



1 2 9 0

UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Mateus Santos Marques

Relatórios de Estágio sob a orientação da Dra. Ana Pedro e do Dr. João Pimentel e Monografia intitulada “Radicais livres e oxidantes no envelhecimento e em doenças neurodegenerativas: novos mecanismos moleculares e processos celulares.” sob a orientação do Professor Doutor João Laranjinha, refentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Mateus Santos Marques

Relatórios de Estágio sob a orientação da Dra. Ana Pedro e do Dr. João Pimentel e Monografia intitulada “Radicais livres e oxidantes no envelhecimento e em doenças neurodegenerativas: novos mecanismos moleculares e processos celulares.” sob a orientação do Professor Doutor João Laranjinha, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2023

Eu, Mateus Santos Marques, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2019288702, declaro assumir toda a responsabilidade pelo Documento Relatórios de Estágio e Monografia Intitulada “Radicais livres e oxidantes no envelhecimento e em doenças neurodegenerativas: novos mecanismos moleculares e processos celulares.” apresentado 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, 8 de setembro de 2023.

Mateus Santos Marques

(Mateus Santos Marques)

Agradecimentos

Findada mais uma etapa desta vida só me restam memórias de um tempo passado e amizades de sobra. Um brinde aos anos mais verdes da minha vida, só me resta agradecer.

Aos meus pais, por todo o amor e carinho que me deram e sempre me darem a coragem e segurança para continuar.

Ao Cisco, por todos os anos de companheirismo e amizade, nos piores e, sem dúvida, nos melhores momentos. Por me acompanhar em todas as aventuras, conversas sem fim e idas a “Plutão”. Sem ti Coimbra não seria a mesma.

Ao PP, a uma das melhores pessoas que Coimbra me ofereceu. Por alinhares em todas as ideias, por todas as risadas partilhadas e por estares presente em viagens a países longínquos e mundos distantes. A minha estadia nesta cidade nunca seria a mesma sem ti.

Ao Simões, marcaste a minha passagem por esta cidade, amigo do peito, sempre a horas certas e sempre com um plano detalhado. Partilhamos viagens e aventuras nesses países longínquos e muitos momentos nestes anos.

Ao Pascoal, fiel amigo partilhamos momentos e viagens, risadas e abraços. Estes 5 anos não seriam os mesmos sem ti.

Ao Zé e ao Bernardo, por me alegarem o dia cada vez que chegava a casa.

À casa do povo, por me dar abrigo e refúgio em noites difíceis.

Vibramil, ao melhor carro que Coimbra já viu.

Ao DJ, Marco, Tiago, Manuel, Piadas, Xano e Rui, por me receberem nesta cidade e me oferecerem incríveis memórias. Ao Teixeira e à Videira pela amizade e todos os jantares. Por todas as conversas e risos.

À Sandra, Mariana, Nádia, Marta Vega e Marta Fernandez por fazerem parte da minha experiência de Erasmus, pelos jantares, viagens, brincadeiras e risadas.

Ao grupo “Peninsula”, por tornarem todos os momentos na Hungria especiais e únicos.

E a todos as outras pessoas que tive o prazer de conhecer ao longo desta jornada.

À Debrecen,

À Coimbra.

Índice

Parte I: Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Lista de Abreviaturas.....	7
1. Introdução.....	8
2. Bluepharma.....	8
3. Análise SWOT.....	9
3.1. Pontos Fortes.....	9
3.1.1. Acolhimento.....	9
3.1.2. Equipa.....	9
3.1.3. Elaboração do plano de Estágio.....	9
3.2. Pontos Fracos.....	10
3.2.1. Armazém.....	10
3.2.2. Área de trabalho disponível.....	10
3.3. Oportunidades.....	10
3.3.1. Obter e consolidar conhecimentos.....	10
3.3.2. Formação interna.....	11
3.3.3. Método <i>Kaizen</i>	11
3.3.4. Manipulação em sistemas de contenção.....	11
3.4. Ameaças.....	11
3.4.1. Ataques informáticos.....	11
3.5. Conclusão.....	12

Parte II: Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas.....	14
1. Introdução.....	15
2. Análise SWOT.....	15
2.1. Pontos Fortes.....	15
2.1.1 Equipa.....	15
2.1.2. Confiança.....	16
2.1.3. Aprendizagem contínua.....	16
2.1.4. Variedade de tarefas.....	16

2.3. Pontos Fracos.....	17
3.1 Stock reduzido.....	17
2.4. Oportunidades.....	17
2.4.1. Atendimento ao publico.....	17
2.4.2. Contacto com diversos idiomas.....	17
2.5. Ameaças.....	18
2.5.1 Número de estagiarios.....	18
2.5.2. Medicamentos esgotados no mercado.....	18
3.Casos Práticos.....	18

Parte III: Monografia “Radicais livres e oxidantes no envelhecimento e em doenças neurodegenerativas: novos mecanismos moleculares e processos celulares.”

Lista de Abreviaturas.....	22
Resumo.....	23
Abstract.....	24
1. Introdução.....	25
2. Conceitos gerais sobre radicais livres.....	25
3.Radicais livres e oxidantes na mitocôndria.....	26
4.Radicais livres, envelhecimento e senescência celular – impacto na neurodegenerescência.....	28
4.1. Envelhecimento celular e danos no DNA.....	29
4.2. Mecanismos de disfunção mitocondrial associada ao envelhecimento.....	29
4.2.1. Instabilidade genómica.....	30
4.2.2. Excesso de Cálcio.....	30
4.2.3. Desequilíbrio na relação NAD ⁺ /NADH.....	31
4.2.4. Estímulos externos.....	32
4.2.5. Alteração do número e fenótipo mitocondrial.....	32

4.2.6. Sistema imunitário inato.....	33
4.2.7. Permeabilização da membrana mitocondrial.....	34
4.3. Doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento, senescência e radicais livres.....	34
4.3.1. Doença de Alzheimer.....	35
4.3.2. Doença de Parkinson.....	37
4.3.3. Doença de Huntington.....	38
4.4. Senescência e neuroinflamação.....	39
4.4.1. Disfunção da autofagia.....	39
4.4.2. Disfunção mitocondrial e sistema imunológico.....	40
4.4.3. Inflamossoma NLRP3.....	41
4.4.4. Inflamação em doenças neurodegenerativas.....	42
4.4.4. Disfunção sináptica.....	44
7. Conclusão.....	46
Bibliografia.....	47

Parte I

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Bluepharma

Abreviaturas

BPF- Boas Práticas de Produção

FFUC- Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

IPC- *In-Process Control*

MICF- Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

OPL- *One-Point Lesson*

SOP- *Standart Operacional Procedure*

SWOT- *Strenghts, Weaknesses, Opportunities and Threats*

I. Introdução

Aos Estudantes do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) é dada a oportunidade de fazer um Estágio Curricular numa diversidade de áreas durante o quinto ano. Entre elas, está a indústria farmacêutica, que abrange várias saídas profissionais para novos farmacêuticos. Esta possibilidade de estágio adiciona valor à formação académica dos estudantes do MICF, pois proporciona uma melhor visão das opções profissionais, oportunidade de aplicar conhecimentos adquiridos durante o percurso académico bem como a chance de adquirir novos.

Assim, com o propósito de ganhar um leque mais alargado de experiência decidi realizar um estágio curricular neste setor. Realizei o meu estágio presencial no Departamento de *Scale-up* da Bluepharma, com início a 3 de janeiro e término a 31 março de 2023 sobre a orientação da Dra. Raquel Sousa e sobre a tutela da Dra. Ana Pedro.

2. Bluepharma

Caracterização

A Bluepharma é uma empresa farmacêutica criada em 2001, com sede em S. Martinho do Bispo, Coimbra, sendo hoje um grupo de 20 empresas com mais de 700 colaboradores. No passado dia 1 de março, viu ser comemorado o seu vigésimo segundo aniversário e ser inaugurada a nova unidade industrial de Eiras, demonstrando o crescimento sustentado da empresa, fruto de uma administração e gestão exemplares.

A Bluepharma possui experiência não só na produção com capacidade de produzir 3 mil milhões de unidades por ano, investigação e desenvolvimento de medicamentos, mas também na sua comercialização, tendo como destino de 90% das suas vendas o mercado estrangeiro. Os principais objetivos são a rentabilidade apoiada em ideais de sustentabilidade e inovação como demonstrado pelos inúmeros projetos de apoio.

A Bluepharma aplica uma metodologia “*Lean six sigma*”, com o desígnio de “fazer mais com menos”, e que é aplicada em todos os seus departamentos.

3. Análise SWOT

3.1. Pontos Fortes (Strengths)

3.1.1 Acolhimento

A Bluepharma destaca-se pela sua ótima recepção, na qual os estagiários e novos colaboradores têm uma manhã com seções de introdução às metodologias, hábitos culturais e história da empresa, orientada pelos elementos dos Recursos Humanos. Posteriormente, é atribuído material informático necessário as necessidades de cada colaborador.

Pela parte da tarde somos encaminhados para os respectivos departamentos onde nos são apresentadas as instalações, a equipa e o nosso orientador(a), com quem discutimos o plano de estágio para os seguintes 3 meses.

3.1.2 Equipa

Num estágio, aquilo que retiramos da nossa estadia é bastante influenciado pela equipa que nos acolhe. Seja em termos de conhecimento adquirido como de gosto pela prática da profissão, o ambiente dentro da equipa e as relações profissionais influenciam em muito a perceção do estágio.

Durante o tempo que estive na Bluepharma tive oportunidade de fazer parte de uma equipa multifacetada e dedicada. Tive a sorte não só de acompanhar de perto o trabalho como integrar uma equipa jovem. Tive a possibilidade de contactar com a sua rotina, problemas diários e contribuir para a criação de soluções.

3.1.3 Elaboração do plano de estágio

Foram discutidos os interesses por parte do orientador(a) de estágio e os meus com o objetivo de criar um plano mais adequado e enriquecedor possível.

Inicialmente é feita a leitura das SOPs (*Standart Operational Procedures*) de forma a estarmos a par dos processos e ações corretas em conformidade com a Boas Práticas de Fabrico (BPF). O objetivo do meu estágio foi atualizar as SOPs de “Equipamento de medição de propriedades de escoamento e ângulo de repouso” e “Aparelho de compactação para determinação do Volume Aparente” e a criação de duas OPL (*One-Point Lesson*) - para a montagem da “Granuladora Alexanderwerk 50N” e do equipamento de enchimento de cápsulas “Zanasi 40E” de forma a facilitar a montagem e desmontagem das máquinas. Estes documentos têm por objetivo tornar mais eficiente o processo de montagens e desmontagens dos equipamentos, diminuindo tempos de *setup*.

Além disso, após várias formações internas, pude acompanhar a produção de fármacos potentes dentro de um ambiente controlado. Acompanhei também a realização de testes de IPC, como, testes de desagregação, dureza e friabilidade.

3.2. Pontos Fracos (*Weaknesses*)

3.2.1. Armazém

O único acesso ao armazém, a partir do *Scale-up*, é feito através de um único elevador partilhado com o resto da produção. Sendo esta a única maneira de transportar material, máquinas ou resíduos, por vezes não havia disponibilidade do mesmo, podendo ter impacto nos planos diários estabelecidos.

3.2.2. Área de trabalho disponível

O departamento de *Scale-up* tem uma área relativamente reduzida para o tipo e dimensão dos equipamentos usados. É bem organizada e possui todas as salas necessárias, mas é difícil deslocar os equipamentos entre as salas de produção. Além disso, o acesso é dificultado quando movemos máquinas para dentro ou fora do departamento.

Ainda, o espaço de armazenamento dentro do departamento é bastante limitado exigindo um elevado nível de organização.

3.3. Oportunidades (*Opportunities*)

3.3.1. Obter e consolidar conhecimentos

Ao fazer o estágio na indústria farmacêutica e acompanhar os desafios diários do setor industrial, pude adquirir e, principalmente, consolidar o conhecimento que obtive durante o meu percurso académico. Tive a sorte de acompanhar de perto todos os processos de produção, desde as pesagens da matéria-prima até à obtenção do produto semi-acabado, bem como observar intervenções da manutenção e operação de todos os equipamentos envolvidos.

Ainda, pude formular/reformular alguns documentos sobre diferentes equipamentos como um equipamento de enchimento de uma compactadora, entre outros, o que me permitiu ganhar um conhecimento mais aprofundado sobre as máquinas e os processos nas quais estão envolvidas. Além disso, participei também em testes farmacotécnicos.

3.3.2. Formação Interna

Durante o meu estágio fiz parte de várias formações presenciais algumas relacionadas com sistemas de contenção, o correto uso do material e a métodos aplicados na produção de medicamentos. A Bluepharma oferece várias formações não só específicas ao departamento integrado pelo colaborador, mas também formações transversais a todos os membros da empresa com o objetivo de sensibilizar todos os seus integrantes do rumo da empresa além da criação de um ambiente agradável com orientações culturais inerentes à empresa. Também tive acesso a um conjunto alargado de SOPs relacionadas com a metodologia de trabalho, segurança, equipamento, documentação e de Boas Práticas de Fabrico. Ainda tive acesso a formações de formato online através do portal da Bluepharma. Aprendi a trabalhar com o sistema Veeva que é um sistema informático de gestão da qualidade.

Em suma, acabei o estágio com um conhecimento mais amplo e aprofundado sobre várias matérias relacionadas com o correto funcionamento de uma fábrica do setor farmacêutico.

3.3.3. Método Kaizen

Desde o primeiro dia estive em contacto com a metodologia *Kaizen*, um sistema de melhoria contínua que tem como alvo criar uma melhor comunicação dentro da equipa, melhor organização e maximizar a produção, minimizando erros e assim aumentar a rentabilidade. Devido a este mecanismo, tive a sensação de que todos os membros da equipa estavam a par de todos os acontecimentos antes de começar a trabalhar e de todos os objetivos para o dia, reduzindo a confusão e perdas de tempo, pois todos os elementos tinham recebido instruções claras para as tarefas do turno assim como informações complementares necessárias.

3.3.4. Manipulação em sistemas de contenção

Durante o estágio tive a oportunidade de entrar em processos de fabrico realizados em contenção e acompanhar de perto os processos de produção, montagem de equipamentos e limpeza. Foi, de facto, uma experiência interessante e enriquecedora pois pude perceber melhor o que os meus colegas sentiam e como operavam, pude também usar o sistema de ar motorizado- VersaFlo 3M- e todo o equipamento de segurança para estas situações.

3.4. Ameaças (*Threats*)

3.4.1. Ataques informáticos

Uma possível ameaça é a possibilidade de um ataque informático, o roubo de informação privada, danificando a credibilidade de uma empresa perante os seus clientes com a confiança

nela depositada. A Bluepharma está bastante consciente desta possibilidade e faz todos os esforços para sensibilizar os colaboradores destes possíveis ataques, como de “*phishing*”, por exemplo, seja através de formações presenciais ou através de formações no seu portal, disponíveis para todos os colaboradores.

Conclusão

A realização deste estágio tinha, para mim, o objetivo de entrar em contacto com a realidade do setor de indústria farmacêutica, conhecer os dilemas diários e as possíveis carreiras que um farmacêutico pode seguir como, também, as suas responsabilidades.

Ao longo destes 3 meses, apliquei vários conhecimentos e ganhei outros relacionados tanto com o papel de um farmacêutico como de outras profissões. Percebi a exigência de liderar uma equipa na área de produção no setor Farmacêutico, a necessidade de estar constantemente atualizado, o rigor, o espírito crítico e as adaptações necessárias, que a tornam numa carreira tão desafiante.

Parte 2

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Adriana

Abreviaturas

FA- Farmácia Adriana

MICF- Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

I. Introdução

A Farmácia Comunitária é na sua base, a prestação de uma ampla variedade de serviços de saúde prestados à comunidade. Seja através da dispensa de medicamentos, aconselhamento farmacêutico ou promover a educação dos utentes sobre a saúde. O farmacêutico tem um papel integral no acompanhamento médico, não só pela disponibilização de os medicamentos necessários, mas pelo contacto próximo com o utente.

O estágio Curricular em Farmácia Comunitária permite que os alunos de MICF coloquem em prática conhecimentos teórico-práticos adquiridos ao longo do seu percurso académico como ganhar novos. Ao longo destes meses são desenvolvidas várias valências imprescindíveis em contexto profissional sendo uma mais-valia para um profissional de saúde como o farmacêutico.

O meu estágio foi efetuado na Farmácia Adriana (FA), sob a orientação do Dr. João Pimentel, diretor técnico desta farmácia. Neste relatório pretendo descrever as atividades e responsabilidades que me foram designadas durante o estágio, decorrido entre o dia 3 de abril até dia 7 de agosto de 2023. Este relatório tem por base a análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), com apresentação de casos práticos com os quais lidei durante a minha estadia na farmácia.

2. Análise SWOT

2.1. Pontos Fortes (*Strengths*)

2.1.1. Equipa

A Equipa da FA destaca-se pelo bom ambiente e profissionalismo, após vários meses a integrar a equipa admito, sem dúvida alguma que, o maior ponto forte é a ligação criada entre os colaboradores da equipa. Desde o primeiro dia, fui recebido sempre de braços abertos e pude criar boas relações laborais, facilitando a minha aprendizagem e o cultivar o meu gosto pelo exercício da profissão. O profissionalismo e dedicação dos colaboradores permitiram-me melhorar e aprender sobre diversas matérias e estar mais bem preparado para realizar um melhor atendimento ao utente. Todos estes pontos foram fundamentais para o sucesso do meu estágio.

2.1.2. Confiança

A confiança que a equipa colocou em mim e na minha colega sentiu-se desde o primeiro dia. Inicialmente o atendimento ao público foi feito com supervisão de outros membros da equipa mais experientes, mas, ao fim de alguns dias passei a desempenhar o atendimento de forma autónoma o que demonstrou confiança nas minhas capacidades. A confiança em mim depositada permitiu que eu mantivesse confiante no meu atendimento e mesmo quando tinha dúvidas a equipa estava prontamente preparada para me ajudar.

2.1.3. Aprendizagem contínua

Durante o tempo que realizei o estágio pude aprender bastante com a equipa que integrei. Todos os dias aprendi algo novo, sempre me senti à vontade para fazer perguntas e não me faltaram respostas. Estiveram sempre prontos a responder as minhas dúvidas, com paciência e gosto em ensinar. Pude crescer com os meus erros e crescer como farmacêutico. Acompanharam-me sempre de perto e a disponibilidade para me ajudar teve um papel fundamental no conhecimento que adquiri durante o meu estágio.

2.1.4. Variedade de tarefas

Um dos pontos fortes foi a diversidade de tarefas na FA. Além do normal atendimento ao público e dispensa de medicamentos as outras atividades, embora reduzidas e espaçadas no tempo, foram enriquecedoras. Algumas destas atividades são comuns a várias farmácias como leitura de pressão arterial e batimentos cardíacos, algo que se tornou mais recorrente na altura de maior calor e a análise de parâmetros bioquímicos como a leitura de glicémia. Também a contagem de stocks, a revisão das datas de validade e reorganização do armazém da farmácia, acredito que estes tipos de atividades foram importantes para desenvolver uma maior consciência sobre o leque de diferentes medicamentos e laboratórios disponíveis no stock da farmácia. Também a realização de encomendas e a sua receção contribuíram para este desenvolvimento. Ter melhor noção do stock existente tornava o atendimento mais ágil e rápido, por saber onde se encontravam os medicamentos não só nas gavetas, mas como no armazém.

Ainda, tive oportunidade de receber formação num novo sistema de aplicação de brincos e pude realizar esta atividade várias vezes ao longo do meu estágio, desenvolvendo uma melhor relação com vários utentes da farmácia. A Dr. Ângela Mota tem formação aplicação de injetáveis e pude ainda acompanhar de perto o perto esta realização cooperando com ela.

A farmácia Adriana tem um protocolo público com Estabelecimento Prisional de Coimbra onde fui entregar medicação por várias vezes e pude contactar com o sistema e organizacional empreendido nesse estabelecimento.

2.3. Pontos Fracos (*Weaknesses*)

2.3.1. Stock reduzido

O *stock* da Farmácia Adriana é adequado à necessidade dos seus utentes, através de uma boa gestão por parte do Dr. João Pimentel. Porém, nem sempre tínhamos disponível o medicamento que o utente procurava ou o genérico do laboratório desejado para venda imediata. Na área dos cosméticos era ainda mais notável, dado que normalmente, existiam apenas algumas gamas disponíveis no *stock*. Esta limitação é explicada pelo tamanho da farmácia e pelo fluxo de utentes à procura desses produtos não justificava alargar a variedade destes produtos. Em alguns atendimentos consegui sentir que os utentes ficavam desanimados pela falta de variedade. Porém, esta limitação era facilmente superada através de encomendas instantâneas, sendo que a FA recebia as entregas dos armazenistas duas vezes por dia.

2.4. Oportunidades

2.4.1. Atendimento ao público

Ao longo do meu percurso académico lidei na grande maioria das vezes com o nome de substâncias ativas, mas tinha dificuldade em relacionar com o nome comercial do medicamento. Apesar de aprendermos o princípio ativo e muitas vezes o seu mecanismo ou possíveis interações com outras substâncias, aquando da necessidade de saber o nome comercial era-me bastante difícil responder com certeza. Assim, após estes meses de estágio e inúmeros atendimentos consegui desenvolver um grande à vontade nesta questão. O contacto direto com os medicamentos é a forma mais eficaz para superar esta limitação. Ainda, ao longo do estágio, ao seguir de perto o atendimento de colegas mais experientes comecei a desenvolver uma melhor capacidade de diagnóstico e no tipo de perguntas adequadas a cada situação.

2.4.2. Contacto com diversos idiomas

A farmácia Adriana está localizada na Praça da República. Um local bastante frequentado não só por estudantes como por estrangeiros. Esta característica tornou-se uma mais-valia pelo enorme contacto com outras línguas e outras culturas. Por várias vezes realizei o meu atendimento em inglês e por vezes até em outras línguas tornando a minha experiência ainda

mais enriquecedora. A possibilidade de realizar o atendimento em inglês permitiu-me ganhar mais confiança nas minhas habilidades e desenvolver as minhas capacidades linguísticas. Além disso, contactei com outras culturas e ganhei conhecimento sobre metodologias e medicamentos estrangeiros.

2.5.Ameaças

2.5.1. Número de estagiários

A FA tem um tamanho reduzido e não tem um enorme fluxo de utentes. Além de que, na época do verão a quantidade de estudantes em Coimbra, uma grande fatia dos utentes que se deslocam a esta farmácia, voltam para casa. Levando a uma diminuição do número de atendimentos por dia. Como é sabido, a atividade mais importante no estágio de farmácia de oficina são os aconselhamentos e dispensas de medicamentos, sendo que nesta altura os focos das minhas tarefas passaram a ser centradas no *backoffice*. A reduzida demanda em atendimentos com o número de estagiários na farmácia, levava a que sobrasse menos tarefas por pessoas e assim, um menor aproveitamento.

2.5.2. Medicamentos esgotados no mercado

Ao longo dos meses de estágio, casos como o Ozempic® ou Ovestin® são alguns dos exemplos de medicamentos com elevada rotação, mas em constante rutura de *stock*. Por um número elevado de vezes, utentes deslocaram-se à farmácia para aviar as suas receitas, mas não me era possível dispensar estes medicamentos devido à escassez nos armazéns nacionais. Esta realidade é, na minha ótica, uma ameaça ao plano terapêutico designado pelo médico. A falta de vários medicamentos no mercado nacional levava a que os utentes andassem de farmácia em farmácia, por vezes fazendo grandes distâncias, mas recebendo sempre uma resposta negativa. É uma ameaça para o correto funcionamento do sistema nacional de saúde e para as farmácias, sendo que não havia uma resolução prática que pudesse aplicar.

Casos Práticos

Caso prático I

Um jovem com cerca de 30 anos dirigiu-se à farmácia com uma crise diarreica. Comecei o atendimento através de algumas perguntas a fim de perceber a duração e a intensidade da crise e se apresenta mais algum sintoma. O utente afirmou que esta crise já dura há cerca de 3 dias e não apresentava febre, sangue nas fezes ou dores abdominais. Questionei se tinha

alterado algo na sua dieta nos dias anteriores ao início do episódio ou iniciado alguma medicação como por exemplo terapêutica antibiótica. O utente confirmou que tinha de facto iniciado a toma de antibiótico há cerca de 4 dias e que tinha ponderado interromper a terapêutica. De imediato, aconselhei a continuação do tratamento e expliquei a importância de uma toma contínua e até ao fim do antibiótico. Expliquei ao utente que seria provável haver uma relação entre a toma deste medicamento com a crise diarreica. Assim, aconselhei ao utente o tratamento com probiótico, o UL-250®, a fim de restabelecer a flora intestinal comitente à terapia do antibiótico.

Caso prático II

Uma utente com cerca de 70 anos dirigiu-se à FA com uma crise de hemorroidas, mencionando ser um problema recorrente. Iniciei o atendimento questionando se tinha dores ao defecar e se apresentava vestígios de sangue. A utente respondeu que teria efetivamente imensas dores, mas que não teria se apercebido de algum sangramento. Também mencionou que sentia imenso desconforto ao longo do dia, especialmente quando fazia grandes movimentos.

Assim, aconselhei à toma de Daflon® 500, 1 comprimido ao dia e dispensei a pomada Hemofissural®, com duas aplicações diárias. Além das medidas farmacológicas, aconselhei a alteração de alimentação com objetivo de diminuir a frequência de aparecimento de hemorroidas. Estas alterações basearam-se na introdução de uma maior ingestão de fibras e de água, não permanecer tanto tempo sentada. Salientei ainda, no caso de não melhorar, deverá dirigir-se a um médico.

Caso prático III

Uma jovem com cerca de 20 anos deslocou-se à FA para dar início ao tratamento de uma infeção urinária. Como tratamento de primeira linha, a utente vinha levantar uma receita de Fosfomicina ®. Ao longo do atendimento apercebi-me que seria habitual a reincidência de infeção urinária e decidi inquirir a utente a fim de saber se tomava quaisquer medidas preventivas para esta situação ao qual a jovem negou. De imediato comecei a explicar que não é normal ter infeções urinárias de forma frequente e aconselhei à utente várias medidas não farmacológicas para evitar o reaparecimento. As medidas aconselhadas envolviam uma maior ingestão de líquidos, aumento da frequência das idas à casa-de-banho e cuidados regulares da higiene íntima. Além destas medidas ainda aconselhei à toma do suplemento alimentar Probiokos Urin®, com constituintes como Proantocianidinas e Arbutina com o objetivo de diminuir a incidência de infeções urinárias.

Ainda, dispensei a Fosfomicina indicando a utente que deve fazer a toma única antes de ir dormir e ao longo do dia seguinte adiar a primeira ida à casa de banho com intuito de alongar o efeito do antibiótico. Por fim, aconselhei que se no caso de haver uma reinfeção deverá consultar um médico.

Caso prático IV

Uma senhora com aproximadamente 40 anos dirigiu-se à Farmácia Adriana reportando que a sua filha de 8 anos teria passado o dia anterior com náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia.

Questionei a senhora se a sua filha teria ingerido algum alimento possivelmente estragado ou certos alimentos como marisco ou carne crua ou a ingestão de água possivelmente contaminada, possíveis causadores de uma infeção no trato gastrointestinal ao qual a senhora afirmou que poderia ser o caso dado que tinha voltado de férias do estrangeiro há cerca de dois dias.

Tendo em conta que a possibilidade de se tratar de uma gastroenterite aconselhei a toma de Antimetil®, medicamento com ação antiemética à base de gengibre com a posologia de 1 comprimido 4 vezes ao dia com o objetivo de diminuir as náuseas e vômitos. Para tratamento da diarreia, sendo uma criança de 8 anos não é aconselhado a toma de agentes antidiarreicos e por isso aconselhei à toma de um probiótico e prebiótico como o Atyflor® para reestabelecer e regular a flora intestinal, 1 carteira por dia após uma refeição. A fim de reidratar a criança também aconselhei o Electrolit® para reestabelecer os níveis de água e sais minerais perdidos através do vômito e da diarreia com várias tomas de pequena quantidade ao longo dos dias seguintes. Normalmente este tratamento de suporte com repouso é suficiente, mas caso os sintomas perdurem aconselhei a deslocar-se a um médico.

Caso prático V

Um utente entrou na Farmácia queixando-se de tosse seca e irritativa. Inquiri o individuo sobre há quanto tempo persistia a tosse, a que respondeu durar há cerca de três dias com aumento da frequência e a intensidade nos períodos noturnos. De seguida questionei o utente se havia iniciado alguma medicação ou sofria de outros sintomas como febre ao qual negou ambas.

Assim, aconselhei o utente à toma de Bisoltussin®, indicado para o tratamento de tosse seca e irritativa por ser um xarope com ação antitússica. A posologia aconselhada foi 15ml a cada 8 horas e no caso de os sintomas persistirem ao fim de 5 dias de iniciar a toma aconselhei a consultar um médico.

Parte III

Monografia “Radicais livres e oxidantes no envelhecimento e em doenças neurodegenerativas: novos mecanismos moleculares e processos celulares.”

Abreviaturas

Alfa-sin- Alfa-sinucleína

APP- Proteína Precursora da Amiloide

CoQ- Coenzima Q

DA- Doença de Alzheimer

DAMP- “Danger-Associated Molecular Patterns”

DH- Doença de huntington

DP- Doença de Parkinson

ETC- Cadeia de transporte de eletrões

GSH- Glutathiona Peroxidase

HNE- Hidroxinonenal

IMM- Membrana mitocondrial interna MCU-

“Uniporte mitocondrial de calcium” mHtt-

Huntigtina mutante

MMP- Potencial da Membrana da Mitocôndria mPTP-

Poros mitocondrial de permeabilidade transitória

MtDNA- DNA mitocondrial

MtROS- ROS mitocondrial

NAD- Nicotinamida Adenina Dinucleotido

NFTs- Tranças Neurofibrilhares

NLR- “Nod-Like Protein”

OMM- Membrana mitocondrial externa

OXPPOS- Fosforilação oxidativa

PAMP- “Pathogen-Associated Molecular Patterns”

PARP- “Poly (ADP-ribose) polymerase”

RNS- Espécies reactivas de azoto

ROS- Espécies reactivas de oxigénio

SASP- “Senescence-associated secretory phenotype”

SNC- Sistema Nervoso Central

SOD- Superóxido Dismutase

TFAM- Fator de Transcrição Mitocondrial Codificado no Núcleo

TLR- “Toll-like Receptor”

TNF- “Tumor-Necrosis Factor”

TRE- Transporte Reverso de Eletrões

VDAC- Canais aniónicos dependentes de voltagem

Resumo

Os radicais livres e oxidantes foram descobertos no meio biológico há mais de 60 anos e desde então têm sido alvo de estudo ao longo de várias décadas, usados como base para várias teorias relativas ao envelhecimento celular devido ao elevado poder oxidativo resultando no fenómeno de *stress* oxidativo. A nível fisiológico tem um papel fundamental nas vias de sinalização para reparação de danos e como agonistas do sistema imunitário.

Para além da síntese enzimática por famílias de enzimas, nomeadamente as NADPH oxidases e as Óxido nítrico sintases, a sua formação é mais proeminente a nível da mitocôndria, sugerindo que este organelo está mais exposto ao *stress* oxidativo. Este conceito levou a que a disfunção mitocondrial mediada por radicais livres constituísse uma das primeiras teorias do envelhecimento. De facto, as alterações estruturais e funcionais pela oxidação através da ação de radicais livres estão presentes a diferentes níveis. Estas alterações a nível do DNA mitocondrial, homeostase do cálcio intracelular ou desequilíbrio do quociente $NAD^+/NADH$ têm implicações no bom funcionamento da mitocôndria e conseqüentemente, diminuição na formação de energia celular e ativação de mecanismos de envelhecimento e senescência.

A disfunção molecular e celular associada à presença de radicais livres e oxidantes em concentrações elevadas está implicada na etiologia de várias doenças neurodegenerativas associadas com o envelhecimento, nomeadamente a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson e a doença de Huntington tendo um possível papel causal bem como no seu desenvolvimento. De facto, o estado de inflamação crónica presente nestas patologias, a diminuição de sinapses e a morte neuronal parecem relacionar-se com a disfuncionalidade da mitocôndria dependente de radicais livres e oxidantes.

Uma vez que as doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento não têm ainda cura é pertinente explorar as novas descobertas relacionadas com a etiologia da doença. Nesta monografia discute-se esta problemática do ponto de vista da produção de radicais livres e oxidantes e da disfunção mitocondrial.

Palavras-Chave: Radicais Livres, envelhecimento e senescência celular, disfunção mitocondrial, inflamossoma.

Abstract

Free radicals and oxidants were discovered in the cells more than 60 years ago and have since been the subject of study for several decades, used as the basis for various theories relating ageing to their high oxidant capacity resulting in the phenomenon of oxidative stress. On a physiological level, they play a fundamental role in the signalling pathways for repairing damage and as agonists in the immune system.

In addition to their enzymatic synthesis by enzyme families, notably NADP oxidases and nitric oxide synthase, the most prominent subcellular site for their production is the mitochondria, an organelle that might be most exposed to oxidative stress. This concept led to the formulation of the mitochondrial free radical theory of aging. Indeed, the alterations caused by oxidation through free radicals are present at different levels, including mitochondrial DNA, intracellular calcium homeostasis or the imbalance in the NAD^+/NADH ratio and have implications for the proper functioning of mitochondria and, consequently, a decrease in on the formation of cellular energy and the activation of aging and senescence mechanisms.

The cell and molecular dysfunction associated with free radicals and oxidants has been implicated in the etiology of aging-linked neurodegenerative diseases, namely Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's, and may play a role in their onset and development. In fact, the state of chronic inflammation present in these pathologies, the reduction in synapses and the high level of neuronal death might be critically related with mitochondrial dysfunction motivated by free radicals.

Considering that the neurodegenerative diseases associated with aging have yet to be cured, it is highly pertinent to explore novel scientific developments related with the onset and developments of these diseases. In this work, I'll discuss this theme in connection free radicals and mitochondrial dysfunction.

Keywords: Free Radicals, aging and cellular senescence, mitochondrial dysfunction, inflamosome.

I. Introdução

Ao longo de décadas tem se estudado os Radicais Livres e qual o seu papel nos mecanismos fisiológicos do corpo humano. A sua implicação no envelhecimento celular e as descobertas de vias de sinalização através destes compostos mudaram a perspectiva sobre estas moléculas. Nesta monografia irei focar a sua produção na mitocôndria e por quais meios danificam estruturas e mecanismos celulares. A partir destas alterações irei abordar como induzem certos sintomas característicos das doenças neurodegenerativas mais proeminentes como o estado de neuroinflamação constante, morte celular e disfunção sináptica na Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson e na Doença de Huntington. Esta monografia foi escrita tendo em conta que nem sempre estão completamente elucidados os mecanismos e que muitas vezes a opinião científica não é consensual em todos os mecanismos abordados. Ainda, nem todos os mecanismos presentes nestes sintomas neurodegenerativos estão presentes, apresento vários processos fisiológicos relevantes para o aparecimento e desenvolvimento da senescência celular e doenças associadas à degeneração do cérebro como a ativação do inflamossoma “*Nod-Like Receptor Protein 3*” (NLRP3) ou mecanismos que alteram o bom funcionamento sináptico.

2. Conceitos gerais sobre radicais livres

Os radicais livres são moléculas reativas e instáveis que contêm um ou mais elétrons desemparelhados na sua orbital externa. Existem espécies reativas de oxigénio chamadas de

ROS, como por exemplo o radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) e o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ou o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), embora este último oxidante não seja um radical livre inclui-se na mesma família, como também existem espécies reativas de azoto como óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$).

Estas moléculas são produzidas em circunstâncias normais não apenas durante processos metabólicos através da atividade enzimática como as NADPH oxidases (que produzem radical superóxido ou peróxido de hidrogénio) e as óxido nítrico sintases (NOS) como também de modo fortuito durante a respiração aeróbia. O local onde a sua formação fortuita é mais proeminente é na mitocôndria, na cadeia de transporte de elétrons (ETC). No entanto, vários fatores podem impulsionar a sua produção como poluentes, stress, hábitos de vida pouco saudáveis ou radiação ¹.

Durante décadas pensava-se que os radicais livres e oxidantes constituíam apenas meras moléculas tóxicas sem qualquer propósito a nível fisiológico. Apenas causavam danos a estruturas celulares oxidando outras moléculas e causando disfuncionalidade a nível celular.

Hoje, sabemos que os organismos vivos produzem radicais através de síntese enzimática, participando na regulação das funções celulares, tal como sabem que a durante a Evolução se desenvolveram mecanismos para contrariar o excesso destas espécies reativas no meio biológico, podendo, portanto, desencadear processo tóxicos. Isto é, surgiram mecanismos antioxidantes para atenuar o excesso da concentração tóxica de radicais e oxidantes – o designado stress oxidativo. Exemplos destes mecanismos envolvem enzimas como glutathione peroxidase (GSH), que reduz o peróxido de hidrogénio e peróxidos lipídicos (a água e álcoois, respetivamente) e a superóxido dismutase (SOD) que remove o radical superóxido. Isto é, em elevada concentração os radicais livres podem causar danos a lípidos, proteínas e ácidos nucleicos (*stress oxidativo*), mas em baixas concentrações são essenciais para a sinalização celular e defesa imunológica.^{1,2}

O stress oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade do sistema antioxidante de neutralizá-los. Os radicais livres podem reagir com lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, causando danos oxidativos às células.³ Isso leva à disfunção celular, alterações estruturais, inflamação e morte celular, contribuindo para o processo de envelhecimento. O cérebro é um órgão com elevada exigência energética sendo por isso bastante sensível não só à falta de ATP como ao *stress oxidativo*.⁴

Estas espécies tem a capacidade de causar danos em inúmeras estruturas celulares e têm sido implicadas na etiologia das doenças neurodegenerativas. As alterações causadas por este fenómeno podem variar desde dano a nível estrutural, por exemplo da membrana lipídica da mitocôndria, ou desequilíbrio na homeostase do cálcio. Os mecanismos nos quais estão envolvidos não estão por vezes completamente elucidados, porém, existe uma forte ligação entre o aumento de ROS e RNS com o aparecimento e desenvolvimento destas doenças. O *stress oxidativo* parece contribuir para a neuroinflamação, comum nestes casos, na disfunção mitocondrial e disfunção sináptica.

3. Radicais livres e oxidantes na mitocôndria

A mitocôndria possui um papel importante na homeostase de uma célula, mas com o avançar da idade esta sofre diversas alterações e à luz do conhecimento atual sabe-se que a sua função vai decrescendo com o aumento da idade.¹ Sendo a mitocôndria o local onde ocorre a respiração aeróbia é de esperar que seja aqui onde se forme a maioria dos radicais livres e consequentemente haja a probabilidade destes organelos serem sujeitos a disfunção dependente de *stress oxidativo*.⁵ Na generalidade destes casos, tem sido descrito um aumento na produção de radicais livres, despolarização do potencial de membrana da mitocôndria e diminuição da produção de ATP. Por exemplo, a diminuição da atividade do complexo I ou

de determinadas enzimas específicas a este organelo encontram-se reduzidas ao longo do tempo vida.⁶

Existem vários locais onde as ROS podem ser produzidas *in vitro*, mas apenas 3 deles demonstraram serem relevantes na produção *in vivo*. Este são: complexo respiratório I, o complexo 2 e o complexo 3. Por outro lado, o complexo 4 que reduz o oxigénio a água não gera ROS.

A topologia de formação das ROS no complexo I e 3 são também diferentes entre eles mesmo. O complexo I produz estas espécies diretamente para a matriz da mitocôndria enquanto o complexo 3 divide a produção entre a matriz e o espaço intermembranar.^{7,9} As ROS criadas por estes complexos têm efeitos à jusante diferentes. As espécies oxidativas do Complexo 3 são um requerimento para ativar a resposta à hipoxia e à diferenciação celular, por outro lado as do complexo I são necessárias à organização da ETC e sensibilidade ao oxigénio pelas células. O complexo I pode também gerar ROS nos dois sentidos, criando assim o transporte reverso de eletrões (TRE) que ocorre quando a *CoQ pool* está reduzida e a forma reduzida transfere eletrões de volta para o Complexo I. Este mecanismo tem como papel a comunicação entre a mitocôndria e a célula trocando informação sobre a quantidade de ATP sintetizado.

Em suma, é na ETC onde existe o maior risco da formação destas espécies, especialmente nos complexos I e III. O complexo III tem especial implicação na produção e libertação do superóxido ($O_2^{\bullet-}$) tanto na matriz mitocondrial como no espaço intermembranar.^{7,8}

Um aspeto a ter em conta é que a mitocôndria é, simultaneamente, fonte e alvo de ROS e RNS. De facto, as membranas da mitocôndria são constituídas por ácidos gordos extremamente suscetíveis a oxidação através da peroxidação destes lípidos ocorrendo a produção de espécies altamente reativas de aldeídos como o hidroxinonal (HNE). Assim, não é surpreendente que esteja exposta a *stress* oxidativo ao longo da sua vida e que este dano, apesar de haver mecanismos antioxidantes, vá acumulando. As proteínas e lípidos da membrana interna são sujeitas a este dano em grande quantidade afetando diretamente ou indiretamente a sua funcionalidade através da despolarização da membrana.

A principal característica de disfunção mitocondrial é a diminuição da capacidade respiratória deste organelo juntamente com a diminuição do potencial de membrana (MMP). Um reduzido MMP é, normalmente, associado a um aumento na produção de ROS. Em casos de redução transitória, a diminuição de MMP leva a ETC a ficar num estado de oxidação e assim diminui a produção de ROS, porém, no caso de esta redução de MMP se manter teremos disfunção a nível da cadeia de transporte de eletrões. A redução de MMP também pode estar associada à fuga de eletrões.^{6,8}

Um dos alvos primários do *stress* oxidativo mitocondrial é o DNA mitocondrial (mtDNA) que pode sofrer danos e modificações via reações com radicais livres. O mtDNA também está mais exposto aos radicais livres, o que aumenta a probabilidade de ser mutado levando a um ciclo onde os radicais oxidantes causam dano ao mtDNA e a sua alteração tem como consequência o aumento da produção destes mesmos radicais. Além de estar mais perto do principal local de produção de radicais livres também está menos protegido. Ao contrário do DNA nuclear, não está protegido por histonas.^{2,3} Pode, portanto, especular-se que sendo tanto o complexo I como o complexo III codificados em parte pelo mtDNA, ao passo que o complexo II é totalmente codificado por DNA nuclear, estas adulterações no mtDNA tenham consequências funcionais destes complexos e consequente perda da sua função, resultando na alteração da homeostase da mitocôndria.⁹

4. Radicais livres, envelhecimento e senescência celular – impacto na neurodegenerescência

Durante o envelhecimento celular há alterações no DNA, disfunção nos mecanismos de autofagia, desregulação da sinalização de nutrientes, alterações epigenéticas e ativação de inúmeros fatores pró-inflamatórios relacionados com a senescência, chamados de “*Senescence associated secretory phenotype*” (SASP). Associado ao envelhecimento está também o fenômeno da senescência celular. Em células senescentes há normalmente um aumento do tamanho celular e paragem do ciclo celular associado e libertação de fatores reconhecidos como SASP.¹⁰ Dado o tema abordado por esta monografia, haverá um maior foco na senescência celular relacionada com a disfunção da mitocôndria e os danos causados pela sua disfunção como pelas ROS.

A esperança média de vida continua a aumentar de forma geral em todo o mundo. Por isso, a questão do envelhecimento tem ganho um foco cada vez maior, mas o aumento da longevidade populacional também significa maior probabilidade de contrair doenças neurodegenerativas. O envelhecimento é um processo natural e inevitável. Assim, as doenças relacionadas com a senescência tem ganho maior peso na pesquisa científica. Pensa-se que fatores genéticos, ambientais e estilo de vida desempenhem papéis cruciais no desenvolvimento e progressão dessas condições. Mas, apesar da extensa pesquisa científica, ainda existem várias lacunas no conhecimento sobre a senescência e destas doenças.⁹

Com o avançar da idade ocorrem alterações a nível cerebral, afetando a sua estrutura e funcionalidade. O cérebro é bastante suscetível ao *stress* oxidativo devido a sua exigência de energia ser elevada. Além disso, a elevada quantidade de lipídios poliinsaturados associada à baixa capacidade antioxidante potenciam os danos oxidativos neste órgão. As características

comuns são atrofia cerebral, agregação de proteínas, inflamação crônica de baixo grau, disfunção mitocondrial e perda de sinapses. As doenças neurodegenerativas são associadas a perda progressiva de funções com resultado o declínio cognitivo e de memória como perda de função motora. Neste contexto, as doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer, a Doença de Parkinson e a Doença de Huntington serão, por regra, dadas como exemplos nesta monografia.¹⁷

4.1. Envelhecimento celular e danos no DNA

A senescência celular associada ao envelhecimento e relacionada com o *stress* oxidativo tem como alvo o DNA. Os radicais livres têm a capacidade de alterar as cadeias seja por quebra de ligações ou modificações químicas. Além disso, podem comprometer a funcionalidade das proteínas envolvidas na reparação do DNA levando à acumulação de alterações ao longo do tempo, tendo como consequência a perda de funções celulares. Aumentando a instabilidade genômica e falhas na sua replicação. Ultimamente, contribuindo para o envelhecimento.⁹

4.2. Mecanismos de disfunção mitocondrial associada ao envelhecimento

A mitocôndria é o organelo no centro da teoria de envelhecimento baseada no dano oxidativo, isto pois, é na mitocôndria onde se forma a maior das ROS, RNS como também outros compostos com poder oxidativo e onde se consome a grande maioria do oxigênio da célula. A disfunção mitocondrial (Figura 1) é, pois, um tema central nos mecanismos do envelhecimento associado à produção de ROS e RNS.¹²

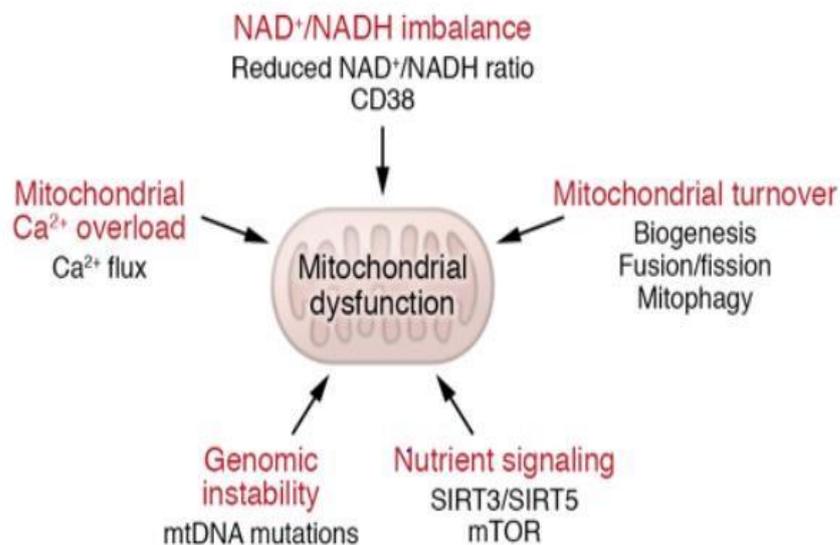


Figura 1. Mecanismo de senescência mitocondrial (Adaptado de Miwa,2022).⁹

4.2.1. Instabilidade genómica

O DNA mitocondrial está exposto a um maior dano oxidativo pelo facto de estar mais perto do local da sua produção. Além de estar mais exposto também possui menores defesas comparativamente ao DNA nuclear, a falta de histonas. Apesar de ser algo controverso, os danos causados ao mtDNA podem estar mais relacionados com a diminuição na síntese de proteínas mitocondriais, particularmente na DA e PD.¹¹

O dano ao mtDNA e aos seus mecanismos de reparação tem impacto direto na sua função e está presente em doenças relacionadas com a funcionalidade da mitocôndria. Uma enzima alvo de alterações é a mtDNA polimerase, enzima esta necessária para a replicação de DNA e quando alterada implica um maior grau de disfuncionalidade e foi correlacionada com a evolução de senescência celular prematura.¹⁰

A PGC-1 alfa é um importante cofator na biogénese e regulação da resposta ao *stress* oxidativo. Sendo que a mitocôndria está presente na síntese de nucleótidos a sua disfuncionalidade pode afetar as quantidades de nucleótidos disponíveis para manter a estabilidade genómica. Esta relação encontra-se aumentada devido ao “*loop*” criado entre os mecanismos. Ainda sem elucidação total dos mecanismos, a inibição deste cofator parece estar presente no desenvolvimento de doenças como HD e PK.¹⁷

4.2.2. Excesso de Cálcio

A mitocôndria tem um papel fundamental na homeostase do Ca^{2+} intracelular. É regulada através de canais tanto na membrana interna como a membrana externa –IMM e OMM. Em casos de aumento citosólico de Ca^{2+} a mitocôndria abre os canais de influxo, os canais aniónicos dependentes da voltagem (VDACs), o componente externo do canal mPTP, e “*Mitochondrial calcium uniporter*” (MCU) nas membranas OOM e IMM respetivamente, de forma que não haja excesso de Ca^{2+} no citosol. Porém, pode causar o excesso na mitocôndria induzindo ao aumento de ROS e disfunção mitocondrial.¹²

O aumento de cálcio induz a dissociação do citocromo C da IMM levando à sua libertação para o citoplasma onde pode induzir a morte celular programada.^{13,14} A libertação do citocromo c através do mPTP ocorre em casos onde a despolarização prolongada da IMM leva a uma permeabilização da OMM e inicia uma cascata que leva a apoptose celular mediada pela caspase-3.^{15,16}

4.2.3. Desequilíbrio na relação NAD^+/NADH

Uma manutenção normal da atividade mitocondrial depende do quociente NAD^+/NADH e uma *pool* de NAD^+ estável. A produção de ATP e manutenção da MMP requerem a presença

do NAD^+ como cofator. A origem do NAD^+ pode ser através da metabolização do NADH no complexo I da cadeia respiratória ou através de outros mecanismos. A sua biogênese também é dependente de estímulos nutricionais e ambientais.

A depleção do NAD^+ está relacionada com morte celular através do mecanismo de ativação da “Poly (ADP-ribose) polymerase I” (PARP1). As PARPs estão envolvidas no mecanismo de síntese do NAD^+ e no caso de haver acumulação de dano no DNA haverá ativação da PARP1, servindo de intermediário na resposta ao dano causado ao DNA e, consumo do NAD^+ levando a uma diminuição da *pool* de NAD^+ , aumentando o desequilíbrio do rácio NAD^+/NADH e alteração no potencial de membrana através da sua despolarização como alteração na sua permeabilidade. Assim, alteração deste equilíbrio e diminuição da *pool* de NAD^+ tem implicação na funcionalidade e mecanismos de reparação da mitocôndria, sendo em parte responsável pela senescência presente neste organelo.⁹

A diminuição na capacidade respiratória e conseqüente diminuição na formação de energia celular como também uma diminuição MMP pode implicar uma maior oxidação da cadeia de transporte de eletrões, se este fenómeno ocorrer de forma regular pode indicar por si uma disfunção na própria ETC.

Uma característica do envelhecimento celular é redução no quociente de NAD^+/NADH . O aumento deste composto incorre no aumento da libertação de SASP. A diminuição da atividade deste complexo pode ser justificada pela oxidação da ETC sendo este o complexo que aparece mais afetado pelo envelhecimento no cérebro.

Embora uma função primordial da mitocôndria seja a produção de ATP, porém, nem sempre é possível seguir o mesmo mecanismo para esta produção pois depende de fatores externos ao organelo. Um bom marcador de disfunção é a habilidade de manter o MMP independentemente dos diferentes estímulos e situações em que se encontra. O potencial de membrana é dependente da libertação de protões através da ETC e criação de um gradiente eletroquímico. Este gradiente é essencial para a síntese de ATP através da ATP *sintetase* e ADP em níveis saudáveis. Querendo dizer que, com a fuga de eletrões deste espaço não teremos o gradiente eletroquímico necessário para manter uma estável produção de ATP.¹⁰

Os compartimentos citoplasmático e mitocondrial compartilham o NAD^+ e NADH , querendo dizer que quando um está afetado o outro também vai sofrer o impacto de qualquer alteração. Uma célula com reduzido rácio apresenta uma elevada quantidade de ADP comparativamente ao ATP e maior AMP relativo ao ATP, pois sem NAD^+ estes mecanismos não se sucedem, no caso de um aumento do rácio AMP/ATP haverá uma maior ativação da AMPK que induz senescência através da ativação/fosforilação da p53.¹⁸

Estranhamente, esta senescência tem como características uma falta de resposta pró-inflamatória normalmente presente em formação da ativação de NF- κ B e ativação das interleucinas 1,6 e 8, a SASP presente tem uma maior quantidade de IL-10 e “*Tumor-Necrosis Factor*” (TNF- α).¹⁰

4.2.4. Estímulos externos

O estado da mitocôndria é dinâmico, as alterações no seu estado são consequência de fatores externos como nutrientes ou necessidade energética. Quando existe um aumento de nutrientes e glucose existe um aumento de insulina levando à ativação do mecanismo mTOR e consequente indução de processo de anabolismo, neste estado a autofagia é inibida. Por outro lado, na situação oposta, onde há diminuição da quantidade de nutrientes há ativação da AMPK. Esta ativação leva à indução da SIRT1 através do aumento do rácio intracelular de NAD⁺/NADH. A família das proteínas SIRTUINS estão presentes na regulação de metabolismo da mitocôndria. Neste estado há aumento da biogénese e da autofagia.¹⁰

A família das SIRTUINS é essencial pelo seu controlo do metabolismo, sendo deacetilases dependentes de NAD⁺ tem uma função de sensores metabólicos. Perda da função desta família está relacionada com doenças neurodegenerativas. Depleção da SIRT3 induz o SASP e consequente inflamação além de diminuir a resposta mitocondrial e atividade funcional.

Sabendo que existe uma relação entre a mitofagia e a acumulação de danos mitocondriais, nas situações em que, por exemplo, há um aumento da expressão do mTORC1 teremos uma redução da mitofagia e consequente acumular de danos.¹⁰

4.2.5. Alteração do número e fenótipo mitocondrial

A continuidade da homeostase depende de mecanismos como biogénese e mitofagia. A família de PPAR-gama (PGC-1- α , beta e PGC-1-cofator) são os principais fatores necessários à correta biogénese mitocondrial pois ativam a transcrição de fatores Nrf1/2 e ERR- α que posteriormente controlam a transcrição do fator de transcrição mitocondrial codificado no núcleo (TFAM) em resposta ao aumento das biogénese deste organelo. A relação com o fenótipo de senescência celular está no aumento da massa da mitocôndria pois nestas situações o cofator PGC-1 α e Nrf1 e Nrf2 estão aumentados e associados à disfuncionalidade, ultimamente, existe correlação entre a da acumulação de disfunção mitocondrial e aumento do seu volume e massa.¹⁷

Outro mecanismo envolvido no aumento do volume é o mecanismo relacionado com a proteína PINK1/*parkin*, induzido por *stress* no mecanismo de mitofagia, porém, uma correlação entre a nitrosilação deste proteína e uma diminuição da fissura da mitocôndria tem parecido

cada vez mais relevante nas alterações deste mecanismo. Alterações nos mecanismos de autofagia mitocondrial podem estar relacionados com senescência prematura.¹⁷

As dinâmicas da mitocôndria como alterações de morfologia em função dos mecanismos de fissão e fusão regulam a sua integridade a nível de número, forma e distribuição, bem como as respostas das mitocôndrias aos estímulos de outros locais subcelulares. Aquando da fusão, há troca de mtDNA danificado por mtDNA em bom estado e serve de mecanismo de manutenção para a saúde do organelo. Alterações neste mecanismo estão relacionadas com senescência celular, aumento do dano causado por espécies oxidativas e consequente redução recetores essenciais, culminando na formação de mitocôndrias de volume anormalmente elevado e sua consequente disfunção.¹⁰

4.2.6. Sistema imunitário inato

Ao longo da transformação da mitocôndria são libertadas as chamadas “*Danger-Associated Molecular Patterns*” (DAMPs) (Figura 2). Estas moléculas são reconhecidas pelo sistema imunitário e promovem um ambiente inflamatório através da sua internalização em células da microglia e ativação de sistemas pró-inflamatórios. Existem várias moléculas dentro deste grupo, mas as mais relevantes para esta monografia são as ROS, mtDNA e o SASP. Uma das respostas inflamatórias mais proeminentes é através do inflamossoma NLRP3. No caso da Doença de Alzheimer (DA), o peptídeo beta-amilóide também tem capacidade de ativar este complexo. A continua libertação destes compostos leva ao reduzido, mas continuo estado de neuroinflamação, nocivo para os neurónios, resultando em apoptose.^{18,19}

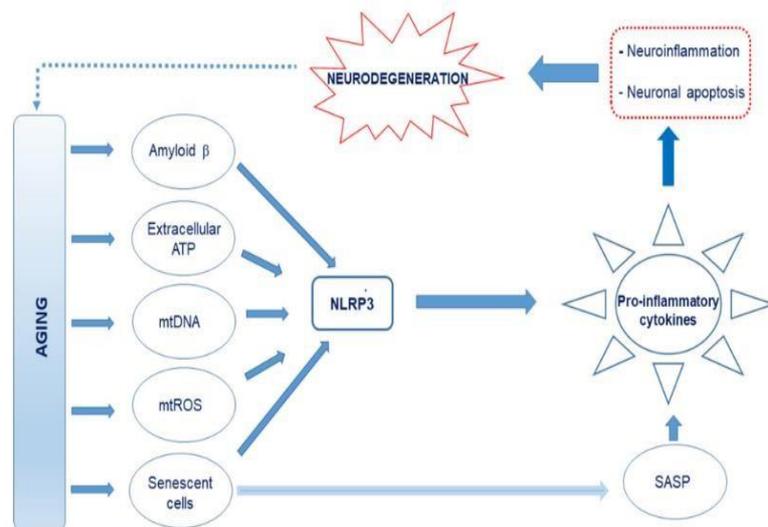


Figura 2. Esquema representativo de fatores com capacidade de ativação do sistema inflamatório NLRP3 (Adaptado de Heneka,2015)⁴⁵

4.2.7. Permeabilização da membrana mitocondrial

O mega canal mPTP é essencial na manutenção do potencial de membrana. Porém, a desregulação deste canal pode acontecer devido a *stress oxidativo*, *Ca²⁺ overload* ou

despolarização da membrana interna da mitocôndria, como já visto, tudo isto são fatores presentes numa célula senescente. A criação de um *loop* é possível pois, devido à sua abertura há perda de potencial de membrana consequente aumento de ROS e redução da capacidade tampão de Ca^{2+} . Ainda, parece que com a idade a quantidade de Ca^{2+} necessário para abertura do canal mPTP diminui, podendo levar a uma maior desregulação.²⁰

Estudos apontam para que se esta abertura é transitória e rara pode ter alguns benefícios, no entanto, no caso de ser frequente e duradoura pode trazer efeitos negativos à homeostase do Ca^{2+} .¹⁰

Além disso, a proteína VDAC1 quando nitrada na DA parece levar a uma despolarização da mitocôndria, o que pode contribuir não só para alteração da transmissão sináptica como a plasticidade.¹⁵

No caso da DP, a agregação da alfa-sinucleína (Alfa-sin) parece conseguir ligar-se a outro componente do mPTP e a ATPsintetase presente na IMM. Esta ligação resulta na oxidação da sua subunidade beta comprometendo o seu papel.^{21,22}

4.3. Doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento, senescência e radicais livres

Dentro do Sistema Nervoso Central (SNC) existe um tipo de células especiais que fazem parte do sistema imunitário, a microglia. O objetivo destas células consiste em suportar os neurónios através da inspeção das sinapses entre neurónios, manter um ambiente prospero e saudável. Em casos de disfunção da barreira hematocefálica, com possível infeção ou lesão neuronal, é a microglia que responde por ação da produção de fatores pro-inflamatórios. O arsenal da microglia também inclui mediadores pro-inflamatórios como IL-1, TNF-alfa e IL-6. Em doenças neurodegenerativas como DA, a microglia reage a padrões moleculares associados a patógenos, os “*Pathogen-Associated Molecular Patterns*” (PAMPs), ou padrões moleculares associados a perigo, DAMPs. Estes padrões estão associados à ativação do fenótipo M1, levando a uma inflamação exacerbada. Este mecanismo irá ser abordado a jusante.

11,17

4.3.1. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) foi primeiro documentada em 1906 por Alois Alzheimer através da observação de um paciente com perda progressiva de funções cognitivas. Após a morte deste doente o seu cérebro foi analisado e foi descrito a fisiopatologia da doença. Um número

elevado de pequenas placas na região do córtex cerebral de chamadas de placas senis, constituídas por agregados do peptídeo beta-amilóide além de tranças neurofibrilares (NFTs) formadas por agregados de proteína tau hiperfosforilada.²⁴

Estas duas características observados por Alois Alzheimer são, ainda hoje, considerados as principais lesões fisiopatológicas da doença, sendo a deposição da proteína tau e do peptídeo beta-amilóide as explicações mais aceites. As explicações para o desenvolvimento destes fenómenos são várias, mas existem algumas mais relevantes que outras.

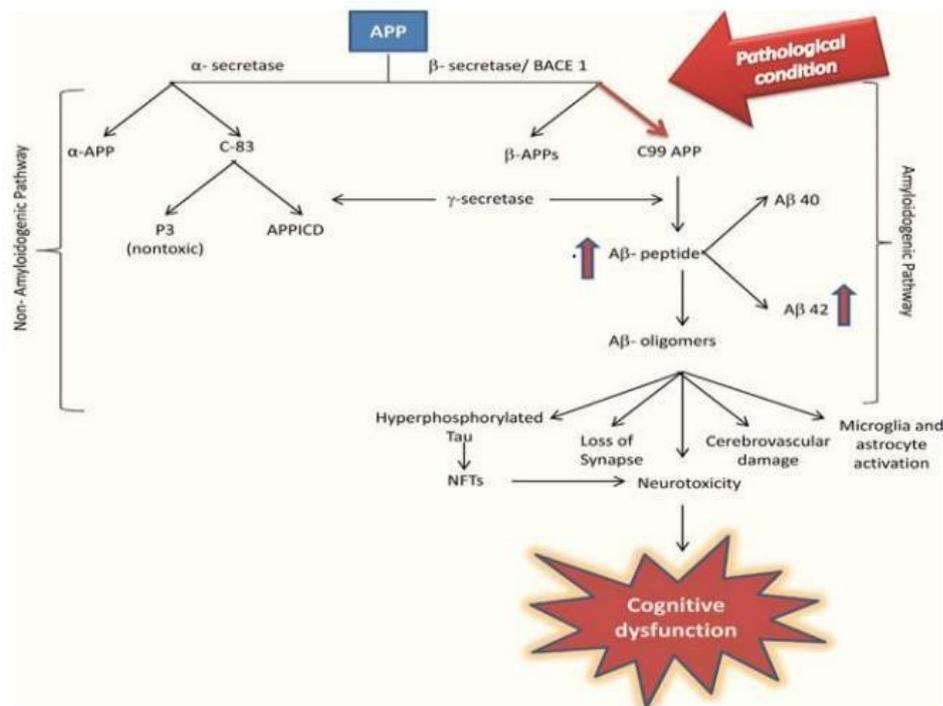


Figura 3. Esquema representativo dos mecanismos de formação do peptídeo beta-amilóide (Adaptado Kumar,2015)²³

A proteína que origina a beta-amilóide é a proteína precursora da amiloide (APP) sintetizada do reticulo endoplasmático. A APP pode ser alvo de clivagem por duas secretases. No caso de ser clivado pela alfa-secretase, a APP é sujeita a proteólise por esta enzima, resultando deste processo a molécula solúvel de nome sAPP-alfa, caracterizada como não-amiloidogénica. A sAPP-alfa tem papeis importante em diferentes fatores para a saúde do cérebro, como a plasticidade neuronal e proteção contra toxinas, e também regula a proliferação das células estaminais, sendo por isso caracterizada com propriedades neuroprotetoras.

No caso de sofrer clivagem pela beta-secretase/BACE I, a APP vai gerar peptídeos beta-amilóide 40 e 42, com composição de 40 e 42 aminoácidos respetivamente. Estes peptídeos formam oligómeros e fibrilhas devido à sua tendência para agregarem-se e por serem insolúveis. Desta agregação formam-se as placas senis (figura 3).

BACE-I aumenta com a idade e é elevada nos cérebros de doentes com DA. O aumento desta expressão pode ser explicado por vários mecanismos como a deficiência no tráfico axonal, stress oxidativo, hipoxia e isquemia resultando na privação de energia, foram também apontados como razões para o aumento da expressão celular da BACEI.^{23,24}

Na doença de Alzheimer é característico observar danos por stress oxidativo, segundo a primeira formulação da hipótese da mitocôndria o stress oxidativo é gerado pela presença de beta-amilose intramitocondrial alterando a função da cadeia de eletrões. A primeira hipótese afirmava que a acumulação continua e gradual do dano oxidativo em vários compostos como DNA, lípidos, RNA e proteínas originava a patologia conhecida com AD. Recentemente, uma segunda hipótese foi avançada, considerando que a disfuncionalidade da mitocôndria origina stress oxidativo, mas de forma independente do beta-amilase intramitocondrial.²⁵ O peptídeo beta-amilóide é reconhecida por ser a causa de induzir stress oxidativo e neuroinflamação através da sua deposição no cérebro, levando à ativação da microglia.²⁶ Um dos mecanismos de ativação da microglia e indução de neuroinflamação, o NLRP3, irá ser abordado a jusante.

No caso de DA, o hipocampo é das primeiras áreas do cérebro a sofrer alterações, afetando assim a memória e, presumivelmente, um alvo para as ROS e RNS. Assim, foi detetado um número elevado de proteínas nitradas nos casos desta patologia resultante do ataque de RNS a proteínas. Cérebros de pacientes diagnosticados com DA apresentam um consumo reduzido de glucose e uma menor produção de energia.⁷⁵ Dado que algumas das proteínas essenciais a estas vias estão nitradas e assim alteradas é de prever que haja uma diminuição destas vias. Proteínas como alfa enolase, catalisadora da conversão de 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato que posteriormente dá origem ao piruvato, e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, enzima que catalisa a conversão da gliceraldeído-3-fosfato em 1,3fosfoglicerato, foram identificadas como altamente nitradas servindo assim de possível correlação para as alterações de metabolismo da glucose no cérebro destes pacientes, pois se sofrerem alterações na sua estrutura a sua atividade também sofrerá alterações.¹⁵

Para além de proteínas nitradas, um outro biomarcador de stress oxidativo é a peroxidação lipídica, ocorre uma interação entre ROS e ácidos gordos polinsaturados e assim há a criação de aldeídos reativos como HNE, conseqüentemente alterar a sua estrutura e de outros componentes da como proteínas.²¹

4.3.2. Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (PD) é a segunda doença neurodegenerativa mais proeminente, estando em primeiro a DA. Por base, nesta doença há perda de neurónios dopaminérgicos, em especial na substância nigra.^{29,30} Um dos mecanismos fisiopatológicos desta doença é a

agregação da alfa-sin. Este agregado incorre em alterações a nível da mitocôndria, *stress* oxidativo e indução de neuroinflamação. Ainda, a alfa-sin, quando expressa em altas quantidades, parece aumentar a produção de ROS.^{27,28}

O *stress* oxidativo parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento desta doença, potenciando não só a agregação da alfa-sin e da “parkin” como também a disfunção do proteossoma, privando a célula de um processo essencial à homeostase das proteínas. Nos doentes de PD as alterações mais comuns na mitocôndria são ao nível do complexo I, alterações na ETC são a causa de falhas na redução do oxigénio a água gerando espécies reativas como o radical superóxido.³³ Esta alteração é considerada a maior causa de formação de ROS em modelos de PD contribuindo para o *stress* oxidativo.²²

A deleção de mtDNA é também considerada uma das principais razões para o desenvolvimento de processos de envelhecimento e senescência como de doenças neurodegenerativas. Nos modelos de PD comparados ao controlo, o nível de deleções está aumentado e a disfunção de mtDNA é apontada como uma das causas de perda de neurónios em cérebros envelhecidos e com PD.^{29,30} A deleção de mtDNA está associada com as alterações no complexo IV, onde a alteração à fosforilação oxidativa (OXPHOS) e libertação do citocromo C contribuem para o declínio da função mitocondrial. À parte do complexo II, os restantes complexos têm componentes resultantes da transcrição do mtDNA. Assim, se o *stress* oxidativo causa danos ao mtDNA e estas alterações levam à formação de componentes aberrantes na ETC, será de esperar que com a progressão da idade este mecanismo fique mais presente e haja aceleração do processo de desenvolvimento de PD.^{31,32}

Além da relação com alterações mitocondriais, a alfa-sin também parece ter um papel na modulação sináptica.³⁴ A agregação desta proteína parece afetar os neurotransmissores dopaminérgicos.^{35,36}

4.3.3. Doença de Huntington

A Síndrome de Huntington, é uma doença genética que afeta o sistema nervoso central de forma progressiva. Esta condição é caracterizada por uma combinação complexa de sintomas motores, cognitivos e psiquiátricos, que geralmente se agravam com o tempo.³⁷

A causa da síndrome de Huntington é uma mutação no gene HTT, localizado no cromossoma 4. Essa mutação leva à produção incomum de uma proteína denominada de huntingtina que,

formando agregados em neurónios, afeta a função celular. A doença tem sido muito estudada nas últimas décadas e é notório que o fenótipo característico é a neuroinflamação com origem na disfunção da microglia.³⁷

A proteína huntingtina mutada induz a expressão dos genes para citocinas pró-inflamatórias causando uma resposta exacerbada por parte da microglia. Estes mecanismos inerentes ao processo da inflamação estão correlacionados com a ativação dos "Nod-Like Receptors" (NLRs) e os "TollLike Receptors" (TLRs). No caso do mecanismo dos NLRs, como já foi mencionado acima, origina uma resposta inflamatória. No caso dos TLRs, a sua ativação induz a ativação de NF-kB que, por sua vez, regula não só a atividade de NLRs como a expressão de interleucinas como a IL-1beta, IL-6 e IL-8 e o TNF-alfa.^{38,39,40,41}

Ainda, a huntingtina mutante (mHtt) causa alterações na capacidade de manter uma correta homeostase de Ca^{2+} a nível da mitocôndria em células da microglia. O aumento de Ca^{2+} pode levar à síntese de óxido nítrico, ROS e citocinas induzindo uma alteração fenotípica dos astrócitos (macroglia) e da microglia, estabelecendo as condições um estado de neuroinflamação. O dano causado por este ambiente nocivo leva a libertação de DAMPs.⁴³

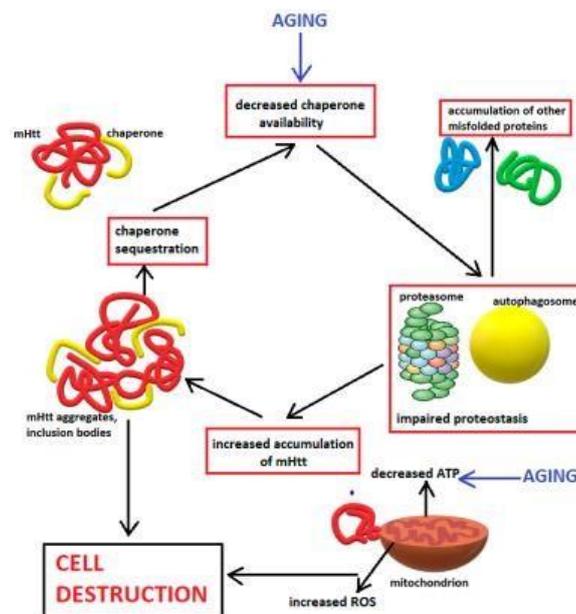


Figura 4. Esquema representativo do mecanismo de ação da proteína huntingtina (Adaptado de Jurcau, 2022)¹⁹

De modo geral, nas doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento ocorrem alterações a nível da proteostase nomeadamente diminuição da expressão de chaperonas. Com a diminuição destas proteínas existe por um lado uma menor capacidade celular de enovelamento de proteínas na sua estrutura nativa funcional e, por outro, os mecanismos de remoção de proteínas desnaturadas/agregadas dependentes de chaperonas estão comprometidos. Portanto, a falha na proteostase tem consequências óbvias na morte celular

associada às doenças neurodegenerativas. Agravando estes processos, o envelhecimento também leva a uma diminuição do ATP que por si também afeta o sistema da proteostase.^{19,22}

A própria mHtt parece afetar a mitocôndria via diversos mecanismos, alterando a sua funcionalidade e aumentando a produção de ROS. Este aumento, causa inúmeros danos como já visto. A figura 4 exemplifica o “loop” de “feedback-positivo” pois a acumulação desta proteína, limita a quantidade de chaperonas disponíveis e maior será o dano à mitocôndria, com fluxos aumentados de ROS que, por sua vez, induzem danos celulares e morte celular.⁴⁴

4.4. Senescência e neuroinflamação

4.4.1. Disfunção da autofagia

Neste contexto, é relevante considerar que a autofagia existe como mecanismo de limpeza, onde as células degradam proteínas agregadas ou organelos inteiros que sejam reconhecidos como danificados, em que para o caso da mitocôndria chama-se mitofagia.^{45,48} A disfunção deste processo contribui para a ocorrência dos designados “*Damage-associated molecular patterns*” (DAMPs), os quais incluem, o mtDNA danificado, ROS e o peptídeo beta-amilóide os quais podem iniciar a resposta imunológica através da inflamação. A resposta inflamatória é mediada por citocinas como IL-6, TNF-alfa através do recetor TL9 e pela IL-1 beta e IL-18 com ativação do recetor NLRP3.^{46,47}

Como visto anteriormente, a quantidade de DAMPs está relacionada com vários mecanismos e disfuncionalidades. A maior e prolongada formação de DAMPs leva a uma ativação de um ambiente inflamatório através do inflamossoma NLRP3.⁴⁹ Em modelos celulares e de animais com DA, na microglia está presente o aumento da fragmentação da mitocôndria e está associado ao aumento de citocinas pro-inflamatórias e neurotoxicidade. Estas alterações propagam-se para astrócitos e neurónios.⁴²

Em suma, as mitocôndrias danificadas e disfuncionais, não sendo removidas por mitofagia, prevenindo, assim, a hiperinflamação por ativação crónica do inflamossoma NLRP3, induzem um aumento no mecanismo de inflamação.⁵⁰

4.4.2. Disfunção mitocondrial e sistema imunológico

A microglia consome uma grande quantidade de energia. Mas, com a avanço da idade ou o desenvolvimento da neurodegenerescência, aumenta a disfunção mitocondrial e o declínio da OXPHOS juntamente com a diminuição do turnover do organelo. Em casos da diminuição da OXPHOS há normalmente um aumento de glicólise associado e conseqüente aumento na expressão de enzimas glicolíticas. Nos casos de DA é especialmente preocupante pois, a presença do peptídeo beta-amilóide e da tau leva ao aparecimento do fenótipo proinflamatório

destas células. Estas mudanças levam a que haja uma alteração no perfil metabólico para um ainda maior foco na glicólise.^{51,74} Este aumento em células da microglia é um fenômeno reconhecido em fases iniciais de DA, normalmente seguido de uma fase de tolerância imunológica. Durante esta fase tanto a glicólise como a OXPHOS encontram-se diminuídas e as células da microglia apresentam menor poder fagocítico.⁵²

Assim, se as perturbações a nível mitocondrial se mantiverem por longos períodos induzirão a um estado de inflamação prolongado onde tanto há uma diminuição tanto da glicólise como da OXPHOS, resultando uma falha de abastecimento energético para estas células e falha do poder fagocítico. Ainda, a secreção de citocinas pro-inflamatórias tem um efeito nocivo, exacerbando a neurotoxicidade e potenciando a neurodegenerescência.⁵³

A disfunção mitocondrial e acumulação de DNA danificada e constante libertação de DAMPs são apontados como algumas das razões para início da senescência celular. Na presença de células classificadas como senescentes, existe a libertação do fenótipo associado a este fenómeno, o SASP. Assim, as células senescentes podem ser nocivas para o ambiente em que se encontram. A libertação de SASP, citocinas e ROS leva a criação de um ambiente nocivo para as células circundantes, além da promoção de *inflammaging*.⁷⁶ O SASP é um fenótipo muito heterógeno, desde interleucinas como IL-1 α , IL-1 β e IL-6, quimiocinas IL-8 e fatores de crescimento ou metaloproteínas. Os principais reguladores deste fenótipo são o NF- κ B ou o mTOR. Estes marcadores estão “*upregulated*” em astrócitos de pacientes com DA. As consequências fisiopatológicas resultam na incapacidade dos astrócitos de manterem neurónios saudáveis e consequente envelhecimento e morte de celulares cerebrais.

Sabendo que a microglia são os macrófagos residentes do SNC seria de esperar que tivessem como alvo as células senescentes, porém não há evidências que tal ocorra. Assim, células senescentes podem continuar no cérebro por muito mais tempo do que normalmente seria esperado.

4.4.3. Inflamossoma NLRP3

O inflamossoma NLRP3 é um complexo proteico constituído por 3 componentes. A proteína NLRP3, a ASC e a proteína Caspase-1 (figura 5). Este complexo pode ser ativado por vários fatores, como por exemplo a ativação via DAMPs e PAMPs. Este complexo proteico atua via a caspase-1, esta proteína vai dar início à maturação de várias proteínas como a IL-1 β e IL-1 α . Em certas situações pode até dar origem ao fenómeno de apoptose via gasdermina D.⁵⁴ Esta hipótese é ainda sustentada pelo facto de em pacientes com DA ser detetado maiores concentrações destas citocinas pró-inflamatórias, especialmente em células da glia perto de placas senis.^{55,56}

A ativação do inflamossoma é feita através de dois passos. Não haverá início da sua atividade na ausência das ativações distintas. Ao primeiro passo chama-se de “*Priming*”. Os macrófagos têm de ser expostos a um estímulo inicial, como a ligação de DAMPs a recetores como TLRs ou a recetores de citocinas induzindo a ação do NF- κ B. Este fator vai aumentar a expressão da NLRP3 e pro-IL-1 β . Este sinal parece não ter grande efeito a nível do ASC, pro-caspase-1 ou pro-IL-18.^{57,58}

Além de um aumento na expressão desta proteína, a NLRP3 está ubiquitinada no domínio LRR. Neste estado ela está inativa. Com o estímulo de “*priming*” há ativação da enzima BRCC36 que é responsável pela desubiquitinação deste domínio.^{59,60} A nível da mitocôndria também há um aumento de síntese de DNA necessário para a ativação deste inflamossoma.⁶¹

O segundo passo é referido como a ativação do inflamossoma. Esta ativação pode ser originada por muitos estímulos diferentes, entre os quais se incluem efluxos iónico, produção de mtROS e a destruição da membrana lisossomal. Após a ativação por via da ligação de DAMPs ou PAMPs o inflamossoma sofre alterações conformais. Há ativação do Fator Nuclear- κ B, estimulando a formação da pro-citocinas 1- β e 18 como a iniciação do mecanismo via NLRP3. A ação deste complexo é através da ativação da caspase-1 que através da clivagem da pro-IL-1 β e pro-IL-18, citocinas pró-inflamatórias, as torna ativas. Este é o processo de maturação. A IL-1 β é reconhecida por induzir estado de febre e a infiltração de células imunológicas. A IL-18 é necessária para a produção do IFN-gama.

Ainda, a caspase-1 também cliva a FL-GSDMD a N-GSDMD (gasdermina D), permitindo que esta proteína tenha o seu N-terminal ativo para formar poros na membrana plasmática. Este fenómeno chama-se piroptose, uma forma de morte celular programada com envolvimento das caspases. Tem como objetivo a libertação de diversos fatores estimuladores do sistema imunitário. Também há indução da produção de DAMPs, para aumentar a resposta imunológica.⁶²

Assim, este sistema cria uma resposta inflamatória com possível morte celular e intensificação de um ambiente inflamatório e, conseqüentemente, nocivo para os neurónios.

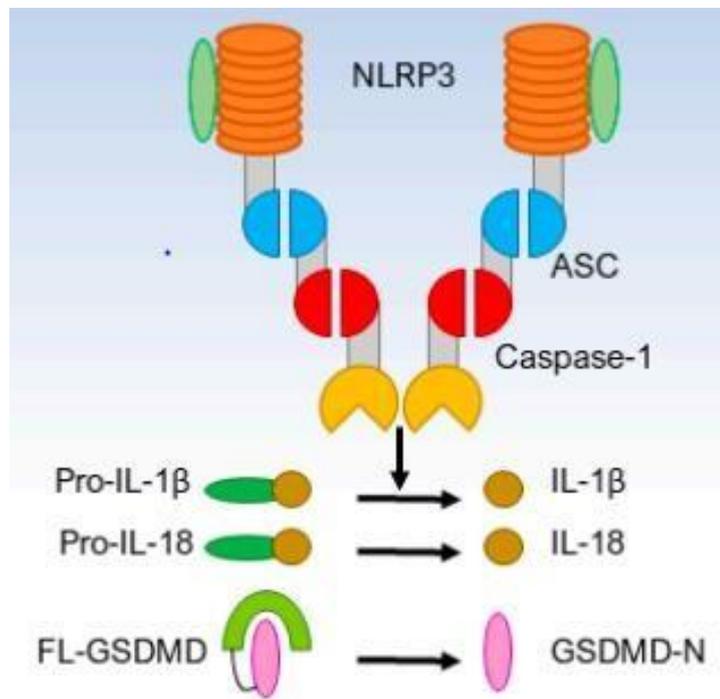


Figura 5. Esquema representativo do mecanismo de ação do inflamossoma NLRP3 (Adaptado de Kelley,2019)⁷¹

4.4.4. Inflamação em doenças neurodegenerativas

Em doenças como na DA a acumulação de agregados proteicos induz a ativação da microglia e astrócitos, promovendo um ambiente de inflamação e aumento da fagocitose destes agregados. É encontrado níveis elevados de moléculas pro-inflamatórias como IL-1beta na microglia perto da formação de placas beta-amilóide e IL-18. Ambos são resultado da ativação prolongada do inflamossoma NLRP3 (figura 6). Além disso, outros estudos apontam para o aumento da expressão da proteína NLR3, ASC e caspase-I em monócitos de doentes com DA.⁶³

Na sequência da acumulação do peptídeo beta-amilóide, parece ocorrer um processo de ativação do complexo NLRP3 através da catepsina B. Ao serem fagocitadas as fibrilhas amiloides causam dano aos lisossomas e induzem a ativação do inflamossoma. Ainda, embora a ligação entre a hiperfosforilação da tau e a ativação deste inflamossoma ainda não tenha sido estudada ao mesmo nível das fibrilhas amiloides, existem estudos que apontam para esta ligação.^{71,72}

Vários estudos apontam para uma relação entre a doença DA e a crónica ativação do inflamossoma.⁶⁴ As fibrilhas amiloides induzem a ativação crónica deste mecanismo, e a existência de um ambiente de inflamação constante impulsiona ainda mais a formação de agregados de beta-amilóide, criando um “loop” de feedback-positivo. A IL-18 é ativadora de

cinases presentes no mecanismo de hiperfosforilação da tau, como a Cdk5 ou a GSK-3beta, possivelmente este mecanismo é induzido pela ativação do NLRP3 (figura 6).⁶⁵

Em termos globais, estes estudos apontam para que o complexo proteico NLRP3 tem um papel importante na característica inflamação crônica presente nestes doentes, sendo ativado tanto pelo peptídeo beta-amilóide como pela tau. A sua ativação constante parece ter como consequência o aumento do próprio peptídeo beta-amilóide como da tau, criando um *loop* de feedback-positivo.

Na PD, o fenótipo característico é a perda de neurónios dopaminérgicos acompanhada de agregados proteicos de Alfa-sin, chamado de corpos de Lewis. Os mecanismos que envolvem os agregados na neurodegenerescência ainda não estão completamente elucidados, porém parece existir uma relação com alguns processos celulares como autofagia, disfunção da mitocôndria e função lisossomal.^{66,67}

Os pacientes com PD também sofrem de desregulação do sistema imunitário, levando a um perfil de neurotoxicidade causada por uma libertação crônica de citocinas pró-inflamatórias. O inflamossoma NLRP3 parece estar altamente regulado nestas situações.⁶⁸ Os monócitos ao fagocitarem a alfa-sin, induzem o aumento na resposta inflamatória através do NLRP3. Aparentemente, este mecanismo é semelhante ao da beta-amilóide, através de dano lisossomal posterior a fagocitose, há libertação da catepsina B. Ainda, a caspase-1 parece induzir a agregação da alfa-sin através da sua clivagem.^{69,70}

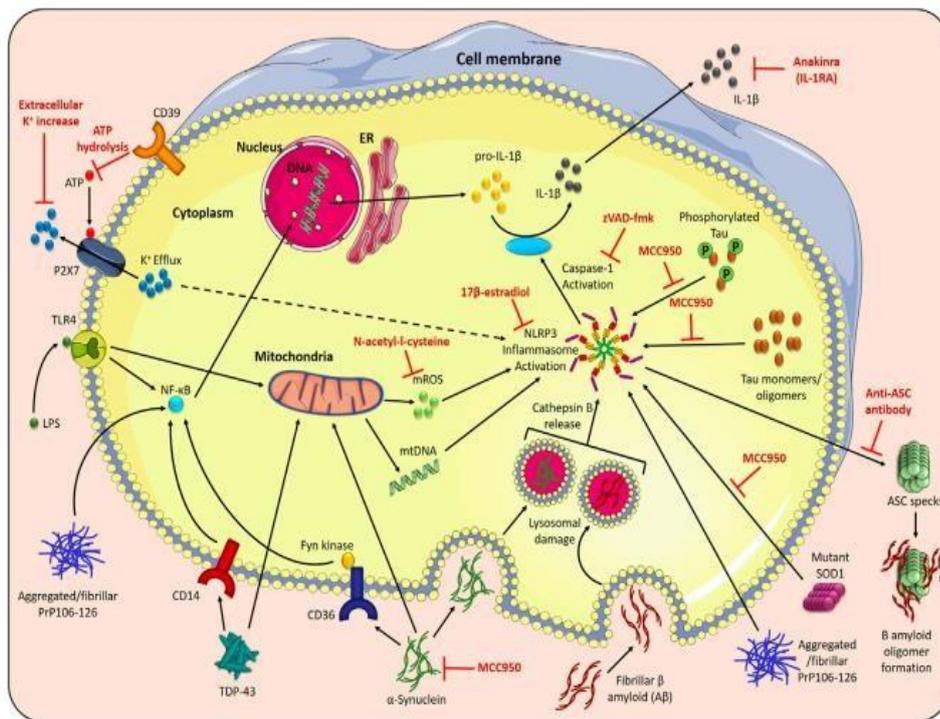


Figura 6. Esquema representativo dos mecanismos de ativação do inflamossoma NLRP3 (Adaptado de Holbrook, 2021)⁷²

Na PD é normal a presença de mitocôndrias disfuncionais. Com esta disfunção, como já foi referido anteriormente, existe também um aumento de mtROS. Estes são indutores também do mecanismo de inflamação onde o NLRP3 atua (figura 6). Desta forma a libertação de citocinas pró-inflamatórias e criação de um ambiente neurotóxico juntamente com o fenómeno de piroptose leva à morte de neurónios no SNC.⁷¹

4.4.5. Disfunção sináptica

A disfunção sináptica ocorre quando a comunicação sináptica entre neurónios está comprometida (figura 7). A neurotransmissão nas sinapses exige que vários mecanismos biológicos, que incluem canais iónicos, recetores membranares (por exemplo o recetor NMDA de glutamato nas sinapses excitatórias), complexos proteicos, entre vários outros componentes, ocorram de forma correta, significando que qualquer alteração nas estruturas e componentes moleculares envolvidas podem causar disfunção sináptica. Como já referido anteriormente, a disfunção mitocondrial ligada a um aumento da produção de ROS está presente em várias doenças como por exemplo DA. Por outro lado, sabe-se que as ROS, beta-amilóide e a proteína tau no estado hiperfosforilada afetam a atividade dos recetores NMDA. A formação de agregados da proteína tau pode também alterar o transporte axonal das mitocôndrias contribuindo para destabilização dos recetores NMDA.⁷³ Ainda, as alterações revistas anteriormente a nível da produção de energia por parte da mitocôndria, dano originado pelo *stress* oxidativo, alteração na transcrição de genes e na homeostase de Ca²⁺ podem afetar a função sináptica. O cérebro é o órgão que consome mais energia relativamente ao seu tamanho. A exigência metabólica do cérebro faz com que a alteração na produção de ATP por parte da mitocôndria tenha efeitos ainda mais devastadores. O hipometabolismo de células cerebrais já descrito em casos de AD associado às disfunções mitocondriais é anterior à acumulação de placas beta-amilóide, podendo contribuir para o aumento do *stress* oxidativo e disfunção sináptica anterior à formação das placas beta-amilóide. A contribuição da mitocôndria para este fenótipo de doença neurodegenerativa pode resultar tanto do comprometimento na produção de energia como no aumento da quantidade de ROS que leva a alterações à função sináptica.⁷³ Além de tudo referido, a peroxidação de lípidos afeta tanto a função e organização da dendrite como o tráfico de recetores. Pode ainda ser o caso de afetar a membrana mitocondrial alterando a sua produção de ATP.⁷³

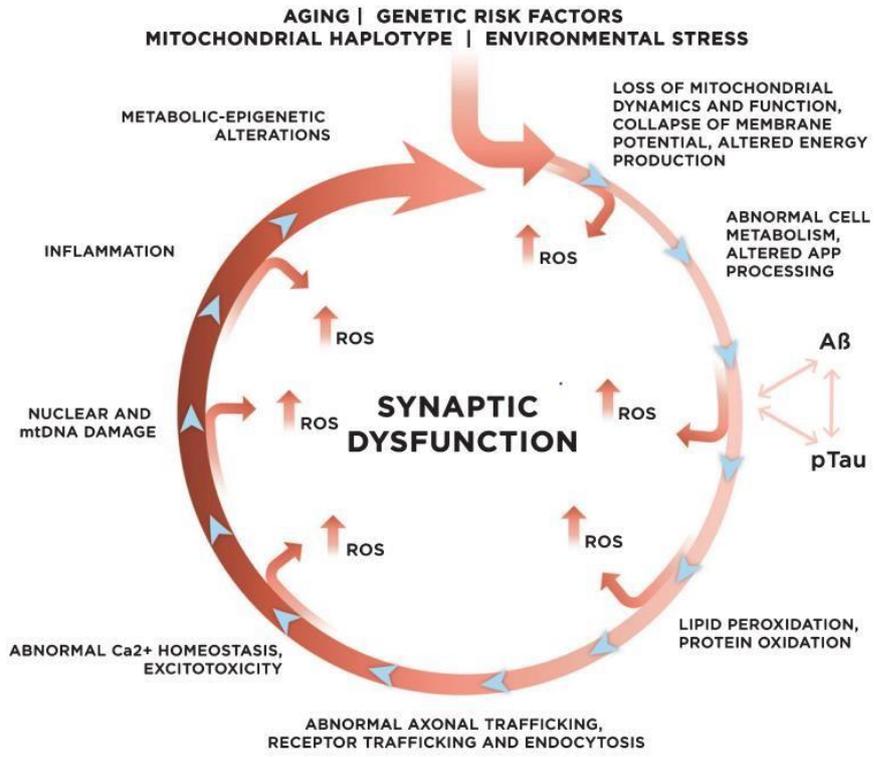


Figura 7. Esquema representativo da disfunção sináptica (Adaptado de Tönnies,2017)⁷³

7. Conclusão

A presente monografia apresenta diversos possíveis mecanismos moleculares e processos celulares que relacionam o *stress* oxidativo ao envelhecimento e senescência e consequentemente a doenças neurodegenerativas. Ao longo dos anos foram formuladas e reformuladas várias hipóteses envolvendo os radicais livres e oxidantes no envelhecimento e neurodegenerescência, mas, aparentemente, a mitocôndria tem um papel central no desenvolvimento da senescência, além da implicação de um aumento descontrolado de espécies oxidativas e os seus malefícios.

Os mecanismos associados ao envelhecimento e senescência envolvendo a mitocôndria são vários e nem todos foram discutidos nesta monografia. O foco no dano ao genoma, especialmente mtDNA, alterações na homeostase do Cálcio ou no quociente NAD^+/NADH e alterações nas estruturas como proteínas e lípidos podem ser apontados como possíveis alterações de elevada importância, mas a falta de conhecimento sobre como se relaciona com o avanço das doenças neurodegenerativas não permite estabelecer uma relação forte de causa-efeito. Vários estudos tentam provar essa relação, porém outros remetem para outras possibilidades.

É possível afirmar que, o envelhecimento resulta da acumulação de danos e disfunções causados por uma enorme variedade de fatores. A complexidade do tema está não só em perceber os próprios mecanismos, mas como eles se impulsionam um ao outro. A criação de um ciclo vicioso entre o dano causado e o fenótipo aparenta, geralmente, intensificar-se entre si através da sua própria atuação.

Tendo isto em conta, o papel dos radicais livres, apesar de ser vastamente estudado ainda apresenta espaços em branco de como implica o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. O papel das ROS está entre a neuroprotecção e sinalização contra os possíveis efeitos de destruição. Mais estudos são necessários para entender por quais mecanismos atua e qual a relação com a senescência e doenças neurodegenerativas.

Bibliografia

1. Pomatto, L. C. D., & Davies, K. J. A. (2018). **Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing.** *Free radical biology & medicine*, 124, 420–430. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.016>
2. Harper, M. E., Bevilacqua, L., Hagopian, K., Weindruch, R., & Ramsey, J. J. (2004). **Ageing, oxidative stress, and mitochondrial uncoupling.** *Acta physiologica Scandinavica*, 182(4), 321–331. <https://doi.org/10.1111/j.1365-201X.2004.01370.x>
3. Cadenas S. (2018). **Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection.** *Biochimica et biophysica acta*. *Bioenergetics*, 1859(9), 940–950. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2018.05.019>
4. Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1998). **The free radical theory of aging matures.** *Physiological reviews*, 78(2), 547–581. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.2.547>
5. Landar, A., & Darley-Usmar, V. M. (2003). **Nitric oxide and cell signaling: modulation of redox tone and protein modification.** *Amino acids*, 25(3-4), 313–321. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0019-7>
6. Coppé, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). **The senescence associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression.** *Annual review of pathology*, 5, 99–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>
7. Han, D., Williams, E., & Cadenas, E. (2001). **Mitochondrial respiratory chain independent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space.** *The Biochemical journal*, 353(Pt 2), 411–416. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3530411>
8. Miwa, S., Jow, H., Baty, K., Johnson, A., Czapiewski, R., Saretzki, G., Treumann, A., & von Zglinicki, T. (2014). **Low abundance of the matrix arm of complex I in mitochondria predicts longevity in mice.** *Nature communications*, 5, 3837. <https://doi.org/10.1038/ncomms4837>
9. Muller, F. L., Liu, Y., & Van Remmen, H. (2004). **Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane.** *The Journal of biological chemistry*, 279(47), 49064–49073. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407715200>
10. Miwa, S., Kashyap, S., Chini, E., & von Zglinicki, T. (2022). **Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging.** *The Journal of clinical investigation*, 132(13), e158447. <https://doi.org/10.1172/JCI158447>

11. Nissanka, N., & Moraes, C. T. (2018). **Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease.** *FEBS letters*, 592(5), 728–742. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12956>
12. Bravo-Sagua, R., Parra, V., López-Crisosto, C., Díaz, P., Quest, A. F., & Lavandero, S. (2017). **Calcium Transport and Signaling in Mitochondria.** *Comprehensive Physiology*, 7(2), 623–634. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160013>
13. Hansson, M. J., Månsson, R., Morota, S., Uchino, H., Kallur, T., Sumi, T., Ishii, N., Shimazu, M., Keep, M. F., Jegorov, A., & Elmér, E. (2008). **Calcium-induced generation of reactive oxygen species in brain mitochondria is mediated by permeability transition.** *Free radical biology & medicine*, 45(3), 284–294. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.021>
14. Peng, T. I., & Jou, M. J. (2010). **Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1201, 183–188. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05634.x>
15. Sultana, R., Poon, H. F., Cai, J., Pierce, W. M., Merchant, M., Klein, J. B., Markesbery, W. R., & Butterfield, D. A. (2006). **Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach.** *Neurobiology of disease*, 22(1), 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.10.004>
16. Swerdlow, R. H., Koppel, S., Weidling, I., Hayley, C., Ji, Y., & Wilkins, H. M. (2017). **Mitochondria, Cybrids, Aging, and Alzheimer's Disease.** *Progress in molecular biology and translational science*, 146, 259–302. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.12.017>
17. Grimm, A., & Eckert, A. (2017). **Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view.** *Journal of neurochemistry*, 143(4), 418–431. <https://doi.org/10.1111/jnc.14037>
18. Roger, L., Tomas, F., & Gire, V. (2021). **Mechanisms and Regulation of Cellular Senescence.** *International journal of molecular sciences*, 22(23), 13173. <https://doi.org/10.3390/ijms222313173>
19. Jurcau A. (2022). Molecular Pathophysiological Mechanisms in Huntington's Disease. *Biomedicines*, 10(6), 1432. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061432>
20. Krestinina, O., Azarashvili, T., Baburina, Y., Galvita, A., Grachev, D., Stricker, R., & Reiser, G. (2015). **In aging, the vulnerability of rat brain mitochondria is enhanced due to reduced level of 2',3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase (CNP) and subsequently increased permeability transition in brain mitochondria in old**

- animals.** *Neurochemistry international*, 80, 41–50.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.09.008>
21. Ebanks, B., & Chakrabarti, L. (2022). **Mitochondrial ATP Synthase is a Target of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases.** *Frontiers in molecular biosciences*, 9, 854321. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.854321>
 22. Ludtmann, M. H. R., Angelova, P. R., Horrocks, M. H., Choi, M. L., Rodrigues, M., Baev, A. Y., Berezhnov, A. V., Yao, Z., Little, D., Banushi, B., Al-Menhali, A. S., Ranasinghe, R. T., Whiten, D. R., Yapom, R., Dolt, K. S., Devine, M. J., Gissen, P., Kunath, T., Jaganjac, M., Pavlov, E. V., ... Gandhi, S. (2018). **α -synuclein oligomers interact with ATP synthase and open the permeability transition pore in Parkinson's disease.** *Nature communications*, 9(1), 2293. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04422-2>
 23. Kumar, A., Singh, A., & Ekavali (2015). **A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update.** *Pharmacological reports : PR*, 67(2), 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.09.004>
 24. Serý, O., Povová, J., Míšek, I., Pešák, L., & Janout, V. (2013). **Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review.** *Folia neuropathologica*, 51(1), 1–9. <https://doi.org/10.5114/fn.2013.34190>
 25. Swerdlow R. H. (2018). **Mitochondria and Mitochondrial Cascades in Alzheimer's Disease.** *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 62(3), 1403–1416. <https://doi.org/10.3233/JAD-170585>
 26. Zhong, L., Wang, Z., Wang, D., Wang, Z., Martens, Y. A., Wu, L., Xu, Y., Wang, K., Li, J., Huang, R., Can, D., Xu, H., Bu, G., & Chen, X. F. (2018). **Amyloid-beta modulates microglial responses by binding to the triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2).** *Molecular neurodegeneration*, 13(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0247-7>
 27. Junn, E., & Mouradian, M. M. (2002). **Human alpha-synuclein over-expression increases intracellular reactive oxygen species levels and susceptibility to dopamine.** *Neuroscience letters*, 320(3), 146–150. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)00016-2](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)00016-2)
 28. Kumar, H., Lim, H. W., More, S. V., Kim, B. W., Koppula, S., Kim, I. S., & Choi, D. K. (2012). **The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's Disease: convergence and parallelism.** *International journal of molecular sciences*, 13(8), 10478–10504. <https://doi.org/10.3390/ijms130810478>

29. Kraytsberg, Y., Kudryavtseva, E., McKee, A. C., Geula, C., Kowall, N. W., & Khrapko, K. (2006). **Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons.** *Nature genetics*, 38(5), 518–520. <https://doi.org/10.1038/ng1778>
30. Bender, A., Krishnan, K. J., Morris, C. M., Taylor, G. A., Reeve, A. K., Perry, R. H., Jaros, E., Hersheson, J. S., Betts, J., Klopstock, T., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2006). **High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease.** *Nature genetics*, 38(5), 515–517. <https://doi.org/10.1038/ng1769>
31. Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J., Staden, R., & Young, I. G. (1981). **Sequence and organization of the human mitochondrial genome.** *Nature*, 290(5806), 457–465. <https://doi.org/10.1038/290457a0>
32. Bender, A., Krishnan, K. J., Morris, C. M., Taylor, G. A., Reeve, A. K., Perry, R. H., Jaros, E., Hersheson, J. S., Betts, J., Klopstock, T., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2006). **High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease.** *Nature genetics*, 38(5), 515–517. <https://doi.org/10.1038/ng1769>
33. Kushnareva, Y., Murphy, A. N., & Andreyev, A. (2002). **Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state.** *The Biochemical journal*, 368(Pt 2), 545–553. <https://doi.org/10.1042/BJ20021121>
34. Goedert M. (1997). **Familial Parkinson's disease. The awakening of alphasynuclein.** *Nature*, 388(6639), 232–233. <https://doi.org/10.1038/40767>
35. Kim, K. S., Choi, S. Y., Kwon, H. Y., Won, M. H., Kang, T. C., & Kang, J. H. (2002). **Aggregation of alpha-synuclein induced by the Cu,Zn-superoxide dismutase and hydrogen peroxide system.** *Free radical biology & medicine*, 32(6), 544–550. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00741-4](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00741-4)
36. Xu, J., Kao, S. Y., Lee, F. J., Song, W., Jin, L. W., & Yankner, B. A. (2002). **Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease.** *Nature medicine*, 8(6), 600–606. <https://doi.org/10.1038/nm0602-600>
37. Palpagama, T. H., Waldvogel, H. J., Faull, R. L. M., & Kwakowsky, A. (2019). **The Role of Microglia and Astrocytes in Huntington's Disease.** *Frontiers in molecular neuroscience*, 12, 258. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00258>

38. Chang, K. H., Wu, Y. R., Chen, Y. C., & Chen, C. M. (2015). **Plasma inflammatory biomarkers for Huntington's disease patients and mouse model.** *Brain, behavior, and immunity*, 44, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.09.011>
39. O'Regan, G. C., Farag, S. H., Casey, C. S., Wood-Kaczmar, A., Pocock, J. M., Tabrizi, S. J., & Andre, R. (2021). **Human Huntington's disease pluripotent stem cell-derived microglia develop normally but are abnormally hyper-reactive and release elevated levels of reactive oxygen species.** *Journal of neuroinflammation*, 18(1), 94. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02147-6>
40. Yang, H. M., Yang, S., Huang, S. S., Tang, B. S., & Guo, J. F. (2017). **Microglial Activation in the Pathogenesis of Huntington's Disease.** *Frontiers in aging neuroscience*, 9, 193. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00193>
41. Björkqvist, M., Wild, E. J., Thiele, J., Silvestroni, A., Andre, R., Lahiri, N., Raibon, E., Lee, R. V., Benn, C. L., Soulet, D., Magnusson, A., Woodman, B., Landles, C., Pouladi, M. A., Hayden, M. R., Khalili-Shirazi, A., Lowdell, M. W., Brundin, P., Bates, G. P., Leavitt, B. R., ... Tabrizi, S. J. (2008). **A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease.** *The Journal of experimental medicine*, 205(8), 1869–1877. <https://doi.org/10.1084/jem.20080178>
42. Politis, M., Lahiri, N., Niccolini, F., Su, P., Wu, K., Giannetti, P., Scahill, R. I., Turkheimer, F. E., Tabrizi, S. J., & Piccini, P. (2015). **Increased central microglial activation associated with peripheral cytokine levels in premanifest Huntington's disease gene carriers.** *Neurobiology of disease*, 83, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.08.011>
43. Pchitskaya, E., Popugaeva, E., & Bezprozvanny, I. (2018). **Calcium signaling and molecular mechanisms underlying neurodegenerative diseases.** *Cell calcium*, 70, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.06.008>
44. Sánchez-López, F., Tasset, I., Agüera, E., Feijóo, M., Fernández-Bolaños, R., Sánchez, F. M., Ruiz, M. C., Cruz, A. H., Gascón, F., & Túnez, I. (2012). **Oxidative stress and inflammation biomarkers in the blood of patients with Huntington's disease.** *Neurological research*, 34(7), 721–724. <https://doi.org/10.1179/1743132812Y.0000000073>
45. Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G. C., ... Kummer, M. P. (2015). **Neuroinflammation in Alzheimer's disease.** *The Lancet. Neurology*, 14(4), 388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
46. Swanson, K. V., Deng, M., & Ting, J. P. (2019). **The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics.** *Nature reviews. Immunology*, 19(8), 477–

489. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>
47. Green, D. R., & Levine, B. (2014). **To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate.** *Cell*, 157(1), 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.049>
48. Desai, S., Juncker, M., & Kim, C. (2018). **Regulation of mitophagy by the ubiquitin pathway in neurodegenerative diseases.** *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 243(6), 554–562. <https://doi.org/10.1177/1535370217752351>
49. Feldman, N., Rotter-Maskowitz, A., & Okun, E. (2015). **DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies.** *Ageing research reviews*, 24(Pt A), 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.01.003>
50. Kim, M. J., Yoon, J. H., & Ryu, J. H. (2016). **Mitophagy: a balance regulator of NLRP3 inflammasome activation.** *BMB reports*, 49(10), 529–535. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2016.49.10.115>
51. Joshi, A. U., Minhas, P. S., Liddel, S. A., Haileselassie, B., Andreasson, K. I., Dorn, G. W., 2nd, & Mochly-Rosen, D. (2019). **Fragmented mitochondria released from microglia trigger AI astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration.** *Nature neuroscience*, 22(10), 1635–1648. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0486-0>
52. Baik, S. H., Kang, S., Lee, W., Choi, H., Chung, S., Kim, J. I., & Mook-Jung, I. (2019). **A Breakdown in Metabolic Reprogramming Causes Microglia Dysfunction in Alzheimer's Disease.** *Cell metabolism*, 30(3), 493–507.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.06.005>
53. Lauro, C., & Limatola, C. (2020). **Metabolic Reprogramming of Microglia in the Regulation of the Innate Inflammatory Response.** *Frontiers in immunology*, 11, 493. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00493>
54. Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Yu, J. W., Datta, P., Miller, B., Jankowski, W., Rosenberg, S., Zhang, J., & Alnemri, E. S. (2007). **The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation.** *Cell death and differentiation*, 14(9), 1590–1604. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402194>
55. Griffin, W. S., Stanley, L. C., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L. J., White, C. L., 3rd, & Araoz, C. (1989). **Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(19), 7611–7615. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.19.7611>

56. Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y., & He, Y. (2019). **The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation.** *International journal of molecular sciences*, 20(13), 3328. <https://doi.org/10.3390/ijms20133328>
57. Holbrook, J. A., Jarosz-Griffiths, H. H., Caseley, E., Lara-Reyna, S., Poulter, J. A., WilliamsGray, C. H., Peckham, D., & McDermott, M. F. (2021). **Neurodegenerative Disease and the NLRP3 Inflammasome.** *Frontiers in pharmacology*, 12, 643254. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.643254>
58. Bauernfeind, F. G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E. S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B. G., Fitzgerald, K. A., Hornung, V., & Latz, E. (2009). **Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression.** *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(2), 787–791. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901363>
59. Juliana, C., Fernandes-Alnemri, T., Kang, S., Farias, A., Qin, F., & Alnemri, E. S. (2012). **Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation.** *The Journal of biological chemistry*, 287(43), 36617–36622. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.407130>
60. Py, B. F., Kim, M. S., Vakifahmetoglu-Norberg, H., & Yuan, J. (2013). **Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity.** *Molecular cell*, 49(2), 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.009>
61. Zhong, Z., Liang, S., Sanchez-Lopez, E., He, F., Shalpour, S., Lin, X. J., Wong, J., Ding, S., Seki, E., Schnabl, B., Hevener, A. L., Greenberg, H. B., Kisseleva, T., & Karin, M. (2018). **New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation.** *Nature*, 560(7717), 198–203. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0372-z>
62. Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2006). **Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages.** *Cellular microbiology*, 8(11), 1812–1825. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00751.x>
63. Saresella, M., La Rosa, F., Piancone, F., Zoppis, M., Marventano, I., Calabrese, E., Rainone, V., Nemni, R., Mancuso, R., & Clerici, M. (2016). **The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer's disease.** *Molecular neurodegeneration*, 11, 23. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0088-1>
64. Venegas, C., Kumar, S., Franklin, B. S., Dierkes, T., Brinkschulte, R., Tejera, D., VieiraSaecker, A., Schwartz, S., Santarelli, F., Kummer, M. P., Griep, A., Gelpi, E., Beilharz, M., Riedel, D., Golenbock, D. T., Geyer, M., Walter, J., Latz, E., & Heneka, M. T. (2017).

- Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid- β in Alzheimer's disease.** *Nature*, 552(7685), 355–361. <https://doi.org/10.1038/nature25158>
65. Ojala, J. O., Sutinen, E. M., Salminen, A., & Pirttilä, T. (2008). **Interleukin-18 increases expression of kinases involved in tau phosphorylation in SH-SY5Y neuroblastoma cells.** *Journal of neuroimmunology*, 205(1-2), 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.09.012>
66. Panicker, N., Ge, P., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2021). **The cell biology of Parkinson's disease.** *The Journal of cell biology*, 220(4), e202012095. <https://doi.org/10.1083/jcb.202012095>
67. Kalia, L. V., Kalia, S. K., McLean, P. J., Lozano, A. M., & Lang, A. E. (2013). **α -Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease.** *Annals of neurology*, 73(2), 155–169. <https://doi.org/10.1002/ana.23746>
68. Williams-Gray, C. H., Wijeyekoon, R. S., Scott, K. M., Hayat, S., Barker, R. A., & Jones, J. L. (2018). **Abnormalities of age-related T cell senescence in Parkinson's disease.** *Journal of neuroinflammation*, 15(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1206-5>
69. Kouli, A., Camacho, M., Allinson, K., & Williams-Gray, C. H. (2020). **Neuroinflammation and protein pathology in Parkinson's disease dementia.** *Acta neuropathologica communications*, 8(1), 211. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-01083-5>
70. Codolo, G., Plotegher, N., Pozzobon, T., Brucale, M., Tessari, I., Bubacco, L., & de Bernard, M. (2013). **Triggering of inflammasome by aggregated α -synuclein, an inflammatory response in synucleinopathies.** *PloS one*, 8(1), e55375. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055375>
71. Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y., & He, Y. (2019). **The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation.** *International journal of molecular sciences*, 20(13), 3328. <https://doi.org/10.3390/ijms20133328>
72. Holbrook, J. A., Jarosz-Griffiths, H. H., Caseley, E., Lara-Reyna, S., Poulter, J. A., WilliamsGray, C. H., Peckham, D., & McDermott, M. F. (2021). **Neurodegenerative Disease and the NLRP3 Inflammasome.** *Frontiers in pharmacology*, 12, 643254. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.643254>
73. Tönnies, E., & Trushina, E. (2017). **Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease.** *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 57(4), 1105–1121. <https://doi.org/10.3233/JAD-161088>
74. Zhou, R., Ji, B., Kong, Y., Qin, L., Ren, W., Guan, Y., & Ni, R. (2021). **PET Imaging of Neuroinflammation in Alzheimer's Disease.** *Frontiers in immunology*, 12, 739130. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.739130>