação de proximidade com os seus utentes.

Raros foram os atendimentos que realizei, em que o utente não tinha ficha de cliente, onde podia ver além da identificação do utente, o histórico de compras o que assim, para mim enquanto estagiária, tornava mais fácil um atendimento porque conseguia ver a terapêutica deste utente, conhecer os laboratórios de sua preferência e caso este tivesse outro problema de saúde tinha mais dados que me ajudavam no meu aconselhamento.

A proximidade com o utente, foi um ponto positivo no meu EC, uma vez que muitas vezes, a FC é a primeira linha de contacto que um utente tem com um profissional de saúde, e é onde este recorre de modo a obter aconselhamento farmacêutico, e assim conhecer o utente permitiu que o meu atendimento fosse mais personalizado.

#### **2.1.6. Sistema informático**

No 4ºano do MICE, na cadeira de Organização e Gestão Farmacêutica, tive a oportunidade de ter contacto com o sistema informático Sinfarma®, no que tivemos uma

demonstração de como funcionava o módulo de atendimento do novo Sinfarma<sup>®</sup> e também tivemos aulas práticas onde pudemos contactar com o Sinfarma<sup>®</sup> 2000 e fazer uma simulação da elaboração e receção de encomendas tal como de um atendimento.

Neste EC, um dos pontos positivos foi poder contactar com outro tipo de sistema informático que existe nas farmácias comunitárias, o Winphar<sup>®</sup>. O Winphar<sup>®</sup> é um *software* que apoia o farmacêutico no atendimento do utente como também na gestão de outras tarefas que são essenciais na FC. Este programa permite elaborar e rececionar encomendas, gerir *stocks*, gerir devoluções, criar ficha de clientes e visualizar o histórico de compras do mesmo, controlar prazos de validade, consultar a ficha técnica de um produto onde pudemos consultar a sua informação técnico-científica entre outras funcionalidades.

É um programa com imensas funcionalidades, muito eficiente e fácil de utilizar, que me auxiliou no meu EC, durante os atendimentos, pois fornece informações acerca do medicamento, tais como a posologia e o modo de administração o que reforçou a minha segurança no aconselhamento.

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

### **2.2.1. Plano de estudos de MICF**

Apesar do plano de estudos de MICF ser vasto em diversas áreas, ainda existem algumas lacunas em certas UC, que são fundamentais para desempenhar o nosso papel enquanto farmacêutico na FC.

No decorrer do meu EC existiram dificuldades no aconselhamento em algumas áreas como a de Dermocosmética, suplementação alimentar, veterinária, puericultura, infeções oftalmológicas em que tive de pedir ajuda à equipa técnica e aprender com os seus conhecimentos.

No MICF, existem UC nestas áreas, como Dermofarmácia e Cosmética (DC) ou Preparações de Uso Veterinário (PUV), mas são unidades curriculares muito voltadas para a componente teórica e com pouca vertente prática. Em DC aprendemos, entre outras coisas, a composição dos cosméticos mas acho que também é necessário conhecermos os produtos, algumas marcas e fazer casos práticos reais. Por outro lado, o conhecimento adquirido em PUV não foi o suficiente, até mesmo no caso de patologias comuns como parasitas externos e internos, faltando também nesta UC uma componente prática com casos práticos.

Em conclusão, acho importante que o plano curricular de MICF aposte mais na componente prática, pois é assim que ganhamos destreza para realizar o nosso trabalho enquanto profissionais de saúde.

### **2.2.2. Insegurança e receio na realização de atendimentos ao público**

Ao longo do meu percurso académico em MICF, adquiri muitos conhecimentos teóricos mas é com o EC que temos contacto com o mundo profissional e que percebemos a importância do trabalho de um farmacêutico.

Uma das principais dificuldades que senti no EC, foi o atendimento ao utente, mais concretamente o aconselhamento farmacêutico. Conseguir transpor os conhecimentos adquiridos ao longo de cinco anos, para casos clínicos reais, não era um caso simples, o que por vezes fazia-me sentir nervosa e insegura. Nos casos de aconselhamento farmacêutico, ouvir o problema do doente, relembrar os conteúdos teóricos, fazer as perguntas adequadas de acordo com problema, pensar nas soluções e ao mesmo tempo adaptar o discurso ao utente, tornava-se às vezes um problema pois havia sempre o receio de errar, colocando a vida do utente em risco, e de não conseguir passar a mensagem para o utente.

Nestas situações pude sempre contar com a ajuda da equipa técnica da FM, que estavam sempre disponíveis para me auxiliar nos atendimentos e esclarecer dúvidas. Desta forma, com o decorrer do EC esta insegurança e receio foram ultrapassadas com ajuda, tempo, estudo e prática, o que me permitiu desempenhar os meus atendimentos com uma confiança e postura correta perante o utente.

### **2.2.3. Aconselhamento de Dermocosmética**

A FM apresenta uma diversidade reduzida em produtos de dermocosmética, trabalhando apenas com uma marca em específico, a Thader TH pharma, e tendo pouca expressividade de outras marcas de dermocosmética.

Nos dias e hoje, o utente opta por comprar estes produtos *online* ou em lojas das grandes superfícies comerciais, onde há mais descontos e produtos com preços mais acessíveis, o que faz com que a procura na farmácia seja reduzida e assim não compensa a farmácia ter um *stock* maior destes produtos. No entanto em casos específicos, a farmácia encomenda os produtos por pedido de um utente ou se o farmacêutico achar que um produto é mais adequado para as necessidades deste do que aquele que existe na farmácia.

Apesar de tudo considerei este um ponto negativo no meu EC, uma vez que, tive pouco contacto com a área de Dermocosmética e com a diversidade de produtos dermocosméticos que existem no mercado.

#### **2.2.4. Sazonalidade do estágio**

Como dito anteriormente o meu EC realizou-se entre o mês de janeiro até ao mês de maio, decorrendo assim, predominantemente, no inverno tendo apanhado o início da primavera. Durante este período e devido à COVID-19, os Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) mais procurados pelos utentes eram os medicamentos para estados gripais e constipações, pastilhas para a dor de garganta, xaropes antitússicos e expetorantes, descongestionantes nasais, analgésicos e antipiréticos como o paracetamol e com o início da primavera os anti-histamínicos para as alergias.

Por conseguinte, não tive a oportunidade de contactar, de forma detalhada, com produtos mais típicos da época de verão, como os protetores solares, bronzeadores, cremes pós-solares, cremes para queimaduras solares, repelentes de insetos e cremes para as picadas de insetos, o que foi para mim uma lacuna no meu EC, uma vez, que não tive a oportunidade de desenvolver a minha capacidade de aconselhamento nesta área.

#### **2.2.5. Dificuldade na associação dos nomes comerciais à nomenclatura**

##### **DCI**

Uma das grandes dificuldades do meu EC foi associar o nome comercial de um medicamento com a nomenclatura DCI, isto é, Denominação Comum Internacional.

No decorrer do meu percurso académico em MICEF, era mais comum a utilização do nome das substâncias ativas do medicamento, enquanto na farmácia é mais usual a utilização do nome comercial do medicamento. Houve alturas no meu atendimento, em que o utente só conhecia o medicamento pelo nome comercial ou até mesmo pela cor ou formato da caixa ou do comprimido o que dificultou um pouco o meu atendimento, uma vez que, demorava algum tempo para associar a substância ativa ao nome comercial.

Contudo, a disponibilidade para ajudar da equipa técnica da FM, o auxílio do sistema informático Winphar® e a prática permitiram que conseguisse ultrapassar esta dificuldade e assim tivesse mais confiança no meu atendimento.

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

#### **2.3.1. Dispensa de medicamentos hospitalares**

Com o impacto do COVID-19 no nosso país o governo achou por bem adotar várias medidas de modo a evitar a expansão da doença. Assim sendo, de forma a garantir o acesso do doente aos medicamentos dispensados na Farmácia Hospitalar, o Ministério da Saúde emitiu o Despacho n.º 4270-C/2020, de 7 de abril e posteriormente o Despacho n.º

5315/2020, de 7 de maio, que determinam que estes medicamentos podem ser dispensados, a pedido do utente, na FC ou ao domicílio.<sup>5,6</sup>

O registo e dispensa desta medicação é feita no sistema informático, Winphar<sup>®</sup>, em que no separador Cliente, escolhemos Acompanhamento Farmacêutico, depois Administração de medicamentos e aí colocamos todos os medicamentos que chegavam do hospital, este processo só pode ser realizado por farmacêuticos, mas tive a oportunidade de acompanhar toda a realização do mesmo, desde a chegada e verificação da medicação hospitalar até à dispensa ao utente, onde o farmacêutico verifica, com o utente, se está tudo bem com este e se não ocorreu nenhuma reação adversa ou interação medicamentosa com a toma do medicamento.

Na FM existem algumas pessoas que usufruem desta medida, o que beneficia o utente, pois evita deslocações desnecessárias ao hospital para levantar unicamente a medicação, garantindo assim a continuação do tratamento e evitando uma exposição desnecessária.

### **2.3.2. Dispensa de medicamentos estupefacientes e psicotrópicos**

Na FM tive a oportunidade de dispensar medicamentos estupefacientes e psicotrópicos, o que acontece com muita frequência nesta farmácia, os medicamentos mais dispensados desta classe é o Tapentadol, de nome comercial Palexia<sup>®</sup> retard<sup>7</sup>, que é utilizado para o tratamento da dor crónica intensa em adultos e a Buprenorfina<sup>8</sup>, que é utilizada em casos de toxicod dependência major de opiáceos.

A dispensa deste tipo de medicamentos, seguem regras e controlos muito rigorosos, de modo que para dispensar estes medicamentos o utente tem que apresentar uma RM válida e o cartão de cidadão. No ato da dispensa, no final da compra o sistema informático reconhece o produto como estupefaciente/psicotrópico e é gerada uma tabela que deve ser devidamente preenchida pelo farmacêutico, tanto com os dados do utente como os do adquirente (nome, data de nascimento, número do cartão de cidadão, morada, código postal). Além destes dados, na tabela também fica registado a identificação da prescrição, do médico prescriptor, da farmácia, do medicamento, da quantidade dispensada e da data de dispensa.<sup>9</sup>

Após a venda é gerado um talão de dispensa especial onde consta toda a informação mencionada em cima, devendo ser arquivado na farmácia pelo período de três anos. O registo de venda destes medicamentos é enviado mensalmente (até ao dia 8 do mês seguinte) ao INFARMED.

Para mim a dispensa deste tipo de medicamentos foi considerada uma oportunidade pois como são medicamentos com um controlo mais apertado, exigiu em mim uma atenção mais acrescida no momento da dispensa.

### **2.3.3. Procedimentos de fim do mês**

Apesar de já ter realizado um estágio de Verão em FC, não tive a oportunidade de contactar com os procedimentos que são realizados no fim de cada mês. No entanto, neste EC tive a oportunidade de observar como também de realizar os procedimentos de fim do mês o que foi para mim uma mais-valia uma vez que pude perceber a dinâmica da farmácia e adquirir conhecimentos de como realizar esta tarefa, visto que esta informação não faz parte do plano curricular de MICF.

Os procedimentos de fim do mês, na FM, iniciam-se cerca de uma semana antes dos término do mesmo. Um dos procedimentos realizados é a verificação dos prazos de validade dos medicamentos e produtos existentes na FC, na qual é retirada uma lista dos medicamentos cujo prazo de validade termina dentro de 3 meses, e cabe à equipa técnica da farmácia verificar a validade de cada produto e retirar do circuito de venda os produtos cujo prazo de validade esteja a expirar ou atualizar o prazo de validade do produto. Os produtos fora de validade são colocados numa caixa devidamente identificada para posterior tratamento.

Outro procedimento de fim do mês, é a conferência, fecho e faturação do receituário. Primeiramente, é realizada a conferência de todas as receitas, em que se verificam todos os pontos cruciais de forma a detetar possíveis erros que puderam ter “escapado” durante a dispensa dos medicamentos e que são possíveis de ser retificados. Nas receitas manuais, deve-se confirmar se contêm a vinheta do médico prescriptor e a sua assinatura, a vinheta do local de prescrição (que é opcional), o número do Serviço Nacional de Saúde ou de um sub-sistema de Saúde, se a data ainda está no limite dos 30 dias, se a exceção está assinalada, se o medicamento prescrito foi o medicamento dispensado, se as quantidades dispensadas foram as corretas, se o utente assinou a receita no ato da dispensa, se o farmacêutico assinou, carimbou e datou a receita e se a receita foi faturada no organismo de participação correto. Em seguida, as receitas são separadas de acordo com o organismo de participação e agrupadas em lotes de 30, no último dia de cada mês, há o fecho informático dos lotes e posteriormente emissão de um “verbete de identificação de lote”, e de seguida procede-se à impressão da “Relação Resumo de Lotes” e à “Fatura”, posto isto, emitimos a guia de fatura, só para o SNS, e transmitimos as faturas eletrónicas das respetivas entidades. Finalmente, as receitas do SNS são enviadas para o Centro de Conferências de Faturas, até

ao dia 10 do mês seguinte, as receitas das restantes entidades são enviadas para a AFP. O processo de envio das receitas em papel e/ou talões de receitas não é igual para todos os organismos, cada um tem a sua especificidade no que respeita aos documentos a enviar.

E por fim, são enviados para a contabilidade os seguintes documentos: o resumo de faturação a entidades, o inventário, o mapa de vendas do mês onde consta o IVA, o ficheiro SAF-T, bem como os duplicados de todos os documentos com informação fiscal (faturas e resumos de lotes) resultantes dos procedimentos do fecho e faturação do receituário.

## **2.4. Threats (Ameaças)**

### **2.4.1. Medicamentos esgotados**

Durante o meu EC deparei-me com uma outra realidade, a dos medicamentos esgotados, uma situação que era preocupante na farmácia, e tem várias causas, com por exemplo a exportação paralela, como também quebras a nível da produção ou falta de capacidade de produção em relação à procura.

Durante o meu EC, foram vários os medicamentos esgotados, tais como o Plenvu<sup>®</sup> e o Moviprep<sup>®</sup> ambos são preparações para colonoscopias e o Nitromint<sup>®10</sup>, cujo princípio ativo é a nitroglicerina, um vasodilatador que é utilizado no alívio de ataques agudos de angina pectoris e vasospástica, e que atualmente não tem alternativa terapêutica, o que se torna um problema para o utente, pois põe em causa a sua saúde.

Para resolver esta situação, a FM faz diariamente, tanto de manhã como de tarde, o pedido dos medicamentos esgotados aos fornecedores e tem uma lista onde escreve os medicamentos que estão esgotados e a quantidade que precisa, e assim telefona diariamente para os fornecedores para saber a situação daquele medicamento e verificar a disponibilidade do mesmo e também de forma a conseguir alguma embalagem, e assim gerir os *stocks* que têm, de forma assegurar a dispensa destes medicamentos para os utentes.

Considero este ponto uma ameaça ao meu EC, uma vez que alguns utentes tinham dificuldade em compreender a situação e pensavam que a não dispensa ou encomenda de medicamentos esgotados era culpa da farmácia, por esta ter pouco *stock*, ou até mesmo culpa do estagiário pela sua inexperiência a adquirir a medicação. Posto isto, a equipa técnica explicava de forma clara e simples, que a culpa não era da farmácia, mas sim dos fornecedores ou até mesmo da indústria farmacêutica que produz o medicamento, apelando assim a compreensão do utente para a situação. E também procuravam outras soluções, como dispensar medicamentos do mesmo grupo homogéneo, quando isto era possível.

#### **2.4.2. Estabelecimentos de venda de MNSRM (parafarmácia)**

O Decreto-Lei n.º 134/2005, de 16 de agosto, estabelece o regime da venda de MNSRM fora das farmácias, ou seja, veio possibilitar a venda destes medicamentos em estabelecimentos específicos, normalmente conhecidos por parafarmácias.<sup>11</sup>

São estabelecimentos que existem em muitos locais, e especialmente nas grandes superfícies comerciais, e por efetuarem grandes volumes de compras tem a capacidade de implementar preços de venda ao público inferiores aqueles que são possíveis de ser implementados na farmácia. Tornam-se assim uma grande ameaça tanto para as FC, a nível económico, como para a profissão farmacêutica, uma vez que nestes estabelecimentos a venda destes produtos é feita sem um aconselhamento adequado potenciando assim o uso irracional dos MNSRM, o que se traduz num risco para o utente.

Considero este ponto uma ameaça ao meu EC, uma vez que os utentes optavam por comprar nestes estabelecimentos devido ao preço inferior, em vez da FC, descredibilizando assim o papel do farmacêutico e do seu aconselhamento, o que me desmotivou um pouco.

#### **2.4.3. Falta de confiança dos utentes nos estagiários**

No decorrer do meu EC, notei que por parte de alguns utentes havia falta de confiança no meu aconselhamento. Como estagiários não iremos ter, inicialmente, a mesma agilidade e prontidão que um farmacêutico tem num aconselhamento, mas é com a prática que aprendemos.

Por vezes, os utentes preferiam ficar mais tempo à espera para serem atendidos por um farmacêutico do que serem atendidos por mim ou no meio do meu aconselhamento pedirem opinião a um farmacêutico, o que considero uma ameaça ao meu EC porque assim não me permite desenvolver as competências necessárias para um aconselhamento adequado.

No entanto, na fase final do meu EC notei que por já estarem familiarizados com a minha presença na FC e por me apresentar mais confiante no meu aconselhamento que os utentes foram confiando mais na qualidade do meu aconselhamento.

#### **2.4.4. Receitas Manuais**

Atualmente a maioria das RM que chega à farmácia são receitas eletrónicas, ainda assim ainda chegam algumas receitas manuais, apesar de serem cada vez menos. De acordo com a legislação em vigor, as receitas manuais podem ser prescritas apenas em situações excecionais, nomeadamente, falência informática, prescrição no domicílio, até 40 receitas por mês ou por

inadaptação fundamentada do prescritor, devendo a exceção ser corretamente assinalada na própria receita.<sup>12</sup>

Aquando da dispensa de uma receita manual, o farmacêutico tem de verificar se todas as especificidades desta receita são cumpridas, tais como, a justificação da utilização da receita manual, a presença da vinheta do médico prescritor tal como a sua assinatura, a data da prescrição e verificar se ainda não excedeu os 30 dias de validade destas receitas, a informação do utente, que inclui o nome, número de beneficiário, entidades responsável e regime especial de comparticipação, se aplicável, a ausência de rasuras e por fim verificar que em cada receita só podem ser prescritos 4 medicamentos distintos, e no máximo só podem ser prescritas 2 embalagens por medicamento, excetuando quando são prescritos medicamentos em unidose, neste caso pode-se dispensar 4 embalagens do referido medicamento.

No decorrer do meu EC tive oportunidade de contactar com receitas manuais, o que considerei uma ameaça ao meu EC, uma vez que, antes de proceder à dispensa dos medicamentos temos de verificar se são cumpridas todas as especificidades de uma receita manual e perceber quais são os medicamentos prescritos visto que por vezes a caligrafia não era muita legível, o que levava a que o meu atendimento fosse um pouco mais moroso, tendo que pedir auxílio à equipa técnica da FC, para garantir que estava a dispensar o medicamento correto. Outro aspeto que achei desvantajoso, foi o facto que nestas receitas, o sistema informático, não verifica se os medicamentos que estão a ser dispensados são os que são prescritos, o que faz nas receita eletrónicas, assim o meu atendimento requeria mais atenção para assim evitar possíveis erros de dispensa.

### **3. CASOS CLÍNICOS**

#### **3.1. Caso I - Cansaço ocular**

Uma senhora dirigiu-se à farmácia a solicitar algo para o seu pai de 89 anos, que se queixou de ter os olhos vermelhos e lacrimejo constante. Afirmou, ainda que esta sintomatologia era um pouco frequente uma vez que o pai gosta muito de ler. Questionei se teria algum outro de sintoma tal como secreção ocular, dor e se tinha a pestana colada ao acordar na qual a filha afirmou que não apenas tinha um desconforto e prurido. Também questionei há quanto tempo estaria com estes sintomas na qual respondeu que havia surgido no dia anterior. Após análise da sintomatologia, dirigi o meu aconselhamento para um caso de fadiga ocular/olho seco.

Por conseguinte, procedi ao aconselhamento e dispensa do colírio Hyabak® 0,15% 15 ml<sup>13</sup>, que contém ácido hialurônico, um agente lubrificante e hidratante e o actinoquinol, uma

substância com propriedades anti-UV, que iriam ajudar no caso de sensação de fadiga ocular. No decurso da dispensa, expliquei que a posologia recomendada era de 1 gota em cada olho sempre que necessário, de preferência 3 a 4 vezes ao dia.

Por fim, em simultâneo com a terapêutica dispensada, aconselhei a reduzir o período de leitura contínua e a regular a luminosidade do local onde lê. Para terminar, aconselhei que consultasse um médico especialista caso os sintomas não melhorassem ou se agravassem num período de 72 horas após o início do tratamento.

### **3.2. Caso 2 - Tosse alérgica**

Uma senhora com cerca de 35 anos dirigiu-se à farmácia com queixas de tosse persistente, na qual descreveu como sendo “tosse de cão” e queria algo para aliviar aqueles sintomas. Questionei há quanto tempo durava a tosse, ao que me respondeu que durava há 3-4 dias. Por conseguinte, perguntei se começou alguma medicação nova ou se já tinha tomado algo para tosse no qual me respondeu que não. Por fim, perguntei se havia mais sintomatologia associada, nomeadamente febre, dores no corpo, expetoração, na qual obtive uma resposta negativa, referiu que para além da tosse tinha dores de cabeça, nariz congestionado e irritação na garganta.

Após análise visual, reparei que a utente tinha os olhos muito vermelhos, e então questionei se a senhora tinha histórico de alergias, a qual respondeu que tinha alergias 3-4 vezes por ano. Após análise da sintomatologia, dirigi o meu aconselhamento para um caso de tosse alérgica.

Por essa razão, procedi ao aconselhamento e dispensa de um anti-histamínico, o Cetix® 10 mg<sup>14</sup>, cujo princípio ativo é o dicloridrato de cetirizina, explicando que a posologia recomendada era de 1 comprimido por dia, e que este comprimidos são para colocar na boca e chupar. Aconselhei também a toma de um xarope antitússico, o Levotuss® 6 mg/ml<sup>15</sup>, que tem como princípio ativo a levodropropizina. Por fim, no momento da dispensa, expliquei que a posologia recomendada era de 10 mL três vezes ao dia, em intervalos nunca inferiores a 6 horas, até desaparecimento da tosse, mas nunca excedendo 14 dias de tratamento. No caso de persistência dos sintomas após 2 semanas de tratamento, aconselhei a suspensão do tratamento e que consultasse um médico.

### 3.3. Caso 3 - Doença hemorroidária

Um senhor, com 42 anos, dirigiu-se à farmácia a queixar-se que sente uma pequena saliência no reto e que tem irritação, comichão nessa zona e quando vai à casa de banho sente dor.

Questionei há quanto tempo perdurava esta sintomatologia, ao que me respondeu que a mesma durava há 2 dias mas que já não era a primeira vez que apresentava esta sintomatologia. Por conseguinte, perguntei se tomava alguma medicação, se havia sangramento, se faz grande esforço a defecar, se já tomou alguma coisa para aliviar os sintomas, ao qual o utente respondeu às três primeiras perguntas com um não e explicou que anteriormente quando apresentava esta sintomatologia apenas colocava uma pomada. Por fim fiz algumas perguntas sobre o estilo de vida do utente, no qual este explicou que trabalha num escritório e que passa muito tempo sentado e que não tem muito cuidado com a sua alimentação, mas que de vez em quando ia ao ginásio.

Dado à luz dos sintomas, conclui que o senhor estava com uma crise hemorroidária. Assim sendo, procedi ao aconselhamento e dispensa de um creme retal o Procto-Glyvenol<sup>®</sup>, que contém Tribenosido, e atua reduzindo a permeabilidade capilar, melhora o tónus vascular e tem ação anti-inflamatória, e Cloridrato de Lidocaína, um anestésico local que alivia o prurido, ardor e dor causadas pelas hemorroidas. Expliquei que o creme era para aplicar 2 vezes por dia, de manhã e à noite nos primeiros dias e quando os sintomas diminuírem passar a aplicar apenas 1 vez por dia até desaparecimento da sintomatologia.<sup>16</sup>

Como utente referiu que não era a primeira vez que teve estes sintomas característicos de crise hemorroidária aconselhei algo que atua nível sistémico, o Daflon<sup>®</sup> 1000 mg, que consiste numa fração flavonoica purificada micronizada que atua aumentando o tónus vascular e reforça a resistência capilar, explicando que a posologia recomendada era de 1 comprimido 3 vezes ao dia durante 4 dias, passando depois a 1 comprimido 2 vezes ao dia durante 3 dias e por fim passa a ser 1 comprimido por dia.<sup>17</sup>

Para uma higienização adequada da zona afetada, aconselhei o uso de umas toalhas apropriadas para hemorroidas e fissuras anais, as Hemofarm plus, que contém produtos naturais como aloé vera, hamamélia e castanheiro-da-índia e de um creme lavante indicado para a lavagem da zona anal e perianal em caso de distúrbios hemorroidais, o Neofitoroid, que contém complexos moleculares vegetais com uma ação detergente, protetora e lenitiva.<sup>18</sup>

Por fim, aconselhei algumas medidas não farmacológicas tais como alteração da dieta adotando uma alimentação rica em fibras, aumentar a ingestão de líquidos, evitar o consumo de comidas condimentadas, álcool e café, alteração dos hábitos de vida através da prática de

exercício físico, adotar bons hábitos defecatórios e também sugeri, nas fases de dor muito intensa, a lavagem com água fria ou aplicar gelo durante alguns minutos na zona afetada.

### **3.4. Caso 4 - Herpes zoster (zona)**

Um senhor, com 49 anos, dirigiu-se à farmácia a queixar-se de erupções nas costas, com alguma comichão e dor intensa. Para um melhor diagnóstico aconselhei o utente a mostrar o local afetado no gabinete. Após analisar as costas do senhor, constatei uma área de grande mancha vermelha na zona torácica com extensão para a axila do lado esquerdo bem como algumas vesículas. Questionei se teve contacto com algum alérgico, no qual respondeu que não contactou com nada que pudesse desencadear um processo alérgico. Também questionei há quanto tempo tinha esta sintomatologia no qual respondeu que começou há um dia mas que a mancha estava a alastrar. Dado à luz dos sintomas e após análise visual, conclui, com apoio do FAS, que o senhor poderia ter herpes zoster.

Deste modo, procedi ao aconselhamento e dispensa de um analgésico Ben-U-ron® em comprimidos de 500 mg<sup>19</sup>, cujo princípio ativo é o paracetamol, explicando que a posologia recomendada, era de 1-2 comprimidos em intervalos de 8 horas. E de um creme antivírico Aciclovir Labesfal 50 mg/g<sup>20</sup>, cujo princípio ativo é o aciclovir que atua impedindo a multiplicação do vírus, explicando que o creme é para aplicar localmente até 5 vezes por dia em intervalos de 4 horas. Aconselhei também algumas medidas não farmacológicas como a utilização de roupas de algodão mais largas para reduzir a irritação da pele, aplicar gelo para reduzir a dor, utilizar uma toalha individual só para aquela zona e usar produtos de higiene não reativos para a pele.

No entanto, dado à extensão do problema, juntamente com o facto de ainda estar no período de 72 horas após o aparecimento das lesões sugeri que o utente marque uma consulta médica para medicação suplementar.<sup>21</sup>

### **3.5. Caso 5 - Desconforto urinário**

Uma senhora, com 45 anos, dirigiu-se à farmácia com queixas de desconforto urinário. Perguntei para descrever os sintomas, no qual respondeu que tinha vontade de urinar frequentemente e repentinamente, com alguma dor e prurido.

Questionei há quanto tempo durava a sintomatologia, ao que me respondeu que durava há 2 dias. Por conseguinte, perguntei se tinha sangue na urina e se já tinha tomado alguma coisa para aliviar os sintomas, ao qual respondeu que não. Questionei então se era recorrente ter esta sintomatologia e infeções urinárias na qual me respondeu que teve uma infeção

urinária há 2 anos. Dado à luz dos sintomas, dirigi o meu aconselhamento para um caso de uma infeção urinária não-complicada numa fase inicial.

Deste modo, procedi ao aconselhamento e dispensa de um produto fitoterapêutico o Systelle<sup>®22</sup>, que contém uva ursina<sup>23</sup>, uma planta com propriedades antissépticas, antibacterianas, anti-inflamatórias, diuréticas que segundo a Agência Europeia do Medicamento (EMA) é utilizada no alívio de sintomas de infeções não complicadas do trato urinário inferior, explicando que a posologia recomendada era de 2 comprimido 3 vezes ao dia de preferência com alimentos, durante 7 dias consecutivos.

Para complementar esta terapêutica aconselhei também o chá BIOLYS-conforto urinário, que contém hibisco e arando vermelho<sup>24</sup>, ambos com propriedades antibacterianas e diuréticas, e segundo a EMA o arando vermelho é tanto utilizado para aliviar sintomas de infeções não complicadas do trato urinário inferior como para prevenção, explicando que a posologia era de 2 a 4 saquetas por dia.

Por fim aconselhei algumas medidas não farmacológicas<sup>25</sup>, nomeadamente ingerir pelo menos 1,5L de água, evitar alimentos que acidificam a urina (tomate, laranja), ir regularmente à casa de banho não estando mais de 4 horas sem urinar, urinar após relações sexuais, limpar a zona genital da frente para trás, usar roupa íntima de algodão, evitar o uso de pensos diários e calças de ganga apertadas e usar produtos de higiene íntima com propriedades antibacterianas. No caso que os sintomas não melhorassem ou se agravassem após 7 dias do início do tratamento, aconselhei que consultasse um médico.

#### **4. CONCLUSÃO**

O EC marca o ponto final, ao fim de uns longos cinco anos, do MIF e é a primeira realidade que um estudante tem do mercado de trabalho, apesar de ao início ser um pouco assustador, é uma experiência única em que temos a oportunidade de colocar em prática tudo aquilo que aprendemos no curso e desenvolvermos outras capacidades.

O EC, na FM permitiu-me consolidar os conhecimentos adquiridos, desenvolver e adquirir novas competências práticas, sociais e interpessoais que irão ser fundamentais para o meu futuro, em qualquer que seja o caminho que ingresse profissionalmente. Esta experiência, foi para mim, bastante enriquecedora mas ao mesmo tempo um pouco desafiante, que me fez sair da minha zona de conforto e que me permitiu crescer tanto a nível profissional como a nível pessoal.

Em conclusão, quero agradecer a toda a equipa da FM, pela simpatia, acolhimento, disponibilidade, dedicação que tiveram para comigo desde o primeiro momento. E pelas

experiências e ensinamentos que compartilharam comigo e que me ajudaram a crescer tanto como pessoa como também futura profissional de saúde.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Decreto-Lei n.º 172/2012, de 1 de agosto. Diário da República n.º 148/2012, Série I de 2012-08-01. Ministério da Saúde. Lisboa.
2. Decreto-Lei n.º 307/2007, de 31 de agosto. Diário da República n.º 168/2007, Série I de 2007-08-31. Ministério da Saúde. Lisboa.
3. Decreto-Lei n.º 95/2004, de 22 de abril. Diário da República n.º 95/2004, Série I-A de 2004-04-22, páginas 2439-2441. Ministério da Saúde. Lisboa.
4. VALORMED - Quem Somos. [Consultado a 1 de maio de 2022]. Disponível em: <http://www.valormed.pt/paginas/2/quem-somos/>
5. Despacho n.º 4270-C/2020, de 7 de abril. Diário da República n.º 69/2020, 3º Suplemento, Série II de 2020-04-07, páginas 2 – 3. Ministério da Saúde. Lisboa
6. Despacho n.º 5315/2020, de 7 de maio. Diário da República n.º 89/2020, Série II de 2020-05-07, página 82. Ministério da Saúde. Lisboa
7. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento Palexia Retard, Comprimidos de libertação prolongada** [Acedido a 24 de abril de 2022]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
8. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento Buprenorfina, comprimidos sublinguais** [Acedido a 24 de abril de 2022]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
9. Portaria n.º 224/2015, de 27 de julho. Diário da República n.º 144/2015, Série I de 2015-07-27. Ministério da Saúde. Lisboa.
10. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento Nitromint 0,5 mg comprimido sublingual** [Acedido a 4 de abril de 2022]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
11. Decreto-Lei n.º 134/2005, de 16 de agosto. Diário da República n.º 156/2005, Série I-A de 2005-08-16, páginas 4763-4765. Ministério da Saúde. Lisboa.
12. INFARMED - **Normas relativas à dispensa de medicamentos e produtos de saúde** [Acedido a 4 de abril de 2022]. Disponível na Internet: [https://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/Normas\\_Dispenza/4c1aea02-a266-4176-b3ee-a2983bdfe790](https://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/Normas_Dispenza/4c1aea02-a266-4176-b3ee-a2983bdfe790)
13. Hyabak- Laboratoires Théa. [Acedido a 28 de março de 2022]. Disponível na Internet: <https://thea.pt/produtos/hyabak>

14. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento Cetix 10 mg, comprimidos para chupar** [Acedido a 30 de março de 2022]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
15. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento Levotuss® 6 mg/mL, xarope** [Acedido a 30 de março de 2022]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
16. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento Procto-Glyvenol 50 mg/g + 20 mg/g, Creme rectal** [Acedido a 4 de abril de 2022]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
17. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento Daflon 1000, 1000 mg comprimido revestido por película** [Acedido a 4 de abril de 2022]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
18. Aboca S.P.A. - Società Agricola. **NeoFitoroid creme lavante protetor e lenitivo** - [Acedido a 4 de abril de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.aboca.com/pt-pt/produto/neofitoroid-creme-lavante-protetor-e-lenitivo/>
19. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento ben-u-ron® 500 mg, comprimidos** [Acedido a 27 de março de 2022]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
20. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento Aciclovir Labesfal 50 mg/g, creme** [Acedido a 27 de março de 2022]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
21. Ordem dos Farmacêuticos- **Herpes zoster e neuralgia pós-herpética** - E-Publicações – Publicações [Acedido a 27 de março de 2022]. Disponível na Internet: [https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/publicacoes/e\\_publicacao\\_herpes\\_zoster\\_final\\_20749690815f9028ecdf473.pdf](https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/publicacoes/e_publicacao_herpes_zoster_final_20749690815f9028ecdf473.pdf)
22. Systelle- Tilman Portugal. [Acedido a 24 de abril de 2022]. Disponível na Internet: <https://tilmanportugal.com.pt/systelle/>
23. European Medicine Agency. (2018). **Herbal medicine: summary for the public Bearberry leaf - *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., folium.** [Acedido a 26 de abril de 2022]. Disponível na internet: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-summary/bearberry-leaf-summary-public\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-summary/bearberry-leaf-summary-public_en.pdf)

24. European Medicines Agency. (2021). **European Union herbal monograph on Vaccinium macrocarpon Aiton, fructus** Draft Discussion in Working Party on European Union monographs and European Union list (MLWP) and Committee on Herbal Medicinal. [Acedido a 26 de abril de 2022]. Disponível na internet: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/draft-european-union-herbal-monograph-vaccinium-macrocarpon-aiton-fructus-first-version\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/draft-european-union-herbal-monograph-vaccinium-macrocarpon-aiton-fructus-first-version_en.pdf)

25. Falch, C., Sousa, M., Ramalho, P., & Rodrigues, S. **Intervenção farmacêutica na suspeita de infecção urinária-estudo de caso da farmácia ferrer**. [Acedido a 24 de abril de 2022]. Disponível na Internet: [https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/editor2/2021/WWW/Eventos/i\\_jornadas\\_fc/posteres/intervencao\\_farmaceutica\\_na\\_suspeita\\_de\\_infeccao\\_urinari\\_a\\_y\\_estudo\\_de\\_caso\\_da\\_farmacia\\_ferrer.pdf](https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/editor2/2021/WWW/Eventos/i_jornadas_fc/posteres/intervencao_farmaceutica_na_suspeita_de_infeccao_urinari_a_y_estudo_de_caso_da_farmacia_ferrer.pdf)

## 6. ANEXO

### Anexo I - Ficha de preparação do medicamento manipulado

**FARMÁCIA MENDES**  
 FARMEDES - Act. Farm. Unipessoal, Lda.  
 Dir. Téc.: M. Helena M. S. P. Homem e Sousa  
 Cont. N.º 505 961 067  
 Rua Dr. António Ferreira Bairão  
 Tel. 241 897 235 + 2205-655 TRAMAGAL  
 (Carimbo da Farmácia)

Medicamentos usados em Dermatologia		
A.	II.	I.

#### Ficha de Preparação

#### Solução Alcoólica de Ácido Bórico à Saturação (FGP A.II.1)

Forma farmacêutica: solução

Data de preparação: 27/01/2022

Número do lote: 1/2022

Quantidade a preparar: 30ml

Matérias-primas	Nº do lote	Origem	Farma-copela	Quantidade para 100 g	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Rubrica do Operador e data	Rubrica do Supervisor e data
Ácido bórico	003/111/1	Dimet		5,0 g	1,65g	1,65g	AB 27/01/2022	AB 27/01/2022
Álcool a 70 % (V/V)	23000505	Agca		q.b.p. 100 ml	q.b.p. 33ml	q.b.p. 33ml	AB 27/01/2022	AB 27/01/2022

#### Preparação

	Rubrica do operador
1. Verificar o estado de limpeza do material a utilizar.	AB
2. Colocar em proveta rolhada uma quantidade de álcool a 70 % (V/V) correspondente a de cerca de $\frac{3}{4}$ da quantidade total de solução a preparar.	AB
3. Pesar o ácido bórico, e adicionar, aos poucos, ao álcool a 70% (V/V), agitando fortemente durante 20 segundos, após cada adição.	AB
4. Após adição de todo o ácido bórico, completar o volume com álcool a 70 % (V/V) e agitar durante 20 segundos.	AB
5. Deixar a proveta em repouso durante 1 hora, agitando-a, durante 20 segundos, de 15 em 15 minutos. Início: <u>16h58</u> Final: <u>18h04</u>	AB
6. Filtrar a solução obtida em 5.	AB
7. Lavar o material utilizado.	AB
8. Secar o material.	AB

Rubrica do Director Técnico	Data
AB	27/01/2022

## Embalagem

1. Embalar a solução em frasco de vidro âmbar, tipo III (FPVI).

Material de embalagem	Nº do lote	Origem
frasco Condo-Gotas		CCP Pórtugal - Armazém Torres Novas

Capacidade do recipiente: 30ml

Operador: AB

## Rotulagem

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

## Modelo de rótulo

Identificação da Farmácia  
Identificação do Director-Técnico  
Endereço e telefone da Farmácia

Identificação do Médico prescritor  
Identificação do Doente

**SOLUÇÃO ALCOÓLICA DE ÁCIDO BÓRICO À SATURAÇÃO**  
(FGP A.II.1.)

100 ml de solução contém 4 g de ácido bórico  
(Quantidade dispensada)  
Contém iodeto de potássio, água purificada e álcool  
etilico  
Medicamento para aplicação cutânea  
Uso externo  
Não ingerir

(Data da preparação)  
(Prazo de utilização)  
Conservar à temperatura ambiente no  
frasco bem fechado  
(Nº do lote)  
Manter fora do alcance das crianças

Operador: AB

## Verificação

Ensaio	Especificação	Resultado		Rubrica do Operador
		Conforme	Não Conforme	
<b>I. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS</b> 1.1. Aspecto  Verificar conformidade com a especificação	Solução límpida e transparente	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<u>AB</u>

Rubrica do Director Técnico <u>HPJ</u>	Data 27/01/2022
---	--------------------

Ensaio	Especificação	Resultado		Rubrica do Operador
		Conforme	Não Conforme	
1.2. Cor	Solução incolor	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Verificar conformidade com a especificação		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
2. CONFORMIDADE COM A DEFINIÇÃO DA MONOGRAFIA "PREPARAÇÕES PARA USO AURICULAR" DA FPVI	Texto "Preparações para Uso Auricular" (FGP, Parte I, Cap. 1, 1.3 Formas Farmacêuticas)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
3. QUANTIDADE	<u>30</u> ml (± 5%) (quantidade a preparar)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Antes do enchimento verificar, em proveta graduada, o volume da preparação				
		Aprovado <input checked="" type="checkbox"/>	Rejeitado <input type="checkbox"/>	
Supervisor 		27/01/2022		

Nome e morada do doente

Esmeralda  
Trasmagal

Nome do prescriptor

Maria

Anotações

Rubrica do Director Técnico	Data
	27/01/2022

## Cálculo do preço de venda

MATÉRIAS-PRIMAS:							
matérias-primas:	embalagem existente em armazém		preço de aquisição de uma dada quantidade unitária (s/IVA)		quantidade a usar	factor multiplicativo	preço da matéria-prima utilizada na preparação
	quantidade adquirida	preço de aquisição (s/IVA)	quantidade unitária	preço			
Ácido bórico	30g	0,67€	1g	0,02€	x 3,65g	x 2,2	= 0,073€
Álcool a 70% (V/V)	250ml	3,54€	1ml	0,01€	x 33ml	x 2,2	= 0,726€
					x	x	=
					x	x	=
					x	x	=
subtotal A							≈ 0,80€
HONORÁRIOS DE MANIPULAÇÃO:							
forma farmacéutica preparada					quantidade	valor	
Solução					1	4 x 3	
					subtotal B	12€	
MATERIAL DE EMBALAGEM:							
materiais de embalagem		preço de aquisição (s/IVA)		quantidade	preço		
Frasco conta-gotas		0,76€		1	0,76€		
					subtotal C	0,76€	
rótulo		preço de aquisição (s/IVA)		quantidade	preço		
					subtotal D		
dispositivos auxiliares de administração		preço de aquisição (s/IVA)		quantidade	preço		
					subtotal E		
					subtotal F (C + D + E)	0,76€	
PREÇO DE VENDA AO PÚBLICO: (A + B + F)					13,56 x 1,3 ≈ 17,63		
					+ IVA (6%) ≈ 1,06		
					TOTAL 18,69		
Operador				Supervisor			

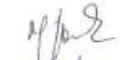
Rubrica do Director Técnico	Data
<i>[assinatura]</i>	27/6/2022



Uilente: ERMELINDA, 		MM
Telefone: 1 Entidade Responsável: SNS Nº. de Beneficiário:	R.C.: * 3 8 2 6 6 2 6 4 6 *	
 * 1 3 1 3 5 6 *	MARIA, Especialidade: OTORRINOLARINGOLOGIA Telefone:	C.H.M.T. H.TOMAR-CEXT  * 0 1 4 7 1 0 3 *
R <sub>x</sub> DCI / nome, dosagem, forma farmacêutica, embalagem, posologia		N.º Extensão      Identificação Ótica
1 solução alcoólica saturada de ácido bórico, 70, 30, álcool 70%, FSA Posologia: Duração Prolongada, 4 gotas no ouvido de 12 - 12 horas 8 dias em cada mes		1 Uma  * 7 9 8 7 6 8 5 *
2		
3		
4		
Validade: 30 dias Data: 2021-11-23		 (Assinatura do Médico Prescritor)

Processado por computador - Apresentação Especializada Médica, v2.0.0 - 09/05/2016

<b>Farmácia Montez</b> Dir. Técnica: M <sup>a</sup> Helena Homem Sousa Rua Dr. António Ferreira Bairão 2205-655 TRAMAGAL / Teif. 241897235	Dra. Maria Ermelinda, Ermelinda,
<b>SOLUÇÃO ALCOÓLICA DE ÁCIDO BÓRICO À SATURAÇÃO (FGP A.I.I.)</b>	
100ml de solução contém 4g de ácido bórico (30 ml) Contém iodeto de potássio, água purificada e álcool etílico Medicamento para aplicação otológica Não ingerir	Preparado 27/01/2022 Validade - 27/03/2022 Conservar à temperatura ambiente no frasco bem fechado. Lote- 01/2022 Usos externos
Manter fora do alcance das crianças	

  
 27/01/2022

## **PARTE II**

### **RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INVESTIGAÇÃO CIENTÍFICA**

Centro de Neurociências e Biologia Celular – Coimbra

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**CAG-** Trinucleótido constituído por Citosina, Adenina e Guanina

**CNC-** Centro de Neurociências e Biologia Celular

**DNA-** Ácido desoxirribonucleico

**EC-** Estágio Curricular

**FFUC-** Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

**MICF-** Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

## I. INTRODUÇÃO

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), tem um plano curricular bastante abrangente que destina-se a preparar os estudantes para as diversas áreas profissionais no ramo da Saúde, nomeadamente Farmácia Comunitária e Hospitalar; Indústria Farmacêutica; Distribuição grossista de medicamentos; Análises Clínicas; Assuntos Regulamentares; Marketing Farmacêutico; Ensino; Investigação, bem como outras áreas ligadas ao doente, medicamento, saúde pública e de natureza analítica.

Por esta razão, a FFUC apresenta aos estudantes a possibilidade de realizar o Estágio Curricular (EC), além de na Farmácia Comunitária, noutra área do medicamento, nomeadamente na Indústria Farmacêutica, Análises Clínicas, Investigação, entre outras.

Tendo em consideração o meu interesse pela área de Investigação, decidi realizar o meu EC nesta área, de modo a tentar perceber qual o papel do farmacêutico nesta área e como posso aplicar os conhecimentos adquiridos neste ramo.

O meu EC, no Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC), decorreu entre maio e agosto de 2022, sob a orientação do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida e supervisão de David Ramos e Kevin Leandro, ambos estudantes de doutoramento no grupo. O presente relatório apresenta-se sob a forma de uma análise SWOT (do inglês *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*) em que são abordados os pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças que decorreram durante o meu percurso no CNC.

### I.1. CNC- Centro de Neurociências e Biologia Celular

O CNC é uma instituição científica de referência nacional e internacional, fundada em 1990, sendo o primeiro Laboratório Associado em Portugal, que tenciona estimular a investigação biomédica e biotecnológica.<sup>1</sup>

O CNC congrega investigadores das áreas da Medicina, Farmácia, Ciências e Tecnologia, do Instituto de Investigação Interdisciplinar da Universidade de Coimbra, do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e do Instituto Português de Oncologia. A investigação no CNC está organizada em dois setores o da Biomedicina e o da Biotecnologia que se dividem em três áreas científicas Biotecnologia; Neurociências e Doenças do Cérebro; Metabolismo, Envelhecimento e Doença.<sup>1</sup>

O CNC dedica-se à formação multidisciplinar pós-graduada na Universidade de Coimbra, à comunicação de ciência e à transferência de tecnologia.<sup>1</sup>

## **2. ANÁLISE SWOT**

### **2.1. Strengths (Forças)**

#### **2.1.1. Equipa e integração**

No decorrer do meu EC, integrei o grupo de investigação do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida, intitulado “*Gene and Stem Cell Therapies for the brain*”, que se foca na doença de *Machado-Joseph*. Esta doença também conhecida por ataxia espinocerebelosa do tipo 3, é uma doença neurodegenerativa autossómica dominante, de origem portuguesa, que é causada pela repetição anormal do trinucleótido CAG no gene ataxina-3 e caracteriza-se pela perda da coordenação motora dos membros superiores e inferiores, disfagia, disartria, distonia e problemas de visão, na qual não há ainda nenhuma terapia para evitar a progressão da doença.<sup>2</sup>

Desde o momento que integrei a equipa, senti-me bem recebida e apoiada o que fez desaparecer as minhas inseguranças e ter confiança na realização das tarefas e nunca ter receio em pedir ajuda. Com o decorrer do EC, foi perceptível a cumplicidade entre os membros da equipa, tanto a nível profissional, como a nível de relação interpessoal, pelo que tornou a minha experiência muito enriquecedora e que me permitiu desenvolver competências, entre as quais a comunicação, relação interpessoal e profissionalismo.

A confiança que depositaram em mim e o incentivo à minha autonomia na realização de certas tarefas foi para mim uma mais-valia pois permitiram-me consolidar os conhecimentos adquiridos e desenvolver novas competências, nomeadamente espírito crítico, rigor científico, responsabilidade e autonomia, características que são expectáveis de encontrar num profissional de excelência na área da investigação.

#### **2.1.2. Plano de estágio**

O meu EC no CNC, durante três meses, consistiu numa rotação pelo laboratório, de modo a compreender a dinâmica de trabalhar num laboratório, onde tive a oportunidade de observar e trabalhar com diferentes pessoas do grupo e aprender o que desenvolviam e as técnicas laboratoriais que utilizavam e assim ter uma visão alargada sobre o que se faz no grupo.

O primeiro dia foi informativo, onde conheci os estudantes de doutoramento do grupo do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida, o David e o Kevin, que iriam estar comigo durante os três meses de EC e que me iriam ajudar a integrar no laboratório e nas práticas laboratoriais. Em seguida, foi-me mostrado as infraestruturas do CNC em particular os dois laboratórios pertencentes ao grupo.

As primeiras semanas, foram de adaptação ao laboratório em que aprendi várias técnicas e fiz pequenos procedimentos com diferentes pessoas do grupo. Tive a oportunidade de acompanhar diversos procedimentos que envolviam a utilização de animais de laboratório, tais como a cirurgias estereotáxicas, sacrifícios e á posteriori a recolha de órgãos. Após esta recolha e armazenamento, tive a possibilidade de observar e realizar o seccionamento de cérebros de murganho, processo este realizado estando este congelado e utilizando um equipamento específico, o crióstato.

Aprendi e realizei outras técnicas como genotipagem, clonagem, extração de DNA de células, quantificação de proteína, *Western Blot* (preparação de amostras de proteínas, separação de proteínas por eletroforese em gel, transferência da proteína do gel para a membrana, incubação com anticorpo e imagem), *Polymerase chain reaction* (PCR), purificação de DNA, imunohistoquímica, quantificação de DNA ou RNA usando o *Nanodrop*, isolamento de vesículas extracelulares por *size exclusion chromatography* (SEC), transformação e cultura de bactérias, purificação de DNA de células de *Escherichia Coli*.

Após o 1º mês, comecei a desenvolver algumas técnicas sozinha, tais como a passagem de células, que é necessário quando a confluência é mais ou menos 80% e que permite a manutenção das linhas celulares por longos períodos de tempo. O plaqueamento de células que consiste na contagem de células de modo a espalhar uma quantidade definida de uma suspensão de células para uma placa. E a transfeção de células que é um processo de introdução de DNA plasmídico nas células que codificam para genes de interesse de modo a produzir células geneticamente modificadas.

Em conclusão, o meu plano de estágio não era fixo podendo sempre haver alterações devido há imprevisibilidade que é uma experiência, no entanto é vantajoso uma vez que assim aprendi a como ultrapassar um problema e a ter um espírito crítico.

### **2.1.3. Multidisciplinaridade da equipa**

Durante o meu percurso no CNC tive a oportunidade de observar e trabalhar com outras pessoas do grupo, em que pude aprender o que desenvolviam. A diversidade da formação dos profissionais que ingressam o grupo, onde existem profissionais das áreas da biologia, bioquímica, biotecnologia, genética, ciências farmacêuticas e entre muitas mais áreas da saúde foi uma mais-valia para mim, pois pude trabalhar com alguns deles e aprender com eles o que desenvolviam e perceber como pessoas de áreas diferentes e com conhecimentos diferentes trabalham em prol do mesmo objetivo.

A colaboração conjunta de profissionais de áreas diferentes num projeto é vantajoso, pois cada um tem perspectivas diferentes na sua elaboração, o que permite a troca de ideias e a resolução de problemas que possam surgir no decorrer do mesmo, culminado assim em resultados mais rápidos e positivos.

#### **2.1.4. Horário flexível**

Outro ponto forte do meu EC era a flexibilidade de horários, não tendo horário de entrada nem de saída. Na área de Investigação científica, ao contrário do que acontece noutras áreas, não há um horário laboral fixo, os investigadores tem autonomia para realizar o seu próprio horário, podendo trabalhar no seu projeto sempre que achem necessário sem que haja qualquer tipo de restrição ao nível de horas.

Isto deve-se ao facto que cada pessoa no grupo tem o seu projeto e cada uma tem o seu ritmo de trabalho mas também devido ao facto que cada experiência demora um tempo específico e que no decorrer deste processo podem ocorrer erros que levam a que a experiência demore mais tempo.

Enquanto estagiária, este foi um ponto positivo uma vez que não havendo um horário fixo de trabalho no CNC pude contactar com um maior número de experiências, em espaços de tempos diferentes mas também nos períodos em que não tinha tantas experiências laboratoriais dedicava-me à leitura de literatura científica sobre a doença de *Machado-Joseph* e doença de Huntington.

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

### **2.2.1. Plano de estudos de MICF**

O plano de estudos de MICF é muito vasto, e tem o intuito de formar os alunos para as diferentes áreas do ciclo de vida do medicamento, desde a Investigação e Desenvolvimento até ao doente. No entanto, a investigação científica não é uma das principais saídas profissionais de MICF, logo um aluno deste curso tem de fazer um esforço adicional para ingressar por esta área.

Decerto que existem unidades curriculares, como Biologia celular, Biologia molecular, Investigação e Comunicação em Ciência e Biotecnologia Farmacêutica que tem um plano curricular que será muito útil para quem quer seguir pelo ramo de investigação científica. No entanto, a maior parte das unidades curriculares são muito direcionadas para as áreas em que o farmacêutico tem mais relevo, nomeadamente na Farmácia Comunitária ou Hospitalar e na Indústria Farmacêutica, o que é uma desvantagem para quem quer seguir uma outra área.

Apesar de tudo, o plano de estudos de MICF dá-nos a oportunidade de realização de EC noutra área do medicamento, como a de investigação científica, o que foi para mim uma mais-valia pois pude adquirir novos conhecimentos e ver como é que um farmacêutico se encaixa nesta área.

### **2.2.2. Duração do estágio**

Como referido anteriormente, o meu EC no CNC decorreu entre os dias nove de maio e nove de agosto, com a duração total de três meses. Não querendo descartar todos os conhecimentos e técnicas que aprendi ao longo destes meses, mas creio que a curta duração do EC, de certa forma, foi um ponto negativo pois não me permitiu adquirir um conhecimento mais abrangente da área.

Para fazer uma simples rotação no laboratório, aprender algumas técnicas e conhecer alguns dos projetos que estão a ser desenvolvidos no grupo três meses é tempo suficiente. No entanto, se quisermos desenvolver algum tipo de experiência, obter resultados e analisá-los, torna-se um pouco difícil num curto espaço de tempo pois este é um processo que demora algum tempo a ser elaborado, realizado e a ter resultados pois nem tudo é linear, e muitas vezes as experiências falham ou correm mal e é necessário voltar ao início e repensar a experiência novamente.

Acompanhar uma pessoa do grupo de modo a ver o início e o fim do projeto é complicado, apenas é exequível ver alguma parte deste pois este é um projeto de doutoramento que irá ser desenvolvido e otimizado ao longo de quatro anos.

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

### **2.3.1. Formações**

No início do meu EC tive a oportunidade de realizar duas formações, uma formação de Saúde e Segurança e outra para novos utilizadores das Salas de Cultura Celular.

Na formação de Saúde e Segurança realizei uma visita às instalações do CNC com um membro do Health, Security and Safety Office, em que me foi transmitido as noções básicas de saúde e segurança que devemos ter em âmbito de um centro de investigação e de um laboratório, assim como a organização global do CNC. Nesta formação aprendi os tipos de riscos (biológico, químico, físico, entre outros) e como proceder em caso de derrame ou de um acidente, como fazer o gerenciamento de resíduos entre muitas outras coisas necessárias para trabalhar num laboratório e garantir a própria segurança e a segurança de quem partilha o mesmo espaço.

Na formação das Salas de Cultura Celular foi-me dado a conhecer as salas de cultura, tanto a de linhas celulares como a sala de culturas primárias, os seus componentes básicos como as estufas, as câmaras de fluxo laminar, o banho de água entre outros. Esta formação para além de ter o objetivo de dar a conhecer estas salas, tinha também o objetivo de transmitir as precauções que devemos ter e os erros mais frequentes a evitar aquando da utilização destas e dos seus equipamentos, de modo a nos protegermos e a protegermos os outros usuários da sala.

Os conhecimentos adquiridos nestas duas formações foram muito úteis, uma vez que assim já temos um conhecimento base, o que poderá ser benéfico para o meu futuro profissional.

### **2.3.2. Participar semanalmente na reunião de grupo**

Uma outra oportunidade que tive durante o meu EC no CNC foi a oportunidade de participar semanalmente na reunião do grupo do professor doutor Luís Almeida. As reuniões tinham lugar no auditório do 2º andar do CNC, todas as quinta-feira a partir das 9h30, em que apresentavam uma ou duas pessoas por reunião e normalmente em inglês.

Estas reuniões tinham o objetivo de partilhar o trabalho desenvolvido por cada pessoa do grupo, em que cada pessoa apresentava o trabalho que estava a desenvolver e os resultados obtidos ou o trabalho que iria desenvolver no futuro. No entanto, também podiam apresentar um novo artigo científico que tenha saído recentemente e que consideravam ser vantajoso para dar a conhecer ao grupo. No fim de cada apresentação, eram colocadas questões às pessoas que apresentavam, nomeadamente dúvidas ou conselhos.

Ter participado nestas reuniões foi muito benéfico para mim pois pude aprender o que cada pessoa do grupo estava a trabalhar e aprender mais sobre a doença de *Machado-Joseph* e as diferentes técnicas que estão a ser estudadas, no grupo, para conhecer a doença e também para a retardar/curar mas também porque pude desenvolver o meu conhecimento de inglês e adquirir novos conhecimentos científicos que poderão ser úteis para o meu futuro.

## **2.4. Threats (Ameaças)**

### **2.4.1. Conhecimentos e experiência**

Um profissional que trabalhe na área da investigação científica está sempre em constante pesquisa e atualização dos seus conhecimentos, aprendizagens e técnicas de modo desenvolver o seu projeto com o maior rigor científico e obter resultados relevantes.

Deste modo, o conhecimento e a experiência que tinha antes da realização deste EC não era o suficiente para desenvolver um projeto científico sozinha o que considerei uma ameaça, uma vez que nunca tinha trabalhado num laboratório nem tive contacto com muitos equipamentos usados em muitas técnicas, nem tinha conhecimentos necessários sobre a doença de *Machado-Joseph*. No entanto, ver estes aspetos como uma ameaça fizeram-me realizar cada tarefa com o maior esforço possível, procurando sempre ter os conhecimentos necessários para a realização da mesma.

### **3. CONCLUSÃO**

A investigação científica é uma área de extrema importância e exigência, desta forma, é esperado que um profissional de excelência desta área, demonstre algumas qualidades, nomeadamente responsabilidade, dinamismo, autonomia e espírito crítico. É uma área que está sempre em constante inovação, logo é necessário por parte dos profissionais que haja a capacidade de autoaprendizagem e de esforço voluntário para que existam resultados significantes. No entanto, podem ocorrer alguns contratemplos onde os profissionais tem que ter a capacidade de se adaptar e contornar o problema.

Ter tido a oportunidade de estagiar noutra área do medicamento foi para mim uma vantagem pois possibilitou-me um contacto com uma realidade diferente, a nível de estágios, de todas as que já tinha vivenciado. O EC no CNC foi para mim uma experiência bastante enriquecedora onde pude pôr em prática os conhecimentos adquiridos ao longo de 5 anos no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, mas também aprender novos conhecimentos e desenvolver novas competências. Mas ao mesmo tempo foi uma experiência desafiante, que me fez sair da minha zona de conforto e colocou à prova a minha capacidade de trabalho autónomo, adaptação e resiliência.

Em suma, quero agradecer aos profissionais do CNC com quem tive oportunidade de trabalhar, pela disponibilidade que tiveram para comigo e pelos conhecimentos que partilharam comigo.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. *About CNC | CNC UC*. [Acedido a 26 de agosto de 2022]. Disponível na internet: <https://cnc.uc.pt/en/about-cnc>
2. Miranda, C. O., Nobre, R. J., Paiva, V. H., Duarte, J. V., Castelhana, J., Petrella, L. I., Sereno, J., Santana, M., Afonso, S., Januário, C., Castelo-Branco, M., & de Almeida, L. P. (2022). **Cerebellar morphometric and spectroscopic biomarkers for Machado-Joseph Disease**. *Acta Neuropathologica Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/S40478-022-01329-4>

## **PARTE III**

### **“TERAPIA GÉNICA DA DOENÇA DE HUNTINGTON”**

Monografia

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AAVs-** Vírus adeno-associados

**ASOs-** Oligonucleótidos antisense

**BHE-** Barreira Hematoencefálica

**CAG-** Trinucleótido constituído por Citosina, Adenina e Guanina

**Cas9-** CRISPR *associated protein 9*

**CRISPR/Cas9-** Repetições Palindrómicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas com uma nuclease 9 associada, do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated protein 9*

**crRNA-** CRISPR RNA

**DH-** Doença de Huntington

**DNA-** Ácido desoxirribonucleico **HTT-** Gene da Huntingtina

**Htt-** Proteína Huntingtina

**IT-** *Interesting Transcript*

**LCR-** líquido cefalorraquidiano

**mHTT-** Gene da Huntingtina mutado

**mHtt-** Proteína Htt mutante

**miRNA-** microRNA

**mRNA-** RNA mensageiro

**NfL-** neurofilamento cadeias leves

**PAM-** *protospacer adjacent motif*

**poliQ-** Poliglutamina

**RNA-** Ácido ribonucleico

**RNAi-** RNA de interferência

**RNase -** Ribonuclease

**sgRNA-** *single guide RNA*

**siRNA-** *small interference RNA*

**SNC-** Sistema Nervoso Central

**SNP-** *single-nucleotide polymorphism*

**TALENs-** *transcription activator-like effectors*

**TBZ-** Tetrabenazina

**tracrRNA-** *trans-activating CRISPR RNA*

**UHDRS-** *Unified Huntington's disease Rating Scale*

**VMAT2-** Transportador vesicular de monoaminas 2

**ZFNs-** *Zinc Finger Nuclease*

## I. INTRODUÇÃO

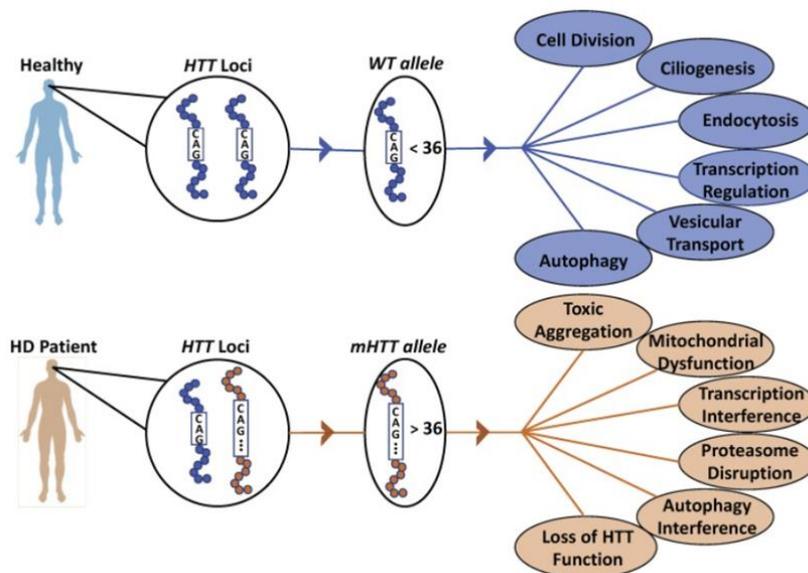
A Doença de Huntington (DH), descrita pela primeira vez por George Huntington em 1872, é uma doença neurodegenerativa autossômica dominante, caracterizada por movimentos involuntários, sintomas psiquiátricos e défices cognitivos, que normalmente surgem por volta dos 45 anos de idade (Komatsu, 2021). A DH é causada por uma expansão continua de repetições do trinucleótido CAG no exão 1 do gene inicialmente designado de *Interesting Transcript 15* (IT-15), que codifica para a proteína huntingtina (Htt) (Landles & Bates, 2004). A Htt é essencial em várias funções celulares, tais como transporte de vesículas, divisão celular, regulação de processos de transcrição, autofagia e manutenção dos tecidos (Figura 1) (Fields *et al.*, 2021).

A mutação da proteína huntingtina (mHtt) consiste numa sequência excessivamente longa de poliglutaminas (poliQ) resultante da expansão anormal do trinucleótido CAG no gene da huntingtina. Esta sequência longa confere características tóxicas à mHtt que são prejudiciais para a célula (Figura 1). Diversos estudos revelaram que a mHtt interfere com a função neuronal através da agregação tóxica de proteínas, desregulação transcricional, disfunção mitocondrial e sináptica, comprometimento da proteostase e interferência na autofagia, o que leva à disfunção e morte neuronal (Fields *et al.*, 2021). A nível clínico, a DH caracteriza-se por sintomas tais como a coreia que é um distúrbio do movimento hipercinético caracterizado por movimentos espontâneos excessivos que são irregulares, involuntários e abruptos (Wild e Tabrizi, 2007), a depressão, a ansiedade, a irritabilidade e a apatia não havendo ainda nenhuma terapêutica que permita bloquear ou reverter a progressão da doença, pois atualmente as terapias disponíveis limitam-se apenas à gestão dos sintomas característicos da doença (Komatsu, 2021).

No entanto, têm vindo a ser desenvolvidas estratégias terapêuticas que são promissoras para o tratamento da DH, nomeadamente técnicas com foco no DNA, como a CRISPR/Cas9 e abordagens pós-transcricionais de redução da Htt, tais como a interferência de RNA (RNAi) ou os oligonucleótidos antisense (ASOs), em que o objetivo principal é a redução dos níveis da mHtt. Um dos maiores desafios destas terapias é entrega das mesmas no cérebro. Pode ser feita através de injeção direta do Sistema Nervoso Central (SNC), mas tal constitui uma abordagem muito invasiva para os doentes (Komatsu, 2021).

Este trabalho foca-se na DH, mais especificamente nas terapias génicas que estão a ser desenvolvidas. Primeiramente é descrita a doença onde são abordadas as suas manifestações clínicas, epidemiologia, fisiopatologia, diagnóstico, terapêutica e biomarcadores e por fim são apresentadas as principais terapias genéticas que estão a ser desenvolvidas na DH, as

limitações/desafios e ensaios clínicos que estão a decorrer e que são promissores para esta doença.



**Figura 1 - A função da Huntigina (Htt) e da Huntigina mutante (mHtt).** A huntigina tem sido muito investigada e apesar da sua função não se encontrar totalmente esclarecida, sabe-se hoje que a htt está ligada a uma diversidade de funções celulares, nomeadamente divisão celular, transporte vesicular, endocitose, ciliogênese, autofagia e regulação de processos de transcrição. Por outro lado, a mHtt que tem uma cadeia longa de glutaminas (PolQ) próximo do terminal amínico, vai desencadear acumulação de agregados proteicos e provocar uma sucessão de eventos prejudiciais para a célula, tais como disfunção mitocondrial, interferência na atividade do proteossoma, desregulação na transcrição, interferência na autofagia e perda da função da Htt. (Retirado de (Fields *et al.*, 2021))

## 2. DOENÇA DE HUNTINGTON

### 2.1. Manifestações Clínicas da DH

A DH é uma doença neurodegenerativa e caracteriza-se por sintomas motores, cognitivos e psiquiátricos (Anexo 1). A idade média de aparecimento dos sintomas é aos 40 anos de idade, podendo aparecer em qualquer idade, desde a infância até à terceira idade (Ghosh e Tabrizi, 2018). A idade de início dos sintomas da DH está relacionada com o comprimento da expansão do número de repetições CAG. Sabemos que quanto maior for a extensão da expansão do trinucleótido CAG mais precocemente ocorre a doença e mais rápida é a sua progressão. Existe assim uma relação inversa entre a idade de início dos sintomas e o número de repetições (Rosenblatt *et al.*, 2006, 2012).

A nível motor, o sintoma mais comum consiste em movimentos involuntários arrítmicos, aleatórios e excessivos, mais conhecidos por movimentos coreicos. A coreia caracteriza-se por movimentos não intencionais de pequena amplitude, inquietação e falta de coordenação. À medida que a doença progride, aparecem outros sintomas como a distonia, a

bradicinesia, a acinesia e a rigidez que causam posturas anormais. Por falta de controlo muscular, estes sintomas podem causar desequilíbrio e contribuir para quedas e também causam dificuldade na articulação de movimentos motores finos como escrever, falar, comer, mastigar e engolir, o que pode levar a perda de peso (Aziz *et al.*, 2008; Ghosh e Tabrizi, 2018).

Os problemas cognitivos podem ocorrer antes do início dos sintomas motores e progridem gradualmente com o tempo, levando em último caso a demência (Bates *et al.*, 2015). Estes incluem lentidão cognitiva geral, défices de memória a curto prazo, fraco reconhecimento de emoções, problemas de atenção, comprometimento da capacidade de resolução de problemas e das funções de execução, que incluem o planeamento, o pensamento concreto, o início apropriado de ações e a inibição da impulsividade (Duff *et al.*, 2010; Peavy *et al.*, 2010).

Os sintomas psiquiátricos são os mais perturbadores tanto para o doente como para os familiares, uma vez que não são tão consistentes como outros sintomas e causam um substancial grau de incapacidade, sendo por isso uma das razões de institucionalização dos doentes (Hamilton *et al.*, 2003; Ho *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2012). Estes sintomas aparecem no início do curso da doença, podendo ser uma das suas manifestações iniciais. A depressão é o sintoma mais comum, seguido de ansiedade (Ghosh e Tabrizi, 2018; Paulsen *et al.*, 2005). A apatia é, também, um dos sintomas comuns da doença, que se caracteriza pela falta de interesse, dificuldade em iniciar tarefas do dia-a-dia e comportamento passivo, que tende a piorar com o tempo (van Duijn *et al.*, 2014).

A irritabilidade, agressividade, comportamento obsessivo-compulsivo e psicose são outras manifestações neuropsiquiátricas relatadas, sendo as duas primeiras relacionadas com a disfunção do lobo frontal do cérebro (Paulsen *et al.*, 2001; Rosenblatt e Leroi, 2000). Os pensamentos suicidas e o suicídio são muito comuns na DH, e acontecem normalmente em doentes que começam a desenvolver sintomas ou quando começam a tornar-se dependentes do seu cuidador (Paulsen, Hoth, *et al.*, 2005).

Os sintomas neurológicos integram a dificuldade em falar, o que pode ser esmorecedor para o doente, surgindo de uma combinação de disartria e de dificuldade em encontrar palavras devido à disfunção cognitiva. Problemas de deglutição, que podem provocar engasgamento, também surgem resultante da falta de coordenação dos músculos orais, faríngeos e de comprometimento cognitivo (Ghosh & Tabrizi, 2018). São também muito comuns na DH os distúrbios do sono que podem ser provocados pela ansiedade e coreia noturna (Videnovic *et al.*, 2009).

A esperança média de vida de uma pessoa com DH é cerca de 15 a 20 anos após o início dos sintomas, sendo a pneumonia a causa mais comum de morte nestes doentes, devido

à diminuição de sincronização dos movimentos (Lanska *et al.*, 1988). Outras causas de morte incluem a insuficiência cardíaca e o suicídio, sendo esta última considerada a segunda causa mais comum de morte na DH (Ghosh & Tabrizi, 2018).

## **2.2. Epidemiologia**

Até aos dias de hoje, estão identificadas nove doenças de poliglutaminas, a DH, a atrofia muscular espinhal e bulbar, a atrofia dentato-rubro-palidoluisiana, e as ataxias espinhocerebelosas 1, 2, 3, 6, 7 e 17, sendo a DH a mais comum dentro deste grupo (Paulson, 2018). A DH é classificada como uma doença rara, uma vez que tem uma prevalência mundial de 2,7 por 100 000 indivíduos. Os estudos realizados apuraram que a prevalência da DH é mais alta na América do Norte, Europa e Austrália em comparação com os países asiáticos, onde esta é mais baixa (Pringsheim *et al.*, 2012). Enquanto a prevalência nas primeiras três regiões é de 5,70 por 100 000 indivíduos, na Ásia é cerca de dez vezes menor, reduzindo-se para 0,40 por 100 000 indivíduos (Pringsheim *et al.*, 2012).

Foi reportado que a prevalência da DH, nos últimos 50 anos, aumentou em 15-20% na América do Norte, Europa e Austrália, o que pode ser devido a vários fatores, nomeadamente o aumento do conhecimento acerca da DH, o aumento de um diagnóstico correto que foi complementado com a possibilidade da realização de um teste genético para confirmar a patologia do doente, o aumento das taxas de mutação, a redução do estigma ou “vergonha” que antigamente eram associados a esta doença e o aumento da disponibilidade de medicamentos para o tratamento sintomático que aumenta assim o tempo de vida (Rawlins *et al.*, 2016).

## **2.3. Mecanismos patológicos da DH**

Como abordado previamente, a DH é uma doença neurodegenerativa hereditária originada por uma repetição anormal do trinucleótido CAG no exão I do gene *HTT*. O *HTT* codifica uma proteína conhecida por Huntingtina com um peso molecular de cerca de 350 kDA e contém várias unidades repetidas de 50 aminoácidos, designadas por repetições HEAT, que formam uma estrutura super-helicoidal de núcleo hidrofóbico (Hoogeveen *et al.*, 1993). Esta proteína é expressa em todo o organismo, nomeadamente no cérebro e possui vários locais de interação, desempenhando o papel de proteína-esqueleto pois ajuda a coordenar outras proteínas e algumas funções celulares (Komatsu, 2021).

A *htt* tem um papel importante, e existem vários estudos em murganhos que avaliam os efeitos da eliminação da *HTT* nas várias fases de desenvolvimento do murganho. A deleção

da HTT, antes do desenvolvimento do SNC, causa letalidade embrionária, enquanto a deleção condicional no período pós-natal leva ao desenvolvimento de um fenótipo neuronal degenerativo progressivo (Dragatsis, Levine e Zeitlin, 2000). Contudo, em murganhos com mais de 4 meses de idade, a deleção de HTT não causa neurodegenerescência nem morte, mas em murganhos com 2 meses de idade a deleção causa morte por pancreatite aguda resultante da degeneração das células acinares pancreáticas (Wang *et al.*, 2016).

Apesar a função da Htt não ser totalmente conhecida, sabe-se que esta tem um papel significativo em várias funções tais como no tráfego vesicular (Saudou e Humbert, 2016); na coordenação da divisão celular (Saudou e Humbert, 2016); na regulação da transcrição celular pois interage com o p53 demonstrando assim efeito na reparação de danos no DNA, ciclo celular e apoptose (Bae *et al.*, 2005); na regulação da autofagia uma vez que foi demonstrado que na DH, o número de autofagossomas está aumentado (Martin *et al.*, 2015) na sobrevivência celular; na ciliogénese (Keryer *et al.*, 2011), no transporte axonal e no aumento da produção do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), proteína importante para a sobrevivência neuronal e neurogénese (Gauthier *et al.*, 2004).

A repetição anormal do trinucleótido CAG resulta na produção de uma proteína mutante que contém uma cadeia alongada de PoliQ no terminal amínico da proteína, o que leva há acumulação de agregados proteicos assim como a uma série de eventos patogénicos (Ratovitski *et al.*, 2009). Repetições de CAG inferiores a 35 situam-se no intervalo normal da expansão de CAG, repetições de CAG superiores a 36 são consideradas patogénicas, sendo que no intervalo de 36 a 39 conferem penetrância incompleta, com o risco de vir a desenvolver DH mais tarde do que o normal. Repetições superiores a 40 conferem penetrância total e levam ao desenvolvimento da DH na idade adulta e por fim repetições maiores que 55 levam ao desenvolvimento de DH juvenil em que há o desenvolvimento dos sintomas antes dos 20 anos de idade (Bates *et al.*, 2015).

**Tabela 1-** Número de repetições CAG, associado ao risco de desenvolvimento da doença de Huntington (Adaptado de (Bates *et al.*, 2015)).

Nº. de repetições CAG	Descrição do gene	Risco de desenvolver a DH	Risco de passar a DH para as gerações futuras
≤26	Normal	Não	Não
27-35	Normal mas elevado	Não	Possível
36-39	Penetrância reduzida	Talvez	Sim
≥40	Penetrância total	Sim	Sim
≥55	Huntington juvenil	Sim	-

Pensa-se que o mecanismo patológico da DH, envolve quer a perda de função, através da destruição de algumas funções da Htt, mas simultaneamente um ganho de função tóxica da mHtt (Bates *et al.*, 2015). Estes mecanismos incluem stress oxidativo (Browne *et al.*, 1997), disfunção sináptica e mitocondrial (Johri, Chandra e Beal, 2013; Nithianantharajah e Hannan, 2013), diminuição da função do complexo do poro nuclear (Grima *et al.*, 2017), alteração do tráfego axonal (Reddy e Shirendeb, 2012), desregulação transcricional (Jones e Hughes, 2011). A proteína mutante sofre clivagem proteolítica, por proteases de cisteína, como as caspases e as calpaínas, e formam pequenos fragmentos que acumulam nos neurónios e causam neurotoxicidade (Ratovitski *et al.*, 2009). Os fragmentos de mHtt causam disfunção da via ubiquitina-proteossoma, não havendo degradação dos agregados, o que leva a neurotoxicidade (Harding e Tong, 2018).

Para além destes mecanismos patológicos, estudos recentes demonstraram que o *splicing* incompleto dependente do comprimento do CAG do exão I do HTT resulta num mRNA curto que é traduzido numa proteína do exão I que é patogénica (Sathasivam *et al.*, 2013). Também foi demonstrado, em modelos animais, que a expressão da mHtt, resulta em neuropatologia, nomeadamente atrofia do corpo estriado e comprometimentos motores (Slow *et al.*, 2003). As regiões do cérebro mais afetada pela DH são os gânglios da base e córtex cerebral, que estão associados ao movimento, raciocínio, emoção, comportamento, sentimentos e cognição. Estas regiões sofrem atrofia que é seguida de perda de neurónios e astrocitose (Reiner *et al.*, 2011).

A compreensão dos mecanismos patológicos da DH permitiu assim que fossem identificados novos alvos terapêuticos e que fossem desenvolvidas várias terapias promissoras, como as terapias génicas, nomeadamente técnicas de edição de genoma e técnicas à base de RNA de interferência que tem a finalidade de silenciar o gene e o RNA mensageiro da mHTT e assim levar à diminuição dos níveis da proteína mHtt (Komatsu, 2021).

## **2.4. Diagnóstico**

Atualmente, conforme definido no “*Diagnostic Confidence Level*” (DCL) da *Unified Huntington's Disease Rating Scale* (UHDRS) o diagnóstico da DH requer a presença de sintomas inequívocos da doença numa pessoa que tenha um historial familiar de DH ou que seja portadora do gene mutado (Reilmann, Leavitt e Ross, 2014). O diagnóstico da DH é, na maior parte das vezes, realizado através de um teste genético para a presença da expansão do trinucleótido CAG no gene que codifica a Htt ou através de uma avaliação clínica e história familiar. Alguns dos sintomas que são característicos da doença são a disfunção motora,

nomeadamente, a apatia, problemas cognitivos e características neuropsiquiátricas (Bates *et al.*, 2015).

Em alguns casos, o recurso à neuroimagem, particularmente à tomografia computadorizada e à ressonância magnética nuclear podem apoiar o diagnóstico quando o histórico familiar é desconhecido e o teste genético é inconclusivo. Estes exames normalmente mostram atrofia estriatal simétrica do núcleo caudado e do putamen, mas tal não é específico apenas da DH (Bates *et al.*, 2015). A gravidade da doença pode ser avaliada através de uma escala, a UHDRS, que se baseia em avaliações motoras, cognitivas, comportamentais e funcionais e assim fornecer um parecer global do estado do doente (Siesling *et al.*, 1998).

## **2.5. Terapêutica da DH**

Atualmente, ainda não existe cura para a DH, apenas tratamentos sintomáticos, tanto farmacológicos como não-farmacológicos, que ajudam no controlo de alguns sintomas, nomeadamente na coreia, na distonia e nas manifestações comportamentais e psiquiátricas (McColgan & Tabrizi, 2018). O objetivo da terapêutica disponível para a DH, é melhorar a qualidade de vida do doente, sendo necessário também o acompanhamento deste por parte de uma equipa multidisciplinar, que envolve médicos neurologistas, psiquiatras, fisioterapeutas, nutricionistas, terapeutas e enfermeiros que assim, com base na sua experiência clínica escolhem qual o melhor curso de tratamento para cada doente (McColgan e Tabrizi, 2018).

Nem sempre são necessárias terapias farmacológicas para o tratamento da sintomatologia, caso esta seja ligeira ou não case incómodo ao doente. A coreia é um dos principais sintomas motores dos doentes na DH, e encontrar terapêutica para este sintoma tem sido o foco de muito estudos comparativos (Estévez-Fraga *et al.*, 2016). Até aos dias de hoje, existem apenas dois fármacos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA), para o tratamento dos movimentos coreicos na DH, a tetrabenazina (TBZ), também aprovada pela Agência Europeia do Medicamento (EMA), e a deutetribenazina. A TBZ é da classe dos antipsicóticos e causa a depleção da dopamina e outras monoaminas no SNC, através da inibição reversível do VMAT2 (Estévez-Fraga *et al.*, 2016). A deutetribenazina é quimicamente um isómero da TBZ, e causa também a depleção de monoaminas dos terminais nervosos (Heo & Scott, 2017).

Ambos os fármacos demonstraram a redução significativa dos movimentos coreicos, embora a TBZ tenha alguns efeitos secundários, nomeadamente depressão e sonolência, sendo necessária monitorização antes e após a prescrição deste fármaco. Por outro lado, a deutetribenazina mostrou ter menos efeitos secundários comparativamente à TBZ, mantendo

os mesmos níveis de eficácia (Heo e Scott, 2017) (McColgan e Tabrizi, 2018). Outras opções para o tratamento da coreia, são os antipsicóticos atípicos como a olanzapina, risperidona e quetiapina, com ação a nível dos sintomas motores e psiquiátricos, nomeadamente irritabilidade, agitação e ansiedade. Antipsicóticos típicos, como o haloperidol também são usados mas têm mais efeitos secundários associados (Ghosh e Tabrizi, 2018).

Para o tratamento dos sintomas psiquiátricos ainda não existem muitos estudos de fármacos que sejam benéficos para estes sintomas na DH, no entanto para tratar a irritabilidade e controlar os comportamentos agressivos são muitas vezes usados antipsicóticos atípicos, enquanto para tratar a depressão são usados inibidores seletivos da recaptação da serotonina, como o citalopram, fluoxetina, paroxetina e sertralina. Na psicose, o aripiprazol e olanzapina são os que são considerados mais benéficos. Para tratar a insónia, é comumente usado a mirtazipina que é um antidepressivo sedativo. Fármacos como o metilfenidato, amantadina, bromocriptina e bupropiom, são usados na apatia apesar de não existirem estudos que demonstrem o seu benefício na DH (Estévez-Fraga *et al.*, 2016; McColgan e Tabrizi, 2018).

Em muitos casos, a terapêutica não farmacológica também é benéfica para aliviar os sintomas da doença. A fisioterapia é recomendada para melhorar o equilíbrio e a marcha, terapia ocupacional para ajudar a manter a sua autonomia e independência, terapia de fala para melhorar a comunicação, terapia cognitivo-comportamental com psicólogos para ajudar na gestão da ansiedade, depressão e comportamentos obsessivo-compulsivos, consultas com nutricionistas para estabelecer regimes de alimentação adequada para estes doentes (Estévez-Fraga *et al.*, 2016; Ghosh e Tabrizi, 2018).

## **2.6. Biomarcadores**

Os biomarcadores são entidades que podem ser medidas experimentalmente e que indicam a gravidade da doença, preveem a sua progressão e também a resposta a um agente terapêutico. Antes de serem utilizados, a fisiopatologia da doença tem de ser compreendida e devem ser cumpridos requisitos relativamente à sua especificidade, reprodutibilidade, precisão e medição (Tabrizi *et al.*, 2020).

Um biomarcador utilizado na DH é a quantificação da proteína mHtt no líquido cefalorraquidiano (LCR), uma vez que os neurónios danificados libertam mHtt para o LCR que é possível quantificar recorrendo a imunoensaios (Fodale *et al.*, 2017). A quantificação permite correlacionar a fase da doença com a gravidade da mesma, técnica usada e validada em ensaios clínicos (Wild *et al.*, 2015). Num ensaio clínico para demonstrar a diminuição de mHtt

utilizando um ASO, a concentração de mHtt no LCR foi utilizada com biomarcador farmacodinâmico, permitindo assim monitorizar a eficácia da terapêutica instituída (Tabrizi *et al.*, 2019).

O neurofilamento *cadeias leves* (NfL) é encontrado nos axónios e é libertado quando há dano neuronal podendo assim ser usado com biomarcador da DH (Shahim *et al.*, 2017). Foi demonstrado que as concentrações de NfL no plasma de doentes com Huntington são até 5 vezes maiores relativamente a indivíduos saudáveis, dependendo da fase da doença (Byrne *et al.*, 2017). Foi observada uma correlação entre a NfL no plasma e no LCR, o que sugeriu que a NfL provém do LCR (Byrne *et al.*, 2017). Estes dois biomarcadores correlacionam-se com o grau de atrofia cerebral e a gravidade da doença (Johnson *et al.*, 2018). No entanto, a concentração de NfL no plasma é mais aconselhado para prever a progressão da doença do que a concentração de NfL no LCR, uma vez que, num estudo, as concentrações plasmáticas de NfL, em indivíduos pré-sintomáticos, previram a probabilidade da manifestação da doença nos próximos 3 anos (Tabrizi *et al.*, 2020). O aumento das concentrações tanto de mHtt como NfL são as primeiras mudanças que são detetadas na DH antes da manifestação dos sintomas clínicos (Byrne *et al.*, 2018).

Por fim, as concentrações da proteína tau, que é uma proteína axonal que estabiliza os microtúbulos, no LCR foram maiores em pessoas com DH em comparação com pessoas saudáveis (Niemelä *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2016). A agregação desta proteína foi observada em tecido cerebral de pessoas com DH, *post-mortem* e por outro lado também foi observado fosforilação e processamento anormal da proteína em indivíduos com DH em comparação com indivíduos saudáveis (St-Amour *et al.*, 2017; Vuono *et al.*, 2015).

Estes biomarcadores estão a ser usados em ensaios clínicos de forma a avaliar o estado e a progressão da doença, bem como a eficácia terapêutica das novas estratégias usadas para diminuir as concentrações de HTT na DH (Tabrizi *et al.*, 2020).

### **3. TERAPIA GÉNICA**

A terapia génica é uma forma de medicina molecular e baseia-se na transferência de material genético para as células, de modo a corrigir uma disfunção celular ou adicionar uma nova função à célula e tem como objetivo curar e/ou modificar a progressão da doença e melhorar o estado clínico de um doente (Akhtar *et al.*, 2011; Soofiyan *et al.*, 2013). Esta técnica envolve o uso de ácidos nucleicos para diferentes abordagens tais como a substituição, adição, silenciamento ou edição de genes (Kaufmann *et al.*, 2013). Segundo a EMA, um medicamento de terapia genética é “ um medicamento biológico que contém uma substância ativa que

consiste num ácido nucleico recombinado utilizado ou administrado a seres humanos com o objetivo de regular, reparar, substituir, adicionar ou eliminar uma sequência genética” (DIRECTIVE 2001/83/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL OF 6 NOVEMBER 2001).

A terapia génica apresenta vantagens no tratamento de doenças monogénicas hereditárias, como a DH.

### **3.1. O gene**

O gene IT-15, mais conhecido pelo gene da huntingtina, localiza-se no braço curto do cromossoma 4 na posição 4p16.3 e é composto por 67 exões, contém na extremidade 5' da região de codificação uma repetição polimórfica e instável de trinucleótidos CAG (Bates *et al.*, 2015). O trinucleótido CAG codifica o aminoácido glutamina, consequentemente o HTT é composto por repetições do mesmo, o que resulta na produção de uma cadeia de PoliQ. Indivíduos saudáveis tem menos de 36 repetições de glutaminas, o que resulta na produção da Htt enquanto mais de 36 repetições é considerado preditivo para a DH, e há a produção de mHtt (Bates *et al.*, 2015). O gene *HTT* é altamente conservado e o seu *knockout* embrionário, antes do desenvolvimento neuronal, é letal em murganhos, enquanto o *knockout* parcial em animais adultos de muitas espécies, incluindo em primatas é bem tolerado (Fields *et al.*, 2021).

#### **3.1.1. Polimorfismos do gene**

A DH é uma doença neurodegenerativa causada por uma mutação no HTT. A inibição do *mHTT* é uma estratégia terapêutica estudada para a DH, utilizando para este fim abordagens alelo-seletivas que têm como alvo polimorfismos por substituição de um nucleótido (SNPs) do *mHTT*, que já estão a ser desenvolvidas em ensaios clínicos (Kay *et al.*, 2019). A maioria das pessoas com DH são heterozigóticas para a repetição CAG, ou seja, têm um alelo selvagem/ *wild-type* da *HTT* e um alelo mutante de *HTT*, logo terapias alelo-seletivas para a *mHTT* têm a vantagem de conservar a proteína *wild-type* que assegura a função biológica nos vários mecanismos celulares em que está envolvida (Claassen *et al.*, 2020).

Alguns SNPs têm mais frequência na DH, os haplótipos mais comuns na DH, são o rs362307 (A1), rs2798235 (A2) e o rs113407847 (A3a), sendo estes os alvos de silenciamento alelo-seletivos para o tratamento da DH. A análise dos haplótipos mais comuns na DH, em todas as regiões do mundo, permite selecionar o SNP mais adequado para as terapêuticas de silenciamento alelo-seletivas num maior número de indivíduos, pois indivíduos com HD, de diferentes origens geográficas expressam diferentes SNPs (Kay *et al.*, 2019).

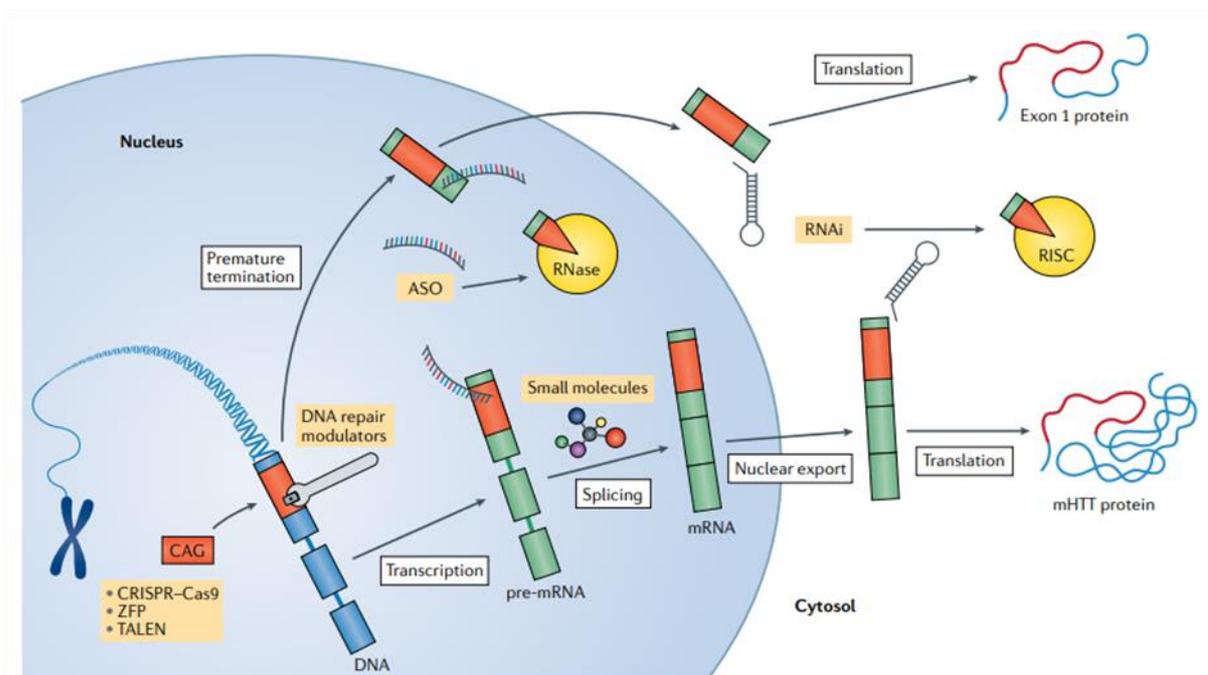
A maioria dos cromossomas da DH na Europa são encontrados no haplogrupo A, enquanto nas populações do leste asiático, nomeadamente China e Japão, os cromossomas estão associados ao haplótipo C. Os haplótipos A1 e A2 são os haplótipos de maior risco e prevalência na DH. O haplótipo A1 do HTT é o mais comum, os alelos intragénicos que definem este haplótipo são o rs72239206 (sofreu uma deleção de intrões de 4 pares de base), o rs149109767 (sofreu uma deleção de codão de 3 pares de base) e o rs362307 (é um SNP localizado na região 3'-não traduzida). Estes SNPs são encontrados em indivíduos com a DH na Europa e no sul da Ásia, não sendo encontrados nos indivíduos com descendência africana e no leste asiático, nomeadamente na China e Japão, podendo ser este o motivo da baixa prevalência da DH no leste asiático. O haplótipo A2 é o segundo haplótipo mais comum da mutação da DH e é mais predominante no norte da Europa. O haplótipo A3a é o terceiro haplótipo mais comum da mutação da DH e é mais encontrado em doentes de Huntington com ascendência do Norte da Europa, do sul asiático e não são encontrados em doentes do leste asiático e com ascendência africana (Kay *et al.*, 2019).

Já existem ensaios clínicos que usam técnicas alelo-seletivas como é o caso das terapias com ASOs. A Wave Life Sciences Ltd desenvolveu uma terapia com ASOs que tem como alvo a transcrição de mRNA de mHTT do SNP1 (rs362307) e o SNP2 (rs362331), no entanto este ensaio clínico que estava em fase I/2 foi interrompido por falta de eficácia uma vez que não havia uma diminuição significativa de mHtt no LCR dos pacientes, por outro lado também foram relatados alguns efeitos secundários, nomeadamente tonturas, quedas, dor de costas e infeções do trato respiratório superior (Wave Life Sciences to Present Preclinical In Vivo and In Vitro Data for SNP3-Targeting Huntington's Disease Program at CHDI Foundation's 15th Annual HD Therapeutics Conference, 2020; WVE-120101 - Huntington's Disease News). Esta empresa desenvolveu outra estratégia terapêutica que utiliza um ASO que tem como alvo um SNP3, uma variante alélica ligada ao trato de repetição CAG expandido no pré-mRNA da HTT (Estevez-Fraga *et al.*, 2022).

### **3.2. Terapias**

A investigação intensiva sobre a DH, levou a uma maior compreensão dos mecanismos patológicos da doença, o que levou à identificação de novos alvos terapêuticos. No caso da DH a patologia é atribuída à produção de mHtt, que tem um efeito tóxico, logo estratégias que diminuem a mHtt são estratégias promissoras. Estas estratégias (Figura 2) incluem terapias com foco no RNA e que inibem a expressão de mHtt a nível pós-transcricional, como os oligonucleótidos antissense (ASOs) e a interferência de RNA (RNAi) e com foco no DNA

através de técnicas de edição do genoma, como a CRISPR/Cas9 (Ghosh & Tabrizi, 2018; Komatsu, 2021).



**Figura 2 - Terapias genéticas da Doença de Huntington.** Na imagem podemos observar os vários métodos terapêuticos que podem ser usados para a DH. A patologia da DH é causada pela expansão anormal do trinucleótido CAG (que está representado nas secções a vermelho do DNA e RNA), o que resulta na produção de mHtt. Nas caixas a laranja, podemos observar as diferentes terapêuticas. Abordagens à base de RNA, como o RNA de Interferência (RNAi) e os oligonucleótidos antisense (ASO) que inibem a expressão de mHtt por desencadear clivagens, degradação ou inibição transcricional da proteína mutante e abordagens à base de DNA, como o CRISPR-Cas9, Zinc-finger protein (ZFP) e *Transcription activator-like effector nuclease* (TALEN), que visam modificar a sequência genética ou a transcrição do HTT, através da combinação de uma nuclease com um componente específico de ligação ao DNA (Retirado de (Tabrizi et al., 2020)).

### 3.2.1. Estratégias direcionadas ao RNA

#### 3.2.1.1. Oligonucleótidos antisense

Uma das primeiras terapias génicas que chegou aos ensaios clínicos para o tratamento da DH, foi uma terapia com foco no RNA, com ASOs. Os ASOs são oligodesoxinucleótidos curtos, sintéticos e de cadeia simples com cerca de 18 a 30 nucleótidos (Scoles et al., 2019). Estes ligam-se por complementaridade a alvos no pré-mRNA ou no mRNA através do emparelhamento de bases *Watson-Crick*. Após este passo os ASOs modulam a expressão génica por meio de diferentes mecanismos, tais como recrutamento de RNase HI, modificação do *splicing* do RNA, inibição da formação da extremidade 5', modulação da poliadenilação e inibição da tradução (Fields et al., 2021; Tabrizi et al., 2019).

Uma das vias mais frequentemente usada é de recrutamento de RNase HI, em que após a ligação do ASO ao pré-mRNA, ocorre a formação de um complexo híbrido RNA-DNA

que é reconhecido pela RNase HI e o mRNA é clivado por hidrólise. Os fragmentos resultantes da clivagem são eliminados por exossomas ou nucleases, o que faz com que haja interrupção da tradução ou modulação do processamento do RNA (Tabrizi *et al.*, 2019).

Esta terapia à base de ASOs difere da terapia à base de RNAi, uma vez que atua mais a montante, ligando-se ao pré-mRNA, ou seja, ligam-se a exões e intrões tendo assim mais locais de ligação, enquanto as sequências de RNAi atuam no RNA maduro (Rinaldi e Wood, 2017). Os ASOs são uma terapia muito promissora para doenças neurológicas, como a DH, uma vez que têm um tempo de semi-vida longo. Não saturam nenhuma via endógena a nível intracelular e têm uma ampla distribuição pelo SNC, sendo captados por neurónios e células da glia, logo não necessitam de transportadores, como os vetores virais, o que é um benefício visto que os efeitos dos ASOs são reversíveis (Rook & Southwell, 2022; Tabrizi, Leavitt, *et al.*, 2019).

O Spiranza<sup>®</sup> (Nusinersen) é um ASO que foi aprovado para o tratamento da atrofia muscular espinhal o que demonstra o potencial que a terapia usando ASOs tem para as doenças neurodegenerativas (Messina e Sframeli, 2020). Estudos já realizados demonstraram que a infusão intraventricular de um ASO não alelo-seletivo reduziu a expressão tanto do mRNA da HTT selvagem como do mRNA da HTT mutada e de Htt, levando a uma melhoria nos sintomas motores, diminuição da desregulação transcricional e aumento da esperança média de vida (Kordasiewicz *et al.*, 2012). Noutro ensaio realizado pela Wave Life Sciences Ltd, foi utilizado um ASO alelo-seletivo que tem como alvos os SNPI e SNP2 do mRNA de mHTT. Este estudo demonstrou uma redução de 12,4% da mHtt no LCR enquanto o NfL e a Htt no LCR permaneceram inalterados, no entanto este estudo foi terminado por falta de eficácia (Wave Life Sciences Announces Topline Data and Addition Of).

Num ensaio desenvolvido pela Ionis Pharmaceuticals, em que foi utilizado um ASO não alelo-seletivo (ASO IONIS-HTTRx), cada doente recebeu uma dose diferente de ASOs, em quatro injeções intratecais da terapia ou do controlo durante 4 semanas. Neste ensaio foi demonstrado que o ASO foi bem tolerado, não havendo efeitos adversos em relação à terapia e mostrando uma redução de 40% da mHtt no LCR de indivíduos com DH numa fase inicial. O modelo pré-clínico farmacocinético/farmacodinâmico sugere que uma redução de 40% no LCR equivale a uma diminuição de 55-70% de mHtt na região cortical e de 20-35% na região do corpo estriado (Smith e Tabrizi, 2020). No entanto, não foram reportadas diferenças significativas nas funções cognitivas, psiquiátricas e neurológicas, entre os grupos que receberam a terapia e os grupos do placebo, embora este ensaio clínico tenha sido realizado apenas para avaliar a segurança da terapia (Tabrizi, Leavitt, *et al.*, 2019). O curto espaço de tempo durante o qual tipicamente um ensaio clínico é realizado dificulta a avaliação de

alterações clínicas, pois a progressão da doença demora anos e não meses (Tabrizi, Leavitt, et al., 2019).

### 3.2.1.2. Interferência de RNA (RNAi)

Outra terapia com foco no RNA, é a que usa a RNAi. As terapias baseadas em RNAi envolvem mecanismos endógenos e evolutivamente conservados no citoplasma da célula para promover a degradação de mRNA alvo (Tabrizi et al., 2019). O processo de RNAi pode ser mediado por três moléculas, tais como microRNA (miRNA), *short interfering RNA* (siRNA) e *short hairpin RNA* (shRNA), pois apesar do processo de biogênese destas moléculas ser diferente, elas usam a mesma via de RNAi. O mecanismo geral da RNAi (Anexo 2) envolve a clivagem de RNAs longos de cadeia dupla (dsRNA) pela endonuclease Dicer e formação, à posteriori, de fragmentos de RNA de cadeia simples. As cadeias antisense ou guias desses fragmentos são incorporadas no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) que se irá ligar ao mRNA complementar alvo. Quando a sequência alvo é reconhecida, esta é clivada pela RNase Argonata 2 do complexo RISC, o que resulta num silenciamento do gene e à posteriori uma diminuição da expressão proteica (Ahmadzada et al., 2018; Tabrizi et al., 2020; Vázquez-Mojena et al., 2021).

Relativamente à sua origem os miRNAs podem ser de origem sintética ou natural, enquanto os siRNA são tipicamente de origem sintética. Os siRNAs diferem dos miRNA pois são originários de RNAs de cadeia dupla, e ao contrário dos miRNAs não formam *estruturas em gancho de cabelo*. Os siRNAs têm mais especificidade para o alvo, baixa toxicidade e complementaridade perfeita com a sequência de mRNA, inibindo a expressão de um mRNA específico por clivagem, enquanto os miRNA tem complementaridade parcial com o RNA alvo o que permite a supressão completa de múltiplos alvos de mRNA. Ambos os RNAs têm de ser entregues através de um vetor, por exemplo através de um vírus adeno-associado (AAV) ou um vetor lentiviral, podendo estes necessitar de ser administrados nas regiões alvo do cérebro pois em muitos casos não atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) (Tabrizi et al., 2019, 2020).

Foi demonstrado pela primeira vez que o RNAi, diminuía os níveis de HTT em modelos celulares (Chen et al., 2005). O primeiro estudo realizado *in vivo*, demonstrou que a administração bilateral no estriado de shRNAs entregues por um vetor AAV, num modelo de murganhos (modelo N171-82Q), diminui os níveis de mHtt em 55% e melhorou a função motora (Harper et al., 2005). Outro estudo, também em murganhos, revelou que o uso de siRNA, reduziu a expressão de HTT e melhorou o fenótipo e a neuropatologia da DH (DiFiglia

et al., 2007; Wang et al., 2005). Um estudo utilizando microRNAs artificiais mediados por um vetor AAV do tipo 1/2 direcionado para o exão 2 do HTT demonstrou menor toxicidade do que os vetores shRNA, também demonstrou uma melhoria comportamental e maior esperança de vida em murganhos. Este estudo revelou ainda que o cérebro de mamíferos tolera, durante vários meses, uma diminuição de cerca de 75% dos níveis de expressão de htt, o que se torna um facto surpreendente, devido ao papel importante que desenvolve em vários processos celulares (Boudreau et al., 2009).

A UniQure está a desenvolver o primeiro ensaio clínico, em humanos, em que se usa um vetor AAV numa terapia para o tratamento da DH, o que irá permitir aprender mais sobre a viabilidade, segurança e eficácia desta terapia. O ensaio clínico em desenvolvimento tem o intuito de verificar a segurança, a tolerabilidade e eficácia de AMT-130, que consiste num AAV5 com um micro-RNA artificial que irá silenciar o *wild-type* HTT e o mHTT (Rodrigues & Wild, 2020). Em modelos animais, mais precisamente em murganhos, a injeção intracraniana bilateral no estriado de AMT-130 melhorou a neuropatologia da doença e reduziu os níveis de HTT em comparação com o controlo e em modelos de miniporco com DH, o AMT-130 também reduziu os níveis de HTT no núcleo estriado (Evers et al., 2018; Miniarikova et al., 2017).

### **3.2.2. Estratégias direcionadas para o DNA - edição de genes**

Nos dias de hoje, as abordagens à base de DNA podem atuar tanto através da regulação da transcrição do gene ou pela edição do genoma, através da modificação direta do gene. Estas abordagens combinam um elemento específico de ligação ao DNA, que permite uma ligação eficiente e precisa no DNA alvo, com um elemento efetor, que altera a sequência ou expressão do gene, como nucleases, moduladores epigenéticos ou fatores de transcrição (Tabrizi, Ghosh e Leavitt, 2019).

Uma destas abordagens é a CRISPR/Cas9, do tipo II, que funciona como um sistema imune adaptativo das bactérias e *Archea*, que reconhece e destrói DNA estranho em células procarióticas. CRISPR significa Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas e a Cas9 é uma nucleasse guiada por RNA que cliva a cadeia dupla de DNA em lugares específicos (Tabrizi, Ghosh e Leavitt, 2019).

O sistema tradicional CRISPR/Cas9 foi originalmente descrito em *Escherichia coli*. A memória imunológica provém da clivagem do DNA em pequenos segmentos espaçadores derivados de genoma exógeno, que posteriormente são incorporados no CRISPR *locus*. O *locus* é transcrito em pré-CRISPR RNA (pré-crRNA), a *trans-activating* CRISPR RNA

(tracrRNA) ativa a ribonuclease do hospedeiro (RNase) III, o que faz com que o pré-crRNA sofra um processo de maturação e forme o CRISPR RNA (crRNA). O crRNA e o tracrRNA são unidos e formam um complexo que irá reconhecer a sequência na proximidade do *protospacer adjacent motif* (PAM) e em seguida a Cas é guiada para cortar uma sequência específica o que resulta na degradação do DNA (Guan *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2021).

Este sistema foi mais tarde adaptado para ser usado em células eucarióticas, para o que foi criada uma guia simples de RNA (sgRNA), que tem entre 16 e 20 nucleótidos e é uma forma híbrida do complexo crRNA-tracrRNA. Tem especificidade para uma sequência alvo complementar e liga-se a esta levando consigo a Cas9, esta ligação só acontece na presença de um PAM na região adjacente. Quando a Cas9 se liga ao DNA alvo esta sofre uma mudança conformacional e cliva a dupla cadeia de DNA em zonas específicas, o seu domínio HNH cliva a cadeia complementar e o domínio RuvC cliva a cadeia não complementar. De seguida, a reparação do genoma danificado pode ser feita de duas maneiras, nomeadamente através de recombinação homóloga (HDR) e recombinação não homóloga (NHEJ) (Cheng, Zhang e Ding, 2021).

Os estudos que recorrem ao uso da CRISPR/Cas9 para o tratamento da DH ainda estão em desenvolvimento pré-clínico, mas têm potencial terapêutico (Tabrizi, Ghosh e Leavitt, 2019). No entanto, já foi demonstrado, em estudos de linhas não neuronais humanas, que a técnica não catalítica de CRISPR/Cas9, bloqueou a transcrição do HTT (Heman-Ackah, Bassett e Wood, 2016). A CRISPR-Cas9, também mostrou tanto em fibroblastos de doentes com HD como em modelos animais diminuir a expressão de mHtt (Shin *et al.*, 2016). Noutro estudo foi demonstrado que este sistema inativou a expressão de mHtt, tanto em células-estaminais pluripotentes induzidas humanas como no cérebro de um modelo de murghanos, através da inativação seletiva de alelos CAG expandidos visando SNPs associados (Monteys *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017).

### **3.3. Limitações/Desafios**

As terapias apresentadas têm algumas limitações, nomeadamente na entrega e nos efeitos *off-target*. Espera-se que estes desafios venham a ser ultrapassados de modo a otimizar estas terapias para que assim tenham sucesso em ensaios clínicos e à posteriori possam ser utilizadas no tratamento de doenças neurodegenerativas, como a DH.

As terapias à base de ASOs não necessitam de vetores virais, logo os efeitos desta terapia na expressão génica são reversíveis. No entanto, uma desvantagem é que necessitam de várias administrações para manter os níveis terapêuticos, o que poderá causar efeitos

adversos relacionados com a exposição prolongada aos ASOs ou mesmo devido às injeções por punção lombar repetidas (Tabrizi *et al.*, 2020).

Por outro lado, também têm algumas limitações como o facto dos ASOs não serem adequados para administração oral pois não atravessam a BHE, mas são solubilizados no LCR logo podem ser entregues diretamente no SNC através de injeção intratecal, ou intraventricular (Tabrizi, Ghosh e Leavitt, 2019). Os níveis de ASOs são mais altos nas regiões do cérebro que estão junto ao LCR, uma vez que a sua distribuição é afetada pela dinâmica do LCR, pela anatomia do espaço intratecal, pelo volume injetado e pela depuração (Hesterman *et al.*, 2016). Por estas razões, os ASOs dificilmente atingem o corpo estriado, pois é uma zona profunda do cérebro e de difícil acesso através do LCR, logo no caso da DH a diminuição de Htt no corpo estriado é menor do que no córtex, facto este que foi comprovado num estudo em primatas não humanos, que receberam uma terapia de ASOs através de uma injeção intratecal em que houve uma redução de 50% de Htt no córtex e uma redução de apenas 15 a 20% de Htt no corpo estriado (Komatsu, 2021; Leavitt *et al.*, 2016).

Uma das limitações para o desenvolvimento das terapias de RNAi é a entrega de siRNAs livres, pois estes não atravessam a BHE, nem penetram a membrana celular. Por essa razão necessitam de vetores virais como os AAVs ou LVs, muitas vezes administrados por neurocirurgia estereotáxica, o que constitui uma desvantagem pois é uma técnica muito invasiva, com risco de infeções e por outro lado o doente pode desenvolver uma reação imunitária à administração que pode levar à morte (Komatsu, 2021). No entanto têm vindo a ser estudados vetores virais que podem entregar RNAi por administração intravenosa periférica e assim atravessar a BHE, tais como o AAV9 (Foust *et al.*, 2008) e o AAV-PHP (Matsuzaki *et al.*, 2018). Um estudo realizado em murganhos transgénicos, com a administração de um AAV9 expressando um miRNA por injeção intravenosa, demonstrou uma diminuição de mHtt em todas as regiões do cérebro e diminuição da atrofia no córtex e no estriado (Dufour *et al.*, 2014).

Recentemente, foi desenvolvido um novo vetor viral capaz de atravessar a BHE de forma eficiente e que tem um fenótipo para tipos específicos de células, o AAV.CAP.B10. Em estudos realizados em murganhos e primatas não humanos este vetor exhibe uma especificidade para os neurónios, sendo a entrega com este vetor menor em órgãos periféricos como o fígado (Goertsen *et al.*, 2021). Outra limitação da terapia de RNAi é que muitas pessoas têm anticorpos para alguns serotipos de AAV, o que leva à neutralização do vetor viral (Tabrizi *et al.*, 2019). Outros desafios no desenvolvimento desta terapia são os efeitos *off-target*, a sobrecarga da via de degradação de RNAi e imunogenicidade (Milone e O'Doherty, 2018; Tabrizi *et al.*, 2020).

As limitações das estratégias de edição de genoma, como a CRISPR/Cas9 é que requerem na maioria entrega viral, atingem apenas certas zonas do cérebro e necessitam de um PAM específico que esteja adjacente à sequência de DNA alvo. Outras preocupações são os efeitos *off-target* noutras partes do genoma, mutagénese insercional e imunogenicidade causada pelos vetores virais que são necessários para a entrega da terapêutica e a expressão prolongada de nucleases, como a Cas9. Para ultrapassar a expressão prolongada da Cas9 foi desenvolvido o KamiCas9, um sistema de edição auto-inativado de Cas9 de modo a obter uma expressão transitória de proteína Cas9, alta eficiência na edição, diminuição da frequência *off-target* e assim melhorar a segurança da terapia (Merienne *et al.*, 2017). Outra estratégia recorre à utilização duma *Nuclease-dead Cas9* (dCas9), que é uma Cas9 mutante em que os domínios catalíticos da nuclease estão inativos, logo esta não corta o DNA apenas se liga a este e bloqueia a transcrição da célula, inibindo a expressão do gene (Moradpour e Abdulah, 2020).

#### 4. ENSAIOS CLÍNICOS

Nos dias de hoje, o foco dos ensaios clínicos na DH encontra-se direcionado para terapias genéticas, como o silenciamento dos genes ou estratégias destinadas a diminuir a produção de mHtt (Komatsu, 2021). Apesar de alguns estudos não terem sido bem-sucedidos (refs), estão em curso ensaios clínicos promissores no desenvolvimento de uma terapia que ajude a prevenir a doença ou a retardar a sua progressão (Komatsu, 2021). No Anexo 3 resumem-se os ensaios em curso, com foco nas terapias baseadas em RNA, nomeadamente ASOs e miRNA (Estevez-Fraga *et al.*, 2022).

A UniQure está a desenvolver um estudo de fase I/2 randomizado, duplamente cego para investigar a segurança, tolerabilidade e eficácia de uma injeção bilateral única no núcleo estriado de AMT-130 em adultos com DH num estado inicial em comparação com uma injeção simulada. O AMT-130 consiste num vetor viral adeno-associado do tipo 5 (AAV5) com um miRNA artificial (AAV5-miHTT) e tem o intuito de silenciar tanto a HTT selvagem como a mHTT e assim inibir a produção de mHtt. O AMT-130 é administrado numa dose única, no núcleo caudado e putamen, através de uma cirurgia cerebral guiada por ressonância magnética. O AAV5 irá atuar como sistema de entrega, do DNA dum miRNA, que vai ser entregue às células alvo passando a ser expresso por estas. O miRNA ao ser expresso irá reconhecer e ligar-se ao mRNA da mHtt e levar à sua degradação e bloqueio da sua tradução (Rodrigues & Wild, 2020; Safety and Proof-of-Concept (POC) Study With AMT-130 in Adults With Early Manifest Huntington Disease - ClinicalTrials.Gov).

Recentemente a UniQure publicou resultados preliminares do seu ensaio clínico de fase I/2 da terapia gênica AMT-130 para o tratamento da DH. Segundo os resultados apresentados o tratamento com AMT-130, de baixa dose, foi bem tolerado e não foram reportados efeitos adversos em relação à terapia. Revelaram também que houve uma redução de mais de 50% de mHTT no LCR e que a NfL no LCR estava perto da linha de base após 12 meses do início da terapia com AMT-130 (*uniQure Announces Update on Low-Dose Cohort in Phase III*). No entanto mais tarde, a UniQure veio a reportar que alguns doentes tratados com AMT-130, de dose mais elevada, reportaram graves efeitos adversos logo após a cirurgia para a injeção da terapia, com inchaço e dores fortes de cabeça, o que levou ao adiamento temporário do tratamento até que aja uma revisão da sua segurança (*Press Releases | Investors & Media | uniQure; Serious side effects reported for some people treated with the huntingtin-lowering drug AMT-130, currently in clinical trials - HDBuzz - Huntington's disease research news.*).

Outra terapia está a ser desenvolvida pela Wave Life Sciences Ltd. O ensaio SELECT-HD com a finalidade de diminuir a mHtt é um estudo multicêntrico, randomizado, duplamente-cego, controlado por placebo de fase I/2 para avaliar a segurança, tolerabilidade, farmacocinética e farmacodinâmica do WVE-003 em doentes com DH em fase inicial (*Study of WVE-003 in Patients With Huntington's Disease - Full Text View - ClinicalTrials.gov*). O WVE-003 é um ASO que tem como alvo o SNP3, uma variante alélica ligada ao trato de repetição CAG expandido no pré-mRNA do HTT, presente em adultos com HD. Neste estudo, o WVE-003 integra um esqueleto contendo fosforil guanidina que aumenta a exposição tecidual, o tempo de semi-vida no SNC e a potência do ASO em comparação com outras moléculas semelhantes usadas pela Wave (Estevez-Fraga *et al.*, 2022).

Por fim, outro estudo que estava a ser desenvolvido, pela Roche, que também usa um terapia ASO é o GENERATION-HDI que consiste num ensaio estudo clínico randomizado, multicêntrico e duplamente-cego de fase 3 para avaliar a eficácia e a segurança de um administração intratecal de RO7234292 (RG6042) em comparação com um placebo em adultos com HD (*A Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Intrathecally Administered RO7234292 (RG6042) in Participants With Manifest Huntington's Disease - ClinicalTrials.Gov*). O RG6042, mais conhecido por Tominersen, é um ASO que se liga ao mRNA do HTT, visando a sua degradação e assim diminuindo a produção de mHtt. Os participantes recebiam uma dose de 120mg a cada dois meses ou a cada quatro meses com injeções através da coluna no líquido cefalorraquidiano de Tominersen ou placebo (Estevez-Fraga *et al.*, 2022).

Este estudo, foi descontinuado em 2021, pelo Comité Independente de Monitorização de Dados devido a uma avaliação negativa do perfil de risco/benefício, pois apesar de haver

diminuição de mHTT no líquido cefalorraquidiano houve um aumento de reações adversas, nomeadamente reações inflamatórias e casos de hidrocefalia. No entanto, a Roche está a desenvolver um novo ensaio clínico de fase 2, para doentes mais jovens e com doses mais baixas para encontrar uma nova janela terapêutica para este composto (Estevez-Fraga *et al.*, 2022).

## 5. CONCLUSÃO

Desde a identificação do HTT e da mutação em 1993, há cerca de 30 anos, muito se tem aprendido acerca da patologia da DH. Apesar de atualmente apenas haver tratamento para a sintomatologia, muitos são os ensaios clínicos com terapias inovadoras que estão a decorrer que poderão tornar-se revolucionárias para o tratamento da DH num futuro próximo (Ghosh e Tabrizi, 2018).

A descoberta de biomarcadores que acompanham a progressão da doença e os testes genéticos vieram permitir a monitorização das diferentes fases da doença, possibilitando que no futuro seja possível prever o aparecimento dos sintomas e assim iniciar o tratamento antes que estes surjam de modo a prevenir a neurodegenerescência (Tabrizi, Ghosh e Leavitt, 2019).

As terapias génicas, tanto as com base no RNA, como os ASOs e o RNAi, como as com base no DNA, como a CRISPR/Cas9 são estratégias terapêuticas inovadoras que estão a ser investigadas e que podem vir a ser muito promissoras para o alívio da DH. Um dos grandes desafios desta terapêutica é a sua entrega e distribuição no cérebro, no entanto a administração intratecal de ASOs e a administração intracraniana de vetores virais para RNAi demonstraram ter potencial de translação clínica (Tabrizi, Ghosh e Leavitt, 2019). Algumas destas terapêuticas já estão a ser investigadas em ensaios clínicos, enquanto outras ainda estão em ensaios pré-clínicos mas com resultados promissores. O objetivo destas terapias é melhorar a qualidade de vida dos doentes, aumentar a esperança média de vida dos mesmos e evitar a progressão ou até mesmo curar a DH (Pan e Feigin, 2021).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**A Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Intrathecally Administered RO7234292 (RG6042) in Participants With Manifest Huntington's Disease** - Full Text View - ClinicalTrials.gov - [Consultado a 9 julho de 2022]. Disponível em: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03761849?recrs=abdf&type=Intr&cond=Huntington+Disease&draw=2&rank=20>.

AHMADZADA, Tamkin; REID, Glen; MCKENZIE, David R. - **Fundamentals of siRNA and miRNA therapeutics and a review of targeted nanoparticle delivery systems in breast cancer**. *Biophysical Reviews* 2018 10:1. . ISSN 1867-2469. 10:1 (2018) 69–86. doi: 10.1007/S12551-017-0392-1.

AKHTAR, Naveed *et al.* - **Gene therapy: A review article**. *Fly Journal of Medicinal Plants Research*. . ISSN 1996-0875. 5:10 (2011) 1812–1817.

AZIZ, N. A. *et al.* - **Weight loss in Huntington disease increases with higher CAG repeat number**. *Neurology*. . ISSN 0028-3878. 71:19 (2008) 1506–1513. doi: 10.1212/01.WNL.0000334276.09729.0E.

BAE, Byoung Il *et al.* - **p53 Mediates Cellular Dysfunction and Behavioral Abnormalities in Huntington's Disease**. *Neuron*. . ISSN 0896-6273. 47:1 (2005) 29–41. doi: 10.1016/J.NEURON.2005.06.005.

BATES, Gillian P. *et al.* - **Huntington disease**. *Nature Reviews Disease Primers* 2015 1:1. . ISSN 2056-676X. 1:1 (2015) 1–21. doi: 10.1038/nrdp.2015.5.

BOUDREAU, Ryan L. *et al.* - **Nonallele-specific silencing of mutant and wild-type huntingtin demonstrates therapeutic efficacy in Huntington's disease mice**. *Molecular Therapy*. . ISSN 15250016. 17:6 (2009) 1053–1063. doi: 10.1038/MT.2009.17/ATTACHMENT/37A46542-A482-45F1-83F1-D4F9C7E67B1A/MMC6.XLS.

BROWNE, Susan E. *et al.* - **Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: Selective vulnerability of the basal ganglia**. *Annals of Neurology*. . ISSN 1531-8249. 41:5 (1997) 646–653. doi: 10.1002/ANA.410410514.

BYRNE, Lauren M. *et al.* - **Neurofilament light protein in blood as a potential biomarker of neurodegeneration in Huntington's disease: a retrospective cohort analysis**. *The Lancet Neurology*. . ISSN 14744465. 16:8 (2017) 601–609. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30124-2/ATTACHMENT/073CC8BB-70B9-4D82-91A3-4E6B2BA3FEC4/MMC1.PDF.

BYRNE, Lauren M. *et al.* - **Evaluation of mutant huntingtin and neurofilament proteins as potential markers in Huntington's disease.** *Science Translational Medicine.* . ISSN 19466242. 10:458 (2018). doi: 10.1126/SCITRANSLMED.AAT7108/SUPPL\_FILE/AAT7108\_SM.PDF.

CHEN, Zongyu J. *et al.* - **Sleeping Beauty-mediated down-regulation of huntingtin expression by RNA interference.** *Biochemical and Biophysical Research Communications.* . ISSN 0006-291X. 329:2 (2005) 646–652. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.02.024.

CHENG, Hao; ZHANG, Feng; DING, Yang - **CRISPR/Cas9 Delivery System Engineering for Genome Editing in Therapeutic Applications.** *Pharmaceutics.* . ISSN 19994923. 13:10 (2021). doi: 10.3390/PHARMACEUTICS13101649.

CLAASSEN, Daniel O. *et al.* - **Genotyping single nucleotide polymorphisms for allele-selective therapy in Huntington disease.** *Neurology Genetics.* . ISSN 2376-7839. 6:3 (2020). doi: 10.1212/NXG.0000000000000430.

DIFIGLIA, M. *et al.* - **Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* . ISSN 00278424. 104:43 (2007) 17204. doi: 10.1073/PNAS.0708285104.

DIRECTIVE 2001/83/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL OF 6 NOVEMBER 2001).

DRAGATIS, Ioannis; LEVINE, Michael S.; ZEITLIN, Scott - **Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice.** *Nature genetics.* . ISSN 1061-4036. 26:3 (2000) 300–306. doi: 10.1038/81593.

DUFF, Kevin *et al.* - **«Frontal» behaviors before the diagnosis of Huntington's disease and their relationship to markers of disease progression: Evidence of early lack of awareness.** *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences.* . ISSN 08950172. 22:2 (2010) 196–207. doi: 10.1176/JNP.2010.22.2.196.

DUFOUR, Brett D. *et al.* - **Intrajugular Vein Delivery of AAV9-RNAi Prevents Neuropathological Changes and Weight Loss in Huntington's Disease Mice.** *Molecular Therapy.* . ISSN 1525-0016. 22:4 (2014) 797–810. doi: 10.1038/MT.2013.289.

DUIJN, Erik VAN *et al.* - **Neuropsychiatric symptoms in a European Huntington's disease cohort (REGISTRY).** *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry.* . ISSN 0022-3050. 85:12 (2014) 1411–1418. doi: 10.1136/JNNP-2013-307343.

ESTÉVEZ-FRAGA, Carlos *et al.* - **Therapeutic advances in Huntington's disease.** <https://doi.org/10.1080/21678707.2016.1196128>. . ISSN 21678707. 4:8 (2016) 809–821. doi: 10.1080/21678707.2016.1196128.

ESTEVEZ-FRAGA, Carlos *et al.* - **Huntington's Disease Clinical Trials Corner: April 2022.** *Journal of Huntington's Disease.* . ISSN 1879-6397. 11:2 (2022) 105–118. doi: 10.3233/JHD-229002.

EVERS, Melvin M. *et al.* - **AAV5-miHTT Gene Therapy Demonstrates Broad Distribution and Strong Human Mutant Huntingtin Lowering in a Huntington's Disease Minipig Model.** *Molecular Therapy.* . ISSN 15250024. 26:9 (2018) 2163. doi: 10.1016/j.YMTHE.2018.06.021.

FIELDS, Eric *et al.* - **Gene targeting techniques for Huntington's disease.** *Ageing Research Reviews.* . ISSN 1568-1637. 70:2021) 101385. doi: 10.1016/j.ARR.2021.101385.

FODALE, Valentina *et al.* - **Validation of Ultrasensitive Mutant Huntingtin Detection in Human Cerebrospinal Fluid by Single Molecule Counting Immunoassay.** *Journal of Huntington's Disease.* . ISSN 1879-6397. 6:4 (2017) 349–361. doi: 10.3233/JHD-170269.

FOUST, Kevin D. *et al.* - **Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes.** *Nature Biotechnology* 2008 27:1. . ISSN 1546-1696. 27:1 (2008) 59–65. doi: 10.1038/nbt.1515.

GAUTHIER, Laurent R. *et al.* - **Huntingtin Controls Neurotrophic Support and Survival of Neurons by Enhancing BDNF Vesicular Transport along Microtubules.** *Cell.* . ISSN 0092-8674. 118:1 (2004) 127–138. doi: 10.1016/j.CELL.2004.06.018.

GHOSH, Rhia; TABRIZI, Sarah J. - **Huntington disease.** *Handbook of Clinical Neurology.* . ISSN 0072-9752. 147:2018) 255–278. doi: 10.1016/B978-0-444-63233-3.00017-8.

GOERTSEN, David *et al.* - **AAV capsid variants with brain-wide transgene expression and decreased liver targeting after intravenous delivery in mouse and marmoset.** *Nature Neuroscience.* . ISSN 1097-6256. 25:1 (2021) 106–115. doi: 10.1038/S41593-021-00969-4.

GRIMA, Jonathan C. *et al.* - **Mutant Huntingtin Disrupts the Nuclear Pore Complex.** *Neuron.* ISSN 10974199. 94:1 (2017) 93-107.e6. doi: 10.1016/j.NEURON.2017.03.023/ATTACHMENT/B427658B-3683-4DB5-8C75-FB50A1E5DD0A/MMC1.PDF.

GUAN, Lihong *et al.* - **CRISPR-Cas9-Mediated Gene Therapy in Neurological Disorders.** *Molecular Neurobiology* 2021 59:2. . ISSN 1559-1182. 59:2 (2021) 968–982. doi: 10.1007/S12035-021-02638-W.

HAMILTON, Joanne M. *et al.* - **Behavioural abnormalities contribute to functional decline in Huntington's disease.** *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry.* . ISSN 0022-3050. 74:1 (2003) 120–122. doi: 10.1136/JNNP.74.1.120.

HARDING, Rachel J.; TONG, Yu Feng - **Proteostasis in Huntington's disease: disease mechanisms and therapeutic opportunities.** *Acta Pharmacologica Sinica* 2018 39:5. . ISSN 1745-7254. 39:5 (2018) 754–769. doi: 10.1038/aps.2018.11.

HARPER, Scott Q. *et al.* - **RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* . ISSN 00278424. 102:16 (2005) 5820–5825. doi: 10.1073/PNAS.0501507102/ASSET/D8CDF78E-56AC-4DB6-BD21-C4F2C3B6C916/ASSETS/GRAPHIC/ZPQ0150579450004.JPEG.

HEMAN-ACKAH, Sabrina Mahalia; BASSETT, Andrew Roger; WOOD, Matthew John Andrew - **Precision Modulation of Neurodegenerative Disease-Related Gene Expression in Human iPSC-Derived Neurons.** *Scientific Reports.* . ISSN 20452322. 6:2016). doi: 10.1038/SREP28420.

HEO, Young A.; SCOTT, Lesley J. - **Deutetrabenazine: A Review in Chorea Associated with Huntington's Disease.** *Drugs* 2017 77:17. . ISSN 1179-1950. 77:17 (2017) 1857–1864. doi: 10.1007/S40265-017-0831-0.

HESTERMAN, J. Y. *et al.* - **Dynamic dual-isotope molecular imaging elucidates principles for optimizing intrathecal drug delivery.** *JCI Insight.* . ISSN 0021-9738. 1:2 (2016) 85311. doi: 10.1172/JCI.INSIGHT.85311.

HO, Aileen K. *et al.* - **Health-related quality of life in Huntington's disease: Which factors matter most?** *Movement Disorders.* . ISSN 1531-8257. 24:4 (2009) 574–578. doi: 10.1002/MDS.22412.

HOOGEVEEN, André T. *et al.* - **Characterization and localization of the Huntington disease gene product.** *Human Molecular Genetics.* . ISSN 0964-6906. 2:12 (1993) 2069–2073. doi: 10.1093/HMG/2.12.2069.

JOHNSON, Eleanoir B. *et al.* - **Neurofilament light protein in blood predicts regional atrophy in Huntington disease.** *Neurology*. . ISSN 0028-3878. 90:8 (2018) e717–e723. doi: 10.1212/WNL.0000000000005005.

JOHRI, Ashu; CHANDRA, Abhishek; BEAL, M. Flint - **PGC-1 $\alpha$ , mitochondrial dysfunction, and Huntington's disease.** *Free Radical Biology and Medicine*. . ISSN 0891-5849. 62:2013) 37–46. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.016.

JONES, Lesley; HUGHES, Alis - **Pathogenic Mechanisms in Huntington's Disease.** *International Review of Neurobiology*. . ISSN 0074-7742. 98:2011) 373–418. doi: 10.1016/B978-0-12-381328-2.00015-8.

KAUFMANN, Kerstin B. *et al.* - **Gene therapy on the move.** *EMBO Molecular Medicine*. . ISSN 1757-4684. 5:11 (2013) 1642–1661. doi: 10.1002/emmm.201202287.

KAY, Chris *et al.* - **A Comprehensive Haplotype-Targeting Strategy for Allele-Specific HTT Suppression in Huntington Disease.** *The American Journal of Human Genetics*. . ISSN 0002-9297. 105:6 (2019) 1112–1125. doi: 10.1016/j.ajhg.2019.10.011.

KERYER, Guy *et al.* - **Ciliogenesis is regulated by a huntingtin-HAPI-PCMI pathway and is altered in Huntington disease.** *The Journal of Clinical Investigation*. . ISSN 0021-9738. 121:11 (2011) 4372–4382. doi: 10.1172/JCI57552.

KOMATSU, Hidetoshi - **Innovative Therapeutic Approaches for Huntington's Disease: From Nucleic Acids to GPCR-Targeting Small Molecules.** *Frontiers in Cellular Neuroscience*. . ISSN 16625102. 15:2021) 495. doi: 10.3389/fncel.2021.785703 /BIBTEX.

KORDASIEWICZ, Holly B. *et al.* - **Sustained Therapeutic Reversal of Huntington's Disease by Transient Repression of Huntingtin Synthesis.** *Neuron*. . ISSN 08966273. 74:6 (2012) 1031–1044. doi: 10.1016/j.neuron.2012.05.009/ATTACHMENT/A7465E0D-3583-49FB-847F-03D07AC4A651/MMCI.PDF.

LANDLES, Christian; BATES, Gillian P. - **Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease.** *EMBO reports*. . ISSN 1469-3178. 5:10 (2004) 958–963. doi: 10.1038/SJ.EMBOR.7400250.

LANSKA, Douglas J. *et al.* - **Conditions Associated With Huntington's Disease at Death: A Case-Control Study.** *Archives of Neurology*. . ISSN 0003-9942. 45:8 (1988) 878–880. doi: 10.1001/ARCHNEUR.1988.00520320068017.

LEAVITT, Blair *et al.* - **Discovery and Early Clinical Development of ISIS-HTTRx, the First HTT-Lowering Drug to Be Tested in Patients with Huntington's Disease (PL01.002).** *Neurology*. 86:16 Supplement (2016).

MARTIN, Dale D. O. *et al.* - **Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy.** *Trends in Neurosciences*. . ISSN 0166-2236. 38:1 (2015) 26–35. doi: 10.1016/j.TINS.2014.09.003.

MATSUZAKI, Yasunori *et al.* - **Intravenous administration of the adeno-associated virus-PHP.B capsid fails to upregulate transduction efficiency in the marmoset brain.** *Neuroscience Letters*. . ISSN 0304-3940. 665:2018) 182–188. doi: 10.1016/j.NEULET.2017.11.049.

MCCOLGAN, P.; TABRIZI, S. J. - **Huntington's disease: a clinical review.** *European Journal of Neurology*. . ISSN 1468-1331. 25:1 (2018) 24–34. doi: 10.1111/ENE.13413.

MERIENNE, Nicolas *et al.* - **The Self-Inactivating KamiCas9 System for the Editing of CNS Disease Genes.** *Cell Reports*. . ISSN 2211-1247. 20:12 (2017) 2980–2991. doi: 10.1016/j.CELREP.2017.08.075.

MESSINA, Sonia; SFRAMELI, Maria - **New Treatments in Spinal Muscular Atrophy: Positive Results and New Challenges.** *Journal of Clinical Medicine* 2020, Vol. 9, Page 2222. . ISSN 2077-0383. 9:7 (2020) 2222. doi: 10.3390/JCM9072222.

MILONE, Michael C.; O'DOHERTY, Una - **Clinical use of lentiviral vectors.** *Leukemia*. . ISSN 14765551. 32:7 (2018) 1529. doi: 10.1038/S41375-018-0106-0.

MINIARIKOVA, J. *et al.* - **AAV5-miHTT gene therapy demonstrates suppression of mutant huntingtin aggregation and neuronal dysfunction in a rat model of Huntington's disease.** *Gene Therapy*. . ISSN 14765462. 24:10 (2017) 630. doi: 10.1038/GT.2017.71.

MONTEYS, Alex Mas *et al.* - **CRISPR/Cas9 Editing of the Mutant Huntingtin Allele In Vitro and In Vivo.** *Molecular Therapy*. . ISSN 1525-0016. 25:1 (2017) 12–23. doi: 10.1016/j.YMTHE.2016.11.010.

MORADPOUR, Mahdi; ABDULAH, Siti Nor Akmar - **CRISPR/dCas9 platforms in plants: strategies and applications beyond genome editing.** *Plant Biotechnology Journal*. . ISSN 1467-7652. 18:1 (2020) 32–44. doi: 10.1111/PBI.13232.

NIEMELÄ, Valter *et al.* - **Tau or neurofilament light—Which is the more suitable biomarker for Huntington’s disease?** PLOS ONE. . ISSN 1932-6203. 12:2 (2017) e0172762. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0172762.

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J. - **Dysregulation of synaptic proteins, dendritic spine abnormalities and pathological plasticity of synapses as experience-dependent mediators of cognitive and psychiatric symptoms in Huntington’s disease.** Neuroscience. . ISSN 0306-4522. 251:2013) 66–74. doi: 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2012.05.043.

PAN, Ling; FEIGIN, Andrew - **Huntington’s Disease: New Frontiers in Therapeutics.** Current Neurology and Neuroscience Reports 2021 21:3. . ISSN 1534-6293. 21:3 (2021) 1–9. doi: 10.1007/S11910-021-01093-3.

PAULSEN, J. S. *et al.* - **Neuropsychiatric aspects of Huntington’s disease.** Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry. . ISSN 00223050. 71:3 (2001) 310–314. doi: 10.1136/JNPNP.71.3.310.

PAULSEN, Jane S. *et al.* - **Depression and stages of Huntington’s disease.** Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences. . ISSN 08950172. 17:4 (2005) 496–502. doi: 10.1176/JNP.17.4.496.

PAULSEN, Jane S. *et al.* - **Critical periods of suicide risk in Huntington’s disease.** American Journal of Psychiatry. . ISSN 0002953X. 162:4 (2005) 725–731. doi: 10.1176/APPI.AJP.162.4.725/ASSET/IMAGES/LARGE/N916F2.JPEG.

PAULSON, Henry - **Repeat expansion diseases.** Handbook of clinical neurology. . ISSN 22124152. 147:2018) 105. doi: 10.1016/B978-0-444-63233-3.00009-9.

PEAVY, Guerry M. *et al.* - **Cognitive and functional decline in Huntington’s disease: Dementia criteria revisited.** Movement Disorders. . ISSN 1531-8257. 25:9 (2010) 1163–1169. doi: 10.1002/MDS.22953.

Press Releases | Investors & Media | uniQure - [Consultado a 31 agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.uniqure.com/investors-media/press-releases>.

PRINGSHEIM, Tamara *et al.* - **The incidence and prevalence of Huntington’s disease: A systematic review and meta-analysis.** Movement Disorders. . ISSN 1531-8257. 27:9 (2012) 1083–1091. doi: 10.1002/MDS.25075.

RATOVITSKI, Tamara *et al.* - **Mutant Huntingtin N-terminal Fragments of Specific Size Mediate Aggregation and Toxicity in Neuronal Cells.** Journal of

Biological Chemistry. . ISSN 0021-9258. 284:16 (2009) 10855–10867. doi: 10.1074/JBC.M804813200.

RAWLINS, Michael D. *et al.* - **The Prevalence of Huntington's Disease.** Neuroepidemiology. . ISSN 0251-5350. 46:2 (2016) 144–153. doi: 10.1159/000443738.

REDDY, P. Hemachandra; SHIRENDEB, Ulziibat P. - **Mutant huntingtin, abnormal mitochondrial dynamics, defective axonal transport of mitochondria, and selective synaptic degeneration in Huntington's disease.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. . ISSN 0925-4439. 1822:2 (2012) 101–110. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.10.016.

REILMANN, Ralf; LEAVITT, Blair R.; ROSS, Christopher A. - **Diagnostic criteria for Huntington's disease based on natural history.** Movement Disorders. . ISSN 1531-8257. 29:11 (2014) 1335–1341. doi: 10.1002/MDS.26011.

REINER, Anton; DRAGATIS, Ioannis; DIETRICH, Paula - **GENETICS AND NEUROPATHOLOGY OF HUNTINGTON'S DISEASE.** International review of neurobiology. . ISSN 00747742. 98:2011) 325. doi: 10.1016/B978-0-12-381328-2.00014-6.

RINALDI, Carlo; WOOD, Matthew J. A. - **Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders.** Nature Reviews Neurology 2017 14:1. . ISSN 1759-4766. 14:1 (2017) 9–21. doi: 10.1038/nrneurol.2017.148.

RODRIGUES, Filipe B.; WILD, Edward J. - **Huntington's Disease Clinical Trials Corner: April 2020.** Journal of Huntington's Disease. . ISSN 1879-6397. 9:2 (2020) 185–197. doi: 10.3233/JHD-200002.

RODRIGUES, Filipe Brogueira *et al.* - **Cerebrospinal fluid total tau concentration predicts clinical phenotype in Huntington's disease.** Journal of Neurochemistry. . ISSN 1471-4159. 139:1 (2016) 22–25. doi: 10.1111/JNC.13719.

ROOK, Morgan E.; SOUTHWELL, Amber L. - **Antisense Oligonucleotide Therapy: From Design to the Huntington Disease Clinic.** BioDrugs 2022 36:2. . ISSN 1179-190X. 36:2 (2022) 105–119. doi: 10.1007/S40259-022-00519-9.

ROSENBLATT, A. *et al.* - **The association of CAG repeat length with clinical progression in Huntington disease.** Neurology. . ISSN 0028-3878. 66:7 (2006) 1016–1020. doi: 10.1212/01.WNL.0000204230.16619.D9.

ROSENBLATT, Adam *et al.* - **Age, CAG repeat length, and clinical progression in Huntington's disease.** *Movement Disorders.* . ISSN 1531-8257. 27:2 (2012) 272–276. doi: 10.1002/MDS.24024.

ROSENBLATT, Adam; LEROI, Iracema - **Neuropsychiatry of Huntington's Disease and Other Basal Ganglia Disorders.** *Psychosomatics.* . ISSN 0033-3182. 41:1 (2000) 24–30. doi: 10.1016/S0033-3182(00)71170-4.

**Safety and Proof-of-Concept (POC) Study With AMT-130 in Adults With Early Manifest Huntington Disease** - Full Text View - ClinicalTrials.gov - [Consultado a 9 julho de 2022]. Disponível em: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04120493?recrs=abdf&type=Intr&cond=Huntington+Disease&draw=2&rank=13>.

SATHASIVAM, Kirupa *et al.* - Aberrant splicing of HTT generates the pathogenic exon 1 protein in Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* . ISSN 00278424. 110:6 (2013) 2366–2370. doi: 10.1073/PNAS.1221891110/SUPPL\_FILE/PNAS.201221891SI.PDF.

SAUDOU, Frédéric; HUMBERT, Sandrine - **The Biology of Huntingtin.** *Neuron.* . ISSN 0896-6273. 89:5 (2016) 910–926. doi: 10.1016/J.NEURON.2016.02.003.

SCOLES, Daniel R.; MINIKEL, Eric V.; PULST, Stefan M. - **Antisense oligonucleotides.** *Neurology Genetics.* . ISSN 2376-7839. 5:2 (2019) 323. doi: 10.1212/NXG.0000000000000323.

**Serious side effects reported for some people treated with the huntingtin-lowering drug AMT-130, currently in clinical trials** - HDBuzz - Huntington's disease research news. -[Consultado a 31 agosto de 2022]. Disponível em: <https://en.hdbuzz.net/329>.

SHAHIM, Pashtun *et al.* - **Serum neurofilament light as a biomarker for mild traumatic brain injury in contact sports.** *Neurology.* . ISSN 0028-3878. 88:19 (2017) 1788–1794. doi: 10.1212/WNL.00000000000003912.

SHIN, Jun Wan *et al.* - **Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9.** *Human Molecular Genetics.* . ISSN 0964-6906. 25:20 (2016) 4566–4576. doi: 10.1093/HMG/DDW286.

SIESLING, Sabine *et al.* - **Unified Huntington's disease rating scale: A follow up.** *Movement Disorders.* . ISSN 1531-8257. 13:6 (1998) 915–919. doi: 10.1002/MDS.870130609.

SLOW, Elizabeth J. *et al.* - **Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease.** Human Molecular Genetics. . ISSN 0964-6906. 12:13 (2003) 1555–1567. doi: 10.1093/HMG/DDG169.

SMITH, Anne V.; TABRIZI, Sarah J. - **Therapeutic Antisense Targeting of Huntingtin.** DNA and Cell Biology. . ISSN 15577430. 39:2 (2020) 154–158. doi: 10.1089/DNA.2019.5188/ASSET/IMAGES/LARGE/DNA.2019.5188\_FIGURE2.JPEG.

SOOFIYANI, Saeideh Razi *et al.* - **Gene Therapy, Early Promises, Subsequent Problems, and Recent Breakthroughs.** Advanced Pharmaceutical Bulletin. . ISSN 22517308. 3:2 (2013) 249. doi: 10.5681/APB.2013.041.

ST-AMOUR, Isabelle *et al.* - **Co-occurrence of mixed proteinopathies in late-stage Huntington's disease.** Acta Neuropathologica 2017 135:2. . ISSN 1432-0533. 135:2 (2017) 249–265. doi: 10.1007/S00401-017-1786-7.

**Study of WVE-003 in Patients With Huntington's Disease** - Full Text View - ClinicalTrials.gov - [Consultado a 9 julho de 2022]. Disponível em: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05032196?recrs=abdf&type=Intr&cond=Huntington+Disease&draw=2&rank=9>.

TABRIZI, Sarah J. *et al.* - **Targeting Huntingtin Expression in Patients with Huntington's Disease.** New England Journal of Medicine. . ISSN 0028-4793. 380:24 (2019) 2307–2316. doi: 10.1056/NEJMOA1900907/SUPPL\_FILE/NEJMOA1900907\_DATA-SHARING.PDF.

TABRIZI, Sarah J. *et al.* - **Huntington disease: new insights into molecular pathogenesis and therapeutic opportunities.** Nature Reviews Neurology 2020 16:10. . ISSN 1759-4766. 16:10 (2020) 529–546. doi: 10.1038/s41582-020-0389-4.

TABRIZI, Sarah J.; GHOSH, Rhia; LEAVITT, Blair R. - **Huntingtin Lowering Strategies for Disease Modification in Huntington's Disease.** Neuron. . ISSN 0896-6273. 101:5 (2019) 801–819. doi: 10.1016/J.NEURON.2019.01.039.

THOMPSON, Jennifer C. *et al.* - **Longitudinal evaluation of neuropsychiatric symptoms in Huntington's disease.** Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences. . ISSN 08950172. 24:1 (2012) 53–60. doi: 10.1176/APPI.NEUROPSYCH.11030057/ASSET/IMAGES/LARGE/JNP00112-0463-T02.JPEG.

**uniQure Announces Update on Low-Dose Cohort in Phase I/II** - [Consultado a 15 julho de 2022]. Disponível em: <https://www.globenewswire.com/news-release/2022>

/06/23/2467860/0/en/uniQure-Announces-Update-on-Low-Dose-Cohort-in-Phase-I-II-Clinical-Trial-of-AMT-130-Gene-Therapy-for-the-Treatment-of-Huntington-s-Disease.html.

VÁZQUEZ-MOJENA, Yaimeé *et al.* - **Gene Therapy for Polyglutamine Spinocerebellar Ataxias: Advances, Challenges, and Perspectives.** *Movement Disorders.* . ISSN 1531-8257. 36:12 (2021) 2731–2744. doi: 10.1002/MDS.28819.

VIDENOVIC, Aleksandar *et al.* - **Daytime somnolence and nocturnal sleep disturbances in Huntington disease.** *Parkinsonism & Related Disorders.* . ISSN 1353-8020. 15:6 (2009) 471–474. doi: 10.1016/J.PARKRELDIS.2008.10.002.

VUONO, Romina *et al.* - **The role of tau in the pathological process and clinical expression of Huntington’s disease.** *Brain.* . ISSN 0006-8950. 138:7 (2015) 1907–1918. doi: 10.1093/BRAIN/AWV107.

WANG, Guohao *et al.* - **Ablation of huntingtin in adult neurons is nondeleterious but its depletion in young mice causes acute pancreatitis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* . ISSN 1091-6490. 113:12 (2016) 3359–3364. doi: 10.1073/PNAS.1524575113.

WANG, Yu Lai *et al.* - **Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington’s disease by siRNA.** *Neuroscience Research.* . ISSN 0168-0102. 53:3 (2005) 241–249. doi: 10.1016/J.NEURES.2005.06.021.

**Wave Life Sciences Announces Topline Data and Addition of** - [Consultado a 21 julho de 2022]. Disponível em: <https://www.globenewswire.com/en/news-release/2019/12/30/1964891/0/en/Wave-Life-Sciences-Announces-Topline-Data-and-Addition-of-Higher-Dose-Cohort-in-Ongoing-Phase-Ib-2a-PRECISION-HD2-Trial-in-Huntington-s-Disease.html>.

**Wave Life Sciences to Present Preclinical In Vivo and In Vitro Data for SNP3-Targeting Huntington’s Disease** Program at CHDI Foundation’s 15th Annual HD Therapeutics Conference - 2020).

WILD, E. J.; TABRIZI, S. J. - **The differential diagnosis of chorea.** *Practical Neurology.* . ISSN 1474-7758. 7:6 (2007) 360–373. doi: 10.1136/PN.2007.134585.

WILD, Edward J. *et al.* - **Quantification of mutant huntingtin protein in cerebrospinal fluid from Huntington’s disease patients.** *The Journal of clinical investigation.* . ISSN 1558-8238. 125:5 (2015) 1979–1986. doi: 10.1172/JCI80743.

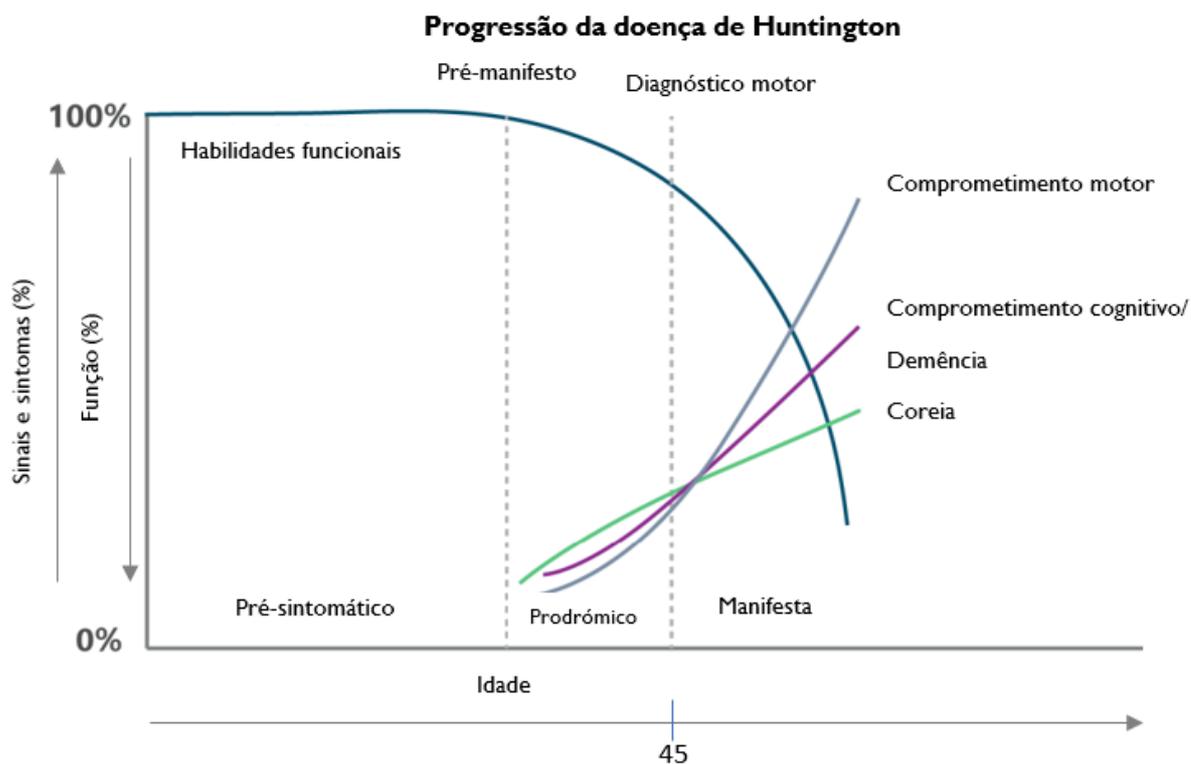
**WVE-120101 - Huntington's Disease News** - [Consultado a 21 julho de 2022].  
Disponível em: <https://huntingtonsdiseasenews.com/wve-120101/>.

XU, Xiaohong *et al.* - **Reversal of Phenotypic Abnormalities by CRISPR/Cas9-Mediated Gene Correction in Huntington Disease Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells**. *Stem Cell Reports*. . ISSN 2213-6711. 8:3 (2017) 619–633. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.01.022.

ZHU, Xiaolin *et al.* - **Gene Therapy for Neurodegenerative Disease: Clinical Potential and Directions**. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. . ISSN 16625099. 14:2021) 107. doi: 10.3389/FNMOL.2021.618171/BIBTEX.

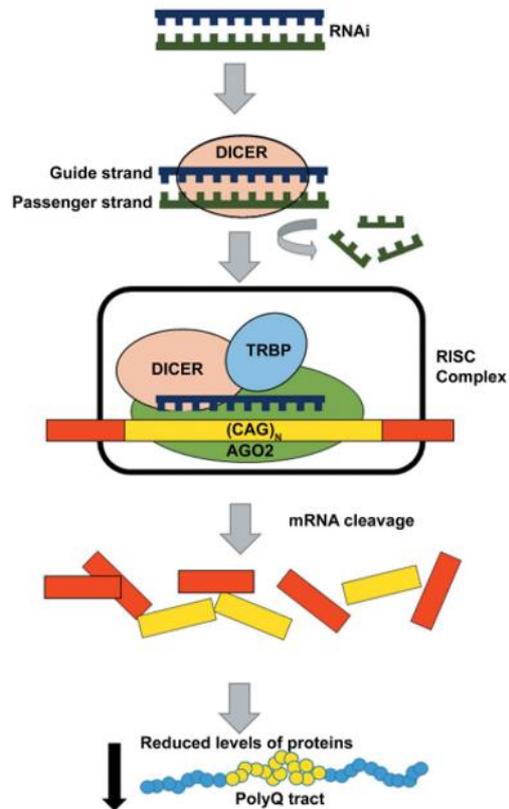
## 7. ANEXO

### Anexo I - Informação complementar sobre a progressão da doença de Huntington



**Figura 3 - Progressão da doença de Huntington.** A fase de pré-manifesto é a fase anterior ao início de sintomas motores e inclui tanto o período pré-sintomático como o prodrômico, no entanto não quer dizer que nesta fase os doentes sejam assintomáticos. Na fase pré-sintomática, os doentes ainda não têm sinais e sintomas característicos da Doença de Huntington. Na fase prodrômica, os doentes já começam a desenvolver sintomas extrapiramidais, tais como mudanças comportamentais, sinais motores e problemas a nível cognitivo. Por último, o doente que já tem sintomas motores pode-se concluir que já manifesta a DH (Adaptado de (Ghosh e Tabrizi, 2018))

## Anexo 2 - Imagem complementar sobre a terapia de RNA de interferência



**Figura 4 - Mecanismo geral da terapêutica de RNAi.** Em primeiro lugar, há a clivagem do dsRNA pela endonuclease DICER e gera um *single-strand* RNA. Em seguida a fita do RNAi é incorporado no RISC e este inibe a tradução através da clivagem do RNA alvo pela RNase AGO2. O RNA alvo não podem então ser traduzido o que faz com que haja uma diminuição dos níveis da proteína alvo. dsRNA- *double-stranded* RNA; RNAi- RNA interferência; RISC- complexo de silenciamento induzido por RNA; AGO2- *Argonaute 2* (Retirado de (Vázquez-Mojena et al., 2021)).

### ANEXO 3 - Ensaios clínicos que estão a decorrer para a DH.

**Tabela 1 -** Ensaios clínicos farmacológicos que estão a decorrer, e que estão registados na Plataforma Internacional de Pesquisa de Ensaios Clínicos (ICTRP) na Organização Mundial de Saúde (OMS), para pessoas com DH. HD- Huntington Disease; VMAT2- Vesicular Monoamine Transporter 2; NMDA- N-methyl-D-aspartate receptor; AMPK-5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (Adaptado de (Estevez-Fraga et al., 2022)).

Study Title	Intervention/ Treatment	Comparison	Mechanism of action	Disease	Phase	Design	Recruitment Status	Sponsor
<b>PROOF-HD NCT04556656</b>	Pridopidine	Placebo	Dopaminergic stabilizer	Early HD	Phase 3	Randomized, double- blind, placebo- controlled study of safety and efficacy	Active, not recruiting	Prilexia
<b>AMT-130 NCT05243017</b>	Intra-striatal rAAV5-miHTT	None	Non allele selective miRNA	Early HD	Phase 1/2	Randomized, double blind, sham-controlled sequential dose escalation study	Recruiting	UniQure Biopharma B.V.
<b>AMT-130 NCT04120493</b>	Intra-striatal rAAV5-miHTT	Imitation (sham) surgery	Non allele selective miRNA	Early HD	Phase 1/2	Randomized, double blind, sham-controlled, parallel trial	Recruiting	UniQure Biopharma B.V.
<b>PIVOT-HD NCT05358717</b>	PTC518	Placebo	mRNA degradation	HD	Phase 2	Randomized, placebo- controlled, Dose- ranging study to evaluate the safety and efficacy	Recruiting	PTC Therapeutics
<b>SELECT-HD NCT05032196</b>	WVE-003	Placebo	Allele-selective antisense oligonucleotide	Early HD	Phase 1/2	Multicenter, Randomized, Double- blind, Placebo Controlled	Recruiting	Wave Sciences Ltd.
<b>SURVEYOR NCT05358821</b>	SAGE-718	Placebo	Positive allosteric modulator of the NMDA receptor	HD- Cognitive Impairment	Phase 2	Randomized, placebo- controlled, double- blind, parallel groups and normative comparison study	Not yet recruiting	Sage Therapeutics
<b>DIMENSION NCT05107128</b>	SAGE-718	Placebo	Positive allosteric modulator of the NMDA receptor	HD- Cognitive Impairment	Phase 2	Randomized, placebo- controlled, double- blind	Recruiting	Sage Therapeutics

<b>NCT04713982</b>	Deutetrabenazine	None	VMAT2 inhibitor	HD	Phase 2/3	Single-arm open label trial	Recruiting	Vanderbilt University Medical Center
<b>NCT04421339</b>	Melatonin	Placebo	Melatonin receptor agonist	HD sleep disturbance	-	Randomised, cross-over, single-blinded (participant/ caregiver)	Recruiting	The University of Texas Health Science Center, Houston
<b>HUNTIAM NCT04421339</b>	Thiamin and Biotin	Moderate vs. High doses	B vitamins	HD	Phase 2	Randomized, parallel assignment, open-label trial	Not yet recruiting	Fundación Pública Andaluza para la gestión de la Investigación en Sevilla
<b>NCT04071639</b>	Haloperidol, risperidone, zolof, idebenone and Deutetrabenazine	Haloperidol, risperidone, zolof and Idebone	Multiple (dopamine antagonists, selective serotonin reuptake inhibitor, antioxidant and VMAT2 inhibitor	Early and moderate HD	Phase 1	Non-Randomized, single group assignment	Recruiting	Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University
<b>NCT03515213</b>	Fenofibrate	Placebo	PPAR agonist	HD	Phase 2	Randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel trial	Active, not recruiting	University of California, Irvine
<b>GEN-EXTEND NCT03842969</b>	RO7234292 (RG6042)	None	Allele-nonspecific antisense oligonucleotide	HD	Phase 3	Open-label extension	Active, not recruiting	Hoffmann-La Roche
<b>GENERATION -HDI NCT03761849</b>	RO7234292 (RG6042)	Placebo	Allele-nonspecific antisense oligonucleotide	HD	Phase 3	Randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled	Active, not recruiting	Hoffmann-La Roche
<b>VIBRANT-HD NCT05111249</b>	Branaplam	Placebo	mRNA splicing modifier	Early HD	Phase 2	Randomized, double-blind, placebo-controlled	Recruiting	Novartis Pharmaceuticals
<b>NCT02509793</b>	Tetrabenazine	None	VMAT2 inhibitor	HD with impulsivity	Phase 4	Single group, open-label trial	Recruiting	William Ondo, MD

<b>NCT03854019</b>	Dextromethorphan /Quinidine	Placebo	$\sigma_1$ receptor agonist, serotonin–norepinephrine reuptake inhibitor, and NMDA receptor antagonist/antiarrhythmic agent	HD with irritability	Phase 3	Randomized, crossover assignment	Recruiting	The University of Texas Health Science Center, Houston
<b>NCT04826692</b>	Metformin	Placebo	Antihyperglycemic / AMPK activator	Early and moderate HD	Phase 3	Multicenter, randomized, double-blind, controlled, parallel group	Recruiting	Instituto de Investigacion Sanitaria La Fe
<b>NCT04201834</b>	Risperidone	None	Dopamine antagonist	Early and moderate HD with chorea	Phase 2	Single group assignment, open label	Recruiting	University of Rochester
<b>NCT04301726</b>	Deutetrabenazine	Placebo	VMAT2 inhibitor	HD with dysphagia	Phase 1	Randomized, parallel triple blinded trial	Not yet recruiting	Fundacion Huntington Puerto Rico
<b>NCT04400331</b>	Valbenazine	None	VMT2 inhibitor	Early and moderate HD	Phase 3	Open label, single arm trial	Recruiting	Neurocrine Biosciences

**Tabela 2** - Ensaios clínicos invasivos não farmacológicos que estão a decorrer, e que estão registados na ICTRP na OMS, para pessoas com DH. HD- Huntington disease (Adaptado de (Estevez-Fraga et al., 2022)).

Study Title	Intervention/ Treatment	Comparison	Mechanism of action	Disease	Phase	Design	Recruitment Status	Sponsor
<b>SAVE-DH NCT02728115</b>	Cellavita	Lower and High dose	Stem cell therapy	HD	Phase I	Non-randomized, parallel trial, open label	Active, not recruiting	Azidus Brasil
<b>ADORE-EXT NCT04219241</b>	Cellavita	None	Stem cell therapy	HD	Phase 2/3	Open label extension	Active, not recruiting	Azidus Brasil
<b>NCT04244513</b>	GPI-DBS	Sham intervention	Deep brain stimulation (DBS)	HD with chorea	-	Randomized, double-blind, sham-controlled, cross-over trial	Recruiting	Beijing Municipal Administration of Hospitals

**Tabela 3** - Ensaios clínicos não invasivos e não farmacológicos que estão a decorrer, e que estão registados na ICTRP na OMS, para pessoas com DH. HD- Huntington Disease (Adaptado de (Estevez-Fraga et al., 2022)).

Study Title	Intervention/ Treatment	Comparison	Mechanism of action	Disease	Phase	Design	Recruitment Status	Sponsor
<b>NCT0341758</b>	Neuropsychiatric treatment protocol	Multidisciplinary intervention	Standard of care	HD with neuropsychiatric symptoms	-	Non-randomized, assessor-blinded, parallel trial	Recruiting	Vanderbilt University Medical Center and Teva
<b>HUNT/ACTIV NCT04917133</b>	Adapted Physical Activity program plus classic rehabilitation program	Classic 4-week rehabilitation program	Physical cycling, riding, tests, outings	Mid-stage HD	-	Randomized, parallel assignment trial	Recruiting	Assistance Publique - Hôpitaux de Paris
<b>NCT04429230</b>	Transcranial pulsed current stimulation	Sham intervention	Transcranial electrical stimulation	HD	-	Randomized, crossover double-blinded trial	Not yet recruiting	Western University, Canada