



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Rute Daniela Gomes Lourenço

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Alzheimer’s Disease: Endosomal Trafficking Pathway Dysfunction as a Primary Pathophysiological Event” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Ana Fontes, do Dr. Nuno Marques e da Professora Doutora Armanda Santos, 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

Rute Daniela Gomes Lourenço

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Alzheimer's Disease: Endosomal Trafficking Pathway Dysfunction as a Primary Pathophysiological Event” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Ana Fontes, do Dr. Nuno Marques e da Professora Doutora Armanda Santos, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2022

Eu, Rute Daniela Gomes Lourenço, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2017254189 declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Alzheimer's Disease: Endosomal Trafficking Pathway Dysfunction as a Primary Pathophysiological Event “ 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, 1 de setembro de 2022.

Rute Daniela Gomes Lourenço

(Rute Daniela Gomes Lourenço)

Agradecimentos

Após 5 anos desta grande caminhada pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e já quase a dar o próximo passo numa nova etapa da minha vida, não poderia deixar de agradecer,

À minha mãe e ao meu pai, que são o meu pilar e porto de abrigo, por me apoiarem em todas as fases da minha vida e me incentivarem a lutar sempre pelos meus objetivos.

Ao Gonçalo, que me acompanhou ao longo de toda esta jornada, pelo apoio e por toda a paciência, que teve e continua a ter.

Aos meus avós, que são sabedoria, carinho e amor, por acreditarem sempre em mim e comemorem todos os meus sucessos, espero ser sempre um orgulho para eles.

Ao meu irmão, o melhor presente que poderia ter recebido dos meus pais, espero que ele me veja como um bom exemplo de modelo a seguir.

À restante família que, de certa forma, contribuíram para esta conquista, em especial à minha prima Andreia Santos.

À Professora Doutora Armanda Santos, uma profissional de excelência, por acreditar nas minhas capacidades e por toda a amabilidade, disponibilidade e apoio fornecidos, durante o processo de elaboração desta monografia.

À minha madrinha, Catarina, por toda a ajuda e conselhos dados, ao longo de todo o meu percurso académico.

Às minhas afilhadas, Daniela e Lara, por me terem escolhido para vos guiar, ao longo do vosso percurso académico.

Às minhas amigas da Faculdade, porque sem elas estes últimos 5 anos não teriam tido metade da piada.

A todos os meus restantes amigos, com quem cresci, pela vossa amizade e constante presença nos bons e maus momentos.

A toda a equipa da Farmácia Cruz, por me terem integrado e acolhido tão bem e por me transmitirem o verdadeiro valor de um Farmacêutico Comunitário inserido na comunidade.

A toda a equipa do departamento de *Regulatory Affairs* dos Laboratórios Basi - Indústria Farmacêutica, S.A., por me terem acolhido tão bem e por terem contribuído para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e a todo corpo docente, por todos os conhecimentos transmitidos, que contribuíram para a minha formação.

A Coimbra, que foi sinónimo de casa durante estes últimos 5 anos, por todas as lições e boas memórias. Será eternamente saudade!

Um Obrigada nunca será suficiente!

Índice Geral

PARTE I - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Resumo	12
Abstract	12
Introdução	13
1. Farmácia Cruz	13
2. Análise SWOT	14
2.1. Pontos Fortes	14
2.1.1. Experiência Prévia.....	14
2.1.2. Formação adquirida no MICF	14
2.1.3. Capacidade de trabalhar em equipa	15
2.1.4. Conhecimentos prévios sobre Sifarma®	15
2.2. Pontos Fracos.....	15
2.2.1. Dificuldade no Atendimento ao Público	15
2.2.2. Farmacoterapia e Indicação Farmacêutica de afeções oftálmicas.....	16
2.2.3. Aconselhamento Veterinário	16
2.2.4. Aconselhamento Dermofarmácia e Cosmética.....	17
2.2.5. Grávidas e Bebés.....	17
2.2.6. Posologias	17
2.2.7. Interpretação de receitas manuais.....	18
2.2.8. Organismos de participação complementar ao Sistema Nacional de Saúde.....	18
2.2.9. Associação do nome comercial ao princípio ativo	18
2.3. Oportunidades	19
2.3.1. Aprendizagem gradual	19
2.3.2. Formações	20
2.3.3. Realização de Estágios noutras farmácias do grupo	20
2.3.4. Procedimentos do final do dia e do mês.....	20
2.3.5. Participação nas dinâmicas da Farmácia.....	21
2.3.6. Preparação de medicamentos manipulados.....	21
2.3.7. Ter sido a única estagiária	21
2.3.8. Prestação de Serviços Farmacêuticos	21
2.4. Ameaças.....	22
2.4.1. Pandemia da COVID-19.....	22
2.4.2. Sazonalidade do Estágio.....	22
3. Casos Práticos.....	23
Considerações Finais.....	23
Referências Bibliográficas	24
Anexos	26
Anexo I - Tabela com elementos da equipa técnica da Farmácia Cruz.	26
Anexo II - Tabela com as formações frequentadas durante o estágio.	26

Anexo III - Fotografia com as gerberas, para oferecer às utentes como forma de celebração do Dia Internacional da Mulher, publicada na página de <i>Facebook</i> da Farmácia Cruz.....	27
Anexo IV - Fotografia da oferta de frutos vermelhos para os participantes do rastreio de nutrição, dinamizado com o objetivo de anunciar o regresso do serviço de consultas de nutrição à Farmácia Cruz.....	28
Anexo V - Ficha de Preparação do Manipulado Mycostatin + Lidonostrum + Bicarbonato de sódio 8,4%.....	29
Anexo VI - Ficha de Preparação do Manipulado Enxofre a 6% em Vaselina sólida.....	30
Anexo VII - Ficha de Preparação do Manipulado Pomada de ácido salicílico a 5% (FGP A.I.I.).....	31
Anexo VIII - Casos Práticos.....	32

PARTE II - Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Resumo	37
Abstract	37
Introdução.....	38
1. Laboratórios Basi - Indústria Farmacêutica, S.A.....	38
2. Análise SWOT	39
2.1. Pontos Fortes.....	39
2.1.1. Formação adquirida no MICF.....	39
2.1.2. Destreza na língua inglesa.....	39
2.1.3. Capacidade de trabalhar em equipa.....	40
2.1.4. Interesse na Aprendizagem.....	40
2.2. Pontos Fracos.....	40
2.2.1. Falta de destreza noutros idiomas.....	40
2.2.2. Falta de conhecimentos sobre o funcionamento de <i>Softwares</i> Informáticos.....	41
2.2.3. Desconhecimento do significado de Siglas e Acrónimos.....	41
2.3. Oportunidades.....	41
2.3.1. Formações.....	41
2.3.2. Visita guiada pelas instalações.....	42
2.3.3. Integração em todas as secções do departamento.....	42
2.3.4. Desenvolvimento do sentido crítico.....	42
2.3.5. Desenvolvimento de capacidades de gestão de tempo.....	42
2.3.6. Desenvolvimento de capacidades Informáticas.....	43
2.3.7. Ter sido a única estagiária.....	43
2.3.8. Possibilidade de realização de estágio por via remota.....	43
2.4. Ameaças.....	43
2.4.1. Problemas Informáticos.....	43
2.4.2. Reorganização do estágio.....	44
Considerações Finais.....	44
Referências Bibliográficas.....	46

PARTE III - Monografia “Alzheimer's Disease: Endosomal Trafficking Pathway Dysfunction as a Primary Pathophysiological Event“

Abstract	50
Resumo	51
Introduction	52
1. Forms of Alzheimer disease.....	53
2. Diagnosis and Clinical Manifestations	53
3. AD's histopathological hallmarks	54
3.1. Amyloid pathology	54
3.2. Tau pathology.....	55
4. Endosomal trafficking pathway dysfunction as a driver of AD.....	56
4.1. The contribution of endosomal trafficking pathway to cell function.....	56
4.2. Disruption of endocytic machinery as a trigger for AD development and progression	59
4.3. The role of AD risk genes in endosomal trafficking dysfunction.....	64
4.4. Endosomal trafficking pathway dysfunction and AD's histopathological hallmarks...66	
4.4.1. Endosomal trafficking pathway dysfunction as a driver of Amyloid pathology	66
4.4.2. Endosomal trafficking pathway dysfunction as a driver of Tau pathology.....	73
5. Therapeutic Implications.....	76
6. Biomarkers of Endosomal trafficking pathway dysfunction in AD	78
Conclusions and Future Prospects	80
Bibliographic references	82

Índice de Imagens

PARTE III - Monografia “Alzheimer's Disease: Endosomal Trafficking Pathway Dysfunction as a Primary Pathophysiological Event“

- Figure 1.** General schematic diagram of the possible fates of extracellular molecular cargo, after its entry into the cell, through the three main intracellular traffic routes out of the early endosome: Recycling pathway, Retrograde Pathway and Degradation Pathway.....58
- Figure 2.** Schematic illustration of the cellular environment in the brain, where is highlighted the endocytic protein machinery that is crucial for the function of endocytic pathways in neurons.64
- Figure 3.** Dysfunction of the endosomal trafficking pathway is possibly an upstream driver event that leads to an imbalance between β -CTF and $A\beta$ production and clearance, favoring the amyloidogenic pathway. The increase in APP processing, in early endosomes, is due to a decrease in its traffic through the retrograde and recycling pathways, and the decrease of β -CTF and $A\beta$ clearance is due to impairment of the degradation pathway, which culminates in the accumulation of these fragments. Increased β -CTF levels induce overactivation of Rab5, which can impair all endocytic pathways from the early endosome, thus promoting a pathogenic cycle between endosomal trafficking pathway dysfunction and amyloid pathology. 72
- Figure 4.** Endosomal traffic pathway dysfunction is possibly an upstream driving event that favors the development of Tau pathology. The impairment of the three main EE pathways, retrograde, recycling and degradation pathways, decreases the clearance of extracellular and intracellular p-tau and leads to its accumulation and aggregation. Furthermore, the permeabilization of endosomal membranes promotes the release and propagation of p-tau aggregates, and their interaction with soluble p-tau, which also induces their aggregation. In turn, the pathogenic species of p-tau also induce microtubule destabilization that further promotes endosomal trafficking dysfunction. Moreover, according to the prion-like mechanism hypothesis, tau seeds can be secreted and incorporated by any cell of the central nervous system, promoting the spread of p-tau through the brain.....75

PARTE I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária



Farmácia Cruz

Sob orientação da Dra. Ana Fontes.

Lista de Abreviaturas

FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM - Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

Resumo

Os estudantes do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra têm de realizar obrigatoriamente estágio em Farmácia Comunitária para poderem adquirir o título de Farmacêutico. Deste modo, realizei o meu estágio curricular na Farmácia Cruz, durante o período de 10 de janeiro a 29 de abril de 2022. O relatório de estágio ilustra a análise SWOT (do inglês, *Strengths*, *Weaknesses*, *Opportunities* e *Threats*), referente à frequência do estágio, à adequação do curso e às perspetivas profissionais futuras, e ainda se encontra exposta a análise crítica de cinco casos práticos.

Palavras-Chave: Estágio curricular; Farmácia Comunitária; Análise SWOT; Casos Práticos.

Abstract

The students of the Integrated Master's Degree in Pharmaceutical Sciences at the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra must undertake an internship in Community Pharmacy, in order to acquire the title of Pharmacist. Thus, I carried out my internship at Farmácia Cruz, from January 10th to April 29th, 2022. The internship report illustrates the SWOT analysis (Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats) analysis, referring to the frequency of the internship, the suitability of the course and future professional perspectives, and a critical analysis of five case studies is also exposed.

Keywords: Curricular internship; Community Pharmacy; SWOT Analysis; Case Studies.

Introdução

O título de Farmacêutico apenas pode ser adquirido após a formação de pelo menos 5 anos, dos quais 6 meses se destinam à realização de estágio numa farmácia comunitária ou farmácia hospitalar, sob orientação de um farmacêutico responsável.¹ Deste modo, o plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) engloba a unidade curricular “Estágio” no 2º semestre do 5º ano.² Esta possibilita que o estudante coloque em prática todos os conhecimentos teóricos, adquiridos ao longo do curso e serve de preparação para a prática profissional.

Para a conclusão do meu percurso académico, tive a oportunidade de realizar o meu estágio curricular na Farmácia Cruz, durante o período de 10 de janeiro a 29 de abril de 2022, sob orientação da Dra. Ana Fontes.

O Relatório de Estágio apresentado encontra-se sob o formato de análise SWOT (do inglês, *Strengths, Weaknesses, Opportunities e Threats*) fundamentada a dois níveis, interno e externo, na qual serão identificadas quatro vertentes referentes à frequência do estágio em farmácia comunitária, à adequação do curso e às perspetivas profissionais futuras. A nível interno encontram-se expostos os meus pontos fortes (*Strengths*) e pontos fracos (*Weaknesses*), que contribuíram para o meu desempenho durante o estágio, e a nível externo as oportunidades (*Opportunities*) e as ameaças (*Threats*) que surgiram no decorrer deste. Para além disso, ainda se encontra exposta a análise crítica de cinco casos práticos, que constituem o reflexo da integração da aprendizagem teórica e sua aplicação no contexto da prática profissional.

I. Farmácia Cruz

A Farmácia Cruz é uma das farmácias mais antigas da cidade de Cantanhede, localizada no Largo D. João Crisóstomo Amorim Pessoa, n.º 32, próxima de diversos estabelecimentos de saúde, tais como a Clínica Dentária Rui Rato, o Laboratório de Análises Clínicas Unilabs, o Centro de Saúde de Cantanhede, o Hospital Cantanhede Arcebispo João Crisóstomo e o Centro Médico São Mateus. Esta encontra-se inserida na rede de Farmácias Portuguesas e faz parte de um grupo familiar de Farmácias.

O seu horário habitual é das 9h às 20h, durante os dias da semana, e das 9h às 13h ao sábado, encerrando ao domingo. No entanto, efetua uma escala de serviço permanente, durante uma das semanas de cada mês, existindo rotatividade com as outras três farmácias localizadas na cidade de Cantanhede.

A sua equipa é constituída por 10 elementos, cujo cargos se encontram expostos na Tabela do Anexo I, que têm como missão garantir o bem-estar e a satisfação de todos os seus utentes.

Esta apresenta um leque alargado de serviços para os utentes, desde serviços farmacêuticos, tais como a medição da pressão arterial, a medição de parâmetros bioquímicos (como a glicémia e o colesterol total), a administração de injetáveis, a medição do peso corporal e da altura e a preparação individualizada da medicação, mas também outros, tais como consultas de nutrição, podologia e audiologia.

A sua localização aliada à dedicação de todos os elementos da equipa e serviços prestados fazem com que esta tenha um grande número de utentes de diferentes faixas etárias e classes socioeconómicas fidelizados.

2. Análise SWOT

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Experiência Prévia

A dinâmica presente em Farmácia Comunitária não me era totalmente desconhecida, uma vez que já tinha realizado dois estágios de Verão nesta mesma área. Estas experiências prévias permitiram que adquirisse alguma noção sobre os processos e procedimentos realizados nas farmácias e que, de certa forma, contribuíram para que evoluísse mais rapidamente na execução das tarefas propostas.

2.1.2. Formação adquirida no MICF

O plano curricular do MICF inclui unidades curriculares como Anatomofisiologia Humana II, Farmácia Galénica, Farmacologia Geral, Farmacologia I, Farmacologia II, Farmacoterapia, Farmácia Clínica, Dermofarmácia e Cosmética, Organização e Gestão Farmacêutica, Indicação Terapêutica, Dispositivos Médicos, Fitoterapia, Preparações de Uso Veterinário e Comunicação e Marketing Farmacêutico, cujos programas se encontram direcionados para a vertente de Farmácia Comunitária. Deste modo, estas permitiram-me adquirir conhecimentos teóricos base e desenvolver competências, que contribuíram para a minha preparação e posterior desempenho durante o decorrer do estágio.

2.1.3. Capacidade de trabalhar em equipa

O objetivo principal de qualquer Farmácia é o bem-estar e satisfação dos seus utentes, para tal é importante que a equipa seja unida e que exista uma boa comunicação entre todos os elementos.

A boa receção por parte de todos os colaboradores da Farmácia Cruz, que desde o primeiro dia depositaram em mim um elevado nível de confiança, aliada à minha facilidade em trabalhar em equipa, contribuíram para a minha integração na equipa e posterior cooperação com todos, em prol do alcance dos interesses da Farmácia.

2.1.4. Conhecimentos prévios sobre Sifarma®

O Sistema Informático utilizado na Farmácia Cruz é o Sifarma2000®, principalmente para a receção das encomendas, em conjunto com o Novo Módulo de Atendimento do Sifarma®.

Uma vez que já tinha recebido uma introdução sobre estes dois *softwares* nas aulas Teórico-Práticas de Organização e Gestão Farmacêutica e ainda tive oportunidade de assistir a uma formação sobre estes no PharmCareer, atividade dinamizada pelo Núcleo de Estudantes da Faculdade de Farmácia da Associação Académica de Coimbra para os estudantes de 5º ano do MICEF, já possuía alguns conhecimentos antes de iniciar o estágio. A aquisição de conhecimentos prévios sobre as suas funcionalidades contribuiu para que me familiarizasse e aprendesse a utilizá-los de forma autónoma rapidamente.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Dificuldade no Atendimento ao Público

Inicialmente, apesar de me sentir entusiasmada para começar a realizar atendimentos autonomamente, também me sentia receosa, não tendo plena confiança nos meus conhecimentos e capacidades. Isto fez com que deixasse transparecer insegurança aos utentes e sentisse alguma dificuldade em esclarecer as suas dúvidas.

Apesar de existirem utentes muito compreensivos relativamente a essa in experiência inicial, senti que outros não foram assim tanto, devido inclusivamente ao preconceito existente sobre a falta de capacidades dos estagiários. De certa forma, essa intolerância por parte de alguns utentes acabava também por alimentar essas inseguranças pré-existentes.

Inconformada, procurei refletir nas minhas falhas e esforçar-me para me superar a cada atendimento seguinte, acatando todos os conselhos e informações científicas transmitidos pelos colegas farmacêuticos.

Ao longo do tempo, sinto que o meu desempenho evoluiu e fui ganhando mais confiança, o que me permitiu comunicar e transmitir a informação que pretendia aos utentes de forma mais clara e assertiva, adequando sempre o meu discurso ao utente que tinha à frente, de forma que este compreendesse e saísse da farmácia sem qualquer dúvida. No entanto, quando era confrontada com situações novas e inesperadas, ainda sentia necessidade de pedir auxílio a algum elemento da equipa para lidar com estas, de forma a não cometer nenhum erro que pudesse prejudicar o utente ou a Farmácia.

2.2.2. Farmacoterapia e Indicação Farmacêutica de afeções oftálmicas

Considero que o MICF apresenta uma grande lacuna em termos de farmacoterapia e indicação farmacêutica de afeções oftálmicas e que seria importante incluir no programa de alguma das unidades curriculares, uma vez que estas são situações recorrentes para as quais os utentes se deslocam até à farmácia para receber aconselhamento e esclarecer as suas dúvidas.

A minha falta de conhecimento sobre doenças oftálmicas e sobre a sua farmacoterapia tornou-se um grande obstáculo ao balcão. Esta fez com que não reconhecesse a indicação de alguns fármacos presentes em receitas médicas, necessitando de recorrer à informação científica existente no separador “Ficha do Produto” no Sifar[®]. Para além disso, também senti dificuldade no aconselhamento de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) e de medidas não farmacológicas para determinadas afeções oftálmicas.

2.2.3. Aconselhamento Veterinário

Apesar do plano de estudos do MICF incluir a unidade curricular Preparações de Uso Veterinário, os conhecimentos adquiridos nesta não são suficientes para que o estagiário consiga intervir autonomamente nesta área, o que fez com que sentisse muita dificuldade no aconselhamento veterinário ao balcão.

Dado que cada vez mais utentes têm animais de estimação, é normal que exista um aumento da procura por produtos de bem-estar animal nas farmácias. Para além disso, o papel das Farmácias na dispensa de medicamento veterinários encontra-se favorecido com o Regulamento (UE) n.º 2019/6, de 11 de dezembro de 2018, relativo aos medicamentos veterinários, que entrou em vigor a 28 de janeiro de 2022, e se aplica a todos os Estados Membros da União Europeia.³ Portanto, considerando a expansão deste mercado e a intervenção que as Farmácias podem ter neste, é urgente a reformulação do programa desta unidade curricular, de forma que os estudantes saiam melhor preparados para o

aconselhamento veterinário ao balcão, durante o estágio e futura vida profissional, caso decidam enveredar pelo ramo de Farmácia Comunitária.

2.2.4. Aconselhamento Dermofarmácia e Cosmética

Na Farmácia Cruz existe uma grande diversidade de marcas, gamas e produtos de dermofarmácia e cosmética, o que é benéfico para o utente, uma vez que permite que este tenha acesso a um vasto leque de opções. No entanto, isto fez com que sentisse alguma dificuldade durante o aconselhamento e na escolha do produto mais adequado para cada pessoa.

Apesar do plano de estudos do MICF incluir a unidade curricular de Dermofarmácia e Cosmética, cujo programa se encontra estruturado de forma a introduzir os conceitos teóricos necessários para a prática profissional, é importante ter a consciência de que este mercado se encontra em constante evolução e crescente sofisticação e exigência por parte do consumidor, o que faz com que surjam novos produtos todos os anos e, para além disso, diferentes farmácias têm diferentes marcas e gamas de produtos. Portanto, a unidade curricular de Dermofarmácia e Cosmética é fulcral no plano de estudos do MICF, no entanto, deve-se procurar investir em formação contínua nesta área, de forma a aprimorar o aconselhamento.

2.2.5. Grávidas e Bebés

As grávidas e os bebés fazem parte dos utentes que requerem especial atenção, devido à sua vulnerabilidade. A elevada diversidade de produtos de puericultura, aliado à exigência das grávidas e recém-mães, devido a serem utentes bastante informadas, fez com que sentisse hesitação e receio durante o aconselhamento ou esclarecimento das suas dúvidas.

Este também é um mercado em constante crescimento em termos de informação e evolução em termos de oferta, portanto, também nesta área se deve procurar por formação contínua, para além da adquirida através do MICF.

2.2.6. Posologias

Sendo o MICF um curso de apenas 5 anos, não se consegue abordar com muita profundidade todos os aspetos das matérias lecionadas. Deste modo, ao longo do curso não foi dada tanta ênfase às posologias dos fármacos abordados, o que contribuiu para a minha dificuldade na interpretação e avaliação das posologias indicadas pelos médicos nas receitas e também fez com que no momento de aconselhamento de algum MNSRM tivesse de recorrer à informação

científica presente do separador “Ficha do Produto” no Sifarma® ou questionasse algum dos farmacêuticos presentes, para saber que posologia deveria indicar ao utente.

2.2.7. Interpretação de receitas manuais

As receitas médicas manuais já não aparecem com tanta frequência nas Farmácias, no entanto ainda fui confrontada com algumas, no decorrer do estágio. De forma a que pudesse aceitar e dispensar os medicamentos contidos nas receitas manuais, deveria interpretar a caligrafia do médico prescriptor e conferir a presença de determinados elementos, tais como, a identificação do utente, o número de utente, a entidade financeira responsável, a identificação do médico, com presença obrigatória da vinheta, a exceção legal para a prescrição manual, a identificação dos medicamentos (nome do medicamento, dosagem, forma farmacêutica, dimensão da embalagem e número de unidades), a validade da receita e a assinatura do médico.⁴

O facto de ter estabelecido pouco contacto com este tipo de receitas prejudicou a minha autonomia nos atendimentos, uma vez que quando era confrontada com alguma, pedia sempre a algum dos colaboradores para efetuar uma dupla verificação no momento, para averiguar a conformidade da receita manual, visto que a falha de algum elemento poderia ser motivo para não participação da mesma.

2.2.8. Organismos de participação complementar ao Sistema Nacional de Saúde

Existe uma grande diversidade de subsistemas e organismos de participação complementar ao Sistema Nacional de Saúde que desconhecia por completo. Esta foi uma realidade com a qual apenas estabeleci contacto no decorrer do estágio e, apesar de atualmente já não ser necessário saber de cor o código correspondente a cada organismo, sinto que o facto de não possuir conhecimentos prévios sobre as especificidades de cada um também se tornou um fator que prejudicou a minha autonomia nalguns atendimentos.

2.2.9. Associação do nome comercial ao princípio ativo

No início do estágio senti alguma dificuldade em associar o nome comercial dos medicamentos ao seu princípio ativo, uma vez que no MICF é dado destaque aos nomes dos princípios ativos e a maioria das receitas encontram-se prescritas pela Denominação Internacional Comum, no entanto, os utentes conhecem e referem-se aos medicamentos pelo seu nome comercial. Assim, isso fez com que, nos atendimentos iniciais, não conseguisse associar prontamente o princípio ativo presente na receita correspondente ao medicamento que o utente estava a solicitar.

Todavia, com o tempo e com a prática, comecei a associar os princípios ativos ao nome comercial, pelo que não acho de extrema relevância que seja uma prioridade das unidades curriculares do MICF abordarem os nomes comerciais dos medicamentos.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Aprendizagem gradual

O meu primeiro mês de estágio foi passado no *back office*, no qual realizei tarefas de organização e gestão da farmácia, tais como dar entrada de encomendas, verificando a validade, o estado da embalagem e o número de embalagens, calcular os preços de venda ao público de MNSRM e de outros produtos de saúde, aplicando a margem estabelecida ao preço faturado e a repor *stock* no *back office* e *front office*. Para além disso, nessa mesma altura, tive oportunidade de estudar os fluxogramas de indicação farmacêutica e alguma legislação, presentes no *Dossier* do Estagiário, e de ajudar na dispensa de medicação e produtos de saúde para entregar no Lar de Vilamar, com o qual a Farmácia Cruz tem protocolo estabelecido.

Assim, o primeiro mês passado no *back office* permitiu-me estar em contacto com a vertente mais logística de farmácia comunitária e, simultaneamente, familiarizar-me com o Sifarma2000® e com o novo módulo de atendimento do Sifarma®, para além de conhecer os medicamentos e outros produtos de saúde em *stock* e a sua localização. Considero que foi importante ter iniciado o meu estágio no *back office*, uma vez que me permitiu perceber a importância das tarefas aí desenvolvidas e o seu impacto nos atendimentos.

Após me ter sido dada uma introdução sobre as normas relativas à dispensa de medicamentos e produtos de saúde e os diplomas que regem as participações especiais na farmácia, comecei a observar atendimentos. A observação dos atendimentos permitiu-me ver os diferentes modos de abordagens ao balcão de cada um dos farmacêuticos da equipa e a sua forma de interagir com os utentes. Gradualmente, passei a efetuar atendimentos acompanhada, o que me permitiu ir ganhando alguma confiança até começar os atendimentos sozinha. De ressaltar que todos os elementos da equipa se mantiveram sempre disponíveis para me auxiliar em qualquer situação e para esclarecer alguma dúvida que surgisse.

Deste modo, o facto de a aprendizagem ter sido efetuada de forma gradual permitiu-me adquirir uma visão abrangente sobre Farmácia Comunitária e todos os aspetos que lhe concernem. Um farmacêutico deve ser um profissional de saúde polivalente e multidisciplinar, que, para além do atendimento, deve saber realizar outras tarefas, que se encontram interligadas a este e visam igualmente o bem-estar e satisfação do utente.

2.3.2. Formações

A equipa da Farmácia Cruz incentivou-me a inscrever e a participar em diversas formações, tanto através de via remota como em formato presencial, que se encontram expostas no Anexo II.

A oportunidade de assistir a diversas formações e as visitas de diversos delegados permitiram-me conhecer diversos produtos e marcas que desconhecia, para além de promoverem a aquisição de conhecimentos técnico-científicos e novas abordagens de aconselhamento dos produtos ao utente.

2.3.3. Realização de Estágios noutras farmácias do grupo

Durante alguns dias, tive a oportunidade de realizar estágio em duas das farmácias do grupo, nomeadamente, na Farmácia de São Cosme, localizada na Estrada Nacional 234, Rua de São Romão, em Febres, e na Farmácia de São Damião, localizada no Largo Terreiro I, em Cordinhã. Isto permitiu-me conhecer realidades distintas da Farmácia Cruz, designadamente, em termos de organização da farmácia, da tipologia de utentes que as frequenta, dos produtos mais procurados e dos horários de maior afluência.

A Farmácia de São Cosme abriu recentemente, pelo que ainda não possui um largo leque de utentes fidelizados, para além disso a sua localização faz com que haja muitos utentes de passagem. Por outro lado, a Farmácia de São Damião, como é localizada num meio rural, tem um elevado número de utentes fidelizados, no entanto, estes possuem um perfil de consumo distinto e há menor afluência, em comparação com a Farmácia Cruz.

2.3.4. Procedimentos do final do dia e do mês

No final do mês de março foi-me dada a oportunidade de assistir aos procedimentos do final do dia e do mês na Farmácia de São Cosme.

Nas farmácias do grupo a realização do encerramento da faturação mensal encontra-se ao encargo dos elementos da equipa, ao contrário do que acontece em muitas outras. Portanto, tive a oportunidade de aprender passo a passo os procedimentos para organização do receituário, de acordo com os diversos subsistemas de saúde e envio da faturação às respetivas entidades, de forma que a farmácia receba o reembolso da comparticipação dos medicamentos dispensados ao longo do mês. A aquisição deste conhecimento enriqueceu e tornou mais completo o meu estágio, uma vez que me permitiu estar em contacto com a vertente mais contabilística de Farmácia Comunitária.

2.3.5. Participação nas dinâmicas da Farmácia

A Farmácia Cruz promoveu algumas dinâmicas, que apelaram à criatividade da equipa, nas quais tive a oportunidade de colaborar, dando opiniões e sugestões. Aquelas às quais gostaria de dar maior destaque são a oferta de gerberas às utentes, como forma de celebração do Dia Internacional da Mulher (Anexo III), e a oferta de uma taça com frutos vermelhos aos participantes do rastreio de nutrição, que foi dinamizado com o objetivo de anunciar o regresso do serviço de consultas de nutrição à Farmácia Cruz (Anexo IV).

A promoção destas dinâmicas por parte da Farmácia é bem vista pelos utentes, que se sentem gratos pelo gesto de atenção.

2.3.6. Preparação de medicamentos manipulados

Durante o meu estágio, tive a oportunidade de preparar três manipulados, nomeadamente, Mycostatin + Lidonostrum + Bicarbonato de sódio 8,4%, Enxofre a 6% em Vaselina sólida e Pomada de ácido salicílico a 5% (FGP A.I.I.) e preencher as suas respetivas fichas de preparação de medicamentos manipulados, Anexos V, VI e VII, e rótulos. Assim, pude aplicar em contexto de prática profissional os conhecimentos teóricos e práticos adquiridos na unidade curricular de Farmácia Galénica.

2.3.7. Ter sido a única estagiária

A Farmácia Cruz prefere apenas receber um estagiário de cada vez, pelo que durante todo o meu estágio fui a única estagiária na equipa. Este foi um aspeto que contribuiu para a minha evolução e aprendizagem, uma vez que a equipa tinha mais disponibilidade para me ensinar e esclarecer as dúvidas, conseguindo conciliar com a execução das suas funções.

2.3.8. Prestação de Serviços Farmacêuticos

Tal como referido anteriormente, a Farmácia Cruz apresenta um leque alargado de serviços para o utente. Durante o estágio, tive a oportunidade de efetuar alguns dos serviços farmacêuticos disponíveis, tais como, a medição da pressão arterial e a determinação de alguns parâmetros bioquímicos, nomeadamente, a glicémia e o colesterol total. Isto permitiu que colocasse em prática os conhecimentos adquiridos nas aulas Prático-Laboratoriais da unidade curricular de Anatomofisiologia Humana II e ainda me possibilitou estabelecer uma relação de maior confiança e empatia com os utentes.

2.4. Ameaças

2.4.1. Pandemia da COVID-19

No início do meu estágio, a Pandemia da COVID-19 já se encontrava instalada em Portugal há quase 2 anos. Esta fez com que as Farmácias Comunitárias se adaptassem, de forma a mitigar o contágio na população, pelo que a utilização de equipamentos de proteção individual, tal como as máscaras, e a presença de acrílicos como barreira física, ainda continuavam a ser uma realidade presente nestes estabelecimentos. No entanto, estas medidas, apesar de necessárias e obrigatórias, acabaram por prejudicar, por vezes, a minha comunicação com o utente durante o atendimento.

No decorrer do mês de janeiro, o aumento exponencial do número de casos de COVID-19 levou a algumas baixas médicas, o que criou pressão dentro da própria equipa. Devido a isto, durante essa altura, os colaboradores não conseguiram ter tanta disponibilidade quanto a que desejariam para me ensinar e acompanhar calmamente, uma vez que se encontravam sobrecarregados.

Em contraste, tendo em conta a sua evolução positiva da situação epidemiológica em Portugal, nos meus últimos dias de estágio, entrou em vigor o Decreto-Lei n.º 30-E/2022, de 21 de abril, no qual foram declaradas as medidas restritivas obrigatórias de resposta à pandemia da doença COVID-19. Assim, a obrigatoriedade do uso de máscara foi limitada a estabelecimentos e serviços de saúde, a estruturas residenciais ou de acolhimento de idosos, a serviços de apoio domiciliário às populações vulneráveis e idosas, a unidades de cuidados continuados integrados e a transportes coletivos de passageiros.⁵ Isto fez com que comesçassem a entrar utentes sem máscara para dentro da Farmácia e alguns, mesmo depois de elucidar que nas farmácias ainda era obrigatório o uso de máscara, uma vez que se trata de um estabelecimento de saúde, frequentado por pessoas vulneráveis, desvalorizaram as indicações dadas e demonstraram ser intransigentes.

Por fim, apesar do panorama geral relativamente à pandemia ter mudado muito, comparativamente a 2020 e 2021, e de ter tido a oportunidade de assistir a algumas formações presencialmente, a esmagadora maioria ainda continua a ser realizada por via remota, que não é tão cativante para o público.

2.4.2. Sazonalidade do Estágio

Uma vez que o meu estágio decorreu durante os meses de inverno e início da primavera, tive maioritariamente contacto com casos de aconselhamento para gripes/constipações e alergias.

Assim, a sazonalidade do estágio não me possibilitou a realização de aconselhamentos para as situações que levam os utentes a recorrer à Farmácia nos meses de verão.

3. Casos Práticos

A exposição da análise crítica dos cinco casos práticos, com os quais fui confrontada, no decorrer do estágio curricular na Farmácia Cruz, e me permitiram aplicar na prática os conhecimentos teóricos ao longo do MICF, encontra-se no Anexo VIII.

Considerações Finais

Inicialmente, quando ingressei no MICF, considerava que Farmácia Comunitária era uma das saídas profissionais que menos me cativava. No entanto, a realização do estágio curricular na Farmácia Cruz, cuja equipa apresenta profissionais de saúde de excelência, que me transmitiram pareceres técnicos, científicos e humanos sobre verdadeiro significado e valor de um farmacêutico comunitário, enquanto agente de saúde pública inserido na comunidade, permitiu-me desconstruir esse preconceito inicial e perceber que esta é uma área desafiante, na qual nos encontramos em constante aprendizagem.

Portanto, globalmente, considero que o meu estágio foi extremamente completo e que me foi fornecida uma boa preparação, que me permitirá evoluir enquanto profissional.

Por outro lado, apesar de muitas das unidades curriculares prepararem os estudantes para a realidade que irão enfrentar em Farmácia Comunitária, ainda existem algumas lacunas que deveriam ser preenchidas, dado a multidisciplinaridade e a polivalência exigida aos farmacêuticos comunitários.

Por último, considero fulcral a realização de estágio em Farmácia Comunitária, no último ano do MICF, uma vez que só nessa altura é que nós, estudantes, já adquirimos todos os conhecimentos teóricos necessários para a prática profissional. Esta é uma oportunidade para percebermos se Farmácia Comunitária é uma área que nos interessa, antes de entrarmos efetivamente no mercado de trabalho.

Referências Bibliográficas

1. **Diretiva 2013/55/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de novembro de 2013.** JORNAL OFICIAL DA UNIÃO EUROPEIA 354, 28.12.2013, 132–170.
2. **Despacho n.º 11765/2018, n.º 236 de 7 de dezembro.** Diário da República n.º 236/2018, Série II de 2018-12-07, 32883 – 32886. Universidade de Coimbra.
3. **Regulamento (UE) 2019/6 do Parlamento Europeu e do Conselho de 11 de dezembro de 2018 relativo aos Medicamentos Veterinários e que revoga a Diretiva 2001/82/CE.** JORNAL OFICIAL DA UNIÃO EUROPEIA 4, 7.1.2019, p. 43–167.
4. AUTORIDADE NACIONAL DO MEDICAMENTO E PRODUTOS DE SAÚDE, I. .. - **Normas relativas à dispensa de medicamentos e produtos de saúde.** Ministério da Saúde. (2019) 1–42.
5. **Decreto-Lei n.º 30-E/2022. de 21 de abril.** Diário da República n.º 78/2022, 1º Suplemento, Série I de 2022-04-21, 2–3.
6. GRUPO MEDINFAR - **Saúde Digestiva - Proton®.** 2019. [Acedido a 29 de julho de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.medinfar.pt/pt/produtos/saude-digestiva/proton>
7. JOHNSON & JOHNSON, Lda. - **Resumo das Características do Medicamento - Pantelmin.** 2022. [Acedido a 28 de julho de 2022]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
8. GLAXOSMITHKLINE - **Panadol Gripus.** Panadol. [Acedido a 29 de julho de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.panadol.com/pt-pt/produtos/gripe-constipacao/panadol-gripus.html>
9. LABORATOIRES GILBERT - **Nariz entupido – Constipação.** Marimer, 2017. [Acedido a 29 de julho de 2022]. Disponível na Internet: <https://marimer.pt/higiene-nasal/nariz-entupido-constipacao/>
10. ADVANCIS® - **ADVANCIS® VITAMINA C + EQUINÁCEA COMPRIMIDOS.** [Acedido a 29 de julho de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.advancispharma.com/pt/sistema-respiratorio-imunitario/vitamina-c-equinacea-comprimidos/>
11. PERRIGO® - **Antigrippine Trieffect.** 2016. [Acedido a 29 de julho de 2022]. Disponível na Internet: <https://antigrippine.pt/antigrippine/antigrippine-trieffect/>
12. LABORATÓRIO EDOL - **Rezitop®.** 2022. [Acedido a 29 de julho de 2022]. Disponível na Internet: <https://edol.pt/produto/rezitop/>

13. ZAMBON – PRODUTOS FARMACÊUTICOS, Lda. - **FLUIMUCIL 600 mg.** 2021.
[Acedido a 29 de julho de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.fluimucil.pt/medicamento-expectorante-fluimucil/fluimucil-600-efervescente>
14. GRUPO PIERRE FABRE - **Cicalfate+ Creme Reparador Protetor.** Eau Thermale Avène. [Acedido a 29 de julho de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.eau-thermale-avene.pt/p/cicalfate-creme-reparador-protetor>
15. BEIERSDORF - **Almofada Protectora Para Calos Suaves e auto-aderentes.** Hansaplast. [Acedido a 29 de julho de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.hansaplast.pt/produtos/cuidado-dos-pes/pensos-compressas/almofada-protectora-para-calos>

Anexos

Anexo I - Tabela com elementos da equipa técnica da Farmácia Cruz.

Elemento da equipa	Cargo/Função
José Miguel Gonçalves	Diretor Técnico
Carlos Fernandes	Farmacêutico
Karina Custódio	Farmacêutica
Ana Fontes	Farmacêutica
Sílvia Antunes	Farmacêutica
Cátia Tomásio	Farmacêutica
Sara Nobre	Farmacêutica
Joana Matos	Farmacêutica
Isabel Reis	Técnica de Farmácia
Liliana Duarte	Técnica Auxiliar de Farmácia
Graça Mendes	Técnica Auxiliar de Farmácia

Anexo II - Tabela com as formações frequentadas durante o estágio.

Data	Formação	Iniciativa	Marca de apoio
26 de janeiro de 2022	Webinar Suplementação Nutricional Oral- Da teoria à prática na farmácia	Fresenius Kabi	Fresubin®
27 de janeiro de 2022	Webinar Insónia Infantil- A intervenção da Farmácia	Humana/Farmácia Distribuição	Melamil® e Melamil Tripto®
22 de fevereiro de 2022	Webinar Intervenção Farmacêutica na Tosse	Zambon	Fluimucil®
10 de março de 2022	A arte de gerir a farmácia	Alter Genéricos	-
22 de março de 2022	Webinar O papel do magnésio- Como e Quando Aconselhar a suplementação	Laboratórios Azevedo em parceria com as Escolas da ANF	Bioelectra® Magnesium
24 de março de 2022	Webinar FAMA- Endometriose	Gedeon Richer	-
5 de abril de 2022	Webinar O papel da Microbiota nas Infecções Respiratórias Víricas- Um novo paradigma	Zambon	Xevebir™ AB21™
5 de maio de 2022	Webinar Gastroenterite Infantil – A importância dos prebióticos/probióticos e da rehidratação das crianças	Humana/Farmácia Distribuição	Electrolit® Lactogermine penta®
11 de maio de 2022	FAMA IX Webinar – Miomas Uterinos	Gedeon Richer	-
24 de maio de 2022	Eucerin Sun RoadShow	Eucerin	Eucerin

Anexo III - Fotografia com as gerberas, para oferecer às utentes como forma de celebração do Dia Internacional da Mulher, publicada na página de Facebook da Farmácia Cruz. (Fonte: Farmácia Cruz)



Anexo IV - Fotografia da oferta de frutos vermelhos para os participantes do rastreio de nutrição, dinamizado com o objetivo de anunciar o regresso do serviço de consultas de nutrição à Farmácia Cruz.



Anexo V - Ficha de Preparação do Manipulado Mycostatin + Lidonostrum + Bicarbonato de sódio 8,4%. (Fonte: Farmácia Cruz)



QUANTIDADE	250 ml	LOTE	001/22	Data	07-02-22
------------	--------	------	--------	------	----------

Mycostatin + Lidonostrum + Bicarbonato sódio 8,4%

Nome do Doente	
Posologia	Bochechar durante 3 minutos antes das refeições
Via de Administração	Aplicação oral

Matérias Primas						
	Lidonostrum	Mycostatin	Bicarbonato	Água destilada	Matéria Prima 5	Matéria Prima 6
Lote	2103HA	CR58	BCS2109119	0001_2021		
Preço Custo Embalagem (s/IVA)	4,92 €	2,66 €	0,37 €	0,97 €		
Quantidade Embalagem	125,00	30,00	30,00	1000,00		
Preço Custo Unitário (s/IVA)	0,04 €	0,09 €	0,01 €	0,00 €	#DIV/0!	#DIV/0!
Quantidade	125,000000	30,000000	21,000000	250,000000		
Custo da Quantidade Necessária	4,92 €	2,66 €	0,26 €	0,24 €	#DIV/0!	#DIV/0!
Factor Multiplicativo	0,00					
Kg	1,3	6,40 €	3,458	0,3367	0,31525	#DIV/0!
Hg	1,6	7,872	4,256	0,4144	0,388	#DIV/0!
Dg	1,9	9,35 €	5,054	0,4921	0,46075	#DIV/0!
g	2,2	10,824	5,852	0,5698	0,5335	#DIV/0!
dg	2,5	12,3	6,65	0,6475	0,60625	#DIV/0!
cg	2,8	13,776	7,448	0,7252	0,679	#DIV/0!
						TOTAL Mat. Primas
						8,23 €

Factor Multiplicativo	0,05					
	Quant// Base	Honorários 1	Quanti// Extra	Factor2	Honorários 2	Total Honorários
Pomadas, Geles, Pomadas de incorporação de subst activas em sist pré-preparados industrial/	até 100g	15,33 €	0	0,01 €	- €	15,33 €
Pastas		23,00 €	0	0,01 €	- €	23,00 €
Crems		45,99 €	0	0,02 €	- €	45,99 €
Soluções Liq de incorporação de subst activas em sist pré-preparados industrial/		15,33 €	150	0,01 €	3,83 €	19,16 €
Xaropes	até 100g/100ml	45,99 €	0	0,01 €	- €	45,99 €
Suspensões		23,00 €	0	0,01 €	- €	23,00 €
Emulsões		45,99 €	0	0,01 €	- €	45,99 €
Papéis Medicamentosos	até 10 uni/s	30,66 €	0	0,10 €	- €	30,66 €
Cápsulas	até 50 uni/S	23,00 €	0	0,01 €	- €	23,00 €
Pós Compostos		15,33 €	0	0,00 €	- €	15,33 €
Granulados	até 100g	23,00 €	0	0,01 €	- €	23,00 €
Comprimidos	até 10 comp	30,66 €	0	0,10 €	- €	30,66 €
Supositórios/ Óvulos	até 10 uni/s	30,66 €	0	0,01 €	- €	30,66 €
Soluções Estéreis	até 100g/100ml	23,00 €	0	0,01 €	- €	23,00 €
Soluções Injectáveis		30,66 €	0	0,10 €	- €	30,66 €
Suspensões Injectáveis	até 10 ampolas	43,44 €	0	0,14 €	- €	43,44 €

Materiais de Embalagem	
Preço Custo (s/IVA)	2,00 €
Quantidade	1,00 €
Factor	1,20
Total	2,40 €

VVP do Manipulado		
Matérias Primas	8,23 €	Sub total
Honorários de Manipulação	19,16 €	
Materiais de Embalagem	2,40 €	29,79 €
Factor	1,30	
Total Manipulado IVA 6%	41,05 €	
Total Manipulado IVA 23%	47,63 €	

Dispositivos auxiliares de Administração	
Dispositivo	
Quantidade	- €
Preço	- €
Total dos Dispositivos	- €

Total Manipulado	IVA 6%
	41,05 €

IVA 23%
47,63 €

Preparação	Operador
1 Verificar o estado de limpeza e conservação do material e laboratório.	
2 Preparar a solução de bicarbonato de sódio a 8,4 % dissolvendo 21 g de bicarbonato de sódio em 250 mL de água destilada	
3 Agitar bem até completa dissolução	
4 Medir 125 mL de Lidonostrum 2 % e transferir para proveta graduada de 250 mL.	
5 Transferir os 30 mL do frasco Mycostatin para a proveta de 250 mL que já contém o Lidonostrum.	
6 Completar o volume até 250 mL com a solução de bicarbonato de sódio 1,4 % e agitar bem.	
7 Transferir a solução para um frasco de vidro.	
8 Fechar e rotular a embalagem.	
9 Limpar e arrumar o laboratório.	

Verificação		Operador
1 Características Organolépticas	✓	
Cor	Solução de cor amarela	
Odor	Solução com odor semelhante a mycostatin	
Aspecto	Solução de aspeto homogéneo	
2 pH		
3 Conformidade com a definição da monografia "Preparações Semi-Sólidas para aplicação local" da FP VI		
4 Quantidade	400 0	

Prazo de Validade

3 Meses

Condições de conservação

Em local Fresco e Seco

Anexo VI - Ficha de Preparação do Manipulado Enxofre a 6% em Vaselina sólida. (Fonte: Farmácia Cruz)



QUANTIDADE	LOTE	002/22	Data	11-02-22
------------	------	--------	------	----------

Manip. Enxofre a 6% em Vaselina sólida

Nome do Doente	
Posologia	Aplicar do pescoço para baixo, deixar atuar durante 24h sem lavar, repete passado 10 dias (TODA A FAMILIA)
Via de Administração	Aplicação Tópica

Matérias Primas						
	Vaselina	Enxofre	Matéria Prima 3	Matéria Prima 4	Matéria Prima 5	Matéria Prima 6
Lote	15-02-3420	191304				
Preço Custo Embalagem (s/IVA)	4,72 €	6,33 €				
Quantidade Embalagem	900,00	250,00				
Preço Custo Unitário (s/IVA)	0,01 €	0,03 €	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
Quantidade	376,000000	24,000000				
Custo da Quantidade Necessária	1,97 €	0,81 €	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
Factor Multiplicativo	0,00					
Kg	1,3	2,56 €	0,789984	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
Hg	1,6	3,155057778	0,972288	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
Dg	1,9	3,746631111	1,154592	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
g	2,2	4,338204444	1,336896	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
dg	2,5	4,929777778	1,5192	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
cg	2,8	5,521351111	1,701504	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
						TOTAL Mat. Primas
						4,31 €

0,05						
	Quant// Base	Honorários 1	Quant// Extra	Factor2	Honorários 2	Total Honorários
Pomadas, Geles, Pomadas de incorporação de subst activas em sist pré-preparados industrial/	até 100g	15,33 €	300	0,01 €	15,33 €	30,66 €
Pastas		23,00 €	0	0,01 €	- €	23,00 €
Cremses		45,99 €	0	0,02 €	- €	45,99 €

Soluções Liq de incorporação de subst activas em sist pré-preparados industrial/						
	até 100g/100ml	15,33 €	0	0,01 €	- €	15,33 €
Xaropes		45,99 €	0	0,01 €	- €	45,99 €
Suspensões		23,00 €	0	0,01 €	- €	23,00 €
Emulsões		45,99 €	0	0,01 €	- €	45,99 €

Papéis Medicamentosos						
	até 10 uni/s	30,66 €	0	0,10 €	- €	30,66 €
Cápsulas	até 50 uni/s	23,00 €	0	0,01 €	- €	23,00 €
Pós Compostos	até 100g	15,33 €	0	0,00 €	- €	15,33 €
Granulados		23,00 €	0	0,01 €	- €	23,00 €
Comprimidos	até 10 comp	30,66 €	0	0,10 €	- €	30,66 €
Supositórios/ Óvulos	até 10 uni/s	30,66 €	0	0,01 €	- €	30,66 €

Soluções Estéreis	até 100g/100ml	23,00 €	0	0,01 €	- €	23,00 €
Soluções Injectáveis		30,66 €	0	0,10 €	- €	30,66 €
Suspensões Injectáveis	até 10 ampolas	43,44 €	0	0,14 €	- €	43,44 €

Materiais de Embalagem	
Preço Custo (s/IVA)	1,20 €
Quantidade	2,00 €
Factor	1,20
Total	2,88 €

PVP do Manipulado		
Matérias Primas	4,31 €	Sub total
Honorários de Manipulação	30,66 €	37,85 €
Materiais de Embalagem	2,88 €	
Factor	1,30	
Total Manipulado IVA 6%	52,16 €	
Total Manipulado IVA 23%	60,52 €	

Dispositivos auxiliares de Administração	
Dispositivo	
Quantidade	- €
Preço	- €
Total dos Dispositivos	- €

Total Manipulado	IVA 6%
	52,16 €

IVA 23%
60,52 €

Preparação		Operador
1	Limpar hélice do agitador mecanico com água destilada, secando-o com papel absorvente	
2	Verificar o estado de limpeza do recipiente de mistura	
3	Passar a Vaselina directamente para o recipiente	
4	Passar e pulverizar o enxofre	
5	Adicionar o enxofre à vaselina branca e agitar	
6	Elevar e baixar repetidamente o recipiente no misturador por forma a homogeneizar totalmente	
7	Accionar repetidamente o agitador por forma a destacar a pomada aderida à hélice	
8	Limpar hélice com papel absorvente, lavar com água quente e deseguida com água destilada	
9	Secar hélice com papel absorvente	

Verificação		✓	Operador
1	Características Organolépticas		
	Cor	Pomada de cor amareia	
	Odor	Pomada com cheiro sulfuroso	
	Aspecto	Pomada com aspecto homogéneo	
2	pH		
3	Conformidade com a definição da monografia "Preparações Semi-Sólidas para aplicação local" da FP VI		
4	Quantidade	400	

Prazo de Validade
3 Meses

Condições de conservação
Em local Fresco e Seco

**Anexo VII - Ficha de Preparação do Manipulado Pomada de ácido salicílico a 5% (FGP A.I.I.).
(Fonte: Farmácia Cruz)**



QUANTIDADE	LOTE	003/22
------------	------	--------

Data	22-02-22
------	----------

Pomada de ácido salicílico a 5% (FGP A.I.I.)

Nome do Doente	
Posologia	Segundo indicação médica
Via de Administração	Aplicação tópica

Matérias Primas						
	Acido Salicílico	Vaselina líquida	Vaselina Sólida	Matéria Prima 4	Matéria Prima 5	Matéria Prima 6
Lote	RAS2116900	001/184/9	15-022420			
Preço Custo Embalagem (s/IVA)	2,15 €	4,05 €	4,84 €			
Quantidade Embalagem	100,00	1000,00	900,00			
Preço Custo Unitário (s/IVA)	0,02 €	0,00 €	0,01 €	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
Quantidade	10,000000	2,140000	186,600000			
Custo da Quantidade Necessária	0,22 €	0,01 €	1,00 €	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
Factor Multiplicativo	0,00					
Kg	1,3	0,28 €	0,0112671	1,304541333	#DIV/0!	#DIV/0!
Hg	1,6	0,344	0,0138672	1,605589333	#DIV/0!	#DIV/0!
Dg	1,9	0,4085	0,0164673	1,906637333	#DIV/0!	#DIV/0!
g	2,2	0,473	0,0190674	2,207885333	#DIV/0!	#DIV/0!
dg	2,5	0,5375	0,0216675	2,508733333	#DIV/0!	#DIV/0!
cg	2,8	0,602	0,0242676	2,809781333	#DIV/0!	#DIV/0!
						TOTAL Mat. Primas
						2,03 €

Factor Multiplicativo	5,11 €
------------------------------	--------

	Quant/ Base	Honorários 1	Quant/ Extra	Factor2	Honorários 2	Total Honorários
Pomadas, Geles, Pomadas de incorporação de subst activas em sist pré-preparados industrial/	até 100g	15,33 €	100	0,01 €	5,11 €	20,44 €
Pastas		23,00 €	0	0,01 €	- €	23,00 €
Cremses		45,99 €	0	0,02 €	- €	45,99 €
Soluções Liq de incorporação de subst activas em sist pré-preparados industrial/		15,33 €	0	0,01 €	- €	15,33 €
Xaropes	até 100g/100ml	45,99 €	0	0,01 €	- €	45,99 €
Suspensões		23,00 €	0	0,01 €	- €	23,00 €
Emulsões		45,99 €	0	0,01 €	- €	45,99 €
Papéis Medicamentosos	até 10 uni/s	30,66 €	0	0,10 €	- €	30,66 €
Cápsulas	até 50 uni/S	23,00 €	0	0,01 €	- €	23,00 €
Pós Compostos	até 100g	15,33 €	0	0,00 €	- €	15,33 €
Granulados		23,00 €	0	0,01 €	- €	23,00 €
Comprimidos	até 10 comp	30,66 €	0	0,10 €	- €	30,66 €
Supositórios/ Óvulos	até 10 uni/s	30,66 €	0	0,01 €	- €	30,66 €
Soluções Estéreis	até 100g/100ml	23,00 €	0	0,01 €	- €	23,00 €
Soluções Injectáveis	até 10 ampolas	30,66 €	0	0,10 €	- €	30,66 €
Suspensões Injectáveis		43,44 €	0	0,14 €	- €	43,44 €

Materiais de Embalagem	
Preço Custo (s/IVA)	1,72 €
Quantidade	2,00 €
Factor	1,20
Total	4,13 €

PVP do Manipulado		
Matérias Primas	2,03 €	Sub total
Honorários de Manipulação	20,44 €	26,60 €
Materiais de Embalagem	4,13 €	
Factor	1,30	
Total Manipulado IVA 6%	36,66 €	
Total Manipulado IVA 23%	42,54 €	

Dispositivos auxiliares de Administração	
Dispositivo	
Quantidade	- €
Preço	- €
Total dos Dispositivos	- €

Total Manipulado	IVA 6% 36,66 €
-------------------------	--------------------------

IVA 23% 42,54 €

Preparação	Operador
1 Limpar a hélice do agitador mecânico com água destilada, secando-a, em seguida, com papel absorvente.	
2 Verificar o estado de limpeza do recipiente de mistura do agitador mecânico.	
3 Pesar a Vaselina líquida directamente para o recipiente do agitador mecânico.	
4 Após pesagem das restantes matérias primas, adicionar o ácido salicílico à vaselina líquida e misturar.	
5 Adicionar a vaselina sólida à mistura preparada em 4) e misturar.	
6 Abrir ligeiramente a tampa do recipiente e elevá-lo, de modo a que a hélice empurre o seu fundo móvel totalmente para baixo.	
7 Fechar a tampa do recipiente e baixá-lo totalmente, de modo a que a hélice fique localizada na sua parte superior.	
8 Acionar o agitador durante alguns segundos, de modo a provocar o destacamento de	
9 Retirar o recipiente do agitador e fechá-lo convenientemente.	
10 Limpar a hélice com papel absorvente.	
11 Lavar a hélice com água corrente quente, e, em seguida, com água destilada.	
12 Secar a hélice com papel absorvente.	

Verificação	Operador
1 Características Organolépticas	
Cor	Pomada de cor branca
Odor	Pomada inodora.
Aspetto	Pomada com aspecto homogéneo
2 pH	
3 Conformidade com a definição da monografia "Preparações Semi-Sólidas para aplicação local" da FP VI	
4 Quantidade	200 +- 5g

Prazo de Validade
3 Meses

Condições de conservação
Conservar à temperatura ambiente em recipiente opaco e bem fechado.

Anexo VIII - Casos Práticos

Caso Prático 1

Um utente, com cerca de 70 anos, dirigiu-se à farmácia e queixou-se de dor de estômago e de sensação de regurgitação ácida, que sugere a presença de refluxo gastroesofágico. Através da realização da anamnese, na qual fiz questões sobre a dor que sentia e outros sintomas associados, a sua medicação habitual e estilo de vida, consegui avaliar a sua situação. Assim, como medida farmacológica, aconselhei-o a tomar PROTON[®] 20 mg de manhã em jejum, ou seja, 30 minutos antes do pequeno-almoço, durante 14 dias, uma vez que não apresentava qualquer contraindicação. O PROTON[®] é um MNSRM, uma vez que a caixa é de 14 comprimidos, que contém 20 mg de princípio ativo, o omeprazol, pertencente à classe farmacológica dos inibidores da bomba de protões.⁶ Como medidas não farmacológicas aconselhei-o a reduzir o número de cigarros que fumava por dia, uma vez que me referiu ser fumador, a evitar alimentos fritos, ácidos e picantes, chocolate e café e ainda a não consumir alimentos imediatamente antes de ir dormir. Por fim, ainda lhe sugeri que caso não se sentisse melhor deveria dirigir-se ao médico.

Caso Prático 2

Uma utente, com cerca de 40 anos, dirigiu-se à farmácia e relatou que a filha de 4 anos, nos dias anteriores, se queixava de dores de barriga e acordava a meio da noite com prurido intenso na região anal. Através da realização de mais algumas questões, apercebi-me que o mais provável seria tratar-se de uma oxiúriase, ou seja, uma infeção pelo parasita *Enterobius vermicularis*, uma vez que este aparece habitualmente em crianças em idade escolar e a mãe não detetou a presença de vermes, nem de ovos nas roupas e/ou fezes da criança. Deste modo, como tratamento farmacológico aconselhei Pantelmin[®], MNSRM cujo princípio ativo é mebendazol, um anti-helmíntico de largo espectro de ação, alargado a toda a família, dado que a oxiúriase se trata de uma epidemia familiar e existe grande probabilidade de autoinfeção e reinfeção. Para a filha de 4 anos aconselhei Pantelmin[®] 20 mg/ml, na forma farmacêutica de suspensão oral, 5 mL de manhã e 5 mL à noite, durante ou logo após as refeições, 3 dias consecutivos, e para os restantes membros do agregado familiar Pantelmin[®] 100 mg, 1 comprimido de manhã e 1 comprimido à noite, durante ou logo após as refeições, 3 dias consecutivos.⁷ Como medidas não farmacológicas indiquei o reforço das boas práticas de higiene pessoal, nomeadamente a lavagem das mãos, a limpeza de todo o meio envolvente (roupas de cama e toalhas), a evicção da fricção da área infetada e ainda que poderia aplicar um óleo, na zona perianal, de modo a impedir a dispersão dos ovos no meio ambiente.

A utente ainda me questionou sobre como realmente poderia confirmar de que se tratava de uma infeção por *Enterobius vermicularis*, ao qual respondi que através de diagnóstico laboratorial, no qual se faz a colheita de amostra através de fita adesiva na região perianal, de preferência de manhã, antes do banho ou defecação.

Caso Prático 3

Um utente, com cerca de 25 anos, dirige-se à farmácia e pede dois testes de pesquisa de antigénio para a deteção da infeção pelo vírus SARS-CoV-2. Afirmou que já tinha realizado um teste no dia anterior e que o resultado tinha sido não detetado, no entanto, apresentava congestão nasal, expetoração e febre. Como se tratava de um indivíduo jovem e saudável, que não se encontrava a efetuar nenhuma medicação crónica, optei por lhe aconselhar Panadol® Gripus, que apresenta uma associação de princípios ativos, o paracetamol, a fenilefrina e a guaifenesina, e possui 4 ações: analgésica, anti-pirética, descongestionante e expetorante, na posologia de 2 cápsulas a cada 4/6h, não devendo exceder as 6 cápsulas por dia e no máximo até 3 dias.⁸ Para além disto, ainda aconselhei medidas não farmacológicas, tais como a lavagem nasal, para a qual lhe indiquei 1 a 2 pulverizações, em cada narina, 1 a 3 vezes ao dia, com uma água do mar hipertónica⁹, a ingestão de muitos líquidos e repouso.

O utente ainda solicitou por uma Vitamina C, pelo que decidi recorrer ao auxílio das gamas existentes na farmácia e através da pesquisa na gama de “imunoestimulantes”, acabei por aconselhar Advancis® Vitamina C+ Equinácea, 1 comprimido de manhã.¹⁰

Por fim, ainda lhe indiquei que caso não verificasse melhoria dos sintomas ao fim de três dias, deveria consultar um médico.

Caso Prático 4

Uma utente, com cerca de 60 anos, deslocou-se até à farmácia, para levantar alguns medicamentos, presentes em receitas médicas, para si e para o seu marido. Entretanto, a utente solicitou uma caixa de comprimidos Antigrippine® Trieffect, constituído por uma associação de fármacos, paracetamol e fenilefrina,¹¹ para o marido, afirmando que este se encontrava com corrimento e congestão nasal e com tosse com expetoração. Ao avaliar o histórico de vendas do utente verifiquei que efetuava medicação para a hipertensão arterial e para o glaucoma e questioneei a esposa sobre isto, de modo a confirmar a informação apresentada. Assim, uma vez que a utente me confirmou que o marido tinha estas duas patologias, expliquei-lhe que o Antigrippine® Trieffect não seria a melhor opção para ele, dado que a fenilefrina, como descongestionante nasal sistémico, encontra-se contraindicada em

indivíduos com hipertensão arterial e glaucoma. Portanto, como alternativas sugeri o Rezipop[®], que é um dispositivo médico e reduz eficazmente sintomas como corrimento e congestão nasal, 1 a 2 pulverizações, em cada narina, várias vezes ao dia,¹² e o Flumucil[®] comprimidos efervescentes com 600 mg de acetilcisteína, para alívio da tosse com expetoração,¹³ 1 comprimido, de preferência à noite, dado que não apresentava qualquer contraindicação para estes. Como medidas não farmacológicas aconselhei a ingestão de muitos líquidos e humidificar o ambiente.

No final, a senhora agradeceu-me por a ter alertado que o Antigrippine[®] Trieffect se encontrava indicado contraindicado para o marido e por lhe ter indicado alternativas para a sua sintomatologia.

Caso Prático 5

Um utente, com cerca de 45 anos, dirige-se à farmácia e solicita pensos calicidas para um calo que apresentava na planta do pé. Por conseguinte, questionei se era diabético ao que me respondeu que não, também perguntei qual era o tamanho do calo plantar e, uma vez que o senhor estava a ter alguma dificuldade para me demonstrar qual o tamanho do calo, pedi-lhe para me acompanhar ao gabinete do utente de forma a conseguir visualizar o calo. Entretanto, fui chamar uma colega farmacêutica para dar uma segunda opinião. O utente afirmou que já se encontrava a fazer pensos calicidas há 2 semanas, como não estava a obter melhorias e a pele à volta do calo já se encontrava irritada, sugerimos-lhe vir às consultas de podologia existentes na farmácia. No entanto, como o senhor se demonstrou elevada preocupação com a situação, decidimos enviar fotografias do calo e ligar ao podologista para confirmar se realmente se tratava de um calo e deixá-lo descansado. Ao ver as fotografias, o podologista confirmou que se tratava de um calo muito profundo e informou que o utente deveria parar com o tratamento calicida imediatamente e utilizar algum produto que promovesse a regeneração da pele até à próxima consulta. Assim, aconselhei-o a aplicar 2 vezes ao dia o Avène[®] Cicalfate+ Creme Reparador Protetor¹⁴ e a utilizar as Hansaplast[®] Almofadas Protetoras para Calos, que protegem os calos da dor causada pela pressão e fricção, especialmente pelo contacto com o calçado,¹⁵ até vir à consulta.

No final, o senhor ficou muito agradecido por toda a atenção que tivemos com ele.

Assim, este caso reflete a importância da intercolaboração entre os diferentes profissionais de saúde, uma vez que o objetivo é o mesmo: o bem-estar do utente.

PARTE II

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica



Laboratórios Basi - Indústria Farmacêutica, S.A.

Sob orientação do Dr. Nuno Marques.

Lista de Abreviaturas

CTD - *Common Technical Document*

ERP - Primavera

FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FHC - *The Future Health Care*

FI - Folheto Informativo

IJM - *Injectable Manufacture*

LSM - *Liquid Semi-solid Manufacture*

MED - *Medical Affairs*

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

PM - *Product Management*

REG - *Regulatory Affairs*

RGS - *Registration*

ROT- Rotulagem

SOP - *Standard operating procedure*

VAR - *Variations*

Resumo

A Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra permite que os estudantes do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas realizem estágio curricular noutra área do medicamento, para além de Farmácia Comunitária. Deste modo, tive a oportunidade de realizar estágio em Indústria Farmacêutica, no departamento de *Regulatory Affairs* dos Laboratórios Basi - Indústria Farmacêutica, S.A., durante o período de 2 de maio a 25 de julho de 2022. O relatório de estágio ilustra a análise SWOT (do inglês, *Strengths, Weaknesses, Opportunities* e *Threats*) referente à frequência do estágio, à adequação do curso e às perspetivas profissionais futuras.

Palavras-Chave: Estágio curricular; Indústria Farmacêutica; *Regulatory Affairs*; Análise SWOT.

Abstract

The Faculty of Pharmacy at the University of Coimbra allows students of the Integrated Master's Degree in Pharmaceutical Sciences to carry out curricular internships in another area of medicine, besides Community Pharmacy. Thus, I had the opportunity to do an internship in Pharmaceutical Industry, in the Regulatory Affairs department of Laboratórios Basi - Indústria Farmacêutica, S.A., from May 2nd to July 25th, 2022. The internship report illustrates the SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, and Threats*) analysis of the internship, the suitability of the course, and the future career prospects.

Keywords: Curricular internship; Pharmaceutical Industry; Regulatory Affairs; SWOT Analysis.

Introdução

O plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) engloba a Unidade Curricular “Estágio” no 2º semestre do 5º ano.¹ Não obstante à realização obrigatória de estágio em Farmácia Comunitária, é possibilitado aos estudantes realizarem um estágio adicional noutra área do medicamento. Dado que, ao longo do curso, diversas unidades curriculares abordavam aspetos teóricos relacionados com a Indústria Farmacêutica, isso suscitou a minha curiosidade relativamente à realidade de um Farmacêutico nesta área de atividade.

Para conclusão do meu percurso académico, tive a oportunidade de realizar o meu estágio curricular em Indústria Farmacêutica nos Laboratórios Basi - Indústria Farmacêutica, S.A., no departamento de *Regulatory Affairs* (REG), durante o período de 2 de maio a 25 de julho de 2022, sob orientação do Dr. Nuno Marques.

O relatório de estágio foi elaborado no formato de análise SWOT (do inglês, *Strengths, Weaknesses, Opportunities* e *Threats*) fundamentada a dois níveis, interno e externo, na qual serão identificadas quatro vertentes referentes à frequência do estágio em Indústria Farmacêutica, à adequação do curso e às perspetivas profissionais futuras, salvaguardando a confidencialidade requerida. A nível interno encontram-se expostos os meus pontos fortes (*Strengths*) e pontos fracos (*Weaknesses*), que contribuíram para o meu desempenho durante o estágio, e a nível externo as oportunidades (*Opportunities*) e as ameaças (*Threats*) que surgiram no decorrer deste.

I. Laboratórios Basi - Indústria Farmacêutica, S.A.

Os Laboratórios Basi - Indústria Farmacêutica, S.A. é uma empresa nacional de referência no seu sector de atividade, que possui um portefólio com mais de 240 produtos farmacêuticos registados, desde medicamentos, dispositivos médicos até suplementos e dermocosméticos.²

Esta Indústria Farmacêutica foi fundada em 1956 em Coimbra, tendo sido adquirida pela atual administração em 2003. Atualmente, as suas duas unidades fabris, *Liquid Semi-solid Manufacture* (LSM) e *Injectable Manufacture* (IJM), e restantes instalações encontram-se localizadas no Parque Industrial Manuel Lourenço Ferreira, em Mortágua, distrito de Viseu.^{2,3}

Os Laboratórios Basi - Indústria Farmacêutica, S.A. pertencem ao Grupo *The Future Health Care* (FHC), uma multinacional portuguesa que integra outras empresas que permitem a sua presença em toda a cadeia de valor do medicamento. O Grupo FHC inclui também empresas

de distribuição e logística, tais como a Empifarma - Produtos Farmacêuticos, S.A., FHC | Farmacêutica, Overpharma - Produtos Médicos e Farmacêuticos, Lda. e Laphysan, e também de consultoria, tais como a Phagecon - Serviços e Consultoria Farmacêutica, Lda. e Zeone Informática Lda..^{3,4,5}

Esta empresa é constituída por diversos departamentos, no entanto, apenas foram facultadas vagas para estágios curriculares nos departamentos de *Research & Development*, de *Quality Control*, de *Production*, de *Technical Management*, de *Quality Management System* e de REG. Após alguma ponderação, a minha escolha recaiu sobre o departamento de REG, devido, principalmente, ao meu interesse por esta área, adquirido através da unidade curricular de Assuntos Regulamentares do Medicamento, lecionada no 2º semestre do 4º ano do MICF.

O departamento de REG encontra-se subdividido em diferentes secções, nomeadamente, *Technical Support*, *Product Management (PM)*, *Registration (RGS)*, *Variations (VAR)* e *Medical Affairs (MED)*. As responsabilidades das diferentes secções encontram-se integradas nos processos de lançamento de produto Basi e de outros titulares em regime de *out licensing* ou em regime de *contract manufacturing agreement*, de transposição de escala, de registo no Mercado Regulado, de alterações e de descontinuação de produto.

2. Análise SWOT

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Formação adquirida no MICF

O plano curricular do MICF inclui unidades curriculares como Assuntos Regulamentares do Medicamento, Garantia e Gestão da Qualidade, Tecnologia Farmacêutica I, II e III, cujo programa se encontra direcionado para aspetos presentes na realidade da Indústria Farmacêutica. Deste modo, estas permitiram-me adquirir conhecimentos teóricos base e desenvolver competências, que contribuíram para a minha preparação e posterior desempenho enquanto estagiária no departamento de REG.

2.1.2. Destreza na língua inglesa

Na área de Indústria Farmacêutica é de extrema relevância possuir destreza para ler e escrever em inglês, uma vez que, tratando-se de uma língua universal, a maioria dos documentos oficiais, *Guidelines* e artigos científicos se encontram escritos nesta.

No decorrer do meu estágio, foram-me propostas tarefas que implicaram o domínio da língua inglesa, tais como a revisão dos textos dos Folhetos Informativos (FIs) e da Rotulagem (ROT),

presentes nas Artes Gráficas dos medicamentos, suplementos alimentares e cosméticos, para PM, o preenchimento do *Quality Information Summary* para RGS, a pesquisa bibliográfica para o Módulo 2.4 e o Módulo 2.5 do *Common Technical Document* (CTD) e a elaboração de FIs e ROT a partir dos *Product Information Templates* para MED. Assim, devido às minhas competências e conhecimentos prévios de inglês, a língua não demonstrou ser um entrave à execução destas tarefas.

2.1.3. Capacidade de trabalhar em equipa

Nos Laboratórios Basi existe interligação e interdependência dos diferentes departamentos da organização, de forma a garantir a qualidade, segurança e eficácia de todos os produtos farmacêuticos lançados no mercado. Deste modo, a capacidade de trabalhar em equipa, isto é, de saber comunicar, partilhar conhecimentos, discutir ideias e apresentar sugestões de melhoria, sempre na base do respeito pelo próximo, é uma *soft skill* fundamental para trabalhar em Indústria Farmacêutica.

O facto ter sido bem acolhida e recebida pelos colaboradores do departamento de REG, aliado à minha facilidade em trabalhar em equipa, contribuiu para a minha integração neste departamento e posterior colaboração com todos os elementos, em prol do alcance dos objetivos da organização.

2.1.4. Interesse na Aprendizagem

Uma vez que tive a oportunidade de estagiar em Indústria Farmacêutica, quis reter o máximo de informação possível sobre todos os processos e procedimentos aí desenvolvidos. Deste modo, encontrava-me motivada e entusiasmada para poder contribuir e auxiliar na realização das tarefas desenvolvidas pelo departamento de REG, o que contribuiu para o meu desempenho no decorrer do estágio.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Falta de destreza noutros idiomas

Algumas das tarefas realizadas, essencialmente para PM e para MED, no decorrer do estágio, envolveram outros idiomas, para além do inglês, nomeadamente, o francês e o espanhol, dos quais apenas detenho conhecimentos básicos. Isto não se tornou um fator impeditivo para a sua execução, no entanto, a falta de destreza na leitura e escrita destas duas línguas foi limitativo, na medida em que prejudicava a minha capacidade de interpretação dos textos, demorando mais tempo a analisá-los.

2.2.2. Falta de conhecimentos sobre o funcionamento de Softwares Informáticos

No início do estágio fui confrontada com a existência de diversos *softwares* informáticos próprios, tais como o Q-pulse, o Primavera (ERP) e o GestAW, que são ferramentas de trabalho fundamentais no departamento de REG. Apesar de ter recebido breves introduções sobre o seu funcionamento, inicialmente demonstrei falta de destreza na sua utilização. No entanto, no decorrer do estágio, uma vez que estes eram ferramentas cruciais para executar as tarefas propostas, fui explorando as suas funcionalidades e questionando os colaboradores, sempre que tinha dúvidas sobre os mesmos, de forma a aprender a utilizá-los corretamente.

2.2.3. Desconhecimento do significado de Siglas e Acrónimos

A nível regulamentar são utilizadas diversas siglas e acrónimos para referir departamentos, processos, documentos, programas, bases de dados e *softwares* informáticos, com os quais não estava familiarizada. Isto dificultou a leitura e interpretação de algumas *standard operating procedures* (SOPs) e, inclusivamente, de alguma da informação que me era transmitida verbalmente.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Formações

Nos primeiros dias de estágio recebi formações gerais sobre o Sistema de Gestão de Qualidade, SOP.31 - Vestuário, Farmacovigilância, Q-Pulse: Document LifeCycle e Gestão Ambiental e Segurança no Trabalho, sendo então acolhida como todos os novos colaboradores. Estas foram fundamentais para dar a conhecer a organização e integrar os novos colaboradores.

No Departamento de REG tive formações internas mais específicas sobre ORIMED (base de dados do portfólio dos Laboratórios Basi), SOP.42 - Elaboração de Textos e Circuito de Artes Gráficas, SOP.45 - Criação e manutenção de artigos no ERP, de introdução às *European Commission 2013/C 223/01 Guidelines*, referentes à categorização e tipificação de alterações e a documentação necessária para a sua submissão e das etapas para submissão do CTD, de alterações e de pedidos de elementos. Estas pequenas formações foram uma mais-valia, uma vez que me permitiram enquadrar as tarefas antes de as começar a desempenhar.

Para além disso, ainda tive oportunidade de assistir ao 4th Basi Lab Meeting - “*From an idea to formulation: Developing a new fixed-dose combination product*” na Pharma Academy. Esta atividade

foi implementada no início do ano de 2022 e pretende criar um espaço de partilha e debate de ciência.

2.3.2. Visita guiada pelas instalações

A visita guiada pelas instalações constituiu uma oportunidade para conhecer a localização dos outros departamentos da empresa e para entrar nas unidades de produção de IJM e LSM, onde pude assistir presencialmente às etapas físicas pelas quais o medicamento passa na linha de produção e que só tinha visualizado através de imagens e vídeos, ao longo dos quatro anos teóricos do MICF.

2.3.3. Integração em todas as secções do departamento

Enquanto estagiária do departamento de REG, tive oportunidade de conhecer e auxiliar nas tarefas desenvolvidas pelas diferentes secções. Considero que isto foi uma oportunidade, uma vez que me permitiu adquirir uma visão global do departamento e da distribuição de responsabilidades pelas diferentes secções.

2.3.4. Desenvolvimento do sentido crítico

A realização do estágio no departamento de REG, especialmente na secção de PM, permitiu-me desenvolver o meu sentido crítico, uma vez que a validação e aprovação de artes gráficas de medicamentos, dispositivos médicos, suplementos alimentares e cosméticos assim o exige. É necessário efetuar uma análise atenta, metódica e meticulosa dos pareceres técnicos e científicos presentes nas artes gráficas, para que tudo esteja conforme para a sua libertação no mercado.

A deteção de erros nas artes gráficas de produtos farmacêuticos, após o seu lançamento, pode implicar recolhas de mercado, o que acarreta um elevado sentido de responsabilidade na sua análise, que deve ser efetuada de forma conscienciosa e criteriosa.

2.3.5. Desenvolvimento de capacidades de gestão de tempo

Todas as responsabilidades dos departamentos presentes em Indústria Farmacêutica obrigam ao cumprimento de prazos previamente estabelecidos, que obrigam os colaboradores a saber gerir o seu tempo e a estabelecer prioridades.

A minha integração na secção de PM permitiu-me desenvolver capacidades de gestão de tempo, uma vez que a validação e aprovação de artes gráficas são efetuadas em circuito, que se iniciava no *designer* gráfico, passava por mim e ainda por mais dois colaboradores, pelo que

aprendi a gerir o tempo de análise que despendia, de forma a não prejudicar o dos outros e tendo sempre em conta as prioridades e os prazos de entrega estabelecidos.

2.3.6. Desenvolvimento de capacidades Informáticas

Apesar das dificuldades que senti no funcionamento dos *softwares* informáticos, tais como Q-pulse, ERP e GestAW, ao longo do estágio, tive oportunidade de adquirir conhecimentos sobre as suas funcionalidades e modo de utilização. Para além disso, ainda pude melhorar e aprofundar os meus conhecimentos e habilidades em Microsoft® Word e Microsoft® Excel, que são ferramentas importantes até mesmo no quotidiano.

2.3.7. Ter sido a única estagiária

Durante os meses de maio a julho, fui a única estagiária no departamento de REG, o que demonstrou ser benéfico, visto que os colaboradores se encontravam exacerbados de trabalho e apresentavam prazos para cumprir, o que fez com que por vezes não tivessem tanta disponibilidade, quanto desejariam, para me explicar detalhadamente todos os procedimentos. Assim sendo, mais do que um estagiário tornar-se-ia insustentável e não seria proveitoso em termos de rentabilidade da aprendizagem.

2.3.8. Possibilidade de realização de estágio por via remota

Uma vez que a principal ferramenta de trabalho do departamento de REG é o computador, que me foi logo facultado aquando do início do estágio, e é através deste que se tem acesso a toda a informação da organização, foi-me dada a possibilidade de realizar estágio por via remota durante alguns dias. O teletrabalho é uma prática estabelecida no departamento de REG e que diversos colaboradores usufruem. Assim, com acesso a todas as condições necessárias, tive oportunidade de realizar estágio por via remota alguns dias, podendo sempre contactar algum dos colaboradores, através do Microsoft® Teams, caso tivesse alguma dúvida ou questão, pelo que a minha aprendizagem não foi prejudicada e ainda tinha como vantagem não ter de efetuar a deslocação até à empresa.

2.4. Ameaças

2.4.1. Problemas Informáticos

No início do estágio foi-me emprestado um computador pela empresa e este foi uma ferramenta de trabalho fundamental para realizar as tarefas propostas no decorrer do mesmo, tal como referi anteriormente. Por isso, quando surgiam problemas informáticos, tal como a

instalação incorreta de *softwares*, ou quando não tinha os dados de acesso a determinados programas, tais como Outlook, Microsoft® Teams, Q-pulse, tinha de recorrer aos colaboradores da Zeone, e encontrava-me impedida de realizar as tarefas propostas.

2.4.2. Reorganização do estágio

Inicialmente, era apenas para ser integrada nas secções de RGS, de VAR e de MED, no entanto, o meu estágio sofreu uma reorganização, devido à saída de vários colaboradores do departamento de REG, entre os quais o orientador que me tinha sido atribuído no início, pelo que passei também a integrar a secção de PM.

Apesar de todos os colaboradores do departamento me terem acolhido bem e integrado na equipa, demonstrando-se disponíveis para esclarecer qualquer dúvida ou questão, a fase inicial do meu estágio apresentou-se como um desafio à minha motivação, uma vez que não tinha oficialmente alguém responsável por mim. No entanto, o Dr. Nuno Marques assumiu as funções e responsabilidades de meu orientador e integrou-me na secção de PM.

A minha integração nas diferentes secções foi feita de forma simultânea, o que fez com que a ordem pela qual realizava as tarefas propostas por estas fosse um pouco aleatória. Isto exigiu flexibilidade e capacidade de organização da minha parte e dificultou a minha aprendizagem e compreensão sobre o trabalho desenvolvido em cada uma das secções e o encadeamento dos processos entre estas.

Na minha opinião, o estágio poderia ter sido mais proveitoso, se a integração em cada uma das secções tivesse sido feita de forma sequencial, para que pudesse dedicar-me única e exclusivamente às tarefas de uma secção de cada vez.

Para além disso, considero que um número superior de colaboradores no departamento poderia ter potenciado a minha aprendizagem, na medida em que a disponibilidade para formação, esclarecimento de dúvidas e acompanhamento teria sido superior.

Considerações Finais

A possibilidade de realização de estágio noutra área do medicamento confere uma grande vantagem competitiva aos estudantes do MICF da FFUC, uma vez que nos permite estabelecer contacto com a realidade de outras saídas profissionais, para além de Farmácia Comunitária/Farmácia Hospitalar, antes de entrarmos efetivamente no mercado de trabalho.

A realização de estágio no departamento de REG dos Laboratórios Basi - Indústria Farmacêutica, S.A. permitiu-me estabelecer o meu primeiro contacto com Indústria

Farmacêutica. Assim, tive oportunidade de conhecer a dinâmica interna da empresa e alguns dos processos efetuados, para além de ter avaliado a aplicabilidade dos conhecimentos teóricos adquiridos no MICF no contexto da prática profissional. Esta experiência foi indubitavelmente enriquecedora, tanto a nível profissional como pessoal.

Por último, considero que o Farmacêutico é um profissional extremamente qualificado para integrar a equipa multidisciplinar presente em Indústria Farmacêutica e que o MICF fornece as bases teóricas necessárias para quem perspetive desenvolver uma carreira em Indústria Farmacêutica. No entanto, considero que é importante a especialização na área, após a conclusão do MICF, que, sendo um curso de cinco anos e com o leque tão vasto de saídas profissionais, não permite desenvolver e aprofundar em detalhe todo o conhecimento necessário para Indústria Farmacêutica.

Referências Bibliográficas

1. **Despacho n.o 11765/2018, n.º 236 de 7 de dezembro.** Diário da República n.º 236/2018, Série II de 2018-12-07, 32883 – 32886. Universidade de Coimbra.
2. LABORATÓRIOS BASI - **Laboratórios Basi - Your Health, Our World – Home.** 2021. [Acedido a 20 de julho de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.basi.pt/>
3. GRUPO FHC - **Empresas do Grupo.** 2022. [Acedido a 20 de julho de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.fhcthefutureofhealthcare.pt/pt/empresas-do-grupo>
4. GRUPO FHC - **GRUPO FHC.** 2022. [Acedido a 20 de julho de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.fhcthefutureofhealthcare.pt/pt/grupo-fhc>
5. FHC | Farmacêutica, S.A. - **FHC | Farmacêutica – Home.** [Acedido a 20 de julho de 2022]. Disponível na Internet: <https://www.fhc.pt/>

PARTE III

Monografia

**“Alzheimer's Disease: Endosomal Trafficking Pathway Dysfunction
as a Primary Pathophysiological Event“**

Sob orientação da Professora Doutora Armanda Santos.

List of abbreviations

AD - Alzheimer disease

AP - Amyloid plaque

APLP1 - Amyloid β precursor like protein 1

APOE - Apolipoprotein E

APP - Amyloid precursor protein

APPL - Amyloid precursor protein Like

APPL1 - Adaptor protein containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosine binding domain and leucine zipper motif

BACE1 - β -site APP-cleaving enzyme 1

BBB - Blood–brain barrier

BIN1 - Bridging integrator-1

C99 - β -secretase-derived C-terminal fragment of 99 amino acids

CD2AP - CD2-associated protein

CHL1 - Close homolog of L1

CHMP2B - Charged multivesicular body protein 2B

CIM6PR - Cation-independent mannose 6-phosphate receptor

CNS - Central nervous system

CSF - Cerebrospinal fluid

CT - Computed tomography

CTSD - Cathepsin D

EE - Early endosome

ESCRT - Endosomal sorting complex required for transport

EV - Extracellular vesicle

FAD - Familial Alzheimer disease

GEF - Guanidine nucleotide exchange factor

GWAS - Genome-wide association studies

HRS - Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate

ILV - Intraluminal vesicles

iPSC - induced Pluripotent stem cell

LDL - Low-density lipoprotein

LE - Late endosome

LOAD - Late-onset Alzheimer disease

LYS - Lysosome

miRNA - microRNA
MRI - Magnetic resonance imaging
mRNA - messenger RNA
MVB - Multivesicular body
NFT - Neurofibrillary tangle
NMDA - N-methyl-D-aspartate
NPC I - Niemann-Pick type C I
PET - Positron emission tomography
PHF - Paired helical filament
PI - Phosphatidylinositol
PI3K-C1 - Phosphatidylinositol-3 kinase complex I
PI3P - Phosphatidylinositol-3-phosphate
PICALM - Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein
PSEN - Presenilin
p-tau - Phosphorylated Tau
p-tau²¹⁷ - Tau protein phosphorylated at threonine-217 site
RE - Recycling endosome
RIN3 - Rab interactor-3
SAD - Sporadic Alzheimer disease
SNX - Sorting nexin
SORCS - Sortilin-related VPS10 domain containing receptor
SORLA/LR11/SORL1 - Sortilin-related receptor
SORT1 - Sortilin
TGN - Trans-Golgi network
TREM2 - Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
TSG101 - Tumor susceptibility gene 101
v-ATPase - vacuolar H(+)-ATPase
VPS - Vacuolar protein sorting
WASH - Wiskott–Aldrich syndrome and SCAR homolog
β-CTF - β-secretase-derived C-terminal fragment

Abstract

The neuropathological hallmarks of Alzheimer's disease, amyloid plaques, and tau aggregates are known for more than 100 years, however the pathophysiological mechanism that leads to its development is still not fully understood. Emerging evidence, strongly suggest that dysfunction of the endosomal trafficking system is a potential driver of Alzheimer's Disease. The endosomal trafficking system plays a key role in the maintenance of cellular homeostasis, being particularly important in the cells of the central nervous system, where it is crucial for neurons to get rid of unwanted materials and avoid their accumulation. It is even argued that the dysfunction of this network is a primary event from which the hallmarks of the disease develop independently. Thus, recent investigation of new diagnostic and prognostic biomarkers, as well as new therapies for the prevention and reversal of this neurodegenerative disease, and not just for the treatment of symptoms, has focused on this pathophysiological mechanism and in the molecular components of the endolysosomal network.

Keywords: Alzheimer Disease; Endosomal Trafficking Dysfunction; Amyloid Pathology; Tau Pathology; Biomarkers; Therapeutics.

Resumo

As principais características neuropatológicas da doença de Alzheimer, as placas amilóides e os agregados de proteína tau, são conhecidas há mais de 100 anos, contudo, o mecanismo fisiopatológico que leva ao seu desenvolvimento ainda não é totalmente compreendido. Evidências emergentes sugerem veementemente que a disfunção do sistema de tráfego endossômico é um potencial causador da doença de Alzheimer. O sistema de tráfego endossômico desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase celular, sendo particularmente importante nas células do sistema nervosa central, onde é crucial para os neurónios eliminarem os materiais indesejáveis e evitarem a sua acumulação. Inclusivamente, argumenta-se que a disfunção desta rede é um evento primário, a partir do qual as características principais da doença se desenvolvem de forma independente. Assim, a investigação recente de novos biomarcadores de diagnóstico e prognóstico, bem como de novas terapêuticas para a prevenção e reversão desta doença neurodegenerativa, e não apenas para o tratamento dos sintomas, tem-se focado neste mecanismo fisiopatológico e nos componentes moleculares que constituem a rede endolisossomal.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; Disfunção do Tráfego Endossômico; Patologia Amilóide; Patologia Tau; Biomarcadores; Terapêuticas.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by the progressive deterioration of short-term memory, thinking skills and disrupting behavior, which culminates in complete dependence and death, and for which there still isn't an effective treatment capable of preventing or reversing the disease.^{1,2,3,4,5,6}

Dementia can be caused by several neurodegenerative or cerebrovascular diseases. However, according to the World Health Organization, AD is the main form of dementia in late life worldwide and may contribute to 60-70% of dementia cases.^{1,2,3,5,7,8} Considering that the average life expectancy has been increasing in nearly every country, and with it also the proportion of elderly people in the population,⁷ it's estimated that the number of people suffering from AD will continue to increase in the coming years.^{3,5} It's expected that by the year 2050 dementia will reach 139 million, according to the World Alzheimer Report 2021, Alzheimer's Disease International.⁹

AD is an extremely complex disease, which involves different molecular pathways, cell-types and risk factors, with age being the most relevant risk factor for its development.^{2,10}

In the last decade there has been an increase in pathological and biological evidences that support the morphological and functional dysfunction of the endosomal trafficking system, the endosomopathy, constitutes an early neuropathological event in the course of AD, preceding the appearance of the main neuropathological hallmarks characteristic of this disease. Although, some works carried out in the late 1990s and early 2000s already supported the endosomopathy as a pathogenesis mechanism in AD.^{1,2,11,12,13}

Indeed, abnormal enlargement of early endosomes (EEs) in cells of the central nervous system (CNS) and their accumulation have been consistently reported, through microscopic analysis of post mortem brain samples and also in induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived neurons from AD patients, as an early cytopathological hallmark of AD.^{1,2,5,8,11,14,15,16} In addition, the lysosomal alterations and progressive accumulation of autophagic vacuoles have also been recognized and reported as an early neuropathological feature of AD, a consequence of dysfunctions in the endolysosomal/autophagic systems.¹⁵

Since consistent growing evidence clearly points out that abnormalities in the endosomal network take the center stage in AD pathology, an emerging hypothesis postulates the dysfunction of EEs as a pathogenic hub and driver of the disease,¹⁴ although the mechanism(s) that link EE dysfunction to amyloid and tau pathologies might be still incompletely understood.¹⁷

Furthermore, targeting preclinical endosomal dysfunction may be critical for the discovery of effective new therapeutic interventions aiming AD's endosomal trafficking pathway. Moreover, the knowledge of molecular pathways that contribute to EE dysfunction may unveil new biomarkers, useful for the early diagnosis of AD and to follow the evolution of the disease.^{2,5,11,18,19}

1. Forms of Alzheimer disease

Alzheimer's disease patients may have the sporadic or the rarer familial form of the disease. The sporadic Alzheimer disease (SAD) has a late clinical onset, that is, the onset of cognitive decline begins beyond the age of 65 and the time between disease onset and death can range from a few years to decades. The familial Alzheimer disease (FAD) form, also known as the autosomal-dominant AD form or Mendelian form of the disease, has an early age clinical onset, between 30 and 50 years of age.^{1,2,3,14} The primary pathogenic causes of both forms of the disease may differ and the incidence of SAD is considerably higher when compared to FAD, representing more than 95% of AD cases.^{1,10,14}

However, despite the differences, the two forms of AD, SAD and FAD, share many clinical, biomarker and pathological similarities. For instance, both SAD and FAD have the same neuropathological classical hallmarks and compatibility in cytopathological characteristics can also be observed, namely the presence of enlarged endosomes, which is indicative of the dysfunction of the endosomal trafficking system in both forms of the disease.^{1,2,10,14}

Although emerging findings suggest that both AD forms share the same disturbance of the neuronal endolysosomal pathway, they run at different rates.^{19,20} During the development of familial early onset form of AD the endosomal disruption occurs at a rapid pace, while during sporadic AD it occurs at a slower pace, in addition to the fact that, in this form of AD, neuronal aging is the key factor for the progressive corruption of the endosomal trafficking system.¹⁹

2. Diagnosis and Clinical Manifestations

The hallmarks of AD were first described by Alois Alzheimer, over a century ago, and have remained essentially the same, except the fact that currently we have deeper notions of the molecular and cellular pathogenesis pathways.^{13,21}

The two key neuropathological hallmarks characteristic of AD are the extracellular senile A β -amyloid plaques composed by abnormally folded A β and the intraneuronal accumulation of neurofibrillary tangles (NFTs), resulting from the aggregation of hyperphosphorylated tau

protein.^{2,3,4,5,8,10,11,19} In addition, these proteinopathies are often accompanied by neuropil threads, dystrophic neurites, associated astrogliosis, microglial activation, increased levels of reactive oxygen species and cerebral amyloid angiopathy, culminating in synaptic and neurotransmitter loss, selective neuronal death, and neuroinflammation.^{3,4,10}

The current process of diagnosis of AD is based mainly on neuropsychological test and brain imaging, while new proposals combine the clinical tools with biological markers.^{2,9,22,23} The neuropsychological test performed by a skilled clinician can also be beneficial for the assessment of the prognosis and etiology of the disease, and can be complemented with information provided by the patient's caregivers.²

During the first years, before the onset of dementia, when memory impairment might have reached its threshold, most patients don't express any symptoms.²⁴ The first clinical manifestation of the disease may be the subjective decline of mental abilities, observed in objective cognitive tests.²

Usually, a typical patient, with a late onset of disease, presents as the most characteristic clinical phenotype an initial amnesic mild progressive dementia that evolves to different degrees of impairment in several domains, such as language and speech, spatial cognition, functional executive, working memory and execution of daily routine activities.^{2,11} In contrast, in younger people non-amnesic presentations of the disease are more common.²

Furthermore, the severity of cognitive impairment, the variability in the rate of progression, and its clinical impact differ from patient to patient and may be conditioned by the presence of other comorbidities. At the same time, in mild dementia may also be evident neuropsychiatric symptoms such as depression, anxiety, and social withdrawal, while in more advanced stages may be observed delusions, hallucinations, emotional instability or physically aggressive behaviors.²

3. AD's histopathological hallmarks

3.1. Amyloid pathology

An abnormal accumulation and spreading of extracellular amyloid plaques, throughout the cerebral cortex, is a common histological hallmark of both forms of AD, SAD, and FAD.^{1,2,14,22}

The A β -amyloid cascade hypothesis was formulated due to extensive investigations of rare dominantly inherited mutations, mainly in three genes, that are linked to FAD, coding for the amyloid precursor protein (APP) and the catalytic components of the γ -secretase complex, presenilin 1 (PSEN1) and presenilin 2 (PSEN2).^{1,2,10,19,21} Patients with the SAD do not present

mutations in the APP and PSEN1/2 genes, however, due to the similarities between the two forms of the disease, the A β -amyloid cascade hypothesis was generalized for both.²¹

The amyloid cascade model stipulates that the amyloid pathology in the brain is the primary pathologic driver of AD, being the trigger for the development of the remaining hallmarks of the disease.²¹ During the pathological process, APP, a single transmembrane protein that is enriched in neuronal synapses, is processed through the amyloidogenic pathway in neurons.^{1,2,10,14,22,25} The pivotal rate-limiting step in initiating A β production is the cleavage of APP by the β -secretase I enzyme, widely known as β -site APP-cleaving enzyme I (BACE1), highly expressed in neurons, from which is obtained a soluble APP fragment and a membrane-anchored β -secretase-derived C-terminal fragment of APP with 99 amino acids (β -CTF or C99).^{1,2,6,14,16,22} β -CTF is a substrate of the γ -secretase enzyme and its cleavage originates A β peptides with different lengths of amino acid chains, mainly the A β 40 peptide, which is the most abundant form, and the A β 42 peptide, that is more prone for aggregation and thus considered more neurotoxic. The A β peptides will be then secreted to the extracellular space as monomers.^{1,2,5,14,16,25} The A β 42 peptide, due to its sequence, has a greater tendency to spontaneously aggregate and form structures of higher order, in a concentration-dependent manner, until they precipitate in the form of insoluble amyloid plaques.^{1,2,5} This accumulation of A β starts 10-20 years before the onset of cognitive symptoms, according to results obtained from brain biopsies.^{2,22}

Although it was initially thought that insoluble amyloid plaques were the main cause of neurodegeneration, it's now known that the accumulation of these does not correlate with dementia severity and cognitive decline present in AD. Moreover, intracellular accumulation of β -CTF and A β peptides may play a more important role in the disease development, since they are considered more neurotoxic.^{1,5,13,26}

3.2. Tau pathology

AD is considered the most prevalent form of tauopathy, since the NFTs, one of the histological hallmarks of this disorder, are present inside the nucleus and cytosol of neurons and glial cells (astrocytes and oligodendrocytes), initially in the medial temporal lobe and subsequently in the isocortical regions of the temporal, parietal and frontal lobes of the brain.^{1,2,5,26,27}

The microtubule-associated protein tau is predominantly present in the axonal cytoplasm and its main function is the stabilization of microtubule assembly, thus contributing to the

regulation of the cytoskeleton and axonal transport of cellular cargo through two motor proteins, dynein, and kinesin. In addition, tau still acts as a specialized protein scaffold.^{1,2,8,26,27}

Phosphorylation is one of the main post-translational modifications of tau that contributes to the refinement of its physiological functions. However, in situations of neurodegeneration, hyperphosphorylated tau detaches from microtubules, and aggregates in the cytoplasm leading to the formation of NFTs.^{1,27} Thereby, NFTs are aggregates of insoluble paired helical filaments (PHFs) that are found to accumulate in the intracellular environment of cell bodies and dendrites of neurons, whereby tau pathology may begin in neurons.^{1,2,21,27} Thus, during the progression of the tauopathy there is a loss of function of phosphorylated tau (p-tau) and, furthermore, its aggregates gain a neurotoxic function, which promotes disruption of the axonal trafficking and results in synaptic atrophy, and neuronal dysfunction.^{27,28}

It is currently known that this protein can be actively secreted from neurons through exosomes in both physiological and pathological situations,^{21,27} and there is a well-established correlation between p-tau accumulation and spread throughout the brain with the severity and progression of cognitive decline, hence the importance of p-tau in the pathogenesis of AD.^{1,2,26}

Despite everything, no mutation has yet been discovered in the tau gene related to the development of this pathology.^{1,26}

4. Endosomal trafficking pathway dysfunction as a driver of AD

4.1. The contribution of endosomal trafficking pathway to cell function

The maintenance of physiological homeostasis is done at the expense of inter- and intracellular communication, through the constant traffic of substances.^{20,24,25} Thus, the intracellular sorting, trafficking, and signaling of molecular cargo via endosomes is a highly regulated process that plays a key role in the survival and death of every cell type.^{4,8,10,24,29}

The endosomal trafficking network is essential for all types of cells present in the brain, but considering that neurons are long-lived post-mitotic cells, and consequently cannot get rid of waste materials via cell division, this system is especially important for them to promote the continuity of the synthesis and degradation of different materials.^{4,11,12,20,22,29,30} In addition, endosomal transport and trafficking through the axon plays an important role in synaptic biology, especially in the entorhinal cortex, contributing to the presynaptic release of neurotransmitters. Also, endosomal trafficking is crucial for the regulation of receptor density

in the postsynaptic membrane, which ensures neuronal health and synaptic plasticity, and ultimately support vital signaling functions.^{12,13,20,29,30,31}

Beyond neurons, microglia, which are the key immune responders of the brain, also highly depend on the endosomal network for the trafficking of receptors and several substrates, as well as to promote the degradation and clearance of unwanted material, thus contributing to the neuronal homeostasis.^{6,14,32}

The endolysosomal system is also crucial for the endothelial cells and other cell types that constitute the blood–brain barrier (BBB), which is the dynamic interface between the CNS and the systemic circulation, as it allows the trafficking of nutrients and the removing of unwanted material from the brain.³³

Endosomes are intracellular dynamic and specialized membrane-bound organelles associated with highly motile vesicular and tubular carriers, whose identity and function are tightly regulated by a complex molecular machinery. Neurons have a complex endosomal system where heterogeneous compartments, such as early endosomes (EEs), recycling endosomes (REs), and late endosomes (LEs), which are dispersed throughout the cell, have different functions.^{4,11,16,20} Under physiological conditions, EEs constitute a central hub of intracellular traffic from the cytoplasmic membrane to various intracellular sites via distinct transport routes, which allows the regulation of diverse cellular mechanisms through the coordinated balance of molecular cargo entry and exit from these organelles.^{8,14,20,31} The entry of extracellular molecular cargo, such as proteins and lipids, into the EE network is done through its internalization from the superficial cell plasma membrane in a process called endocytosis via clathrin-dependent or independent mechanisms, but it can also be done through phagocytosis or pinocytosis.^{8,11,13,14,20,29}

Inside the cell, the vesicles with internalized cargo from the cell surface or even from the trans-Golgi network (TGN) can fuse with each other or with pre-existing EE and then are sorted to different destinations via one of three main intracellular traffic routes (Figure 1.):^{8,11,14,20,21,25,29}

- (i) Recycling pathway, through which molecular cargo from EEs is delivered to the cell surface;^{14,19,31}

The molecular cargo through this route can be delivered to the surface directly through the EEs (“fast” recycling) or indirectly through the delivery of cargo to specialized vesicles called REs, and only later to the cell surface (“slow” recycling).^{11,13,14,29}

- (ii) Retrograde pathway, through which molecular cargo is retrieved from EEs and trafficked back to the TGN;^{14,19,31}

The molecular cargo emerges from the endosome, travel along cytoskeleton tracks, tether at, and then fuse with the TGN.²⁹

- (iii) Degradation pathway of molecular cargo from EEs through the lysosome (LYS).^{14,19,29,31}

The molecular cargo target with ubiquitin is recognized by the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) present in EEs, which allows for membrane remodeling and the invagination of the endosomal membrane to form intraluminal vesicles (ILVs), leading to the multivesicular appearance of Les also known as multivesicular bodies (MVBs). However, this can also occur through ESCRT-independent mechanisms.^{13,16,19,20,29} At last, MVBs fuse with LYSs, which are acidic organelles with acid hydrolases inside, giving rise to endolysosomes, which are the compartments responsible for the degradation of cargo.^{4,5,8,11,20,29}

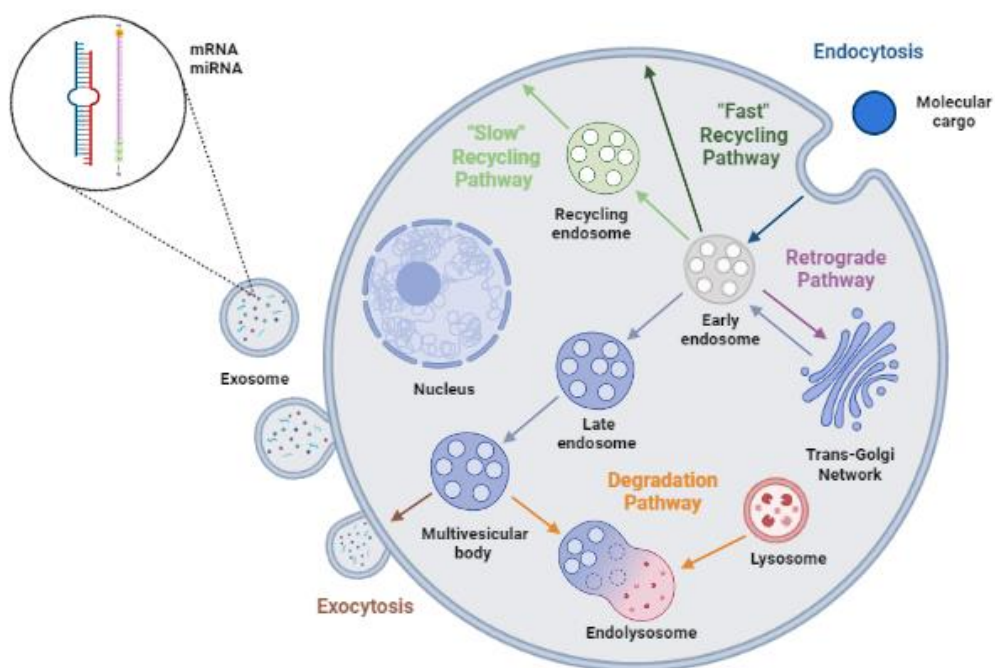


Figure 1. General schematic diagram of the possible fates of extracellular molecular cargo, after its entry into the cell, through the three main intracellular traffic routes out of the early endosome: Recycling pathway, Retrograde Pathway and Degradation Pathway. Abbreviations: mRNA, messenger RNA; miRNA, microRNA. (Source: Image created with BioRender.com)

In addition, molecules found on the cell surface and subsequently internalized can still be degraded through the autophagic pathway, which is distinct from the aforementioned degradation pathway. However, endocytic dysfunction can impact the autophagy pathway,

since they are closely related, having in common the delivery of cellular cargo to the LYSs for degradation.^{1,8,13,22,30}

In neurons, these two pathways can even converge and give rise to the so-called amphisome, which ultimately also fuses with LYSs. Thus, the tight relationship between these pathways, observed in monogenic diseases and experimental models, suggests that the autophagic and endolysosomal systems are mechanistically coordinated to achieve and maintain the balance between degradation and secretion in order to ensure the maintenance of cellular homeostasis. Therefore, the impairment of their mechanisms may be involved in the neurodegenerative processes in AD.^{1,5,13,20,22,34} In fact, data from Hung *et al.*, 2021, suggests that dysfunction of the endolysosomal and autophagic systems represents a pathologic mechanism shared by SAD and FAD.³⁵ This close connection also implies that under pathological conditions endosomal defects can cause autophagic defects and *vice versa*.^{22,30}

The endosomal system is also involved in the release of cellular contents into the extracellular environment in vesicles called exosomes through a process called exocytosis. These vesicles are formed after the fusion of MVBs with the plasma membrane instead of with LYSs, and contain inside unwanted cellular content, but also a diversity of proteins and messenger RNA (mRNA) and microRNA (miRNA). That guarantee various trades of cellular information and substance transfer between neighboring cells, according to the growing number of evidences.^{4,5,11,13,22,24}

Overall, based on several findings and due to the extreme physiological importance of the endosomal trafficking pathway, aberrant cell signaling associated with defects in any of the above-mentioned endosome pathways have profound effects in homeostatic cellular control. Indeed, dysfunction of protein sorting and trafficking can lead to accumulation of waste products in cells, alterations in neurotransmission with progressive neuronal dysfunction, and neurodegeneration. So, it has emerged as an early and upstream trigger event in the development of pathological changes associated with AD.^{4,8,12,13,16,19,29}

4.2. Disruption of endocytic machinery as a trigger for AD development and progression

Currently, due to large-scale multiple genome-wide association studies (GWAS), conducted over the past years, several genes capable of modulating AD susceptibility have been identified. These genes can be categorized into four classes: genes linked to APP processing, genes linked to cholesterol metabolism, genes linked to the immune response, and genes linked to endosomal trafficking.^{3,11,14,21,22}

In the case of genes involved in endosomal trafficking, they encode macromolecules with crucial roles in traffic from the cell membrane to the EE via clathrin-mediated endocytosis and/or in intracellular traffic via one of three pathways out of the EE, namely the degradation, recycling, and retrograde pathways. Thus, certain mutations or deficiency lead to dysfunctions in intracellular signaling and promote the risk of developing AD.^{10,11,12,14} The discovery of this class of genes supports the hypothesis that endosomal trafficking system dysfunction occurs as a primary event in both FAD and SAD, preceding the intracellular accumulation of the classical hallmarks of the disease.^{11,14}

a. BINI, CD2AP and PICALM

The main AD risk genes involved in the dysfunction of the clathrin-mediated endocytosis encode adaptor and scaffold proteins with roles in the formation of vesicles and the binding of cargo to the clathrin coat, namely the bridging integrator-1 (BINI), the CD2-associated protein (CD2AP) and the phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein (PICALM).^{11,14,22}

BINI is an adaptor protein that belongs to the BAR domain protein family located on EEs, LEs, REs, and LYSs and whose expression is mainly observed in oligodendrocytes, microglial cells, and neurons. This cytoplasmic protein is responsible for regulating membrane dynamics, through the scission of clathrin-coated pits from the plasma membrane together with dynamin, a large GTPase, and is also involved in the endocytic recycling pathway.^{10,11,27,36} Results from a recent study strongly support that overexpression of the BINI isoform I in neurons contributes to AD neurodegeneration through dysregulation of the endolysosomal pathway, characterized by the increased size of EEs and accumulation of endosomal vesicles.³⁶

The CD2AP plays an important role in endosome morphology since it supports the link between the vesicle formation and the actin cytoskeleton in clathrin-mediated endocytosis. Further, it appears to be a mediator of the first sorting step in the traffic of molecular cargo out of the EE through the degradation pathway.^{11,14}

PICALM is a monomeric adaptor protein that recruits adaptor complex 2 to clathrin-coated pits from the cell membrane, thus contributing to the regulation of cargo traffic through the clathrin-mediated endocytosis. Further studies suggest that this protein also contributes to the endosomal recycling pathway and trafficking between the TGN and endosomes.^{1,10,11,14,27}

b. GTPase Rab5

The EE and other compartments of the endosomal pathway are marked by different Rab GTPases, which are master regulators of the endosomal vesicular motility, carried out by the motor proteins dynein (retrograde transport) and kinesin (anterograde transport). Interestingly, the expression of some Rab GTPases is found upregulated in AD.^{11,13,16,19,20,22,29} The EEs are marked by the GTP-binding protein Rab5, which, through the cycling between an active form and an inactive state, and the recruitment of effector proteins, regulates endosomal membrane maturation, endosome trafficking, sorting, and endosome fusion, after endocytosis.^{10,11,19} The switch from GTPase Rab5 to GTPase Rab7, required for the maturation of EE into LE, depends on the activity of certain signaling pathways. On the other hand, REs are marked by the GTPase Rab11.^{11,19,20,29}

According to some studies, the hyperactivation of Rab5 results in acceleration of neuronal endocytosis and endosomal fusion, which is reflected in early endosomal abnormalities, further endolysosomal dysfunction, and promotes impairment of signaling pathway leading to cell death.^{10,13,19,37,38} In fact, Pensalfini *et al.*, 2020, recently reported that, in a mouse model, the pathological overactivation of Rab5 itself mediates endosomal dysfunction and consequently induced progressive cholinergic neurodegeneration and impaired hippocampus-dependent memory that features AD.³⁹

c. Retromer

According to several genetic studies, there are AD risk genes that encode proteins linked to modules of the retromer assembly or to receptors transported through this complex that may be implicated in the dysfunction of the endosomal retrograde and recycling pathways regulated by the retromer complex.^{1,8,11,25,26,31}

So, retromer is the master conductor of intracellular sorting and trafficking of specific cargo, such receptors and their ligands, out of endosome, mainly via the retrograde pathway to the TGN, but also via the recycling pathway to the cell surface.^{1,3,6,8,25,26,29,31,40} This highly conserved large multimeric protein complex, present in the cytosolic side of endosomes, consists in two central modules: the cargo recognition module, formed by the vacuolar protein sorting 26 (VPS26), VPS29, and VPS35 trimer, and the tubulation module, formed by membrane sorting nexins (SNXs) dimers. There is also a third module, responsible for the recruitment and stabilization of the cargo recognition module, which includes the proteins SNX3, RAS-related protein RAB7A, and TBC1 domain family member 5. Recent studies have identified a fourth

module with the designation of Wiskott–Aldrich syndrome and SCAR homolog (WASH) complex.^{1,3,6,8,12,25,26,31,40}

The levels of VPS35 and VPS26, two key retromer proteins of the cargo recognition module, decrease in an age- and region-specific manner.^{1,8,10,13,19,29} In 2005, through the use of model-guided microarray technique in human brain samples from AD patients, Scott A. *et al.* proved that the levels of these two proteins were reduced in the entorhinal cortex of the hippocampus. This finding suggested the possibility of an early disturbance of the retromer trafficking function in AD brains.⁴¹ Further, more recently, Simoes *et al.*, through imaging of VPS26b-depleted mice models, showed that the depletion of this protein of the retromer core impairs neuron's endosomal recycling pathway first and foremost in the trans-entorhinal cortex, one brain region known to be particularly vulnerable to the AD's pathogenic processes.⁴² On the other hand, beyond the role of VPS35 in neurons, Joanna Ruth *et al.* provided the first *in vivo* evidence that VPS35/retromer loss contributes to the upregulation of microglial activity that can promote brain tissue disturbance and hippocampal neurodegeneration.⁴³

Recently, the SNX27 protein was also linked to retromer and its function, being responsible for recruiting and linking the cargo that is directed to the cell surface through the recycling route, so the deregulation of this component impairs this traffic pathway.^{6,8,19}

Thus, the downregulation of retromer complex components in the brain hippocampal neurons can lead to the increased accumulation of protein aggregates and consequently to cellular neurotoxicity,^{8,22,25,26,29,44} which contributes to the onset and development of both neuronal and microglial phenotypes of AD, according to the results obtained by Qureshi *et al.*⁴⁴

d. SORLI

The family of VPS10-containing proteins encompasses proteins that contain a vacuolar protein sorting domain, VPS10, including sortilin-related receptor LI (SORLA/LR11/SORLI), sortilin (SORT1), sortilin-related VPS10 domain containing receptor I (SORCSI), SORCS2, and SORCS3, and that might function as retromer cargo sorting receptors in neurons.^{3,11,14,25,31,40}

SORLI and other VPS10-containing proteins' function is to transport molecular cargo out of the EE through recycling and retrograde pathways in nearly all CNS cell types. The gene encoding SORLA harbors rare coding variants that confer an extremely high AD risk for both forms of AD, SAD and FAD.^{1,3,8,10,14,22,26,31}

In Hung and Livesey's 2021 recent study, on how SORLI affect the initiation and progression of AD in human forebrain neurons, they demonstrated that truncating SORLI mutations promoted the disruption of endosomal trafficking, but in the haploinsufficiency the lysosomal function remained intact. However, the complete loss of SORLI resulted in the development of additional defects in LYSs function, and in the autophagy pathway.^{35,45}

e. Cathepsin D

It has also been demonstrated that the retromer complex is responsible for delivering certain hydrolytic enzymes to LYSs via the retrograde pathway. The major protease of human LYSs is cathepsin D (CTSD), which is transported to these compartments by retromers' cargo, cation independent mannose-6-phosphate receptor (CIM6PR) or SORT1. This protease is highly expressed in the brain and its reduced specific activity has been demonstrated in AD. Therefore, retromer complex dysfunction, polymorphisms in the CTSD encoding gene, or mutations in CIM6PR and/or SORT1 genes may be the cause for the decrease in enzyme's activity.^{3,8,11,13,26,29,31,46} For instance, according to some data, the lack of RAB7A palmitoylation promotes a decrease in its interaction with the retromer, and consequently, the endosome-to-TGN trafficking becomes less efficient, which results in the missorting of CTSD.⁴⁷ Decreased CTSD levels will likely cause a mechanistic defect in the degradation pathway that leads to a lysosomal storage disorder and increased neurotoxicity, as seen in animal models.⁸

f. ESCRT

The ESCRT system is fundamental for the sequestration of ubiquitinated cargo proteins by endosomes and degradation in the LYSs. Therefore, silencing key ESCRT components, such as charged multivesicular body protein 2B (CHMP2B), hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (HRS), and tumor susceptibility gene 101 (TSG101), promote intraneuronal accumulation of ubiquitin-positive aggregates and lead to neurodegeneration, which characterizes several neurodegenerative diseases, including AD.^{19,20,22}

Thus, all this emerging evidence strongly suggests that aberrant functioning of molecular machinery linked to endosomal trafficking contributes to the disturbance of normal function and process of the endocytic pathways and may lead to the development of AD (Figure 2.).^{10,22}

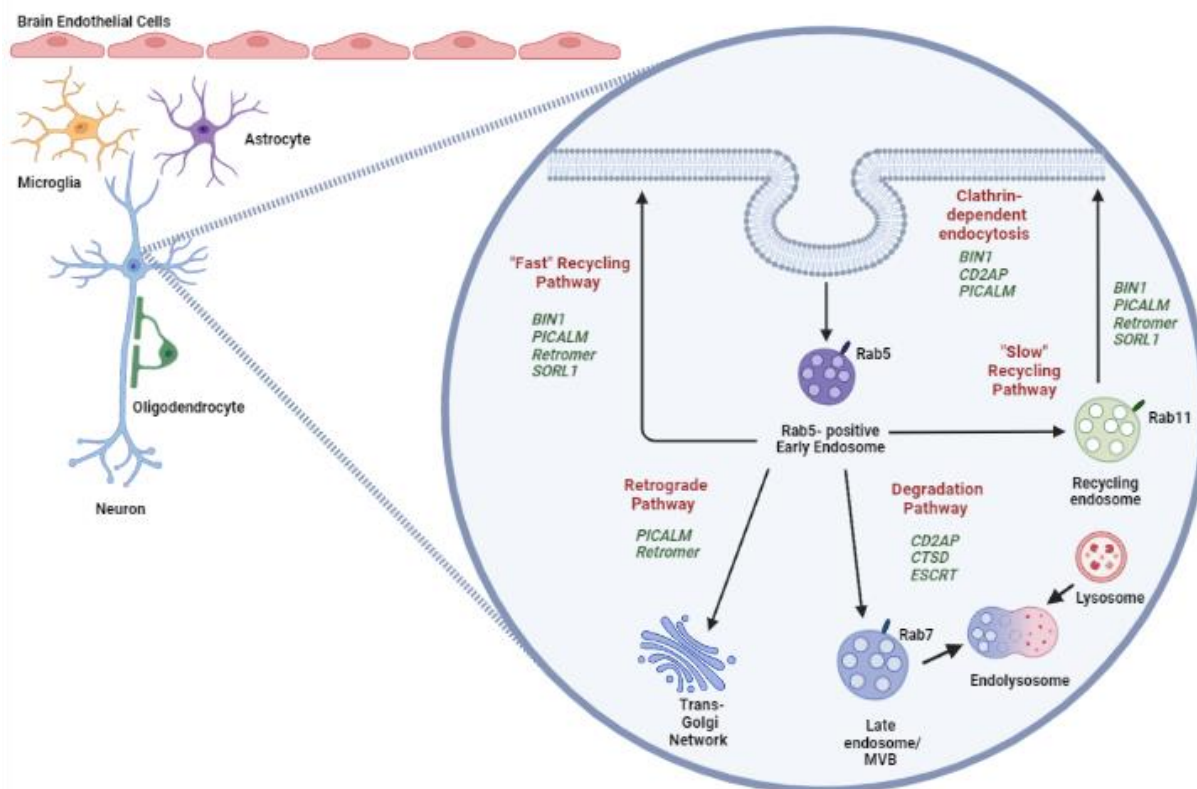


Figure 2. Schematic illustration of the cellular environment in the brain, where is highlighted the endocytic protein machinery that is crucial for the function of endocytic pathways in neurons. Abbreviations: BIN1, Bridging integrator-1; CTSD, Cathepsin D; CD2AP, CD2-associated protein; ESCRT, Endosomal sorting complex required for transport; MVB, Multivesicular body; PICALM, Phosphatidylinositol binding blathrin assembly protein; SORL1, Sortilin-related receptor L1. (Source: Image created with BioRender.com)

4.3. The role of AD risk genes in endosomal trafficking dysfunction

The functions performed by endosomal trafficking system can overlap with immune response, lipid metabolism, and APP processing. So, many genetic factors can cause or increase endolysosomal dysfunction, thus contributing to AD risk.^{11,19}

a. TREM2

The gene of the triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) encodes immunomodulatory receptors located at the microglial cell surface, whose function is the clearance of proteins and other molecules from the extracellular space through phagocytosis. Several TREM2 variants have been linked to late-onset Alzheimer disease (LOAD), as it can cause a reduction of the receptor delivery to the cell surface. This may also reflect the potential dysregulation of TREM2 trafficking through the recycling pathway mediated by retromer, and/or an acceleration of its degradation in the LYSs, ultimately leading to dysfunction of phagocytosis.^{6,8,14,31,40}

b. APOE

Apolipoprotein E, APOE, is produced in the brain, mainly by astrocytes and activated microglia. It's related to the class of cholesterol metabolism genes, being the major transporter of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol in the brain, which is essential to form and maintain synapses. The APOE gene is very susceptible to polymorphisms, and, in 2009, the APOE ε4 allele was identified as the strongest genetic risk factor for the development of LOAD.^{1,2,3,4,13,14,19,37}

According to studies carried out in the brains of AD patients, the presence of the APOE4 genotype accentuates the earlier appearance of endosome enlargement at preclinical stages of AD. The potentiation of the endosomopathy is due to the ability of the APOE ε4 allele to impair the endosomal trafficking system at different levels, sharply stimulating the endocytosis pathway, reducing the recycling pathway, preventing the release of exosomes, and also permeabilizing the LYS membrane, which promotes leakage of acid hydrolases and induces apoptosis.^{2,3,13,14,19,22,30} In fact, the data obtained from the study of Katherine Y. *et al.* suggested that the expression of APOE4 promotes exosome pathway dysfunction leading to reduced secretion of these vesicles and that such alterations are likely to contribute to cognitive impairment, aging-dependent neuron vulnerability, and AD risk.⁴⁸ In addition, in a recent study it was found that the isoform APOE4 accumulates in enlarged LYSs and LEs, increases lysosomal trafficking, and alters the proteomic contents of LYSs following internalization, which suggests a potentially novel mechanism that may contribute to AD pathogenesis.⁴⁹

c. PI3P

Phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) is a phospholipid found in the composition of different cellular biological membranes. The EEs are enriched in PI3P, whose function is to recruit most of the retromer-related SNXs and other proteins with specific binding modules to these compartments for endosomal traffic and/or autophagy.^{1,6,12,25,29,31,40}

The class III phosphatidylinositol-3 kinase complex I (PI3K-CI) is responsible for the phosphorylation of phosphatidylinositol (PI) and the consequent formation of PI3P. The catalytic component of the class III PI3K-CI is called VPS34. The downregulation of VPS34, due to modifications in its encoding gene, lead to a decrease in PI3P and consequently to the disruption of the endocytic pathway. In primary cortical neurons, the deficit of this protein results in impaired endosomal sorting and swelling, and induces rapid neurodegeneration.^{1,31} Morel *et al.*, in their study, showed that PI3P, responsible for the recruitment of a variety of effectors containing PI3P-binding modules to the endosomal membrane, such SNXI,2,6,27 of

retromer and HRS from ESCRT, is selectively deficient in the prefrontal cortex and entorhinal cortex of individuals affected with LOAD, as well as in FAD mouse models. Overall, this study and work from others suggest that AD's pathogenesis is linked to the dysfunction of several genes involved in the formation of PI3P and the effectors that bind to it.⁵⁰

d. PSENs

PSENs are included in the class of genes linked to APP processing, however, they also have γ -secretase-independent functions, namely roles in endolysosomal protein/membrane trafficking. Thus, mutations that cause alterations in their catalytic activity impact the endolysosome and may cause abnormalities that impair intracellular function and communication, such as enlarged EEs and selective accumulation of lysosomal dense bodies in distal axons.^{1,4,11,13}

Endosomal maturation, necessary for vesicular trafficking to continue, consists in the conversion of EEs into other endosomal compartments and involves the gradual acidification of their lumen, mainly through the combination of pump and leak pathways of vacuolar H(+)-ATPase (v-ATPase) and endosomal Na⁺ (K⁺)/H⁺ exchangers, respectively.^{4,11,20,27,51} Thus, mutations that cause the loss of v-ATPase or Na⁺ (K⁺)/H⁺ exchangers functions are often implicated in a growing number of human diseases, including AD. Loss-of-function mutations in v-ATPase are associated with an increase in the pH of the endolysosome and consequent dysfunction of the degradation pathway due to a decrease in enzymatic activity. On the other hand, loss-of-function mutations in endosomal exchangers cause hyperacidification of the endosomal lumen.^{4,13,19,20,22,27,29,51}

Since PSEN 1 is essential for LYSs acidification, the deletion of its gene leads to the blocking of LYSs acidification by disrupting v-ATPase assembly, thus compromising the degradation pathway and promoting substrate accumulation and aggregation.^{1,2,4,5,13,20,22}

4.4. Endosomal trafficking pathway dysfunction and AD's histopathological hallmarks

4.4.1. Endosomal trafficking pathway dysfunction as a driver of Amyloid pathology

The endosomopathy in AD, characterized by the enlargement and dysfunction of EEs, mainly in axons of neurons, is observed in the early stages of the disease, in pyramidal cortical neurons of the neocortex. Since there isn't any histological evidence of amyloid pathology in the brain

at that stage, dysfunction of the endosomal trafficking is thought to be an upstream and driver event of AD pathogenesis.^{5,13,14,16,19,21,22,31,40,52}

Although still debated, most studies suggest that in neurons the amyloidogenic pathway of APP processing, following internalization through clathrin-mediated endocytosis, occurs predominantly within EEs marked by Rab5. After endocytosis, the initial enzymatic step in the pathogenic processing of APP is its cleavage in EEs' membranes, since, currently, there is almost a consensus that the β -secretase I enzyme is predominantly located in the membrane of these organelles, and therefore, β -CTF is processed in LEs/TGN to give rise to A β .^{1,5,10,14,16,19,21,22,31,37,40}

A β fragments accumulate in the lumen of endosomes, where they are toxic, causing EEs dysfunction and enlargement.^{14,21} In this regard, experimental evidence of A β 42 aggregate-induced enlargement of MVBs was first presented by K. Willén *et al.* in cultured AD transgenic neurons, but it is likely that other endocytic compartments, including EEs and LYSs, were also affected. The results obtained in this study support the hypothesis that the endolysosomal system may be the initiation site of A β aggregation and also that A β may induce endosomal enlargement, but not excluding the role of β -CTFs.¹⁷

As previously elucidated, the endosomal network has a central role in the intracellular fate of APP, since it influences the localization of secretases and of APP-cleavage products. So, the accumulation of APP fragments may reflect the presence of defects in the endosomal trafficking and sorting pathway, which are linked to the imbalance between β -CTF and A β production and clearance. That is, there is an increase in APP processing and a decrease in the clearance of endosomes containing cleavage fragments, beyond to increased uptake of A β from extracellular space. This results in intraneuronal accumulation of APP metabolites, which can feed back and contribute to a blockage in endosomal trafficking, creating a pathological vicious cycle.^{1,5,11,13,14,19,21,40,52}

The vicious loop between the development of endosomal system dysfunction and amyloid pathology could be triggered due to increased levels of APP- β CTF.^{2,13,19,20,22} In fact, I. Lauritzen *et al.* established in their study that the accumulation of β -CTF, reported in human AD post-mortem brains, is responsible for being both the cause and effect of the dysfunction of the endosomal-autophagic-lysosomal system, contributing to the pathological loop.¹⁵ Still regarding on this subject, W. Xu *et al.* also demonstrated, through results obtained in studies in vitro and in vivo, that increased expression of APP or β -CTF induced hyperactivation of Rab5, with consequent enlargement of Rab5 endosomes, is likely to disrupt retrograde nerve

growth factor signaling and axonal trafficking, ultimately promoting degeneration of basal forebrain cholinergic neurons.⁵³ Another study showed that BACE1 reduction in a Ts2 mice normalized APP- β CTF elevation, blocked the development of endosome enlargement and also the degenerative changes in the cholinergic neurons.³⁸ Further, S. Kim *et al.* showed that adapter protein containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosine binding domain and leucine zipper motif (APPL1) is an effector recruited by β -CTF to Rab5 endosomes, where it stabilizes Rab5 in its activated form. Thus, high levels of β -CTFs increase the recruitment of APPL1 to Rab5 endosomes and persistently promote Rab5 overactivation that triggers the morphological endosomal anomalies in AD.⁵⁴

All this data strongly supports the emerging concept of pathologic activation of Rab5 in endosomes caused by β -CTF, independent of A β , as an early neuropathology event that connects the dysfunction of endosomal trafficking system to amyloid pathology, and which could potentially be the cause for the development of AD.^{14,38,53,54}

Besides that, data obtained from the study of N. Takasugi *et al.* (2018) suggests a novel unidentified molecular mechanism of β -CTF as a mediator of AD pathogenesis. It was identified that the interaction between TMEM30A and β -CTFs, in endosomes, impaired the recycling and retrograde pathways, as well as a disruption in endosomal maturation and enlarged endosomal morphology in neurons, which are consistent with observations in the early stages of AD.⁵⁵

Furthermore, the endocytic machinery, such CD2AP, BIN1, PICALM, SORT1/SORL1, retromer complex, and SNXs, has also been implicated in trafficking and sorting dysfunction of APP and its cleaving enzymes in neurons. According to some studies, disturbance in the homeostasis of these adaptor proteins may induce the amyloid pathway and increase the risk of developing AD.^{5,13,14,16,22}

Regarding the proteins involved in clathrin-mediated endocytosis, in the study of Shen *et al.* was demonstrated that the interaction of CD2AP with Ras and Rab interactor 3 (RIN3), a guanidine nucleotide exchange factor (GEF) responsible for stimulating and stabilizing GTPase Rab5 in EEs, regulates APP trafficking and processing. This study pointed that increased levels of RIN3 and CD2AP promoted Rab5 activation, which significantly impaired endosomal APP trafficking and processing, leading to the generation and accumulation of neuronal toxic β -CTFs in mouse brain tissues and cultured basal forebrain cholinergic neuron. However, *in vivo* studies will be needed to validate this hypothesis.³⁷

Functional studies have confirmed that SORLI gene encodes a receptor that can also be called the APP sorting receptor, because it binds APP to the endosomal membrane and mediates its intracellular trafficking and processing from endosomes away from amyloidogenic pathway, associating with retromer and other sorting adaptors.^{1,3,6,11,31,40} Knupp *et al.* reported that loss of SORLI induces enlarged endosomes in human iPSC-derived neurons. The endosome enlargement affects APP trafficking in neurons, which leads to an increase in its localization in the EEs and a decrease in the TGN. Thus, this study reinforces the possibility of endosomal pathology as an upstream event of amyloid pathology.⁵⁶ This hypothesis is also supported by studies of Hung *et al.*, which reported that the genetic deletion of SORLI gene, in mouse models, increases the delivery of APP to the endosomes and favors the amyloidogenic pathway and A β production.³⁵ Furthermore, this receptor is also required for retromer-mediated delivery of BACE1 from endosome to TGN and can also directly bind A β in N2a cells and regulate the trafficking to LYSs for degradation.^{1,8,11,20,25} So, in the cortex and hippocampus of AD patients, where the expression of this receptor is absent or reduced, there is an increase in the localization of BACE1 to the endosomes, which promotes APP processing and ultimately the accumulation of A β peptides in the lumen of LEs.^{1,6,8,10,20,25,40}

In addition, SORLI is a receptor that is trafficked by the retromer, so APP might be the cargo that is co-trafficked by this protein complex. Thus, the retromer influences APP metabolism through its ability to suppress A β accumulation and consequently plaque deposition, through proper trafficking of APP and the cleaving enzymes, β -secretase I and γ -secretase.^{8,25,26,31} For instance, Huang *et al.* found that SNX27, an important recruitment module for retromer, can bind to SORLI and thus direct endosomal APP trafficking to the cell surface, avoiding the amyloidogenic processing responsible for the production of A β .⁵⁷ In addition, SNX27 can also bind to the PSEN1 subunit of γ -secretase and inhibit its action, blocking A β formation. The down-regulation of this retromer component implies the reduction of SORLI and APP on the cell surface, and an increase of APP cleavage via the amyloidogenic pathway.^{8,12,19,25,40,57}

The disruption of retromer complex activity contributes to brain amyloidosis, according to several studies *in vitro* and *in vivo*, as it can increase the normal residence time of APP and its cleaving enzyme BACE1 in the endosome, in primary neurons, due to decreased sorting of endosomal cargoes to the TGN, via retrograde pathway, and to the cell surface, via recycling pathway. Consequently, induces APP accumulation within this organelle and it is more likely to be processed into A β , resulting in an overproduction of neurotoxic fragments, which are implicated in AD.^{5,6,13,25,26,29,31,40} According to the findings of N. Kimura *et al.*, that significant accumulation of APP and A β could result from retromer deficiency, responsible for the age-

dependent endocytic pathology, due to dynein dysfunction.⁵⁸ On the other hand, the first cell-based evidence of retromer function in a neuronal setting, suggested that the VPS35 deficiency is the cause of elevations in A β production, through redistribution of APP with its cleaving enzyme BACE1 to endosomes in neuronal processes, and thus promoting amyloid accumulation and enlargement of EEs.⁵⁹

The dysfunction of the degradation pathway has also been linked to the development of amyloid pathology. For instance, the analysis of a murine model of AD (3xTgAD mice) showed an early accumulation of β -CTF at the hippocampus that suggests an impaired clearance of this fragment by the neuronal endolysosomal system.⁶⁰ LYSs are organelles that also contribute to the homeostasis of APP and its fragments, since within them CTSD and other lysosomal enzymes are responsible for the degradation of unwanted material. So, changes in lysosomal enzymes levels are associated with a lack of efficiency in the clearance of A β and β -CTF, through the degradation pathway.^{4,8,19,22} However, Cheng *et al.* showed for the first time that the levels of full-length APP and β -CTFs were not drastically altered in CTSD deficient APP/PS1 mice.⁴⁶ Thus, it is important to carry out further studies to determine the exact mechanism through which CTSD dysfunction lead to AD.¹⁹

Furthermore, according to the results from cell culture studies of Morel *et al.*, APP is ubiquitinated and sorted via PI3P-dependent ESCRT pathway into its degradation in LYSs. The results obtained suggest that both PI3P reducing levels, due to silencing of VPS34, and silencing key ESCRT components, such as HRS and TSG101, contribute to APP missorting and accumulation in the endosomes that causes an enlargement of these organelles, and potentially AD pathogenesis.⁵⁰ In turn, K. Willén *et al.* proposed a model where defects in ESCRT machinery components could promote AD pathogenesis by causing an increase in intracellular accumulation and aggregation of A β 42, as well as enlarged and defective MVBs.¹⁷ However, the accumulation of β -CTF and A β in endolysosomes can also trigger inhibition of ESCRT machinery.²²

The acidic pH of endolysosomes is critical for the activity of pH-sensitive enzymes with a role in APP- β CTF and A β production and degradation. The alkalization (de-acidification) of its lumen, due to mutations in the PSEN1/2 genes, leads to an increase of A β production and to a decrease in its degradation. This enhances the intraneuronal levels of A β fragments and promotes its aggregation, which potentiates amyloid pathology and accelerates neuronal cell death.^{4,5,13,22} In fact, R. Sannerud *et al.* established that PSEN1 and PSEN2 have different locations in primary neurons. PSEN2 is mainly restricted to LEs/LYSs, while PSEN1 is broadly

distributed in the cell. Thus mutations in PSEN2 and some mutations in PSEN1, that can lead to its re-localization to LE/LYS compartments, strongly increase intracellular production and aggregation of intracellular A β 42, and may lead to dysfunction of the endolysosomal compartments in a pernicious feed-forward cycle, causing a profound disturbance of proteostasis associated with AD.⁶¹

On the other hand, the hyperacidification of the endosome lumen also contributes to the alteration of APP processing and promotion of A β aggregation. Prasad H. and Rao R. showed that the knockdown of NHE6, a Na⁺/H⁺ exchanger, located in EEs and REs, modulates the endosomal pH and modifies the processing of APP, ultimately increasing A β production in cultured HEK293 cells. These findings, together with other emerging evidence about the role of Na⁺/H⁺ exchangers in neurodegeneration, suggest that endosomal pH modulation may have a crucial role in the development of AD.⁵¹ Another study demonstrated that decreased expression of the NHE6 exchanger also promoted hyperacidification of APOE4 astrocytes' endosomes, resulting in defective clearance of A β , which is consistent with the results of other investigations, which also propose that this exchanger plays a role in amyloid pathology.⁶²

The β -CTF and A β fragments can also destabilize the integrity of the LYS membrane and permeabilize it, which ends up having negative repercussions on its proper acidification and leads to the leakage and accumulation of these fragments in the cytosol.^{19,20,22} In fact, it was revealed in a study, through the administration of A β 42 oligomers to a neuroblastoma (SHSY5Y) cell line, that this fragment passes through the endosomal system and accumulates in LYSs. So, increased levels of A β in LYSs modify membrane permeability, leading to changes in the lumen pH, inactivation of lysosomal enzymes, and enzyme leakage, which ultimately results in cell death.⁶³

Overall, taken together, all these findings further reinforce the contribution of the endolysosomal system dysfunction in amyloidogenesis and that, on the other hand, amyloid pathology also contributes to the perpetuation of endolysosomal defects (Figure 3.).^{1,22}

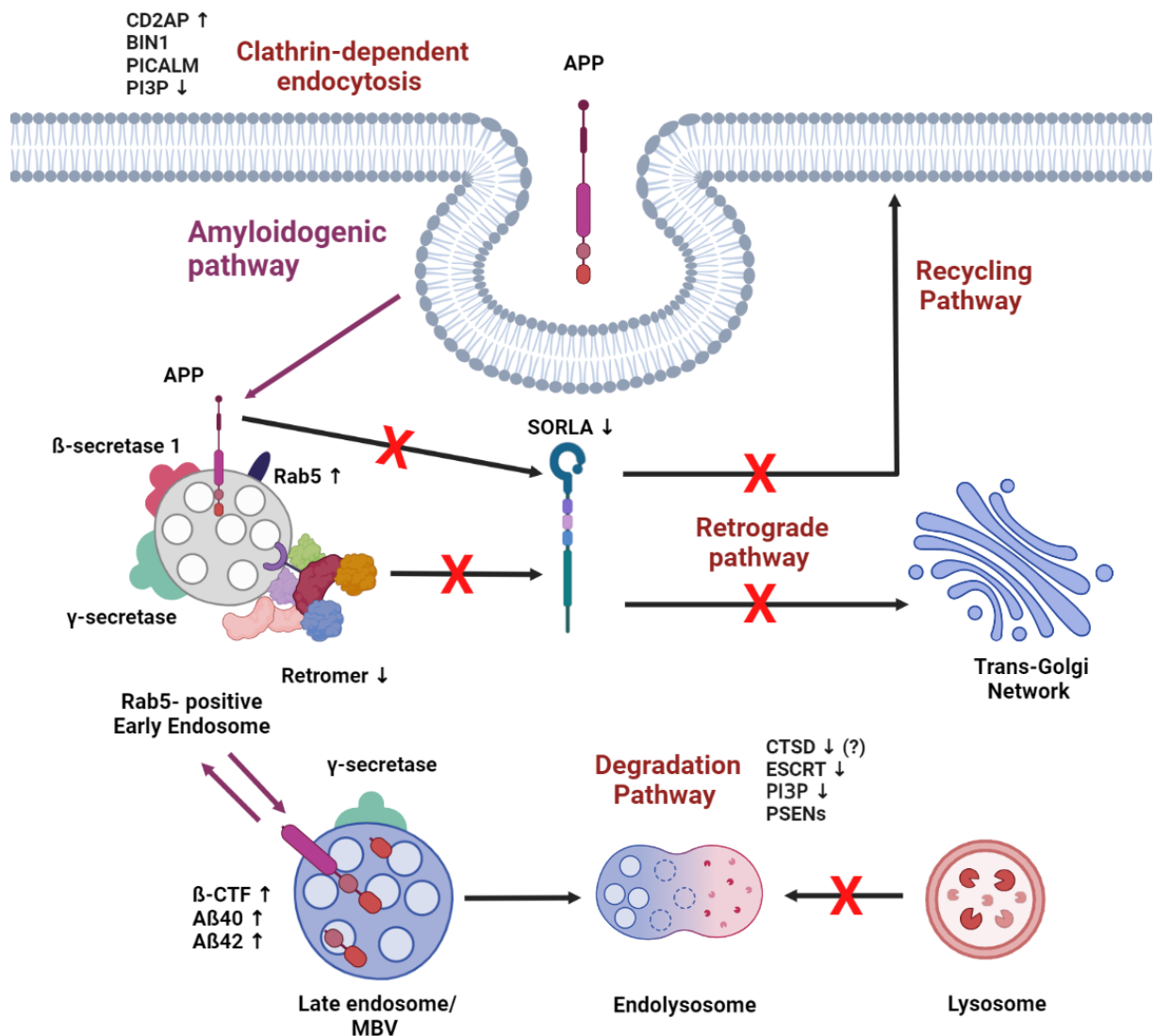


Figure 3. Dysfunction of the endosomal trafficking pathway is possibly an upstream driver event that leads to an imbalance between β -CTF and $A\beta$ production and clearance, favoring the amyloidogenic pathway. The increase in APP processing, in early endosomes, is due to a decrease in its traffic through the retrograde and recycling pathways, and the decrease of β -CTF and $A\beta$ clearance is due to impairment of the degradation pathway, which culminates in the accumulation of these fragments. Increased β -CTF levels induce overactivation of Rab5, which can impair all endocytic pathways from the early endosome, thus promoting a pathogenic cycle between endosomal trafficking pathway dysfunction and amyloid pathology. Abbreviations: APP, Amyloid precursor protein; β -CTF, β -secretase-derived C-terminal fragment; BIN1, Bridging integrator-1; CTSD, Cathepsin D; CD2AP, CD2-associated protein; ESCRT, Endosomal sorting complex required for transport; MVB, Multivesicular body; PICALM, Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein; PI3P, Phosphatidylinositol-3-phosphate; PSEN, Presenilin; SORLA, Sortilin-related receptor. (Source: Image created with BioRender.com)

Lastly, in advanced stages of AD, with the impairment of endolysosomal network, the key APP cleaving enzymes, and APP metabolites can be released into the extracellular space via extracellular vesicles (EVs), such as exosomes. This can contribute to the cell-to-cell and cell-to-extracellular space spread and aggregation of toxic $A\beta$ peptides into fibrils, and subsequent deposition of senile plaques in the brain, according to data obtained in the study of R. Pérez-

González *et al.* along with a growing body of research and evidence. However, while EVs could be a potential vehicle for the propagation of the pathology throughout the brain, there is also evidence that argues that, at the early stages of AD, exosomes secretion may have a protective role in A β pathogenesis, since they transport toxic proteins, which accumulate intracellularly in neurons, to microglia for degradation, or out of the brain into the circulation, thus contributing to an efficient removal.^{5,13,22,48,64}

4.4.2. Endosomal trafficking pathway dysfunction as a driver of Tau pathology

The other main neuropathological hallmark of AD, tau pathology, has also been related to defects in the endosomal system.^{8,11} It is known that, in the neurons, the pathogenic species of p-tau induce microtubule destabilization that further interferes with the axonal transport and promotes the dysfunction of endosomal trafficking. However, there is increasing evidence indicating that dysfunction of endosomal trafficking may be an upstream cellular event that can influence and trigger tauopathy.^{16,26,27,31}

As previously mentioned, mutations in the tau gene are not associated with AD. Nonetheless, mutations in genes related to the clathrin-mediated endocytosis, such as BIN1, CD2AP and PICALM have been implicated in the tau pathology since they may influence the access of extracellular p-tau to neuronal endosomes.^{2,8,11,21,27,31} According to some studies, the BIN1 isoform I can inhibit Rab5 activation and endosome formation, thus reducing p-tau uptake by neurons and its spread within them. So, mutations that cause the loss of BIN1, in neurons, result in increased endocytosis and enlarged Rab5-positive EEs, leading to endosomal membrane damage and tau leakage.^{11,27} Calafate *et al.* provided *in vitro* evidence that the loss of BIN1 function promotes the propagation of tau pathology by overactivating Rab5 and increasing the endocytic flux.⁶⁵ On the other hand, Shen *et al.* demonstrated that overexpression of the RIN3/BIN1 complex, in the EEs, enhanced tau phosphorylation through Rab5 activation. However, *in vivo* studies will be needed to validate this hypothesis.³⁷ In addition, in microglia, the isoform 9 of BIN1 can promote p-tau propagation through the incorporation of this protein into exosomes.²⁷ Thus, the BIN1 gene is correlated with p-tau present in NFTs and is also implicated in its neuronal toxicity, strongly suggesting that this gene, associated with endosomal trafficking, has a fundamental role in the regulation of tau biology.^{10,37}

Results from recent studies demonstrated that the downregulation of the retromer complex is also an active player in the development of tau pathology, and not only in the amyloid

pathology.^{18,26,29} In fact, the abundance of tau aggregation in the brain of AD patients is inversely correlated with reduced expression of retromer components.²⁶

Since the retromer complex is responsible for the regulation of two of the three main routes of the endosomal trafficking network, dysfunction of this protein complex cause defects in the endosomal recycling and retrograde pathways, resulting in increased hyperphosphorylation and aggregation of tau. So, a dysfunction in the recycling pathway leads to a decrease in extracellular p-tau clearance, due to a reduction in phagocytic receptor transport to the surface of microglia and other phagocytic cells. In turn, a dysfunction in the retrograde pathway results in a decrease of intracellular p-tau clearance, due to a reduction in CIM6PR and SORT1 transport, and consequently a decrease in the levels of CTSD and other proteases involved in the degradation of intracellular tau, particularly in the aggregated form, present in LYSs.^{4,6,19,21,31}

Further, a recent in vitro study by A. Filippone *et al.* provides the first experimental evidence that the dysfunction of the retromer complex system, due to the downregulation of VPS35, in human brain endothelial cells of the BBB, affects the endolysosomal degradation pathway, resulting in the in the accumulation of pathological forms of tau protein.³³ In turn, Julian M. Carosi *et al.* showed that depletion of VPS35 component of retromer complex underlies marked accumulation of cytoplasmic p-tau aggregates also in neurons, since retromer has been shown to play an important role in the maintenance of normal integrity of autophagy and endolysosomal pathways, which are responsible for the clearance of aggregated species of tau and/or their precursors. In fact, as previously mentioned, in people with AD, VPS35 and VPS26, components of cargo recognition module of the retromer complex, are reduced in the entorhinal cortex of the brain, and, in this region, there are early signs of tau deposition.⁶⁶

An impairment in lysosomal function, such as de-acidification or hyperacidification, can also favor the aggregation and accumulation of tau in the LYSs of neurons and glia.^{4,13,19,21,51} Furthermore, NFTs are also found in the brains of subjects with Niemann-Pick type C I (NPC I), a congenital lysosomal storage disease that shares similar pathological features with AD, such as endosome dysfunction, which highlights the importance of degradation pathways for control of the tau turnover. Therefore, this evidence supports that endolysosomal dysfunction may promote tau accumulation and thereby the development of tau pathology.^{1,13,27,28}

Still regarding to the endolysosomal pathway, there are several studies on its importance, specifically the ESCRT machinery, for the clearance of ubiquitylated tau.²⁸ For instance, Vaz-Silva *et al.* demonstrated in their study that tau clearance occurs through the endocytic pathway, more specifically through the Rab35/ESCRT pathway, which mediates transport from EEs and MVBs to LYSs.²⁸ As previous literature argues, the impairment of endosomal trafficking

may occur due to the interaction of soluble tau with ESCRT machinery-associated proteins in the endocytic vesicles, which may potentially lead to dysfunction of the ESCRT pathway.⁶⁷ Further, results from K. Willén *et al.* study support a novel scenario, where the impairment of ESCRT machinery function leads to endosomal permeabilization, which can promote the release and propagation of the pathogenic tau phosphorylation.^{17,22,68}

In the early stages of AD, p-tau secretion through exosomes has a protective role, as it promotes the clearance of toxic hyperphosphorylated tau protein that accumulates intracellularly in neurons.²² However, this exosomal secretion of p-tau is also linked to the spread of seeds between neurons and from neurons to microglia, astrocytes, and oligodendrocytes, and to the aggregation of these misfolded proteins in the extracellular space. Tau seeds, vesicle-free or inside exosomes, can be incorporated via endocytosis by neighboring brain cells, and once internalized, tau aggregates⁶⁵ or enzymes of lysosomes⁶⁸ can induce the permeabilization of the endosomal membranes. Thereby, this facilitates the escape of exosomal tau seed into the cytosol, where it interacts with the soluble tau and induces its aggregation.^{5,22,26,27,51} This evidence supports the prion-like mechanism hypothesis, in which it is argued that tau seeds spread through the brain and induce tau pathology in recipient cells (Figure 4).⁶⁸

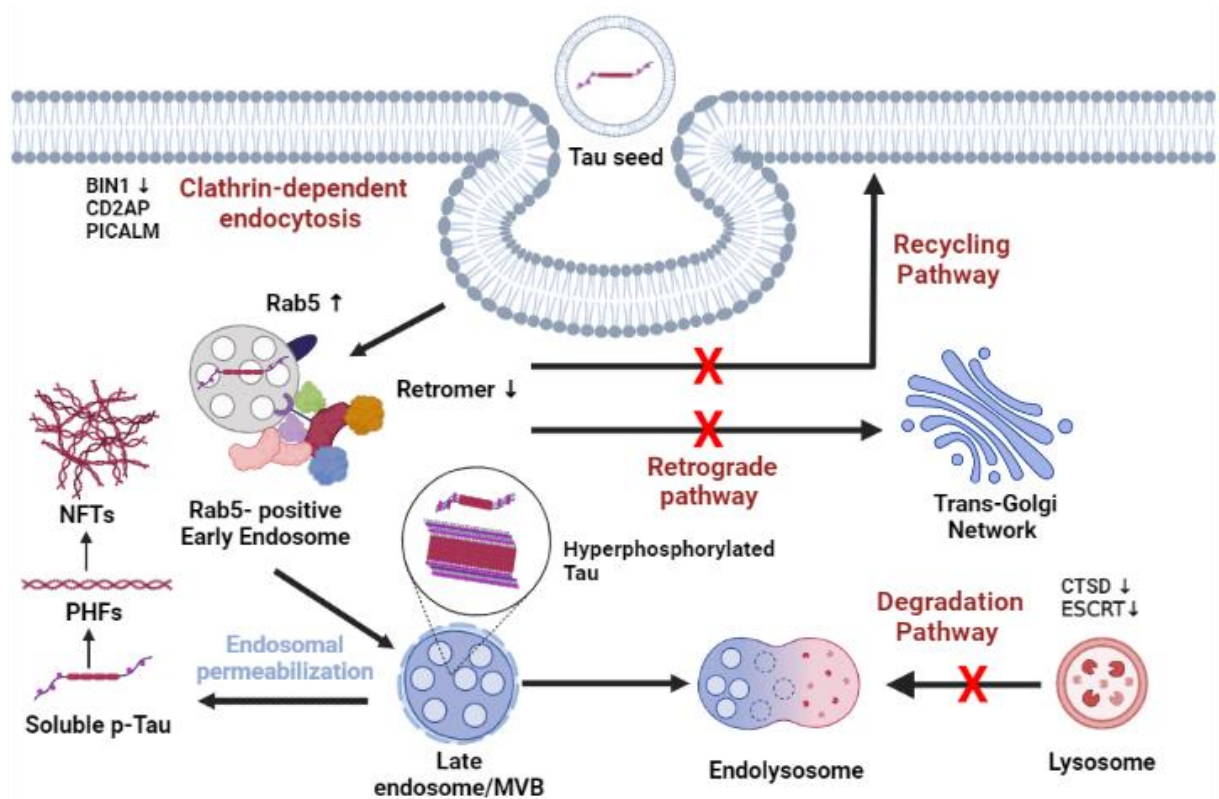


Figure 4. Endosomal traffic pathway dysfunction is possibly an upstream driving event that favors the development of Tau pathology. The impairment of the three main EE pathways, retrograde, recycling and degradation pathways, decreases the clearance of extracellular and intracellular p-tau and leads to

its accumulation and aggregation. Furthermore, the permeabilization of endosomal membranes promotes the release and propagation of p-tau aggregates, and their interaction with soluble p-tau, which also induces their aggregation. In turn, the pathogenic species of p-tau also induce microtubule destabilization that further promotes endosomal trafficking dysfunction. Moreover, according to the prion-like mechanism hypothesis, tau seeds can be secreted and incorporated by any cell of the central nervous system, promoting the spread of p-tau through the brain. Abbreviations: BIN1, Bridging integrator-1; CTSD, Cathepsin D; CD2AP, CD2-associated protein; ESCRT, Endosomal sorting complex required for transport; MVB, Multivesicular body; NFT, Neurofibrillary tangle; PHF, Paired helical filament; PICALM, Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein; p-Tau, Phosphorylated tau. (Source: Image created with BioRender.com)

5. Therapeutic Implications

Currently, specifically for AD, the pharmacological therapies approved are limited to three cholinesterase inhibitors, donepezil, rivastigmine, and galantamine, and one N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist, memantine.^{2,5} These pharmacological tools are only used to improve quality of life because, due to their curative deficiency, they have no impact on the course of the illness.^{5,24}

The lack of effective therapies for AD are due to an incomplete understanding of the pathophysiological mechanisms, but also because there are difficulties in accurately diagnosing AD during the subclinical stages.^{11,19,24} Thus, the comprehension of the molecular mechanism behind AD pathophysiology is extremely important for an early diagnosis, before the symptoms onset, and for drug development of effective therapies that can be used for the prevention and treatment of the disease.^{5,19,24}

The amyloid cascade hypothesis has driven the pharmaceutical industry to develop a range of drugs, that directly alter or inhibit amyloidogenic APP processing, and to complete over 100 clinical trials. The nearly universal failures of these trials suggest that the pathophysiology of AD is not limited to amyloid pathology.^{5,14,21,57} Growing evidence suggests that restoring proper endosomal trafficking may constitute another potential strategy for the development of disease-modifying therapies. Indeed, future therapeutic efforts should focus on trafficking components of the endosomal network as potential therapeutic targets, instead of majorly targeting the amyloidogenic fragments and enzymes, BACE1 and γ -secretase complexes.^{1,19,57}

The leading scientist Scott A. Small argues that interventions that act directly to increase the flow through the EE might be a better, or at least an alternative, therapeutic approach, that will be advantageous in patients with primary defects in endosomal trafficking, due to genetic and/or genetic and environmental issues. Petsko and his coworkers also consider that endosomal traffic jams are the driver of AD pathology, so they argue that therapeutic

interventions to be adopted should be designed with the objective of “unjam” the endosomal trafficking.¹⁴

Enhancing retromer function has recently been considered a good potential therapeutic strategy to reverse endocytic deficits and for ameliorating several aspects of AD pathology, such as A β -deposition, microglial dysfunction, and tau hyperphosphorylation and aggregation, and consequently behavioral impairments.^{8,26,29,40} According to recent studies, in both cell cultures and transgenic mice prone to develop tau and amyloid pathology, the pharmacological stabilization of retromer not only limited A β production, but also reduced tau phosphorylation.⁶⁶ In this regard, a novel class of small molecule pharmacological chaperones, with the ability to bind and stabilize the interactions between members of the retromer complex, and retromer gene therapies, which demonstrated to enhance retromer function, emerged as an interesting and potentially viable therapeutic strategies.^{3,8,26,29,31,40}

Mecozzi *et al.* isolated the compound R55, from the top computational 'hits', and through several *in vitro* studies. This small molecule was shown to act like a retromer pharmacological chaperone, that increased levels of retromer proteins in neurons, stabilized this complex and enhanced its function.⁶⁶

Pharmacological chaperones that increase retromer levels can suppress amyloid pathology by limiting the processing of APP and reducing the neuronal accumulation of APP-derived neurotoxic fragments, by increasing the transport of APP out of the EE.^{6,14,26,31}

Although retromer chaperones, such R55 and R33, are considered a promising therapeutic approach, there is a general concern about their toxic adverse effects. However, studies confirm that increasing retromer levels does not lead to any toxic events in cellular models, as well as animal models, but further studies *in vivo* are important.^{8,26,31,40}

Moreover, the components responsible for regulating Rab5 activation/deactivation, could also be considered promising therapeutic targets for AD.³⁹ Recent evidence from mechanistic studies indicates that the selective inhibitor of p38 α kinase, neflamapimod, has the endolysosomal dysfunction associated with Rab5 as its main pharmacological target, since p38 α is one of the main regulators of Rab5 activity and its effectors, so this drug acts by normalizing the dysregulated activity of Rab5.^{69,70} In fact, this drug was in phase IIb clinical trial, conducted since December of 2017 until June of 2019, in which it proved to be effective, when compared to placebo, in reducing the cerebrospinal fluid (CSF) levels of p-tau and tau, in early-stage AD.^{39,69} However, it didn't demonstrate to be effective in the improvement of episodic memory performance, when compared to placebo, so it's necessary to perform clinical trials

with a higher dose of neflamapimod and with longer duration to assess its effects on AD progression.⁶⁹ In addition, exosomes can also be a tool for AD therapy, having been proposed as a novel therapeutic vector for drug delivery to neurons in several studies, due to their ability to cross the BBB and their inert nature. Hence, the therapeutic use of these vesicles requires a more extensive investigation of their safety, stability, biodistribution, and mode of administration.²²

It is also important to note that many patients with AD have other comorbidities, which can exacerbate cognitive dysfunction and worsen the performance of daily activities. Thus, the treatment of comorbidities is crucial. However, it's always a challenge, since the therapies that apply to the rest of the population may not be the most appropriate for these patients.²

Finally, considering the heterogeneity within AD, more studies are needed to decipher the role of endosomal trafficking dysfunction underlying the molecular mechanisms of AD, so that the development of new pharmacological therapies with the ability to enhance endosomal trafficking pathways may be successful and thus allow effective prevention or reversal of the progression of this neurodegenerative disease.^{14,27}

6. Biomarkers of Endosomal trafficking pathway dysfunction in AD

The use of AD-specific *antemortem* biomarkers is a valuable resource that could support earlier AD diagnosis, since cytopathological changes initiate years before the appearance of clinical symptoms. However, the brain autopsy, after the patient's death, still remains the most fully reliable source for AD diagnosis.^{2,5,23,24}

In addition to aiding in diagnosis, biomarkers also allow predicting disease progression and may also provide new information about the pathogenic mechanisms, which helps in the development of new treatments and in the evaluation of their efficacy and safety.²⁵

Currently, the known AD biomarkers are mostly detected and measured through imaging modalities, such as Computed tomography (CT), Positron emission tomography (PET) and Magnetic resonance imaging (MRI), and CSF analysis. However, the blood-based biomarkers are a fast-growing promise for the clinical practice, according to several experts.²⁹

The most useful biomarkers in diagnosis can be assessed upon CSF collection and are A β 42, total tau protein, and hyperphosphorylated tau protein levels, despite appearing relatively late in the course of the disease.^{25,22} Furthermore, several studies have shown that several endolysosomal proteins were found to be increased in the CSF of AD patients.²³ For example, in a recent study by S. Simoes *et al.* it was performed a CSF proteomic screen, first in mice

models with VPS35 knocked out in forebrain neurons and then in humans, including patients with AD dementia, prodromal AD, and healthy controls. In that screen, the three most relevant proteomic findings for AD were domains of the following proteins: amyloid-beta precursor-like protein 1 (APLP1), close homolog of L1 (CHL1), and tau. The findings suggest that retromer-dependent endosomal trafficking can regulate tau, APLP1, and CHL1, so that the increase in the concentration of these proteins in CSF is likely to reflect the impairment of the retromer. So, the joint increase of these proteins can be considered a potential biomarker of AD's endosomal traffic jams. In addition, some recent reports suggest that the tau protein phosphorylated at the threonine-217 site (p-tau217) present in CSF is a sensitive and specific biomarker, which allows the detection of AD, even in the earliest preclinical stages, before the onset of neurodegeneration.¹⁸

Sylvia E. Perez. *et al.* performed an immunoblot analysis of hippocampal homogenates from cases with an *antemortem* clinical diagnosis of AD and found that levels of CTSD in CSF from AD patients were 4-fold higher compared to other neurodegenerative disorders, suggesting that this enzyme could also be a potential biomarker for endolysosomal dysfunction at AD.⁷¹

Despite the usefulness of biomarkers present in the CSF for the diagnosis, its sampling method requires lumbar puncture, which is an invasive procedure with contraindications, and can only be performed by specialized professionals, so it is restricted in clinical practice.⁵⁹ In contrast, biomarkers associated with blood require a less invasive method of collection, so they may be much more widely applicable and acceptable for AD diagnosis.^{5,22,24} However, there is some concern about the clinical value of peripheral biomarkers for brain disease, since brain-derived molecules are present at much lower concentrations in blood compared to the CSF, so it's still a challenge to identify and validate blood-based biomarkers.^{2,5,23}

Intriguingly, in the search for a new AD diagnostic marker, several studies show that the EVs such as exosomes are an attractive biomarker of the dysfunction of the endosomal trafficking system in AD.^{5,11,29} This is due to the fact of exosomes display a unique signature in terms of proteins (such as β -CTF, A β , tau, β -secretase, and A β -degrading enzymes) and lipids that reflect the pathophysiological state of their cells of origin, thus its content also provides a way to follow the progression of the disease.²²

These EVs could serve as a potential noninvasive biomarker for neurodegenerative diseases, as they are found in several body fluids in addition to CSF, including blood and saliva.^{5,22} Neurally-derived blood exosomes can predict the development of AD up to 10 years before the onset of clinical signs,⁴ which would allow an early diagnosis and inclusion of early AD

patients in new clinical trials that are studying endolysosomal dysfunction as an early neuropathological event in AD.²²

Furthermore, new findings reveal that circulating exosomes in neurodegenerative disorders transport and release the distinct miRNA signature. Thus, because brain-derived miRNA may reflect the onset and progression of neurodegenerative diseases, Cheng *et al.* proposed that altered exosomal miRNA profiles in CSF/blood could also be a potential novel biomarker in the diagnosis during the preclinical phase of AD. However, it is still critical for further research data to validate the role of these EVs and miRNA as biomarkers for the diagnosis of and evaluation of the progression of AD.^{5,22,24}

Conclusions and Future Prospects

AD affects millions of people worldwide and is becoming an ever-increasing socio-economic burden, due to the rise in average life expectancy, and also because there is still no treatment available to reverse or halt the progression of this fatal illness.^{1,10,12,16,34} Indeed, currently, there are no reliable early diagnostic approaches or treatments available for the prevention or reversal of AD, only classes of medications approved to treat the symptoms.^{2,11} Therefore, studying and understanding cell biology, risk factors, and molecular pathways involved in AD's pathogenesis is crucial to establishing new methods for early detection of disease onset and shaping the development of new drugs for more efficient treatments and without toxic adverse effects in the future.^{1,4,10,43}

Technological advances have improved the quality of imaging and video microscopy and thus allowed the observation of endosomal trafficking and sorting dynamics in the neurons. The large GWAS allowed the identification of several genes simultaneously linked to endosomal trafficking and AD. Together, these tools allowed us to conclude that defects in endosomal trafficking pathway appear to be a primary pathophysiological event primary in AD onset.^{16,21,31,35}

Mechanistically, enlarged endosomes observed in AD patients' brains are probably due to too much cargo flowing into endosomes, caused by increased endocytosis, or too little cargo flowing out, caused by problems in the three main pathways of endolysosomal trafficking.³¹

Interestingly, since endolysosomal pathology was detected in brain regions that were free of amyloid plaques and NFTs, this suggests that these cellular abnormalities precede not only the onset of clinical symptoms of dementia but, can directly mediate all of AD's features, acting like the central hub from which each pathology independently emerges.²¹

Biomarkers are useful tools for clinical and preclinical diagnosis of AD and for therapy monitoring. So, it's important to research and validate biomarkers for the dysfunction of the endosomal trafficking system, because currently known biomarkers don't have the sensitivity and specificity required for that.⁵

Since pathophysiological mechanisms may occur decades before the onset of clinical symptoms, early interventions may be key to effective therapies in AD patients.^{11,51} Considering that endosomal network dysfunctions are likely and early event in disease pathogeny, they are an attractive target for study and development of new therapeutics able to reverse or even preventing early disease phenotypes.^{4,11}

Bibliographic references

1. PERIC, Aleksandar; ANNAERT, Wim - **Early etiology of Alzheimer's disease: tipping the balance toward autophagy or endosomal dysfunction?** *Acta Neuropathologica*. ISSN 0001-6322. 129:3 (2015) 363–381.
2. KNOPMAN, David S. *et al.* - **Alzheimer disease**. *Nature Reviews Disease Primers*. ISSN 2056-676X. 7:1 (2021) 33.
3. QURESHI, Yasir H.; BAEZ, Penelope; REITZ, Christiane - **Endosomal Trafficking in Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Neuronal Ceroid Lipofuscinosis**. *Molecular and Cellular Biology*. ISSN 0270-7306. 40:19 (2020) 1–12.
4. AFGHAH, Zahra; CHEN, Xuesong; GEIGER, Jonathan D. - **Role of endolysosomes and inter-organelle signaling in brain disease**. *Neurobiology of Disease*. ISSN 09699961. 134:October 2019 (2020) 104670.
5. ARBO, B. D. *et al.* - **Endosomal dysfunction impacts extracellular vesicle release: Central role in A β pathology**. *Ageing Research Reviews*. ISSN 15681637. 58:April 2019 (2020) 101006.
6. ZHANG, Qiu-Yue *et al.* - **The Role of Retromer in Alzheimer's Disease**. *Molecular Neurobiology*. ISSN 0893-7648. 53:6 (2016) 4201–4209.
7. WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Dementia**. 2021. [Accessed in May 21th, 2022]. Available on the Internet: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
8. VAGNOZZI, Alana N.; PRATICÒ, Domenico - **Endosomal sorting and trafficking, the retromer complex and neurodegeneration**. *Molecular Psychiatry*. ISSN 1359-4184. 24:6 (2019) 857–868.
9. ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, McGill University - **World Alzheimer Report 2021**. 2021. [Accessed in July 2nd, 2022]. Available on the Internet: <https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2021/>
10. XU, Wei *et al.* - **Dysregulation of Rab5-mediated endocytic pathways in Alzheimer's disease**. *Traffic*. ISSN 13989219. 19:4 (2018) 253–262.
11. SZABO, Marcell P. *et al.* - **The role of Alzheimer's disease risk genes in endolysosomal pathways**. *Neurobiology of Disease*. ISSN 09699961. 162:2022) 105576.
12. CHANDRA, Mintu; KENDALL, Amy K.; JACKSON, Lauren P. - **Toward Understanding the Molecular Role of SNX27/Retromer in Human Health and Disease**. *Frontiers in*

Cell and Developmental Biology. ISSN 2296-634X. 9:April (2021) 1–17.

13. NIXON, Ralph A. - **Amyloid precursor protein and endosomal-lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease: inseparable partners in a multifactorial disease.** The FASEB Journal. ISSN 0892-6638. 31:7 (2017) 2729–2743.

14. SMALL, Scott A. *et al.* - **Endosomal Traffic Jams Represent a Pathogenic Hub and Therapeutic Target in Alzheimer's Disease.** Trends in Neurosciences. ISSN 01662236. 40:10 (2017) 592–602.

15. LAURITZEN, Inger *et al.* - **Intraneuronal aggregation of the β -CTF fragment of APP (C99) induces A β -independent lysosomal-autophagic pathology.** Acta Neuropathologica. ISSN 0001-6322. 132:2 (2016) 257–276.

16. BUGGIA-PRÉVOT, Virginie; THINAKARAN, Gopal - **Significance of transcytosis in Alzheimer's disease: BACE1 takes the scenic route to axons.** BioEssays. ISSN 02659247. 37:8 (2015) 888–898.

17. WILLÉN, Katarina *et al.* - **A β accumulation causes MVB enlargement and is modelled by dominant negative VPS4A.** Molecular Neurodegeneration. ISSN 1750-1326. 12:1 (2017) 61.

18. SIMOES, Sabrina *et al.* - **Tau and other proteins found in Alzheimer's disease spinal fluid are linked to retromer-mediated endosomal traffic in mice and humans.** Science Translational Medicine. ISSN 1946-6234. 12:571 (2020).

19. COLACURCIO, Daniel J. *et al.* - **Dysfunction of autophagy and endosomal-lysosomal pathways: Roles in pathogenesis of Down syndrome and Alzheimer's Disease.** Free Radical Biology and Medicine. ISSN 08915849. 114:October 2017 (2018) 40–51.

20. HU, Yong-Bo *et al.* - **The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration.** Translational Neurodegeneration. ISSN 2047-9158. 4:1 (2015) 18.

21. SMALL, Scott A.; PETSKO, Gregory A. - **Endosomal recycling reconciles the Alzheimer's disease paradox.** Science Translational Medicine. ISSN 1946-6234. 12:572 (2020) 1–4.

22. BÉCOT, Anaïs; VOLGERS, Charlotte; NIEL, Guillaume VAN - **Transmissible Endosomal Intoxication: A Balance between Exosomes and Lysosomes at the Basis of Intercellular Amyloid Propagation.** Biomedicines. ISSN 2227-9059. 8:8 (2020)

272.

23. CORLIER, F. *et al.* - **Modifications of the endosomal compartment in peripheral blood mononuclear cells and fibroblasts from Alzheimer's disease patients.** *Translational Psychiatry*. ISSN 2158-3188. 5:7 (2015) e595–e595.
24. CHEN, Jian-Jiao *et al.* - **Potential Roles of Exosomal MicroRNAs as Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Application in Alzheimer's Disease.** *Neural Plasticity*. ISSN 2090-5904. 2017:2017) 1–12.
25. LI, Chaosi *et al.* - **Role of the Retromer Complex in Neurodegenerative Diseases.** *Frontiers in Aging Neuroscience*. ISSN 1663-4365. 8:MAR (2016) 1–12.
26. CAROSI, Julian M. *et al.* - **Retromer dysfunction at the nexus of tauopathies.** *Cell Death & Differentiation*. ISSN 1350-9047. 28:3 (2021) 884–899.
27. JIANG, Shanya; BHASKAR, Kiran - **Degradation and Transmission of Tau by Autophagic-Endolysosomal Networks and Potential Therapeutic Targets for Tauopathy.** *Frontiers in Molecular Neuroscience*. ISSN 1662-5099. 13:October (2020) 1–19.
28. VAZ-SILVA, João *et al.* - **Endolysosomal degradation of Tau and its role in glucocorticoid-driven hippocampal malfunction.** *The EMBO Journal*. ISSN 0261-4189. 37:20 (2018) 1–16.
29. FILIPPONE, Alessia; PRATICÒ, Domenico - **Endosome Dysregulation in Down Syndrome: A Potential Contributor to Alzheimer Disease Pathology.** *Annals of Neurology*. ISSN 0364-5134. 90:1 (2021) 4–14.
30. IHARA, Y.; MORISHIMA-KAWASHIMA, M.; NIXON, R. - **The Ubiquitin-Proteasome System and the Autophagic-Lysosomal System in Alzheimer Disease.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. ISSN 2157-1422. 2:8 (2012) a006361–a006361.
31. SMALL, Scott A.; PETSKO, Gregory A. - **Retromer in Alzheimer disease, Parkinson disease and other neurological disorders.** *Nature Reviews Neuroscience*. ISSN 1471-003X. 16:3 (2015) 126–132.
32. KESSISOGLU, Irini A. *et al.* - **The Drosophila amyloid precursor protein homologue mediates neuronal survival and neuroglial interactions.** *PLOS Biology*. ISSN 1545-7885. 18:12 (2020) e3000703.
33. FILIPPONE, Alessia; SMITH, Tiffany; PRATICO, Domenico - **Dysregulation of the Retromer Complex in Brain Endothelial Cells Results in Accumulation of**

Phosphorylated Tau. Journal of Inflammation Research. ISSN 1178-7031. Volume 14 (2021) 7455–7465.

34. GAO, Song *et al.* - **Genetic variation within endolysosomal system is associated with late-onset Alzheimer's disease.** Brain. ISSN 0006-8950. 141:9 (2018) 2711–2720.

35. HUNG, Christy *et al.* - **SORLI deficiency in human excitatory neurons causes APP-dependent defects in the endolysosome-autophagy network.** Cell Reports. ISSN 22111247. 35:11 (2021) 109259.

36. LAMBERT, Erwan *et al.* - **The Alzheimer susceptibility gene BIN1 induces isoform-dependent neurotoxicity through early endosome defects.** Acta Neuropathologica Communications. ISSN 2051-5960. 10:1 (2022) 4.

37. SHEN, Ruinan *et al.* - **Upregulation of RIN3 induces endosomal dysfunction in Alzheimer's disease. Translational Neurodegeneration.** ISSN 2047-9158. 9:1 (2020) 26.

38. JIANG, Ying *et al.* - **Partial BACE1 reduction in a Down syndrome mouse model blocks Alzheimer-related endosomal anomalies and cholinergic neurodegeneration: role of APP-CTF.** Neurobiology of Aging. ISSN 01974580. 39:2016) 90–98.

39. PENSALFINI, Anna *et al.* - **Endosomal Dysfunction Induced by Directly Overactivating Rab5 Recapitulates Prodromal and Neurodegenerative Features of Alzheimer's Disease.** Cell Reports. ISSN 22111247. 33:8 (2020) 108420.

40. ZHANG, Hongfeng *et al.* - **The Retromer Complex and Sorting Nexins in Neurodegenerative Diseases.** Frontiers in Aging Neuroscience. ISSN 1663-4365. 10:MAR (2018) 1–11.

41. SMALL, Scott A. *et al.* - **Model-guided microarray implicates the retromer complex in Alzheimer's disease.** Annals of Neurology. ISSN 03645134. 58:6 (2005) 909–919.

42. SIMOES, Sabrina *et al.* - **Alzheimer's vulnerable brain region relies on a distinct retromer core dedicated to endosomal recycling.** Cell Reports. ISSN 22111247. 37:13 (2021) 110182.

43. APPEL, Joanna Ruth *et al.* - **Increased Microglial Activity, Impaired Adult Hippocampal Neurogenesis, and Depressive-like Behavior in Microglial VPS35-Depleted Mice.** The Journal of Neuroscience. ISSN 0270-6474. 38:26 (2018) 5949–5968.

44. QURESHI, Yasir H. *et al.* - **The neuronal retromer can regulate both neuronal and microglial phenotypes of Alzheimer's disease.** *Cell Reports*. ISSN 22111247. 38:3 (2022) 110262.
45. HUNG, Christy; LIVESEY, Frederick J. - **Endolysosome and autophagy dysfunction in Alzheimer disease.** *Autophagy*. ISSN 1554-8627. 17:11 (2021) 3882–3883.
46. CHENG, Shaowu *et al.* - **Haplodeficiency of Cathepsin D does not affect cerebral amyloidosis and autophagy in APP/PS1 transgenic mice.** *Journal of Neurochemistry*. ISSN 00223042. 142:2 (2017) 297–304.
47. MODICA, Graziana *et al.* - **Rab7 palmitoylation is required for efficient endosome-to-TGN trafficking.** *Journal of Cell Science*. ISSN 1477-9137. 130:15 (2017) 2579–2590.
48. PENG, Katherine Y. *et al.* - **Apolipoprotein E4 genotype compromises brain exosome production.** *Brain*. ISSN 0006-8950. 142:1 (2019) 163–175.
49. FOTE, Gianna M. *et al.* - **Isoform-dependent lysosomal degradation and internalization of apolipoprotein E requires autophagy proteins.** *Journal of Cell Science*. ISSN 0021-9533. 135:2 (2022).
50. MOREL, Etienne *et al.* - **Phosphatidylinositol-3-phosphate regulates sorting and processing of amyloid precursor protein through the endosomal system.** *Nature Communications*. ISSN 2041-1723. 4:1 (2013) 2250.
51. PRASAD, Hari; RAO, Rajini - **The Na⁺/H⁺ Exchanger NHE6 Modulates Endosomal pH to Control Processing of Amyloid Precursor Protein in a Cell Culture Model of Alzheimer Disease.** *Journal of Biological Chemistry*. ISSN 00219258. 290:9 (2015) 5311–5327.
52. CATALDO, Anne M. *et al.* - **Endocytic Pathway Abnormalities Precede Amyloid β Deposition in Sporadic Alzheimer's Disease and Down Syndrome.** *The American Journal of Pathology*. ISSN 00029440. 157:1 (2000) 277–286.
53. XU, Wei *et al.* - **Amyloid precursor protein-mediated endocytic pathway disruption induces axonal dysfunction and neurodegeneration.** *Journal of Clinical Investigation*. ISSN 0021-9738. 126:5 (2016) 1815–1833.
54. KIM, S. *et al.* - **Evidence that the rab5 effector APPL1 mediates APP- β CTF-induced dysfunction of endosomes in Down syndrome and Alzheimer's disease.** *Molecular Psychiatry*. ISSN 1359-4184. 21:5 (2016) 707–716.

55. TAKASUGI, Nobumasa *et al.* - **TMEM30A is a candidate interacting partner for the β -carboxyl-terminal fragment of amyloid- β precursor protein in endosomes.** PLOS ONE. ISSN 1932-6203. 13:8 (2018) e0200988.
56. KNUPP, Allison *et al.* - **Depletion of the AD Risk Gene SORLI Selectively Impairs Neuronal Endosomal Traffic Independent of Amyloidogenic APP Processing.** Cell Reports. ISSN 22111247. 31:9 (2020) 107719.
57. HUANG, Timothy Y. *et al.* - **SNX27 and SORLA Interact to Reduce Amyloidogenic Subcellular Distribution and Processing of Amyloid Precursor Protein.** The Journal of Neuroscience. ISSN 0270-6474. 36:30 (2016) 7996–8011.
58. KIMURA, Nobuyuki *et al.* - **Dynein Dysfunction Reproduces Age-Dependent Retromer Deficiency.** The American Journal of Pathology. ISSN 00029440. 186:7 (2016) 1952–1966.
59. BHALLA, Akhil *et al.* - **The location and trafficking routes of the neuronal retromer and its role in amyloid precursor protein transport.** Neurobiology of Disease. ISSN 09699961. 47:1 (2012) 126–134.
60. GONZÁLEZ, Alexis E. *et al.* - **Autophagosomes cooperate in the degradation of intracellular C-terminal fragments of the amyloid precursor protein via the MVB/lysosomal pathway.** The FASEB Journal. ISSN 0892-6638. 31:6 (2017) 2446–2459.
61. SANNERUD, Ragna *et al.* - **Restricted Location of PSEN2/ γ -Secretase Determines Substrate Specificity and Generates an Intracellular A β Pool.** Cell. ISSN 00928674. 166:1 (2016) 193–208.
62. PRASAD, Hari; RAO, Rajini - **Amyloid clearance defect in ApoE4 astrocytes is reversed by epigenetic correction of endosomal pH.** Proceedings of the National Academy of Sciences. ISSN 0027-8424. 115:28 (2018) E6640–E6649.
63. SOURA, Violetta *et al.* - **Visualization of co-localization in A β 42-administered neuroblastoma cells reveals lysosome damage and autophagosome accumulation related to cell death.** Biochemical Journal. ISSN 0264-6021. 441:2 (2012) 579–590.
64. PÉREZ-GONZÁLEZ, Rocío *et al.* - **Extracellular vesicles: where the amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragments accumulate and amyloid- β oligomerizes.** The FASEB Journal. ISSN 0892-6638. 34:9 (2020) 12922–12931.
65. CALAFATE, Sara *et al.* - **Loss of Bin1 Promotes the Propagation of Tau Pathology.** Cell Reports. ISSN 22111247. 17:4 (2016) 931–940.

66. CAROSI, Julian M. *et al.* - **Retromer regulates the lysosomal clearance of MAPT/tau.** *Autophagy*. ISSN 1554-8627. 17:9 (2021) 2217–2237.
67. MAHENDRAN, Tharun Selvam *et al.* - **Soluble 4R0N Tau Abrogates Endocytic Vesicular Dynamics.** *Frontiers in Aging Neuroscience*. ISSN 1663-4365. 12:November (2020) 1–11.
68. POLANCO, Juan Carlos *et al.* - **Exosomes induce endolysosomal permeabilization as a gateway by which exosomal tau seeds escape into the cytosol.** *Acta Neuropathologica*. ISSN 0001-6322. 141:2 (2021) 235–256.
69. PRINS, Niels D. *et al.* - **A phase 2 double-blind placebo-controlled 24-week treatment clinical study of the p38 alpha kinase inhibitor neflamapimod in mild Alzheimer’s disease.** *Alzheimer’s Research & Therapy*. ISSN 1758-9193. 13:1 (2021) 106.
70. GERMANN, Ursula A.; ALAM, John J. - **P38 α MAPK Signaling—A Robust Therapeutic Target for Rab5-Mediated Neurodegenerative Disease.** *International Journal of Molecular Sciences*. ISSN 1422-0067. 21:15 (2020) 5485.
71. PEREZ, Sylvia E. *et al.* - **Hippocampal Endosomal, Lysosomal, and Autophagic Dysregulation in Mild Cognitive Impairment.** *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. ISSN 0022-3069. 74:4 (2015) 345–358.