



Inês Maria Monteiro Diogo

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Neuroprotective effects of estradiol and its derivatives” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, da Dra. Catarina Cardoso, do Dr. Nelson Santos e do Professor Doutor Alcino Lopes Jorge Leitão e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Inês Maria Monteiro Diogo

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Neuroprotective effects of estradiol and its derivatives” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, da Dra. Catarina Cardoso, do Dr. Nelson Santos e do Professor Doutor Alcino Lopes Jorge Leitão e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Inês Maria Monteiro Diogo, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2012138968, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Neuroprotective effects of estradiol and its derivatives” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade 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, 16 de julho de 2018

Inês Maria Monteiro Diogo

## **Agradecimentos**

Ao meu tutor da monografia, o Professor Doutor Alcino Leitão, por ter aceite realizar este projeto, por toda a disponibilidade, apoio e motivação que ofereceu durante a elaboração da presente monografia. Agradecer também à professora Doutora Armanda Santos, pelo apoio dado durante a realização desta monografia.

Aos meus orientadores do estágio em Indústria Farmacêutica, Dr. Ângelo Gomes e Dr. Eduardo Abrantes, por todo o apoio, dedicação, esforço e paciência que recebi durante todo o estágio. Sem eles, não teria tido uma experiência tão gratificante e enriquecedora.

A todos os colaboradores dos Laboratórios Basi, em especial à equipa do Laboratório de Físico-química, à Dr.<sup>a</sup> Ana Cláudia Costa, Dr.<sup>a</sup> Maria Inês Silva, Dr.<sup>a</sup> Nadina Afonso e Dr.<sup>a</sup> Teresa Moreira que me acompanharam e guiaram durante a execução das tarefas em laboratório com grande dedicação, simpatia e profissionalismo.

Ao meu orientador de estágio em Farmácia Comunitária, Dr. Nelson Santos, por me permitir a realizar o estágio na Farmácia Conímbriga. A toda a equipa da farmácia Conímbriga, pela transmissão de conhecimentos e experiências, pelo acolhimento e pela confiança depositada em mim.

A todos os meus amigos que estiveram ao meu lado durante todo o percurso, pela força, coragem e companheirismo, em especial à Mariana Mota, à Carolina Bonet e ao Rui Rodrigues por toda a paciência e carinho.

A toda a minha família, em especial à minha mãe, por todo o apoio que recebi no decorrer dos estágios e à minha irmã, pelo apoio e ajuda no desenvolvimento de imagens presentes neste documento.

## Índice

### **CAPÍTULO I – Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica**

Lista de Abreviaturas .....	6
1. Introdução.....	7
2. Análise SWOT .....	8
2.1. Pontos Fortes.....	8
2.1.1. Sessão de acolhimento e integração .....	8
2.1.2. Visita às Instalações .....	8
2.1.3. Instalações do Laboratório de Físico-química.....	8
2.1.4. Equipa do laboratório de Físico-química .....	9
2.1.5. Utilização de equipamentos no laboratório de Físico-química.....	9
2.1.6. Farmacoteca.....	9
2.1.7. Planeamento e organização das análises no laboratório de Físico-química.....	9
2.1.8. Realização de ensaios.....	10
2.1.9. Validação de validades de padrões secundários .....	10
2.1.10. Espectroscopia Raman.....	11
2.1.11. Criação e validação de métodos no equipamento de espectroscopia Raman.....	11
2.2. Fraquezas.....	12
2.2.1. Localização .....	12
2.2.2. Acesso restrito .....	12
2.2.3. Planificação do estágio.....	12
2.3. Oportunidades .....	12
2.3.1. Desenvolvimento pessoal na área de indústria farmacêutica .....	12
2.3.2. Participação na implementação de um novo equipamento.....	13
2.3.3. Integração dos conhecimentos.....	13
2.4. Ameaças.....	13
2.4.1. Peso do farmacêutico em Controlo de Qualidade.....	13
2.4.2. Duração do estágio.....	14
3. Conclusão .....	15
4. Referências Bibliográficas.....	16
5. Anexos.....	17

## **CAPÍTULO 2 – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária**

Lista de Abreviaturas .....	20
1. Introdução.....	21
2. Análise SWOT .....	22
2.1. Pontos Fortes.....	22
2.1.1. Experiência prévia .....	22
2.1.2. Aprendizagem gradual durante o estágio.....	22
2.1.3. Localização da Farmácia.....	22
2.1.4. Equipa e integração .....	23
2.1.5. Organização dos medicamentos .....	23
2.1.6. Tipo de utentes.....	24
2.1.7. Receituário.....	24
2.1.8. Preparação de medicamentos manipulados .....	25
2.1.9. Oferta de outros serviços farmacêuticos .....	25
2.2. Fraquezas.....	26
2.2.1. Dificuldade no aconselhamento farmacêutico .....	26
2.2.2. Comunicação e <i>soft skills</i> .....	26
2.2.3. Lacunas de MICF .....	26
2.2.4. Experiência prévia .....	27
2.3. Oportunidades .....	27
2.3.1. Implementação do projeto <i>Kaizen</i> .....	27
2.3.2. Flexibilidade de horário .....	28
2.3.3. Sessões de formação externa.....	28
2.3.4. Sessões de formação interna .....	28
2.4. Ameaças.....	29
2.4.1. Pouca prática durante MICF .....	29
2.4.2. Venda de MNRM fora das farmácias.....	29
3. Casos Práticos.....	29
3.1. Tosse seca.....	29
3.2. Patologia oral em doentes imunodeprimidos .....	30
4. Conclusão .....	31
5. Referência Bibliográficas .....	32

## CAPÍTULO 3 – Monografía

Resumo.....	34
Abstract.....	35
Abbreviations:.....	36
1. Introduction.....	37
1.1. Estradiol.....	37
1.2. Estrogens signalling.....	38
1.3. Estrogens in the brain.....	39
1.4. Neuroprotection .....	40
1.4.1. Anti-inflammatory action .....	40
1.4.2. Antioxidant action.....	41
1.4.3. Neuronal cell survival.....	42
1.5. Structure-activity relationship .....	42
1.6. Future therapeutics for neurodegenerative pathologies .....	43
1.7. Alzheimer’s disease.....	44
2. The effects of estrogen in Alzheimer’s disease pathology .....	46
2.1. APP processing $\beta$ -secretase activity.....	46
2.2. APP processing $\alpha$ -secretase activity.....	47
2.3. A $\beta$ enzymatic degradation.....	47
2.4. Formation of A $\beta$ plaques .....	48
2.5. Formation of A $\beta$ fibrils oligomers and formation, extension and destabilization of A $\beta$ fibrils.....	48
2.6. Uptake of A $\beta$ by microglia .....	48
2.7. Neuroinflammation .....	49
2.8. Neuronal cell death .....	49
2.9. Oxidative stress and glucose transport into the brain .....	50
2.10. Discussion of the effects of estrogen in Alzheimer’s Disease.....	50
3. New therapeutics .....	52
3.1. DHED, a brain selective prodrug.....	52
4. Conclusion .....	54
5. References .....	56

# **CAPÍTULO I**

**Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica**

**Laboratórios Basi, Indústria Farmacêutica, S.A.**



## **Lista de Abreviaturas**

CQ – Controlo de Qualidade

FQ – Físico-química

IV – Infravermelho

LB – Laboratórios Basi

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Rf – Fator de retenção (*Retardation factor*)

TLC – Cromatografia em camada fina (*thin-layer chromatography*)

UV – Ultra-violeta

## **I. Introdução**

Este relatório foi realizado no âmbito do Estágio Extracurricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, na área de Indústria Farmacêutica. O estágio teve lugar nos Laboratórios Basi - Indústria Farmacêutica S.A., no departamento de Controlo de Qualidade, Laboratório de Físico-Química sob a orientação do Dr. Ângelo Gomes e Dr. Eduardo Abrantes, entre 8 de janeiro de 2018 e 30 de março de 2018.

Os Laboratórios Basi são uma empresa de indústria farmacêutica pertencente ao grupo FHC Farmacêutica, que iniciou a sua atividade em 1956, dedicada ao desenvolvimento, produção e comercialização de medicamentos e outros produtos de saúde. Em 2007, com a reestruturação organizacional e implementação de novas estratégias, registou um crescimento significativo, solidificando ainda mais a sua posição no mercado farmacêutico. Atualmente encontram-se no processo de desenvolvimento de uma nova unidade de produção para fabrico de soluções parentéricas, representando um aumento na sua capacidade de produção [1,2].

Os Laboratórios Basi em Mortágua concentram a sua produção em formas farmacêuticas líquidas e semissólidas, com tecnologia de ponta e profissionais qualificados, para oferecer produtos de elevada qualidade a preço acessível, indo de encontro às necessidades crescentes do mercado farmacêutico internacional. O departamento de controlo de qualidade é responsável por garantir a qualidade e segurança das matérias-primas e produto acabado, de modo a garantir eficácia e segurança dos medicamentos e outros produtos de saúde para a população que os irá consumir [2].

## **2. Análise SWOT**

### **2.1. Pontos Fortes**

#### **2.1.1. Sessão de acolhimento e integração**

A sessão de acolhimento e integração realizada no primeiro dia do meu estágio curricular, consistiu na apresentação do enquadramento dos Laboratórios Basi do grupo FHC Farmacêutica, na sua evolução histórica e de projetos futuros por parte do Dr. João Oliveira, responsável pelo departamento de qualificação de entidades externas. Do meu ponto de vista, esta apresentação foi crucial na obtenção de uma visão global e integrada da empresa.

#### **2.1.2. Visita às Instalações**

A visita guiada à zona de produção, zona de enchimento e acondicionamento, desenvolvimento analítico e galénico, controlo de qualidade e armazém, permitiu-me conhecer o trabalho desenvolvido em cada um dos departamentos e a interação entre todos eles. Tive a possibilidade de associar os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do MICF e a prática profissional do farmacêutico, na Indústria Farmacêutica.

#### **2.1.3. Instalações do Laboratório de Físico-química**

O laboratório de FQ está organizado de modo a que todas as tarefas diárias sejam executadas da forma mais organizada e prática. É composto por sala de reuniões, sala de armazenamento de todas as amostras em análise, local de limpeza e acondicionamento dos materiais de laboratório, sala de pesagens com porta hermética, sala de instrumentação, sala com hottes, sala de reagentes e por fim um local para execução do trabalho diário dos analistas, cada um com um espaço predefinido.

Ao entrar no laboratório é necessário usar bata, proteções para o calçado, no caso de não estar a usar calçado apropriado, touca para o cabelo, tapa barbas e ainda na execução de qualquer tarefa em laboratório, a utilização de luvas e outros equipamentos de proteção individual. Estando tudo bem organizado, a minha integração no laboratório foi facilitada e todas as regras aplicadas ao vestuário, permitem garantir a segurança de todos analistas [3].

#### **2.1.4. Equipa do laboratório de Físico-química**

A equipa de profissionais do Controlo de Qualidade é bastante jovem, estando familiarizada com as dificuldades iniciais que um estagiário enfrenta e tendo a sensibilidade necessária para compreender os erros e dúvidas deste. Os analistas, para além de ajudarem em qualquer dúvida que ocorra, incentivam a execução das tarefas em vez de apenas exemplificar a sua execução. Por esta razão, durante este estágio pude executar uma grande diversidade de tarefas, aplicando os conhecimentos adquiridos no MICF e a perceber a grande magnitude de ensaios que é necessário realizar, necessitando estar todos conformes, para poder libertar um lote de produtos para o mercado.

#### **2.1.5. Utilização de equipamentos no laboratório de Físico-química**

Para utilização dos equipamentos do laboratório de FQ, é necessário fazer o registo no logbook respetivo presente para cada um dos equipamentos, tais como no espetrofotómetro de UV, espetrofotómetro de IV, polarímetro e densímetro/ refratómetro. Cada registo contém a data de utilização, amostra analisada e respetivo lote e as siglas do analista que executou a análise. Este tipo de procedimento permite rastrear todas as análises realizadas num determinado equipamento [4].

#### **2.1.6. Farmacoteca**

Os LB garantem o armazenamento de amostras de retenção, sendo estas representativas do lote da matéria-prima, produto intermédio ou produto acabado. Estas amostras têm de estar disponíveis para o Infarmed e autoridades competentes, caso necessário, sendo que a quantidade retida tem que permitir a realização de duas análises completas, de acordo com as especificações aprovadas. Os LB asseguram medidas para garantir a manutenção das amostras de retenção, conforme as condições de conservação aprovadas e acesso restrito aos colaboradores.

#### **2.1.7. Planeamento e organização das análises no laboratório de Físico-química**

As análises realizadas no laboratório de FQ estão divididas em quatro grupos: matérias-primas, produto acabado, estabilidades e material de acondicionamento. O planeamento diário de cada analista, é realizado semanalmente consoante a chegada de matérias-primas às instalações, os produtos que estejam em linha de produção e os ensaios de estabilidade que são necessários realizar.

Ao início de cada semana cada analista sabe os ensaios que tem a realizar durante a semana, permitindo-o organizar o seu tempo da melhor maneira.

#### **2.1.8. Realização de ensaios**

Seguindo a farmacopeia ou as especificações aprovadas, o analista realiza os ensaios. Através de um software de gestão de dados é possível visualizar o stock atualizado de todos os reagentes e ver se estão disponíveis para a realização dos ensaios. Cada analista tem o seu caderno de laboratório em que descreve os ensaios realizados durante o dia, o produto e lote analisado, tais como todos os reagentes e lotes de reagentes utilizados e os resultados obtidos. Deste modo tudo o que é realizado no laboratório é registado e rastreável [4].

#### **2.1.9. Validação de validades de padrões secundários**

A cromatografia em camada fina (*TLC*) é um ensaio realizado em alguns testes de identificação de matérias-primas, produto acabado e estabilidades. A cromatografia é um ensaio, que permite a separação de compostos consoante a sua afinidade para a fase móvel ou para a fase estacionária, permitindo a identificação de compostos através da utilização de padrões e verificação da presença de impurezas (Figura 1). Em *TLC* a mancha obtida após a eluição da fase móvel e se necessário a adição de agente revelador, tem de ter o mesmo  $R_f$ , tamanho, forma e/ou cor que o padrão de referência, segundo a farmacopeia europeia ou as especificações aprovadas, para poder ter uma identificação conforme. Pode realizar vários *TLC*'s acompanhada pelos vários analistas como mostra a Figura 2.

Os padrões secundários utilizados em *TLC* têm um prazo de utilização de 6 meses após preparação e são armazenados entre 2 a 8°C. Por terem uma validade relativamente curta sem que tenham sofrido necessariamente algum tipo de degradação e sendo os padrões primários um recurso relativamente dispendioso, foi-me proposta a validação de validades dos padrões secundários, para possível aumento do prazo de utilização destas soluções. Para isso, foram preparados novos padrões secundários e realizadas os respetivos *TLC*'s, utilizando simultaneamente padrões secundários que já tinham passado o prazo de utilização ou estavam perto de o atingir. As manchas obtidas tinham de corresponder às especificações aprovadas sem diferença entre os padrões, para a validação de um novo prazo de utilização (Figura 3).

### **2.1.10. Espectroscopia Raman**

Os LB encontravam-se no processo de implementação de um novo equipamento de espectroscopia Raman. Através desta tecnologia, é possível caracterizar materiais a partir da frequência das vibrações moleculares, permitindo obter informação química e estrutural do composto e assim proceder à sua identificação, sem que seja necessário o contacto direto com a amostra. A implementação deste equipamento tem como objetivo reduzir o número de contentores amostrados e o tempo de deslocação dos contentores para a sala de amostragem. Não é necessária recolha dos compostos armazenados em embalagens transparente, diminuindo assim o risco de contaminação. Já para outros compostos, é necessário deslocarem para a sala de amostragem para serem recolhidos e identificados.

### **2.1.11. Criação e validação de métodos no equipamento de espectroscopia Raman**

Para a identificação de um composto através de espectroscopia Raman, o método tem de estar previamente criado e validado no equipamento. Para a criação de um método é necessário obter no mínimo, se possível, três assinaturas do composto, neste caso recorreu-se a amostras da matéria prima previamente analisadas. As assinaturas são leituras com baixo nível de ruído (Figura 4). Com a criação do método realizava-se posteriormente o método de seletividade, que permite avaliar se o método criado apresenta semelhanças com algum método previamente criado ou com algum método da biblioteca e, é possível ter uma ideia se é possível validar ou não o método desse composto. De seguida, realiza-se o teste positivo com três amostras do composto, para averiguar se o equipamento apresenta um resultado positivo para o composto pretendido (Figura 5A). Por fim realiza-se o teste negativo e para isso são selecionados compostos quimicamente semelhantes ao composto de interesse, utilizando o PubChem, a Farmacopeia Europeia como referências (Figura5B) e os compostos que deram como semelhantes no método da seletividade.

Se todos os testes obtiverem o resultado pretendido significa que o método é robusto e seletivo para o composto de interesse e que pode ser utilizado em substituição dos testes de identificação da farmacopeia.

## **2.2. Fraquezas**

### **2.2.1. Localização**

Os Laboratórios Basi localizam-se em Mortágua a cerca de 50 quilómetros de distância de Coimbra. A realização deste estágio só foi possível devido à utilização de transporte pessoal próprio, sendo as despesas também diminuídas com a partilha deste transporte com outro estagiário. A principal desvantagem desta distância era o tempo gasto diariamente em deslocação, que resultava em pouco tempo para trabalho pessoal após a chegada do estágio.

### **2.2.2. Acesso restrito**

Por medidas de segurança, a entrada no edifício dos LB, nos laboratórios, na zona de produção ou na zona de enchimento e acondicionamento tinha acesso restrito. Os funcionários deslocavam-se dentro das instalações consoante as autorizações que tinham no sistema, via impressão digital ou código pessoal. Este acesso não foi dado aos estagiários e por isso para entrar no edifício e sempre que fosse necessário deslocar para um desses locais, era necessário interromper o trabalho de algum funcionário.

### **2.2.3. Planificação do estágio**

A temática do estágio na qual me inscrevi foi “Validação de validades de fases móveis” sob a orientação de Dr.<sup>a</sup> Carla Gonçalves. Como se trata da realização de tarefas na zona de laboratório relativa à cromatografia gasosa, comecei por executar tarefas na zona FQ, para me ambientar ao dia-a-dia do laboratório de CQ. Para iniciar o que seria o meu tema de estágio, realizei validações de validades de padrões secundários de TLC e de seguida comecei a auxiliar na implementação do novo equipamento. Não realizei o meu tema de estágio, mas tive a oportunidade de realizar uma grande variedade de outras tarefas, tendo uma visão geral do trabalho realizado no laboratório de CQ em indústria farmacêutica.

## **2.3. Oportunidades**

### **2.3.1. Desenvolvimento pessoal na área de indústria farmacêutica**

Considero uma grande oportunidade ter realizado o estágio nos Laboratórios Basi, podendo consolidar a minha formação como farmacêutica e conhecer a realidade do mundo profissional em indústria farmacêutica. Este estágio permitiu-me conhecer o papel do farmacêutico na Indústria Farmacêutica e os departamentos em este pode ser inserido, pela

grande variedade de assuntos lecionadas durante o curso. Com este estágio tive ainda a oportunidade de consolidar e aplicar conhecimentos e aperfeiçoar as minhas competências na área de Controlo de Qualidade.

### **2.3.2. Participação na implementação de um novo equipamento**

Durante o meu estágio nos LB tive a grande oportunidade de participar na implementação de um novo equipamento, que só foi possível devido ao *timing* do meu estágio. Com isto, pude verificar como são implementados novos procedimentos dentro da indústria farmacêutica, com a criação de novos protocolos, procedimentos e autorizações que são necessárias realizar, desde a compra do equipamento até à sua utilização no dia-a-dia da empresa.

### **2.3.3. Integração dos conhecimentos**

Com este estágio pude verificar a aplicação de vários conhecimentos lecionados teoricamente e a grande importância de ter adquirido estes conhecimentos, pois eles estão presentes no dia-a-dia de uma empresa de indústria farmacêutica, como Assuntos Regulamentares do Medicamento, Tecnologia Farmacêutica e Gestão e Garantia da Qualidade. Verificar a aplicação destes conhecimentos num contexto prático ajudou-me a consolidar ainda mais a minha formação.

## **2.4. Ameaças**

### **2.4.1. Peso do farmacêutico em Controlo de Qualidade**

Uma das grandes ameaças que pude verificar, não só como estagiária, mas como possível saída profissional, é a grande variedade de cursos que podem ser inseridos na área de Controlo de Qualidade em indústria farmacêutica. Verifiquei que dentro do laboratório FQ, os analistas têm uma grande variedade de formações e o peso do farmacêutico é mais reduzido que noutros departamentos da empresa. Isto significa que se esta for uma área de interesse para a minha futura vida profissional, terei de ter em conta o elevado grau de competição para esta posição.



#### **2.4.2. Duração do estágio**

Graças à receptividade de toda a equipa do laboratório de FQ, a fase de adaptação e aquisição de conhecimentos foram rápidas, mas como a duração total do estágio foi de 3 meses, limitou o meu aproveitamento e a minha contribuição para a empresa, mesmo que a minha experiência tenha sido muito enriquecedora. A proposta de um novo plano de estudos do MICF que apresentasse uma duração do estágio curricular superior a 6 meses, permitiria dar uma componente prática da profissão de farmacêutico mais completa, que para além das componentes de Farmácia Comunitária e Farmácia Hospitalar, poderia incluir Indústria Farmacêutica.

### **3. Conclusão**

Em suma, este estágio possibilitou um grande desenvolvimento tanto a nível pessoal como a nível profissional, tendo sido uma experiência bastante desafiante e enriquecedora. Considero a minha prestação na execução das tarefas que me foram atribuídas positiva e espero que tenham sido uma mais valia para a empresa.

Durante estes 3 meses tive a oportunidade de acompanhar as tarefas executadas no laboratório de Físico-Química e ter uma visão geral do funcionamento de uma indústria farmacêutica. A realização deste estágio representa uma grande vantagem a nível de acesso a este mercado de trabalho, pela experiência e competências adquiridas e por isso tenho de agradecer novamente aos Laboratórios Basi e a toda a equipa com que trabalhei.

#### **4. Referências Bibliográficas**

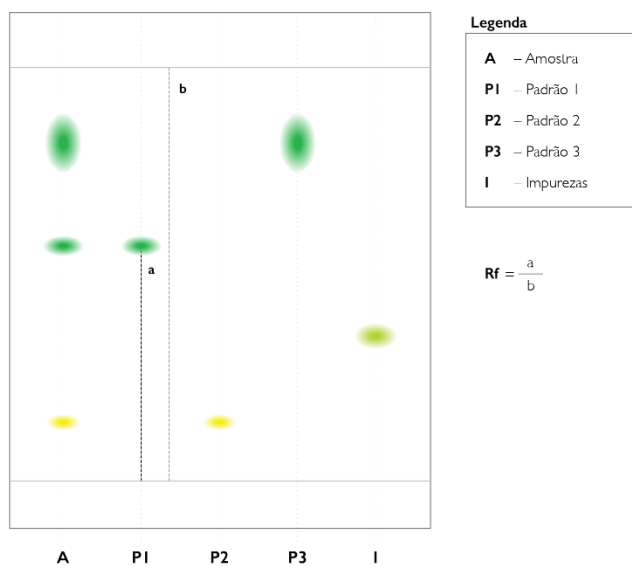
1) Laboratórios Basi – History – [Acedido a 10 de junho de 2018] Disponível na internet:  
<http://www.basi.pt/empresa/historia>

2) LinkedIn - Laboratórios Basi - [Acedido a 10 de junho de 2018] Disponível na internet:  
<https://www.linkedin.com/company/laboratorios-basi-industria-farmac-utica-sa>

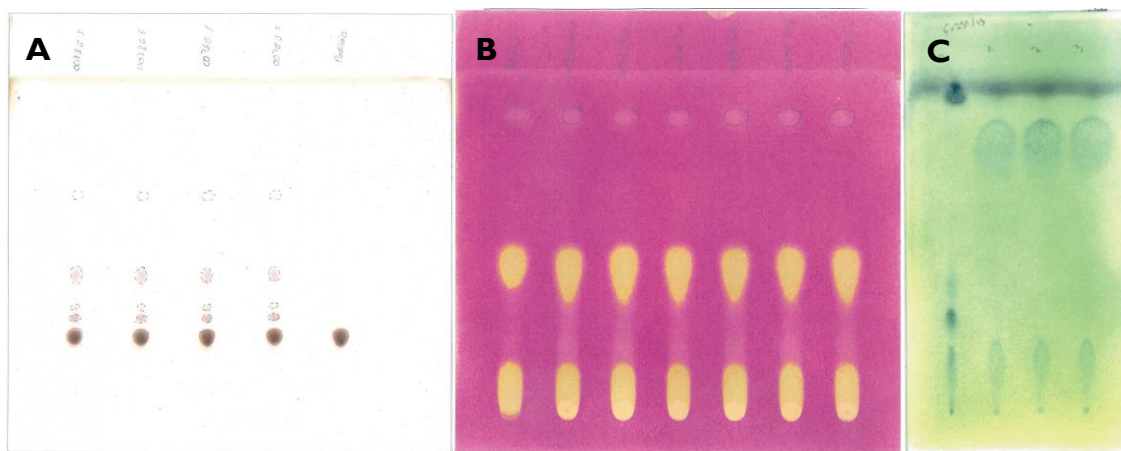
3) Infarmed, I.P. - Decreto-Lei n.º 69/2003, de 10 de Abril – Diário da República n.º 85/2003, Série I-A (2003), [Acedido a 15 de junho de 2018] Disponível na internet:  
[http://www.infarmed.pt/documents/15786/1067108/decreto\\_lei\\_69-2003.pdf](http://www.infarmed.pt/documents/15786/1067108/decreto_lei_69-2003.pdf)

4) Infarmed, I.P. - Decreto-Lei n.º 99/2000, de 30 de Maio - Diário da República n.º 125/2000, Série I-A (2000), [Acedido a 15 de junho de 2018] Disponível na internet:  
[http://www.infarmed.pt/documents/15786/1067108/decreto\\_lei\\_99-2000.pdf](http://www.infarmed.pt/documents/15786/1067108/decreto_lei_99-2000.pdf)

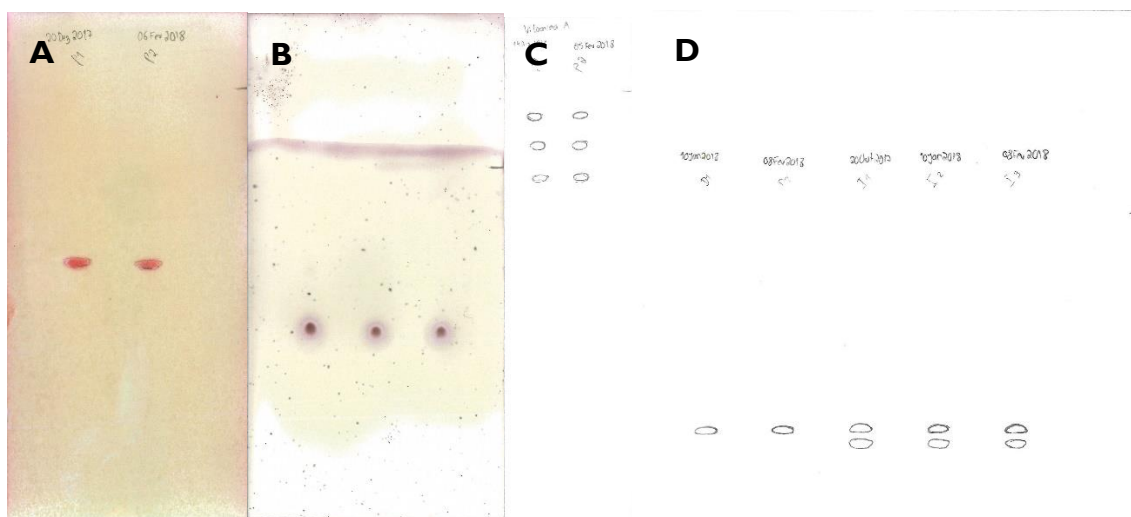
## 5. Anexos



**Figura 1.** Exemplo esquemático de cromatografia em camada fina e demonstração esquemática do Rf. Neste exemplo a amostra é constituída pelos compostos do padrão 1, padrão 2 e padrão 3 e com ausência da impureza.



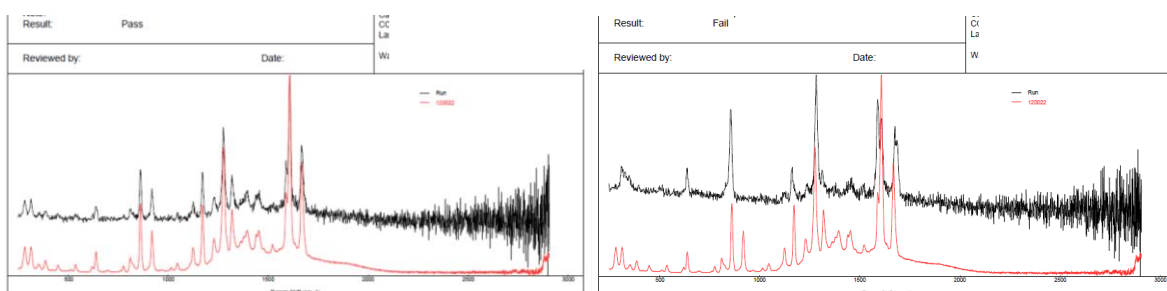
**Figura 2.** Utilização de cromatografia em camada fina em ensaios de identificação no laboratório de FQ. Em A e B as amostras são comparadas com padrões de referência para a identificação do/s composto/s. Em C as amostras são comparadas com uma impureza, que está presente em baixa quantidade ou ausente na amostra.



**Figura 3.** Utilização de cromatografia em camada fina para validação de validades de padrões secundários. As manchas obtidas tem que ter a mesma cor, forma e Rf para avaliar se os padrões estão conformes. A revelação dos resultado foi realizada através da utilização de um agente de revelação em A e B e luz UV em C e D.



**Figura 4.** Exemplo de uma assinatura obtida pelo equipamento de espectroscopia Raman para criação de um método.



**Figura 5.** Exemplo de uma análise utilizando o método já criado no equipamento de espectroscopia Raman. A vermelho é possível visualizar a assinatura do método criado e a preto o espectro obtido através do teste. Figura A mostra um resultado positivo e a figura B um resultado negativo.

# **CAPÍTULO 2**

**Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária**

**Farmácia Conímbriga**

## **Lista de Abreviaturas**

DCI – Denominação Comum Internacional

FC – Farmácia Conímbriga

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MSNRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

MSRM – Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

## **I. Introdução**

Este relatório foi realizado no âmbito do Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), em Farmácia Comunitária. O estágio teve lugar na Farmácia Conímbriga (FC), sob a orientação do Dr. Nelson Santos, entre 2 de abril de 2018 e 19 de junho de 2018.

A FC é uma farmácia comunitária localizada em São Fipo, Ega, reconhecida pelos seus utentes como uma farmácia de confiança. O principal objetivo da farmácia é prestar um serviço de qualidade com simpatia e profissionalismo. Deste modo, os farmacêuticos e técnicos de farmácia promovem o uso racional do medicamento tendo como objetivo a saúde e bem-estar do utente e a prevenção de doença.

A farmácia é um local de cedência de medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM), aconselhamento de medicamentos não sujeito a receita médica (MNSRM) e outros produtos de saúde, preparação de medicamentos manipulados e prestação de outros serviços de saúde.



## **2. Análise SWOT**

### **2.1. Pontos Fortes**

#### **2.1.1. Experiência prévia**

Muitas das dificuldades sentidas por grande parte dos estagiários em farmácia comunitária, foram atenuadas pela experiência prévia que tive neste campo. Após a realização de um estágio de verão na FC, e graças às habilitações obtidas na Licenciatura em Ciências Bioanalíticas, fui contratada para trabalhar na FC no decorrer do fim do meu ciclo de estudos em MICF. Considero uma grande vantagem para a minha formação académica ter recebido os conhecimentos teóricos do curso de MICF, ao mesmo tempo que os via serem aplicados na prática do dia-a-dia na farmácia, cimentando ainda mais os conhecimentos que obtive. Por outro lado, facilitou a minha integração no estágio por ter conhecimento prévio do funcionamento normal da farmácia, da sua organização e da sua equipa.

A minha experiência prévia foi uma grande mais valia para mim como estagiária e para o meu local de estágio, que deste modo conseguiu beneficiar mais das minhas capacidades como futura farmacêutica.

#### **2.1.2. Aprendizagem gradual durante o estágio**

Durante o meu estágio, e em complemento aos conhecimentos que fui adquirindo enquanto trabalhadora da FC, senti que pude consolidar gradualmente os conhecimentos teóricos obtidos durante o curso de MICF, assim como desenvolver novas competências e evoluir enquanto futura profissional. O trabalho de um farmacêutico numa farmácia comunitária é muito diversificado e com muitas vertentes, sendo necessária uma aprendizagem gradual do funcionamento geral da farmácia desde a receção de encomendas e a arrumação dos medicamentos, à devolução de produtos e controlo de prazos de validade, até à preparação de medicamentos manipulados, ao atendimento ao público, ao tratamento do receituário, passando posteriormente por tarefas tão distintas como a faturação e aspetos relacionados com a própria gestão da farmácia. Cada tarefa é muito distinta das outras, mas todas são essenciais para o bom funcionamento e organização da farmácia.

#### **2.1.3. Localização da Farmácia**

A farmácia Conímbriga está localizada em São Fipo, Ega, perto de Condeixa-a-Nova. Para além de ser relativamente perto de Coimbra, está perto da minha zona habitacional e

por isso tornou-se um ponto muito forte do meu estágio, tendo gasto relativamente pouco tempo em deslocação.

A FC não se encontra num centro urbano, tem poucas casas e edifícios nas proximidades, o que possibilita mais espaço para estacionamento dos veículos e mais clientes na farmácia. A localização é um dos fatores que permite à FC ter a grande afluência de clientes que tem. Para além de um ponto forte para mim como estagiária, a localização é um ponto forte da farmácia, permitindo enriquecer ainda mais a minha experiência.

#### **2.1.4. Equipa e integração**

Um dos pontos positivos do meu estágio na FC foi a excelente integração que tive na equipa, por já ter feito parte da mesma anteriormente. Como a fase de adaptação no estágio foi bastante curta, todo o trabalho executado por mim e pela equipa foi mais rentável, pois por um lado a equipa já sabia quais as minhas capacidades e competências e por outro eu já sabia as competências e as tarefas desempenhadas por cada um dos membros da equipa. De qualquer modo, qualquer membro da equipa estava sempre disponível para me auxiliar em qualquer dúvida que ocorresse, especialmente a nível do aconselhamento farmacêutico. Aprendi algo com todos os membros da equipa, completando ainda mais os meus conhecimentos e enriquecendo ainda mais a minha experiência de estágio.

A minha rápida integração na equipa permitiu que houvesse menos desperdício de tempo, facto este que se revelou bastante vantajoso para a farmácia, devido à sua elevada afluência de utentes, e permitiu um maior proveito das minhas competências e capacidades.

#### **2.1.5. Organização dos medicamentos**

A farmácia tem um nível de organização dos medicamentos que permite uma rápida aprendizagem e memorização da sua localização. Os medicamentos estão divididos em MSRM e MNSRM. Os MSRM estão organizados por forma farmacêutica, tais como, comprimidos e cápsulas, pós e granulados, pomadas e cremes, colírios, pomadas oftálmicas, tópicos, medicamentos veterinários, pós e suspensões para inalação, galénicos e psicotrópicos e estupefacientes. Os comprimidos e cápsulas estão ainda subdivididos em medicamento de referência e medicamentos genéricos. Todos eles, dentro dos seus devidos locais, estão ordenados por ordem alfabética do nome comercial ou DCI.

Para além de não necessitar de tanto tempo a procurar os medicamentos, devido à rápida memorização dos locais de arrumação, como estão organizados por MSRM e

MNSRM, quando era necessário aconselhamento farmacêutico, sabia quais os produtos que poderia aconselhar.

### **2.1.6. Tipo de utentes**

Como a FC não está localizada num centro urbano, a grande maioria dos clientes estão fidelizados à farmácia, são idosos e já têm historial na farmácia. Este tipo de clientes tornou o meu estágio muito mais desafiante porque com maior frequência os utentes procuram aconselhamento por parte do farmacêutico ou técnico de farmácia e valorizam a informação que lhes é transmitida, permitindo desenvolver as minhas competências a nível de aconselhamento terapêutico. Ter acesso à ficha de cliente de cada indivíduo, permite saber, qual o laboratório que costumam levar ou se existe alguma alteração na dose ou terapêutica, permitindo que o atendimento seja o mais completo possível. Como muita da população é idosa, acho essenciais estes pormenores, pois se o farmacêutico não se aperceber deles o mais provável é o utente realizar uma terapêutica que não era a pretendida, ou por exemplo, tomar medicação em duplicado por ter dois laboratórios diferentes do mesmo medicamento.

### **2.1.7. Receituário**

Atualmente, a grande maioria das receitas que chega à farmácia, incluindo à FC, são receitas eletrónicas ou sem papel devido à obrigatoriedade da sua introdução em 2015 [1]. No entanto, as receitas manuais, apesar de incomuns, vão aparecendo no dia-a-dia da farmácia. Com estas receitas é possível compreender assuntos, que são automáticos com a receita eletrónica, como os regimes de comparticipação e sistemas complementares. O valor da comparticipação altera-se consoante o regime de comparticipação e/ou a referência de despacho pela qual os medicamentos estão abrangidos, como diploma do Lúpus, Psoríase, doença de *Alzheimer*, doença de *Crohn*, entre outros [2]. Para além disso, verifiquei a existência de organismos de complementaridade ao Serviço Nacional de Saúde, que alteravam o valor da comparticipação dos medicamentos, como Eletricidade de Portugal-Sã Vida (EDP-Sã Vida), Serviços Assistência Médico-Sociais (SAMS), Serviços Sociais da Caixa Geral de Depósitos (SS-CGD), entre outros.

Graças à instituição das receitas eletrónicas, a farmácia gasta menos tempo na verificação do receituário ao fim do mês. Nas receitas manuais é necessário verificar data de

validade, medicamentos em receita e medicamentos dispensados ao utente, regime de comparticipação, assinatura do médico e vinhetas.

### **2.1.8. Preparação de medicamentos manipulados**

A preparação de medicamentos manipulados nas farmácias tem vindo a diminuir nos últimos anos, devido à produção de medicamentos pela indústria farmacêutica a baixo custo e aos elevados custos associados à sua produção em farmácia comunitária, referente a matérias-primas e tempo despendido pelos farmacêuticos na sua preparação. Por isso, considero um ponto forte a FC estar equipada com um laboratório funcional que permite a preparação de medicamentos manipulados. Durante o estágio tive a possibilidade de supervisionar e executar a preparação de medicamentos manipulados, tais como, solução alcoólica de ácido bórico à saturação, pomada de enxofre e solução alcoólica de iodo.

Acompanhei o preenchimento da ficha de preparação que garante a correta preparação do medicamento manipulado e o cálculo do preço dos medicamentos manipulados, através do preço das matérias-primas, embalagem e valor de honorários [3]. Pude constatar que o valor de honorários representa grande parte do custo total do medicamento manipulado, que considero ser devido ao valor e responsabilidade inerentes à sua preparação, bem como ao facto de cada vez mais farmácias abandonarem esta prática.

### **2.1.9. Oferta de outros serviços farmacêuticos**

A FC dispõe de uma grande diversidade de serviços que oferece à população, tais como consultas de nutrição, tratamentos de osteopatia, realização de testes bioquímicos (tensão arterial, glicemia e colesterol total), programa troca de seringas e aconselhamento veterinário com um veterinário sempre ao dispor. Ainda está disponível a administração de vacinas e injetáveis, quando está presente pelo menos um dos colaboradores com formação complementar para administração de vacinas não incluídas no Plano Nacional de Vacinação, segundo a Deliberação nº139/CD/2010 [4].

Este é um grande ponto forte da farmácia e que tornou a minha experiência muito mais enriquecedora, com um serviço para a população muito mais completo, uma maior relação de proximidade entre o utente e o farmacêutico e permitindo ao utente um maior controlo de algumas patologias crónicas.

## **2.2. Fraquezas**

### **2.2.1. Dificuldade no aconselhamento farmacêutico**

Embora a minha experiência prévia tenha atenuado em muito a minha dificuldade na realização de aconselhamentos terapêuticos, considero que esta capacidade é desenvolvida lentamente e com o tempo. Esta dificuldade centrava-se em áreas que não são tão abordadas no curso de MICF, como veterinária, mas que foram sendo ultrapassadas com o tempo e a realização de ações de formação.

A minha capacidade de aconselhamento farmacêutico evoluiu bastante e consegui executar aconselhamentos com grande à vontade e confiança, mas também considero que há sempre espaço para melhoria e, devido à evolução constante do conhecimento na área da saúde, o farmacêutico necessita de estar em constante atualização dos seus conhecimentos.

### **2.2.2. Comunicação e *soft skills***

Parte das dificuldades no aconselhamento terapêutico prende-se na comunicação e *soft skills*, isto é, saber transmitir conhecimentos que temos em termos que o utente em questão consiga entender para poder fazer a terapêutica corretamente. A comunicação é uma competência muito importante num farmacêutico, essencial na prática em farmácia comunitária e por vezes esquecida durante o ciclo de estudos. O MICF não tem uma componente prática na área da comunicação durante todo o ciclo de estudos e assim os estagiários ao chegarem à farmácia comunitária sentem esta dificuldade. É necessário saber comunicar corretamente, sem mostrar nenhuma inibição ou dúvida, pois muitas vezes a população é idosa ou com baixos níveis de escolaridade e qualquer dúvida ou indecisão pode por em causa a confiança que o utente tem no farmacêutico, sem que haja necessariamente falta de conhecimentos.

A minha experiência prévia permitiu-me ter menos dificuldades nesta área, mas não deixa de ser uma dificuldade que um estagiário sente ao chegar a uma farmácia comunitária.

### **2.2.3. Lacunas de MICF**

Existem algumas áreas em que senti mais dificuldades, que foram sendo atenuadas, por serem áreas pouco estudadas durante o decorrer do MICF. Pessoalmente as áreas em que senti maior dificuldade foram: veterinária, suplementos alimentares, dermofarmácia e puericultura. A dermofarmácia não considero que seja por falta de formação por parte do MICF, mas pela elevada quantidade de produtos e marcas que existem em farmácia. Em

veterinária, suplementos alimentares e puericultura, senti dificuldade quando o utente pedia aconselhamento sem ter algum produto específico em mente e esta dificuldade foi ultrapassada através de formações e através da prática que ia adquirindo a nível do aconselhamento farmacêutico, com a memorização das indicações terapêuticas de cada produto e dos produtos mais adequados para uma determinada situação clínica.

#### **2.2.4. Experiência prévia**

Considero que a minha experiência prévia em farmácia comunitária foi essencialmente um ponto forte a ter no meu estágio, embora reconheça que em certa medida se revelou também uma fraqueza. Uma vez que já tinha tido um contacto mais profundo com a realidade da farmácia comunitária, o estágio acabou por ser uma continuação do que já tinha realizado e aprendido e não uma nova experiência, como acaba por acontecer à grande maioria dos estagiários de MICF. Como já referi, considero que a capacidade de aconselhamento terapêutico evolui com o tempo e deste modo o estágio contribuiu bastante para que as minhas capacidades e competências continuassem a desenvolver-se. No entanto, relativamente a outras atividades, estas passaram a ser percecionadas por mim como conhecimentos adquiridos.

### **2.3. Oportunidades**

#### **2.3.1. Implementação do projeto *Kaizen***

*Kaizen* é uma palavra japonesa que significa “mudança para melhor”. A implementação do projeto *Kaizen* na FC tem como objetivo o aumento da eficiência de processos, reorganização de espaços e otimização de fluxo, de modo a aumentar o valor para o utente, melhorar resultados e eliminar perdas e desperdícios.

Sempre que ocorre uma reorganização de um espaço, a alteração de hábitos criados é difícil de realizar, sendo necessário grande esforço por parte de todos os intervenientes. Realizei o meu estágio na FC no início da implementação deste projeto e assim pude observar e fazer parte destas mudanças, como reuniões de equipa diárias com o suporte do quadro *Kaizen* e reorganização de espaços. A realização do estágio no momento da implementação deste projeto tornou a minha experiência ainda mais proveitosa e ganhei conhecimentos numa área fora do plano de estudos de MICF.

### **2.3.2. Flexibilidade de horário**

O meu orientador, Dr. Nelson Santos, concedeu-me a excelente oportunidade de poder fazer o horário que me era mais favorável. Por não ser finalista e ter realizado um estágio em indústria farmacêutica, se a questão da flexibilidade de horários não me tivesse sido facilitada, a conclusão do estágio e realização da monografia não teriam sido possíveis.

### **2.3.3. Sessões de formação externa**

Durante o meu estágio da FC tive a oportunidade de realizar duas formações externas. Uma formação promovida pela GlobalVet, LDA, tendo como tema “Protocolos de Aconselhamento - Casos Práticos”, realizada na ANF – Delegação Centro. Com esta formação tive a oportunidade de expandir os meus conhecimentos na área da medicina veterinária, área na qual tinha poucos conhecimentos, sendo realizada a resolução de vários casos práticos de vários animais para uma grande variedade de patologias.

Realizei também uma formação sobre Psoríase, onde fiquei a conhecer melhor a doença e a realidade para muitos doentes com esta patologia, que passa pela utilização crónica de corticosteroides, com todos os riscos associados. Esta formação dava a conhecer um novo produto, o Enstilar<sup>®</sup>, com uma forma farmacêutica inovadora que procura melhorar os resultados obtidos com a formulação utilizada no Daivobet<sup>®</sup>. Este produto é constituído por corticosteroides, para o tratamento dos sintomas, e análogos da vitamina D para controlo da patologia.

### **2.3.4. Sessões de formação interna**

Na FC tive a oportunidade de receber uma formação sobre a gama de produtos Psoriderm<sup>®</sup>, Psoriderm Sensitive<sup>®</sup> e Alpecin<sup>®</sup>. Considero este tipo de formações muito importantes para dar a conhecer aos farmacêuticos e técnicos de farmácia os produtos e as suas indicações, pois sem o conhecimento do produto e das suas propriedades não é possível fazer o seu aconselhamento aos utentes. A gama Psoriderm<sup>®</sup> contém ácido salicílico, estando indicada para a psoríase e para a dermatite seborreica. Hidrata intensamente a pele diminuindo os sintomas e o seu ressurgimento. A gama Psoriderm Sensitive<sup>®</sup>, ao contrário da gama Psoriderm<sup>®</sup>, não contém ácido salicílico e está indicada para a dermatite atópica e eczema, hidratando intensamente mesmo as peles mais sensíveis. O Alpecin<sup>®</sup> é um shampoo anti-descamação, que acalma e reestrutura o couro cabeludo,

podendo ser usado diariamente ao contrário de outros produtos para este efeito que têm uma frequência de utilização diária limitada e implicam a alternância com um champô suave.

## **2.4. Ameaças**

### **2.4.1. Pouca prática durante MICF**

Embora o estágio em farmácia comunitária seja o complemento perfeito para a formação de um aluno no MICF, a sua realização apenas no fim do curso aumenta as dificuldades que vão ser sentidas ao entrar no mercado de trabalho. Durante o curso de MICF, é adquirida uma elevada variedade de conhecimentos, abrangendo diversas áreas em que é necessário o papel de um farmacêutico e por isso considero o curso bastante completo, com a exceção da prática em farmácia comunitária. Esta componente prática seria importante para desenvolver competências na área da comunicação e do aconselhamento, que pela duração do estágio não conseguem ser desenvolvidas por completo.

### **2.4.2. Venda de MNRM fora das farmácias**

A venda de MNRM fora das farmácias deverá ser uma das grandes causas de diminuição de volume de vendas nas farmácias no futuro próximo. Ao ocorrer uma diminuição da carga de trabalho, pela diminuição de utentes na farmácia, isto poderá implicar uma diminuição na prática adquirida no decorrer do estágio em farmácia comunitária e, no futuro, maior dificuldade em entrar neste mercado de trabalho, devido à elevada competição.

## **3. Casos Práticos**

### **3.1. Tosse seca**

Durante o decorrer do estágio foram frequentes as situações em que os utentes procuravam aconselhamento para vários tipos de tosse. Comecei a aperceber-me que em certos casos os utentes queixam-se de tosse seca, não se tratando de facto de tosse seca e irritativa, mas sim de uma tosse produtiva sem conseguir libertar a expetoração. O correto questionamento do utente é essencial para efetuar o correto aconselhamento, pois os xaropes para tosse seca, como o Bisoltussin<sup>®</sup> Tosse Seca, são constituídos por antitússicos de ação central. Estes xaropes devem ser aconselhados com precaução pois sendo inibidores do reflexo da tosse ao nível do SNC, e sendo a tosse uma resposta de defesa do organismo para uma determinada agressão ou agente potencialmente perigoso, a sua inibição pode



trazer mais riscos que benefícios. Quando era este o caso, e percebia que o utente se referia como tosse seca a uma tosse produtiva em que apenas não conseguia libertar a expetoração, aconselhava acetilcisteína, um mucolítico e expetorante, que ajudaria a desfazer e eliminar o muco acumulado nas vias respiratórias, recomendando a toma de um comprimido efervescente por dia, de preferência à noite, advertindo que nos primeiros dias poderia sentir mais tosse.

### **3.2. Patologia oral em doentes imunodeprimidos**

Chegou à farmácia uma senhora cuja mãe fazia quimioterapia, com onze tratamentos realizados. A utente mencionou que a mãe tinha aftas e suspeitei tratar-se de candidíase oral, normal em doentes imunodeprimidos. Após colocar diversas questões, constatei que a doente já tomava Mycostatin® um antifúngico oral. A situação evoluiu e agora a doente apresentava feridas na boca, o que tornava difícil a ingestão de alimentos e bebida. Como se tratava de uma doente imunodeprimida e já tomava medicação para a candidíase oral, aconselhei o bucagel, um gel com efeito anestésico para aliviar a dor e assim facilitar ingestão de alimentos, no máximo de oito a dez aplicações por dia, e Eludril Classic®, duas a três vezes ao dia, um colutório constituído por clorhexidina, um antisséptico, e clorobutanol, um analgésico e calmante, para diminuir o risco de infeção já que o risco está acrescido em doentes imunodeprimidos.

#### **4. Conclusão**

A realização deste estágio permitiu-me evoluir bastante, tanto a nível pessoal como a nível profissional, tendo sido uma experiência bastante desafiante e enriquecedora. Consegui por em prática vários conhecimentos teóricos adquiridos durante o MICF e aplicá-los em contexto prático.

Tive a oportunidade de realizar uma grande variedade de tarefas onde o farmacêutico pode atuar em farmácia comunitária e desenvolver as minhas competências na área do aconselhamento terapêutico. Considero o aconselhamento terapêutico uma característica que distingue a farmácia comunitária, sendo que a farmácia não é só um local de dispensa de medicamentos, mas um local que procura a saúde e o bem-estar do utente, promovendo sempre o uso racional do medicamento. Este serviço é o que diferencia a farmácia comunitária de uma parafarmácia, no que toca à venda de MNSRM, pois o utente sabe que indo à farmácia tem um aconselhamento completo e seguro, com toda a responsabilidade que acarreta para o farmacêutico ou técnico de farmácia.

Considero a minha prestação durante o estágio na Farmácia Conímbriga positiva e foi um grande contributo para a minha formação como futura farmacêutica, com todos os conhecimentos e competências adquiridas.

## 5. Referência Bibliográficas

- 1) Ministério da Saúde - Portaria n.º 224/2015 de 27 de julho - Diário da República n.º 144/2015, Série I (2015), [Acedido a 17 de junho de 2018], disponível na Internet: <https://dre.pt/application/conteudo/69879391>
  
- 2) Infarmed, I.P – Regimes Excepcionais de Participação – [Acedido a 18 de junho de 2018], disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/regimes-excepcionais-de-comparticipacao>
  
- 3) Infarmed, I.P. – Portaria n.º 769/2004, de 1 de julho - Diário da República n.º 153/2004, Série I-B (2004), [Acedido a 11 de junho de 2018], disponível na Internet: [http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/portaria\\_769-2004.pdf/a0b1c512-ac77-42d4-9b06-8b1f3da9fb4d](http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/portaria_769-2004.pdf/a0b1c512-ac77-42d4-9b06-8b1f3da9fb4d)
  
- 4) Infarmed, I.P. - Deliberação n.º 139/CD/2010, de 21 de outubro - Infarmed (2010), [Acedido a 14 de junho de 2018], disponível na Internet: [http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/139\\_CD\\_2010.pdf/4d614fa9-63e0-4220-ad81-d8689829be6a](http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/139_CD_2010.pdf/4d614fa9-63e0-4220-ad81-d8689829be6a)

# **CAPÍTULO 3**

## **Monografía**

### **Neuroprotective effects of estradiol and its derivatives**

## Resumo

O estradiol é uma hormona esteroide sexual feminina, responsável pela manutenção das várias características sexuais secundárias em mulheres e pela regulação do sistema reprodutor feminino.

Recentemente, têm sido descobertos novos papéis do estradiol e dos seus derivados em vários tecidos do corpo humano, tanto em mulheres como em homens. O estradiol regula vários processos fisiológicos, incluindo processos no sistema nervoso central.

O estradiol também é produzido no cérebro e possui efeitos através de uma grande diversidade de mecanismos. Vários destes mecanismos conduzem à expressão de genes ou à sinalização intracelular, que confere proteção contra vários tipos de agressões nas células neuronais, incluindo doenças neurodegenerativas.

O estradiol e os derivados do estradiol demonstram efeitos neuroprotetores em modelos animais da doença de Alzheimer, através da inibição de vários mecanismos patológicos e indução de mecanismos neuroprotetores. Deste modo, a administração de fármacos capazes de estimular vias responsáveis por atividade estrogénica, poderá ser uma terapêutica alternativa para doentes com doença de Alzheimer. O DHED, é um pró-fármaco convertido em estradiol no cérebro e por isso tem efeito neuroprotetores sem causar efeitos sistémicos.

**Palavras-chave:** Estradiol, estrogénios, neuroprotecção, neurodegeneração, Doença de Alzheimer.

## **Abstract**

Estradiol is a female sex steroid hormone, responsible for the maintenance of various secondary sex characteristics in females and the regulation of the female reproductive system.

Recently, new roles of estradiol and its derivatives have been discovered in various tissues of the human body, in both women and men. Estradiol regulates various physiological processes, including processes in the central nervous system.

Estradiol is also produced in the brain and has its effects through a great diversity of mechanisms. Several of these mechanisms lead to gene expression or intracellular signalling, which confers protection against various types of neuronal cell injuries, including neurodegenerative diseases.

Estradiol and its derivatives exhibit neuroprotective effects in animal models of Alzheimer's disease, by inhibiting various pathological mechanisms and inducing neuroprotective mechanisms. Thus, the administration of drugs capable of stimulating pathways responsible for estrogenic activity may be an alternative therapy for patients with Alzheimer's disease. DHED is a prodrug converted to estradiol in the brain and therefore has neuroprotective effect without systemic effects.

**Keywords:** Estradiol, estrogens, neuroprotection, neurodegeneration, Alzheimer's disease.

## Abbreviations

AD – Alzheimer's disease

APP23 – Alzheimer's Disease animal model

APP23/Ar<sup>+/-</sup> – APP23 mice with aromatase gene knockout

A $\beta$  – Amyloid  $\beta$

BACE1 –  $\beta$ -secretase

BBB – Blood-brain barrier

E<sub>1</sub> – Estrone

E<sub>2</sub> – Estradiol

E<sub>3</sub> – Estriol

ER – Estrogen receptor

ERE – Estrogen-response element

GS-Rd – Ginsenoside Rd

IDE – Insulin-degrading enzyme

NEP – Neprilysin

NF- $\kappa$ B – Nuclear factor  $\kappa$ B

OVX – Ovariectomized

PS2 – Presenilin 2

ROS – Reactive oxidative species

WT – Wild-Type

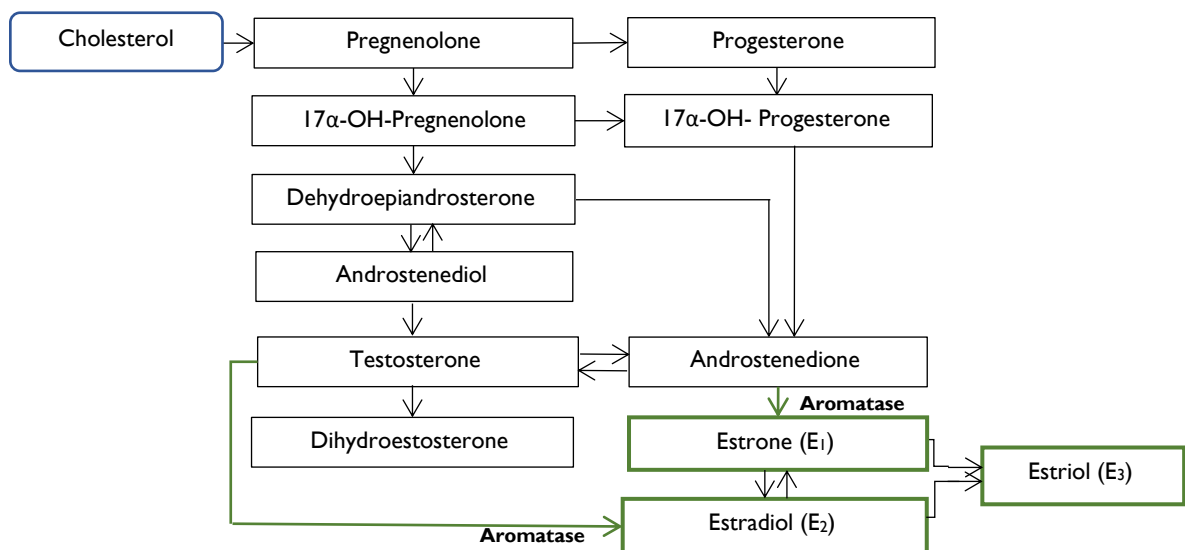
## I. Introduction

### I.1. Estradiol

Estradiol, or  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), is a steroid hormone responsible for several physiological processes. It's predominantly synthesized in the ovaries of premenopausal women being responsible for developing and maintaining reproductive tissues, inducing cell growth, proliferation and differentiation (MITRA, S., W., *et al.*, 2003; JIA, M., *et al.*, 2015). It also plays a role in nonreproductive functions, such as cardiovascular, skeletal and central nervous systems, and other physiological processes, for example, lipid and carbohydrate metabolism, skin physiology and electrolyte balance (MITRA, S., W., *et al.*, 2003; JIA, M., *et al.*, 2015; AREVALO, M., A., *et al.*, 2014).

$E_2$  helps the regulation of such variety of processes that it cannot be presented only as a female sex hormone. Men and postmenopausal women, that have a decline in estrogen production, synthesize estrogen in extragonadal tissues, such as mesenchymal cells in the adipose tissue, aortic smooth muscle cells, some brain regions, osteoblasts and chondrocytes. Most of the estrogen produced in these tissues, acts directly in those tissue resulting in low levels of estrogen being released into the plasma (JIA, M., *et al.*, 2015; VRTAČNIK, P., *et al.*, 2014).

$E_2$  is synthesized through a series of enzymatic reactions, starting with the conversion of cholesterol into pregnenolone in the mitochondria and ending with the conversion of testosterone (androgen) into estrogen by cytochrome P450 aromatase (Figure 1).



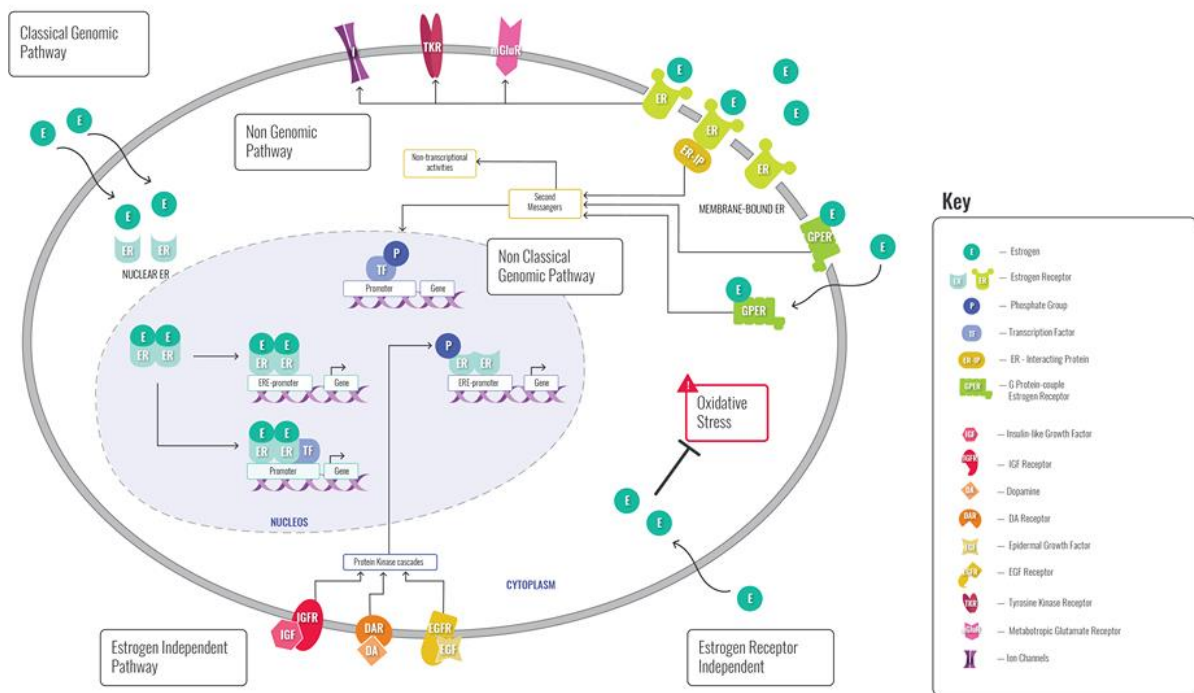
**Figure 1.** Schematic representation of steroidogenesis (Adapted from BREMER, A. A., *et al.*, 2014).



In premenopausal women this enzymatic process is performed completely in the ovaries. In men and postmenopausal women, one of C19 steroid precursor, such as testosterone, androstenedione, dehydroepiandrosterone sulfate and dehydroepiandrosterone, is needed to synthesize estrogen and the precursor used depends on the enzyme present in the extragonadal tissue (AREVALO, M., A., *et al.*, 2014).

## 1.2. Estrogens signalling

Estrogenic activity is mediated through different mechanisms that mainly involves the interaction with intracellular receptors part of the nuclear steroid/thyroid receptors superfamily, the estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) (HALL, J., M., *et al.*, 2001). The molecular mechanisms of estrogens signalling can be summarized in four pathways: classical genomic pathway, non-classical genomic pathway, non-genomic pathway and estrogen independent pathway. Estrogens also exhibit antioxidant activity, that does not need the interaction with ERs (Figure 2).



**Figure 2.** Schematic representation of the signalling pathway mediated by E2 and ERs (Adapted from CUI, J. *et al.*, 2013).

The classical genomic pathway involves the binding of estrogens to the ERs, that in the absence of hormone are sequestered by an inhibitory complex. The binding of estrogens to ERs causes a conformational change that enables dimerization, translocation to nucleus,

binding to estrogen-response element (ERE) and, in some cases, association of coregulator proteins to the dimers, to initiate gene expression.

Some estrogenic effects occur after a short period of time, and therefore cannot be due to gene expression nor protein synthesis. Non-genomic actions are the result of intracellular signalling and activation of protein-kinase cascades, such as cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and mitogen-activated protein kinase (MAPK). They are mostly associated with receptors present in the cell membrane or cytoplasm, for example G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER1), ER $\alpha$  and ER $\beta$ . These signalling pathways may lead to gene expression, representing the non-classical genomic pathway, that result from protein-protein interaction with transcription factors, with no translocation of ERs to the nucleus.

ERs can also be activated in the absence of estrogens through the phosphorylation of the receptor or association with its coregulators. The molecules responsible for ERs activation are regulators of the phosphorylation state in the cell, such as protein kinases or growth factors (PROKAI, L., *et al.*, 2007; VRTAČNIK, P., *et al.*, 2014).

### **1.3. Estrogens in the brain**

The brain is a steroidogenic organ, meaning that it expresses all the molecules and enzymes required to convert cholesterol into steroids. This way the brain receives sex steroids through the plasma and neurosteroids from neuronal cells. Estradiol synthesized in the brain can be the end product of steroidogenesis or a result from the conversion of circulating androgens (MELCANGI, R., C., *et al.*, 2006). Overall, the estradiol concentration will depend on the amount of circulating testosterone, especially in males, the amount of circulating estradiol, especially in females, but with cyclical changes, and the steroidogenic activity in the brain, that may vary due to different life conditions (AREVALO, M., A., *et al.*, 2014).

Both receptors, ER $\alpha$  or ER $\beta$ , are expressed in the brain. ER $\alpha$  is expressed in areas such as amygdala and hypothalamus and ER $\beta$  is expressed during hippocampal formation, cerebral cortex and thalamus (ZHAO, L., *et al.*, 2015).

Due to the ERs location in the brain, steroidal estrogens are responsible for numerous amounts of neurobiological pathways, such as feeding, sexual behaviour, depression, blood pressure, cognition, body temperature, stress, anxiety, locomotion and aggressiveness. Estrogens plasma levels do not greatly affect estrogens brain levels, but the decreased

production by gonadal tissues causes a compensatory adaptation on brain synthesis (MELCANGI, R., C., *et al.*, 2006).

#### **1.4. Neuroprotection**

Hormonal therapy in postmenopausal women, with estrogen-only or combined estrogen-progestin, is used to treat symptoms associated with menopause. Epidemiological analysis showed that these women presented improvement in cognitive skills, suggesting that estrogen may have neuroprotective activity. Animal studies showed that the absence or decrease of estradiol levels enhances brain damage under neurodegenerative diseases, and could be reverted with hormonal therapy with estradiol (AREVALO, M., A., *et al.*, 2014). In humans, lower levels of estradiol are associated with increased risk of cognitive impairment and enhanced development of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease (AREVALO, M., A., *et al.*, 2014; CHAKRABARTI, M., *et al.*, 2014).

$E_2$  is the most potent estrogen. Estrone ( $E_1$ ) and estriol ( $E_3$ ), two active metabolites, are less potent in binding the ERs. Estrogens and ERs agonists have neuroprotective effects, suggesting that part of their effect is through the interaction with the ERs and both  $ER\alpha$  and  $ER\beta$  show similar neuroprotective actions (CHAKRABARTI, M., *et al.*, 2014).

The activation of the ERs results, partly, in the activation of genomic pathways, affecting the expression levels of a great diversity of genes that are associated with neuroinflammation and neurodegeneration (CHAKRABARTI, M., *et al.*, 2014; PROKAI, L., *et al.*, 2007). ERs can also activate nongenomic signalling pathways that can lead to neuroprotection. Estradiol also has antioxidant activity that is independent of the presence of ERs. Therefore, estrogens give protection to a variety of cell types in the central nervous system, during chronic neurodegenerative diseases and acute brain cell injuries (PROKAI, L., *et al.*, 2007).

##### **1.4.1. Anti-inflammatory action**

The CNS is an immune privileged tissue, meaning that the peripheral immune cells do not have access to the brain and has resident immune cells to protect it against aggressions (CHAKRABARTI, M., *et al.*, 2014). In a healthy brain, microglia stay in a resting state, with ramified morphology and low expression levels of receptors in the membrane responsible for the immune response. Due to this morphology, microglia are the first line to sense any disturbance in the CNS and when activated, have phagocytic activity, engulfing cellular debris

and toxic molecules (VEGETO, E., *et al.*, 2008). If the CNS suffers a serious injury or infection, the microglia signals peripheral immune cells to form a stronger defence system. In response to potential danger, microglia synthesizes and releases inflammatory molecules, such as tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ ), reactive oxidative species (ROS), inflammatory cytokines and chemokines, alert brain and immune cells, clear waste in the parenchyma, repair the damage by providing nutrients to the affected cells and support neurogenesis and neuronal activity. These processes need to be well regulated with anti-inflammatory and pro-inflammatory molecules, because the persistent state of activation of microglia causes pathological consequences and the progression of many neurodegenerative diseases.

Microglia are immune cells involved in neurodegenerative diseases and estrogens play a role in its activity. Animal studies showed that young females mice had lower levels of induced neuroinflammation and ER $\alpha$  knockout female mice showed similar results to wild-type (WT) males. Estrogens and ERs regulate neuroinflammation and play a protective and anti-inflammatory role (VILLA, A., *et al.*, 2016) by suppressing microglia activation and recruitment of monocytes, and inhibiting the expression of pro-inflammatory mediators, such as cytokines, chemokines and nitric oxide synthase (iNOS) (CHAKRABARTI, M., *et al.*, 2014; STACEY, W., *et al.*, 2016).

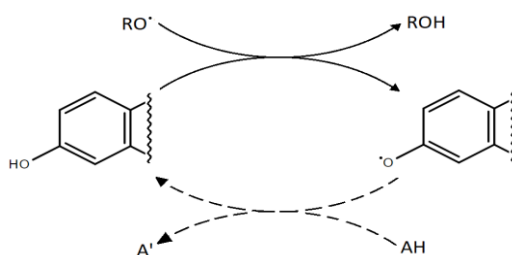
One of the genomic pathways that confers estrogens anti-inflammatory activity is the downregulation of pro-inflammatory genes. Estrogens control the localization of the nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in the cell, a protein that controls the expression of DNA, inhibiting its translocation to the nucleus and binding to gene promoters. Through this process, estrogens inhibit the expression of many genes, including pro-inflammatory genes, such as cyclooxygenase (COX) (HALL, J., M., *et al.*, 2001; VILLA, A., *et al.*, 2016). The overexpression of COX-2 contributes to neuronal death and high levels of COX-2 are found in post-mortem hippocampus of Alzheimer's disease patients (STACEY, W., *et al.*, 2016).

#### **1.4.2. Antioxidant action**

One of the causes of neuronal damage are free-radicals, which are associated with progression and development of neurodegenerative diseases. The brain is predisposed to oxidative stress and has insufficient antioxidant defence systems, so in the case of a neurodegenerative disease, the accumulation of ROS and the damage caused by oxidative stress are increased.

The cell membrane is composed by polyunsaturated fatty acids that can suffer peroxidation due to oxidative stress, decreasing membrane fluidity and disrupting membrane function. With the cell membrane compromised, the cell is unable to maintain the correct concentration of extracellular and intracellular ions, and the membrane proteins and enzymes can lose their function.

Estrogen is an antioxidant molecule, being able to scavenge free radicals and stop the free-radical chain reaction (Figure 3), as shown by the analysis of structure-activity relationship. However, it also has antioxidant activity through the activation of the ERs and increase of antioxidant enzymes expression levels (PROKAI, L., *et al.*, 2007).



**Figure 3.** Schematic representation of scavenging free radicals effect by steroidal estrogens (Adapted from PROKAI, L., *et al.*, 2007).

### 1.4.3. Neuronal cell survival

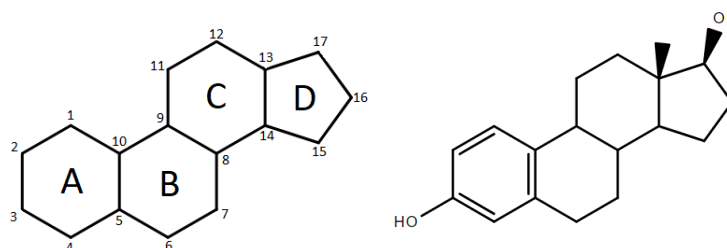
The interaction of estrogens with ERs also induces the expression of neurotrophic factors, such as nerve growth factor, neurotrophins 3 and 4, brain derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor I molecule that support cell growth, survival and differentiation.

Estrogens may play a role in regulating the apoptotic process, by inducing the expression of anti-apoptotic proteins, inhibiting the expression of apoptotic proteins and inducing the expression of caspases inhibitors. Estrogens also induce the expression of several genes that help sustain normal cellular architecture, such as neurofilaments (PROKAI, L., *et al.*, 2007).

### 1.5. Structure-activity relationship

The estrogenic activity results mainly from the interaction with ERs, meaning that the affinity to the receptor affects the overall activity. The most potent activator of ERs, of all endogenous estrogens, is 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>). Through molecular engineering, small substituents can be added to enhance ERs affinity. With polar substituents, the molecule loses its affinity to the ERs, but adding small hydrophobic substituents in positions 4, 12 $\beta$ , 14,

and  $16\alpha$  enhance affinity to the receptor and larger hydrophobic groups are tolerable at positions  $7\alpha$ ,  $11\beta$ , and  $17\alpha$  (Figure 4).



**Figure 4.** Schematic representation of the basic steroid hormone ring system and estradiol molecule (Adapted from MORINAGA, A., *et al.*, 2011).

$17\beta$ -Estradiol and its analogues also act as a phenolic antioxidant, transferring the hydrogen (H) atom and interrupting free radical chain reactions (Figure 3), including lipid peroxidation. Estradiol derivatives with a phenolic A ring,  $17\beta$ -E<sub>2</sub>,  $17\alpha$ -E<sub>2</sub>, estrone (E<sub>1</sub>), estriol (E<sub>3</sub>) and ethinylestradiol (EE), have neuroprotective activity and other steroid molecules without a phenolic A ring, such as testosterone, dihydrotestosterone, progesterone and cholesterol, are inactive. The phenolic A ring is essential to have neuroprotective activity.

Electron donating substituents in the phenolic A ring (alkyl, alkenyl, cycloalkyl, arylalkyl), in the positions 2- and 4-, increase neuroprotection activity, by weakening the phenolic bond and stabilizing the radical phenoxyl. The presence of a hydroxyl group in B or C rings completely eliminates the neuroprotective activity, because it might affect the phenolic bond or change the lipophilicity properties. The presence of double bonds B or C rings increased the neuroprotective activity. The etherification at the position  $17\beta$  with an alkyl straight chain, with three or more carbon atoms, increased neuroprotective activity.

Estrogen analogues and derivatives with lipophilic substituents have higher distribution in the membrane that permits greater activity exerted by the molecule, than those with hydrophilic substituents. Enhancing antioxidant activity, by adding substituents, can decrease ERs affinity and this way avoid feminizing effects (PROKAI, L., *et al.*, 2007).

## 1.6. Future therapeutics for neurodegenerative pathologies

There are many possible candidates for neurodegenerative pathologies' therapy, involving estrogens and estrogen activity.

One of the possible therapies suggests the use of molecules capable of increasing estradiol synthesis in the nervous system. Peripheral Benzodiazepine Receptor (PBR), present in the outer membrane of mitochondria, together with steroidogenic acute

regulatory protein (StAR), promotes the translocation of cholesterol to the inner corner of the mitochondria, a key step to the steroidogenesis. PBR has neuroprotective effects, but also increases steroid synthesis in various tissues (AREVALO, M., A., *et al.*, 2014).

Other alternative to neurodegenerative diseases therapeutics is the use of molecules that are able to reduce oxidative stress and this way reduce lipid peroxidation. The concentration needed to inhibit lipid peroxidation is higher than the ones needed to have neuroprotective effects, suggesting that this process is only one of the mechanisms for neuroprotection (PROKAI, L., *et al.*, 2007).

There are studies to develop neuroprotective estrogen analogues or derivatives that do not impact tissues other than the nervous system, eliminating the side effects associated with chronic estrogen therapy and permitting the administration in women and men.

Selective ER modulators (SERMs) are competitive partial agonists of ERs and are able to inhibit or induce estrogen activity depending on the tissue. Examples of SERMs are tamoxifen, raloxifene, bazedoxifene and genistein, which have shown neuroprotective effects. Because they are not ER agonists, they can avoid feminizing effects and specifically target the CNS (AREVALO, M., A., *et al.*, 2014; CHAKRABARTI, M., *et al.*, 2014).

### **1.7. Alzheimer's disease**

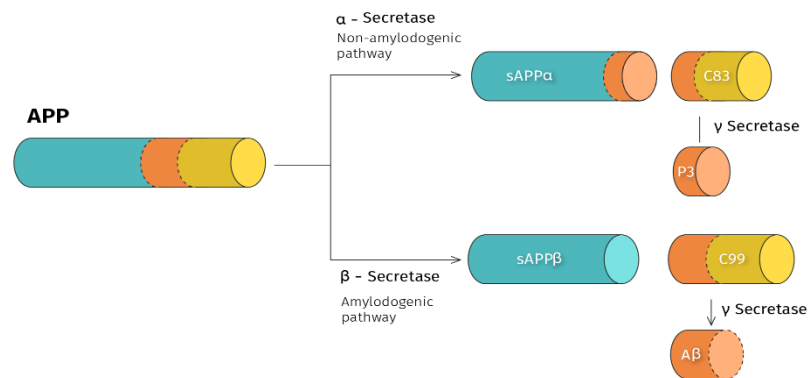
Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder of the central nervous system that affects millions of people worldwide. It is a type of dementia characterized by a wide range of cognitive dysfunctions such as memory loss, compromised reasoning, decreased decision-making, impairment of visual-spatial perception as well as behaviour disturbances, that progresses over time and ends up interfering with the execution of normal daily tasks (CHAKRABARTI, M., *et al.*, 2014; ZHAO, L., *et al.*, 2015).

There are two types of AD, early-onset AD, when the patient has less than 65 years old, and late onset AD, when patients are older than 65 years, being the latter the most common and representing 90% of the cases. Early-onset AD is related to altered genetic background, such as mutations in amyloid precursor protein (APP), presenilin 1 (PSEN1) and presenilin 2 (PSEN2) genes. There are no evident causes for late-onset AD, but there are risk factors, for example, the presence of APOE  $\epsilon$ 4 allele and several life style factors (GONZÁLEZ-REYES, R., E., *et al.*, 2017).

AD pathology is characterized by the presence of extracellular amyloid beta ( $A\beta$ ) plaques, intraneuronal neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated TAU,

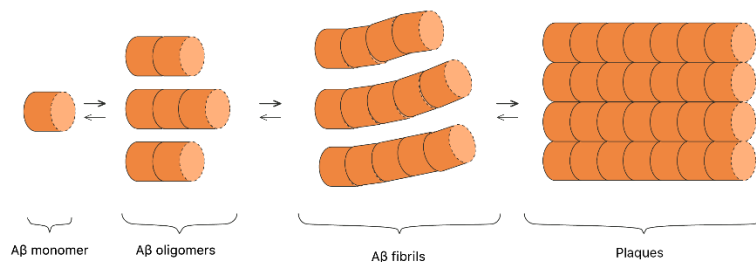
neurodegeneration (ZHAO, L., *et al.*, 2015), brain atrophy starting in the hippocampus (CHAKRABARTI, M., *et al.*, 2014), and neuroinflammation, with increased production of cytokines, chemokines and proteins of the complement system (VEGETO, E., *et al.*, 2008).

A $\beta$  is obtained through the cleavage of APP by  $\beta$ -secretase (BACE-1) and  $\gamma$ -secretase complex, also known as the amyloidogenic pathway (YUE, X., *et al.*, 2005). APP can also be cleaved by  $\alpha$ -secretase and  $\gamma$ -secretase complex, that does not form A $\beta$ , known as the non-amyloidogenic pathway and forms sAPP $\alpha$  (YAN, X. *et al.*, 2017).  $\gamma$ -secretase complex is responsible for cleaving the product of  $\alpha$ -secretase or  $\beta$ -secretase cleavage, being part of both amyloidogenic and non-amyloidogenic pathways (Figure 5).



**Figure 5.** Schematic representation of APP processing (Adapted from DEL PRETE, D, *et al.*, 2014).

Presenilin 2 (PS2) is one subunit of  $\gamma$ -secretase and a mutation in its gene causes a disruption in APP processing, that leads to the formation of A $\beta$  with higher molecular weight, increasing A $\beta$  toxicity and causing early-onset autosomal dominant Alzheimer's disease (AD) (MARÍN-MUÑOZ, J., *et al.*, 2016).



**Figure 6.** Schematic representation of A $\beta$  aggregation (Adapted from NIE, Q., *et al.*, 2011).

A $\beta$  monomers tend to aggregate forming progressively larger molecules: oligomers, fibrils and plaques (Figure 6). A $\beta$  interacts with a great variety of receptors that can induce neurotoxicity, activation of the immune cells in the brain leading to neuroinflammation, release of proinflammatory molecules, such as interleukins, nitric oxide (NO) and TNF $\alpha$ . The activation of NF- $\kappa$ B may be involved in the expression of these genes.



The mechanism of Alzheimer's disease progression and consequent neuronal cell death is still unknown, but there are hypothesis, including the amyloid hypothesis, that supports that the abnormal production and deposition of A $\beta$  is the main trigger to neurodegeneration in AD (VEGETO, E., *et al.*, 2008).

Estrogen plays a role in preventing the development of neurodegenerative diseases, including AD. AD patients have significantly lower levels of total and free estrogen in the brain that are associated with a reduction in the expression of the aromatase gene when compared to non-AD patients brains (YUE, X., *et al.*, 2005).

Genetic variances in the aromatase gene may result in a decrease of estradiol synthesis in the brain, that associated with menopause, increases the risk of developing Alzheimer's disease (AREVALO, M., A., *et al.*, 2014). Polymorphisms or decreased expression of ER $\beta$  are associated with the development of AD pathology. Cells become more vulnerable to A $\beta$ , causing the reduction of mitochondrial function and increase of oxidative stress. The overexpression of the ER $\beta$  is also associated with the protection of neuronal cells against A $\beta$  toxicity and the activation of pathways responsible for cell survival (LEVINTA, A., 2016).

AD is an irreversible disease with no pharmacological solutions for its prevention or cure. Current treatments, only slow the progression of the symptoms. It is, therefore, very important to discover new molecules that offer better therapeutic outcomes to AD's patients (CHAKRABARTI, M., *et al.*, 2014).

## **2. The effects of estrogen in Alzheimer's disease pathology**

### **2.1. APP processing $\beta$ -secretase activity**

A $\beta$  is formed through the cleavage of APP by  $\beta$ -secretase (BACE1) and  $\gamma$ -secretase, known as amyloidogenic pathway (Figure 5). The effect of the absence of estrogen in APP processing can be measured through the analysis of the protein levels and enzymatic activity of BACE1, and the levels of A $\beta$ .

The enzymatic activity and protein levels of BACE1 are elevated in APP23/Ar<sup>+/-</sup> mice, such that they are higher than the WT and APP23 mice with 3 and 6 months. By 12 months old, the enzymatic activity of BACE1 continues elevated but the protein levels decrease to values similar with WT and APP23 mice. The increase in the enzymatic activity of BACE1, results in the increase of A $\beta$  formation and aggregation, accelerating the formation of A $\beta$  plaques (YUE, X., *et al.*, 2005).

PS2 mutant mice also have increased memory impairment when compared to non-mutated mice which is aggravated in the absence of estrogen. A $\beta$  levels are also higher in OVX PS2 mice than in PS2 mice, suggesting that the absence of estrogen contributes to A $\beta$  accumulation and AD pathology. PS2 mutation and the absence of estrogen induce NF- $\kappa$ B activation, and gene expression, including BACE1. Adding  $\beta$ -estradiol to the treatment, inhibits NF- $\kappa$ B activation and its binding activity, reducing BACE1 expression and amyloidogenesis (HWANG, C., H., *et al.*, 2016).

## **2.2. APP processing $\alpha$ -secretase activity**

Ginsenoside Rd (GS-Rd) is used to evaluate APP processing, since it has estrogenic activity through the phosphorylation of Ser118 residue in ER $\alpha$ , activating the receptor and affecting APP metabolism.

APP is also cleaved by  $\alpha$ -secretase and  $\gamma$ -secretase, known as the non-amyloidogenic pathway, that does not form A $\beta$  responsible for AD neuropathology, but forms other proteins, such as sAPP $\alpha$  (Figure 5). OVX mice have higher A $\beta$  levels and the same sAPP $\alpha$  levels as the control group and adding GS-Rd to the treatment results in a decrease of A $\beta$  levels and an increase sAPP $\alpha$  levels.

GS-Rd affects the levels of both products of both pathways, amyloidogenic and non-amyloidogenic, and it is a result of an increase in the expression of  $\alpha$ -secretase and a decrease in the expression of  $\beta$ -secretase. The presence of MAPK, PI3K and ER inhibitors revert the effects of GS-Rd on the expression level of both enzymes, suggesting that these signalling pathways are involved in the estrogenic activity.

The activation of the ER by GS-Rd does not alter the protein levels of the key factors of the MAPK and PI3K pathways, ERK and AKT respectively, but increases the phosphorylated active forms, p-AKT and p-ERK. The presence of ER antagonists returns the levels of the phosphorylated forms back to normal, suggesting that these pathways were enhanced through estrogenic activity (YAN, X. *et al.*, 2017).

## **2.3. A $\beta$ enzymatic degradation**

When compared to the WT mice, APP23 Ar<sup>+/-</sup> mice have lower expression levels of A $\beta$  degrading enzymes in the brain, including neprilysin (NEP) and insulin-degrading enzyme (IDE) (YUE, X., *et al.*, 2005). OVX mice infused with A $\beta$ , also show lower levels of neprilysin-

positive cells, lower NED activity, as well as lower expression levels of NED and IDE, when compared to a control group that has estrogen activity (YUN, J., *et al.*, 2018).

#### **2.4. Formation of A $\beta$ plaques**

The formation of A $\beta$  plaques is one of the main markers of Alzheimer's Disease and results from the aggregation of extracellular A $\beta$ . By 6 months of age, APP23/Ar<sup>+/-</sup> mice are the only ones that develop A $\beta$  plaques in cerebral cortex and hippocampus, with 30-40% of the population affected. The control groups, APP23 and OVX APP23, do not have any signs of the formation of A $\beta$  plaque. By 12 months, all mice develop A $\beta$  plaques but plaque pathology is more advanced in APP23/Ar<sup>+/-</sup> mice, with qualitatively greater size and density (YUE, X., *et al.*, 2005).

#### **2.5. Formation of A $\beta$ fibrils oligomers and formation, extension and destabilization of A $\beta$ fibrils**

After the formation of great quantities of A $\beta$  protein, A $\beta$  tends to aggregate and form compounds that increase in size, from oligomers, to fibrils and finally to plaques, that are one of the main markers of AD pathology (Figure 6). In vitro, A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 exist in a mixture of monomers and oligomers, and A $\beta$  42 tends to form oligomers with higher molecular weight. A $\beta$  oligomer formation is greatly inhibited in the presence of estrogens and the oligomers formed have lower molecular weight, meaning that they are formed by less A $\beta$  monomers. Estriol (E3) is the most effective in blocking oligomer formation, being almost capable of completely blocking A $\beta$  oligomerization (MORINAGA, A., *et al.*, 2011).

The incubation of A $\beta$ 42 or A $\beta$ 40 results in the formation of A $\beta$  fibrils, that is attenuated in the presence of E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> or E<sub>3</sub>, in a dose-dependent manner. The incubation of A $\beta$  fibrils with the respective monomer induces the extension of A $\beta$  fibrils, but the presence of E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> or E<sub>3</sub>, inhibits this extension, by decreasing the equilibrium level. Adding E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> or E<sub>3</sub> to a mixture of A $\beta$  fibrils results in an immediate decrease of the levels of A $\beta$  fibrils, meaning that they also destabilize preformed A $\beta$  fibrils (MORINAGA, A., *et al.*, 2007).

#### **2.6. Uptake of A $\beta$ by microglia**

In the AD brain, activated microglia are concentrated in regions of amyloid deposits and due to their phagocytotic activity they play a role in A $\beta$  clearance. Analysing intracellular

A $\beta$  using human primary microglial cultures in the presence or absence of estrogen was able to A $\beta$  internalization. In absence of estrogen it was observed the basal levels of A $\beta$  internalization by microglia. However the presence of estrogen results in a significant increase of A $\beta$  internalization and more cells actively internalized A $\beta$  in a dose and time dependent manner. The use of ER antagonists in the treatment reduce the estrogen effect of enhanced A $\beta$  uptake but it is not totally eliminated (LI, R., *et al.*, 2000).

As demonstrated in the in vitro study, estrogen deficiency also decreases A $\beta$  clearance by microglia, with less activated microglia surrounding the plaques, in APP23 Ar<sup>+/-</sup> mice when compared to WT mice. Adding 17 $\beta$ -estradiol returns the A $\beta$  clearance levels by microglia back to normal and using an ER antagonist, only partly blocked the protective effect of estrogen (YUE, X., *et al.*, 2005).

## 2.7. Neuroinflammation

Estrogen has anti-inflammatory effect in microglia and the use of an ER antagonist reverts the protective effect of estrogen, suggesting that the anti-inflammatory effect is mediated through the interaction with ERs (VEGETO, E., *ET AL.*, 2008).

A $\beta$  induces the expression of genes responsible for astrocytes and microglia activation, such as COX-2, iNOS, glial fibrillary acidic protein and ionized calcium binding adaptor molecule 1, and the absence of estrogen exacerbates the expression levels of these proteins, in OVX mice when compared to a control group (YUN, J., *et al.*, 2018).

## 2.8. Neuronal cell death

The infusion of A $\beta$ 42 causes apoptosis in neuronal cells of mice and the level of apoptosis was higher in OVX PS2 mutant mice than in normal PS2 mutant mice, with an increase in number of apoptotic cells and decrease in number of surviving neuronal cells in the absence of estrogen (HWANG, C., H., *et al.*, 2016). The same results are obtained with the infusion of A $\beta$  in OVX mice and a control group. OVX mice infused with A $\beta$  have higher number of apoptotic cells and lower number of surviving neuronal cells.

In vitro studies showed the same results. Adding  $\beta$ -estradiol to neuronal cells treated with A $\beta$ , attenuates neuronal cell death and lowers the expression of proteins related to cell death.  $\beta$ -Estradiol may regulate the expression levels of certain genes, including pro-apoptotic genes, through the suppression of NF- $\kappa$ B activation and translocation to the

nucleus. Adding the SERM tamoxifen decreases  $\beta$ -estradiol protective effect, inhibiting the reduction of neuronal cell death and inhibiting the reduction of the expression of proteins related to cell death (YUN, J., *et al.*, 2018).

## **2.9. Oxidative stress and glucose transport into the brain**

The accumulation of  $A\beta$  causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction, which results in neuronal cell death. The presence of  $E_2$  attenuates the generation of ROS in response to an insult of  $A\beta$ , especially cells pre-treated with in  $E_2$ . The addition of an ER antagonist reverts the neuroprotective effect of  $E_2$  (COSTA, A., R., *et al.*, 2016).

OVX mice show a decline in cerebral metabolism that may be due to a deregulation of a great variety of mechanisms, such as glucose transport, ATP generation, mitochondrial capacity and glycolysis. The expression of specific glucose transporters of the blood-brain barrier (BBB) decreases in the absence of  $E_2$ , as verified in OVX mice, that is reverted with the addition of  $E_2$  to the treatment.  $E_2$  also as an effect in the expression of other glucose transporters in endothelial cells and neurons.

The decrease in glucose uptake is not totally reverted with  $E_2$  treatment, suggesting that other mechanisms are involved. OVX mice also show a decline in the expression and activity of hexokinase type II, an enzyme responsible for glucose phosphorylation and essential to glycolysis, and the addition of  $E_2$  to the treatment only partially reverted the protein expression (DING, F. *et al.*, 2013).

## **2.10. Discussion of the effects of estrogen in Alzheimer's Disease**

Estrogens decrease the level of  $A\beta$  production through the inhibition of BACE1, one of the enzymes responsible for the amyloidogenic pathway (YUE, X., *et al.*, 2005; HWANG, C., H., *et al.*, 2016). The interaction of estrogens with the ERs inhibits NF- $\kappa$ B activation and translocation to the nucleus, reducing BACE1 expression (HWANG, C., H., *et al.*, 2016).

Through the interaction and activation of ERs, estrogens also increases the levels of the phosphorylated forms of key factors of the MAPK and PI3K pathways, that result in an increased expression levels of  $\alpha$ -secretase and a decrease in the expression levels of  $\beta$ -secretase. (YAN, X. *et al.*, 2017).

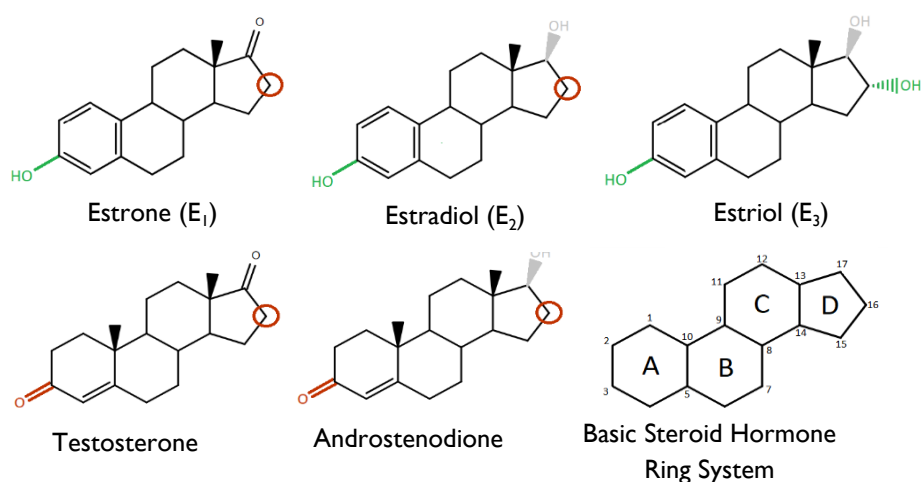
Estrogens have an impact in the expression levels of  $A\beta$  degrading enzymes and pro-apoptotic proteins. Thus, in absence of estrogens there is a decrease in  $A\beta$  degradation and an increase in neuronal cell death (YUN, J., *et al.*, 2018; HWANG, C., H., *et al.*, 2016). With

more NF- $\kappa$ B being translocated to the nucleus in the absence of estrogens, there is an increase in gene transcription, namely genes involved in immune responses, apoptosis and inflammation, being expressed (HWANG, C., H., *et al.*, 2016).

Estrogens enhances A $\beta$  internalization by microglia and it has its effects mainly through the interaction with ERs in the membrane, but also through other mechanisms (LI, R., *et al.*, 2000; YUE, X., *et al.*, 2005).

E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> or E<sub>3</sub> can inhibit the oligomerization of A $\beta$ , the formation an extension of fibrils as well as promote the destabilization of preformed fibrils, being estriol the most active of all hormones. Estrogens may bind to the ends of extending fibrils, destabilizing the A $\beta$  that was just incorporated and increasing the rate of depolymerization. Estrogens may also bind to A $\beta$  monomers, decreasing the rate of polymerization. Sexual steroids have hydrophilic and hydrophobic domains, and the balance of these domains may affect the ability and propensity to bind certain sites of A $\beta$ .

In structure–activity relationships, the hydroxyl group at the C<sub>3</sub> position on the A ring of E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> and E<sub>3</sub> seems to be crucial for the anti-amyloidogenic effects. AND and TEST do not have the hydroxyl group at the C<sub>3</sub> position, doesn't exhibit a great anti-amyloidogenic effect. On the other hand, the hydroxyl group at C<sub>17</sub> (D ring), present in E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub> and TES, seem to have a non-significant role on their activities. On the contrary, the group in the C<sub>16</sub> position on the D ring is only present in E<sub>3</sub> and it might give stronger activity when compared to E<sub>2</sub> and E<sub>1</sub>. In conclusion, 3-hydroxyl group seems to be essential for the anti-amyloidogenic effect and the 16-hydroxyl group contributes for stronger activity (MORINAGA, A., *et al.*, 2007; MORINAGA, A., *et al.*, 2011) (Figure 7).



**Figure 7.** Schematic representation of steroids structures, highlighting the groups responsible for activity (green) (Adapted from MORINAGA, A., *et al.*, 2011).

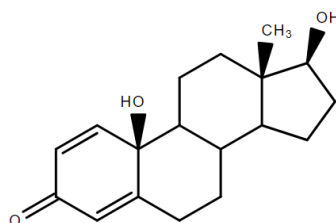
Through the interaction with an ER, estrogen reduces the production of ROS in response to an insult of A $\beta$  and is more relevant in cells pre-treated with estrogen (COSTA, A., R., *et al.*, 2016).

The absence of estrogen results in lower levels of glucose transporters in the BBB and lower levels of expression and activity of hexokinase type II, resulting in a decrease of the transport glucose into the brain and a decrease the fixation and consumption in the cells, contributing to the decline of cerebral metabolism, one marker of AD (DING, F. *et al.*, 2013).

### 3. New therapeutics

#### 3.1. DHED, a brain selective prodrug

10 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihydroxyestra-1,4-diene-3-one (DHED) (Figure 8) is a bioprecursor prodrug converted to E<sub>2</sub> through the reduction by a dehydrogenase/reductase enzyme, NADPH-dependent.



**Figure 8.** Schematic representation of DHED (Adapted from PROKAI, L., *et al.*, 2015).

After the injection in OVX rats, DHED is rapidly converted into E<sub>2</sub> in various brain regions, such as cortex, hippocampus and hypothalamus, without the formation of E<sub>2</sub> in the other tissues, including the uterus. The treated animals had no side effects characteristic to E<sub>2</sub> exposure and DHED did not stimulate the growth of breast cancer cells.

DHED is actually more potent to distribute E<sub>2</sub> into the brain than direct E<sub>2</sub> administration, that needed 10 times the dose to obtain the same results in animals with ischemic injury. In consonance with the mechanisms of estrogens neuroprotective activity, DHED activity is highly mediated by the interaction with ERs in the brain and the presence of ER antagonists reverted the protective effects (PROKAI, L., *et al.*, 2015).

Female OVX AD animal models treated with DHED showed lower levels of APP, A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42, when compared to animals treated with vehicle. In the behavioural test, transgenic AD animal models treated with DHED have the better results than animals treated with vehicle, with lower number of trials to perform a certain task in a course of 3

days, having more ability to learn a task, equal to that found in non-transgenic animal models. The chronic treatment with DHED does not stimulate estrogen-sensitive tissues, having no uterotrophic side-effects nor growth of breast cancer cells. Some effects are more accentuated in OVX than in intact animals, due to the presence of progesterone, also referred as to have neuroprotective effects. DHED and E<sub>2</sub> treatments, do not affect the deposition of A $\beta$  in pre-formed plaques, but prevents the formation of new plaques and inhibits the oligomerization of A $\beta$  (TSCHIFFELY, A., E., *et al.*, 2016).

The same results are obtained in male AD animal models treated with DHED, showing lower levels of APP, A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42, and better results in the behavioural test, than in animals treated with vehicle, with no peripheral exposure that would result in feminizing effects in male animals. The APP levels were reduced to the same levels of non-transgenic animal groups, but DHED dosage needs to be carefully determined. APP is a protein related to synaptic plasticity and synaptogenesis and having its levels highly reduced could result in negative effects.

The E<sub>2</sub> treatments in male animals was ineffective when compared to female animals, that are more responsive to the neuroprotective effects of E<sub>2</sub>. DHED improved the response in male animals, proving that it has neuroprotective effects in both genders (TSCHIFFELY, A., E., *et al.*, 2018).

The great advantage of DHED is its selectivity to the brain, with low peripheral hormone exposure, that is inevitable in E<sub>2</sub> direct administration, and its effectivity in lowering the levels of APP and A $\beta$  with improved cognitive behaviour (TSCHIFFELY, A., E., *et al.*, 2016; TSCHIFFELY, A., E., *et al.*, 2018).



#### 4. Conclusion

Steroidal estrogens play a great variety of roles in the human body, although it is well known for its role in reproductive function in women. Estrogens are synthesised in various extragonadal sites, including the brain, being extremely important in the maintenance of normal neuronal functions and provides neuroprotection against insults, injuries and toxic molecules. The activity in the brain is mediated through a great variety of mechanisms and because some of them involve the regulation of genes expression, it increases even more the overall complexity of the process.

Estrogens have neuroprotection activity through three main forms of action: anti-inflammatory action, antioxidant action and promotion of neuronal cell survival. Anti-inflammatory activity is observed because estrogens regulate the activation of immune cells in the brain and the production of pro-inflammatory molecules. Antioxidant activity is due to the nature of the molecule of steroidal estrogens and the regulation of the production of antioxidant molecules. Estrogens also stimulate neuronal cell survival by regulating the expression of pro-apoptotic and anti-apoptotic genes, as well as the expression of neurotrophic factors that support the survival and growth of neuronal cells.

In Alzheimer's disease, beyond the main neuroprotective actions of estrogens, mutual to other neurodegenerative diseases, there are specific protective mechanisms. As in other neurodegenerative diseases, estrogens inhibit neuroinflammation, oxidative stress, regulates glucose transport into the brain and inhibit neuronal cell death.

AD pathology is characterized by the presence of extracellular A $\beta$  plaques, that are a result of the aggregation of A $\beta$ . Estrogens are able to reduce the production of A $\beta$  through the increase of the expression of  $\alpha$ -secretase and decreasing of the expression of  $\beta$ -secretase, meaning that more APP will go through the non-amyloidogenic pathway. Estrogens also rise the elimination of A $\beta$ , by increasing the expression of enzymes responsible for its degradation and increasing the uptake of A $\beta$  by microglia. Estrogens regulate the production and elimination of A $\beta$  so that it does not reach toxic levels, but in the case of A $\beta$  accumulation, estrogens also inhibit the oligomerization of A $\beta$  and plaque formation, that is one of the main markers of AD pathology.

Estrogens and estrogenic activity could be a target for future therapeutics in Alzheimer's disease and the greatest focus is achieving the neuroprotection without the systemic effects that would result in feminizing effects in males or cell growth in estrogen-

responsive tissues. DHED is a prodrug tested in animals, that is converted into E<sub>2</sub> in the brain and exerts its neuroprotective effect with low peripheral hormone exposure.

Understanding the mechanisms of estrogenic activity is essential to determine the mechanism of neuroprotection and, in consequence, develop new therapeutic solutions for neurodegenerative diseases. With so many mechanisms, it is possible to develop new drugs that target specific pathways or specific receptors, and that way have a specific effect in the neuronal cell.

## 5. References

AREVALO, M. A.; AZCOITIA, I.; GARCIA-SEGURA, L. M. - The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors, *Neuroscience* 16:1 (2014) 17-29.

BREMER, A. A.; MILLER, W. L. - Chapter 13 - Regulation of Steroidogenesis, *Cellular Endocrinology in Health and Disease* (2014) 207-227.

CHAKRABARTI, M.; HAQUE, A.; BANIK, N. L.; NAGARKATTIA, P.; NAGARKATTI, M.; RAY, S. K. - Estrogen receptor agonists for attenuation of neuroinflammation and neurodegeneration, *Brain Research Bulletin* 109 (2014) 22–31.

COSTA, A. R.; MARCELINO, H.; GONÇALVES, I.; QUINTELA, T.; TOMÁS, J.; DUARTE, A. C.; FONSECA, A. M.; SANTOS, C. R. A. - Sex Hormones Protect Against Amyloid- $\beta$  Induced Oxidative Stress in the Choroid Plexus Cell Line Z310, *Journal of Neuroendocrinology* 28:9 (2016) 10.1111/jne.12404.

CUI, J.; SHEN, Y.; LI, R. - Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain, *Trends in Molecular Medicine* 19:3 (2013) 197-209.

DEL PRETE, D; CHECLER, F; MOUNIA CHAMI, M. - Ryanodine receptors: physiological function and deregulation in Alzheimer disease, *Mol. Neurodegener.* 9:21 (2014) doi: 10.1186/1750-1326-9-21.

DING, F.; YAO, J.; ZHAO, L.; MAO, Z.; CHEN, S.; BRINTON, R. D. - Ovariectomy Induces a Shift in Fuel Availability and Metabolism in the Hippocampus of the Female Transgenic Model of Familial Alzheimer's, *PLoS ONE* 8:3 (2013) e59825. doi:10.1371/journal.pone.0059825

GONZÁLEZ-REYES, R. E.; NAVA-MESA, M. O.; VARGAS-SÁNCHEZ, K.; ARIZA-SALAMANCA, D.; MORA-MUÑOZ, L. - Involvement of Astrocytes in Alzheimer's Disease from a Neuroinflammatory and Oxidative Stress Perspective, *Front. Mol. Neurosci.* 10:427 (2017) doi:10.3389/fnmol.00427.

HALL, J. M.; COUSE, J. F.; KORACH, K. S. - The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling, *The Journal Of Biological Chemistry* 276:40 (2001) 36869-36872.

HWANG, C. J.; PARK, M. H.; CHOI, M. K.; CHOI, J. S.; OH, K. W.; HWANG, D. Y.; HAN, S. B.; HONG, J. T. - Acceleration of amyloidogenesis and memory impairment by

estrogen deficiency through NF- $\kappa$ B dependent beta-secretase activation in presenilin 2 mutant mice, *Brain, Behavior, and Immunity* 53 (2016) 113–122.

JIA, M.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; GUSTAFSSON, J. A. - Estrogen receptor alpha and beta in health and disease, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 29:4 (2015) 557-568.

LEVINTA, A. - Neuroprotective Role of Estrogen Receptor- $\beta$  in Alzheimer's Disease Pathology, *UTMJ* 93:2 (2016) 27-30.

LI, R.; SHEN, Y.; YANG, L. B.; LUE, L. F.; FINCH, C.; ROGERS, J. - Estrogen Enhances Uptake of Amyloid  $\beta$ -Protein by Microglia Derived from the Human Cortex, *Journal of Neurochemistry* 75:4, (2000) 1447-1454.

MARÍN-MUÑOZ, J.; NOGUERA-PEREA, M. F.; GÓMEZ-TORTOSA, E.; LOPEZ-MOTOS, D.; ANTEQUERA-TORRES, M.; MARTÍNEZ-HERRADA, B.; MANZANARES-SÁNCHEZ, S.; VIVANCOS-MOREAU, L.; LEGAZ-GARCÍA, A.; RÁBANO-GUTIÉRREZ DEL ARROYO, A.; ANTÚNEZ-ALMAGRO, C. - Novel Mutation (Gly212Val) in the PS2 Gene Associated with Early-Onset Familial Alzheimer's Disease, *Journal of Alzheimer's Disease* 53:1 (2016) 73–78.

MELCANGI, R., C., PANZICA, G., C. - Neuroactive Steroids: Old Players in A New Game, *Neuroscience* 138:3 (2006) 733–739.

MITRA, S. W.; HOSKIN, E.; YUDKOVITZ, J.; PEAR, L.; WILKINSON, H. A.; HAYASHI, S.; PFAFF, D., W.; OGAWA, S.; ROHRER, S., P.; SCHAEFFER, J. M.; MCEWEN, B. S.; ALVES, S. E. - Immunolocalization of Estrogen Receptor  $\beta$  in the Mouse Brain: Comparison with Estrogen Receptor  $\alpha$ , *Endocrinology* 144:5 (2003) 2055–2067.

MORINAGA, A.; HIROHATA, M.; ONO, K.; YAMADA, M. - Estrogen has anti-amyloidogenic effects on Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibrils in vitro, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 359:3 (2007) 697–702.

MORINAGA, A.; ONO, K.; TAKASAKI, J.; IKEDA, T.; HIROHATA, M.; YAMADA, M. - Effects of sex hormones on Alzheimer's disease-associated  $\beta$ -amyloid oligomer formation in vitro, *Experimental Neurology* 228:2 (2011) 298–302.

PROKAI, L.; SIMPKINS, J. W. - Structure–nongenomic neuroprotection relationship of estrogens and estrogen-derived compounds, *Pharmacology & Therapeutics* 114:1 (2007) 1–12.

PROKAI, L.; NGUYEN, V.; SZARKA, S.; GARG, P.; SABNIS, G.; BIMONTE-NELSON, H. A.; MCLAUGHLIN, K. J.; TALBOOM, J. S.; CONRAD, C. D.; SHUGHRUE, P. J.; GOULD, T. D.; BRODIE, A.; MERCHENTHALER, I.; KOULEN, P.; PROKAI-TATRAI, K. - The prodrug DHED selectively delivers 17 $\beta$ -estradiol to the brain for treating estrogen-responsive disorders, *Sci Transl Med.* 7:297 (2015) 297ra113. doi:10.1126/scitranslmed.aab1290.

NIE, Q.; DU, X. G.; GENG, M. Y. - Small molecule inhibitors of amyloid  $\beta$  peptide aggregation as a potential therapeutic strategy for Alzheimer's disease, *Acta Pharmacol. Sin.* 32:5 (2011) 545–551.

STACEY, W.; BHAVE, S.; UHT, R. M. - Mechanisms by Which 17 $\beta$ -Estradiol (E2) Suppress Neuronal cox-2 Gene Expression, *PLoS ONE* 11:9 (2016) e0161430. doi:10.1371/journal.pone.0161430.

TSCHIFFELY, A. E.; SCHUH, R. A.; PROKAI-TATRAI, K.; PROKAI, L.; OTTINGER, M. A. - A comparative evaluation of treatments with 17 $\beta$ -estradiol and its brain-selective prodrug in a double-transgenic mouse model of Alzheimer's disease, *Hormones and Behavior* 83 (2016) 39–44.

TSCHIFFELY, A., E., SCHUH, R., A., PROKAI-TATRAI, K., OTTINGER, M., A., PROKAI, L. - An exploratory investigation of brain-selective estrogen treatment in males using a mouse model of Alzheimer's disease, *Hormones and Behavior* 98 (2018) 16–21.

VEGETO, E.; BENEDUSI, V.; MAGGI, A. - Estrogen anti-inflammatory activity in brain: A therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases, *Frontiers in Neuroendocrinology* 29:4 (2008) 507–519.

VILLA, A.; VEGETO, E.; POLETTI, A.; MAGGI, A. - Estrogens, Neuroinflammation, and Neurodegeneration, *Endocrine Rev.* 37:4 (2016) 372–402.

VRTAČNIK, P.; OSTANEK, B.; MENCEJ-BEDRAČ, S.; MARC, J. - The many faces of estrogen signalling, *Biochimica Medica* 24:3 (2014) 329-342.

YAN, X.; HU, G.; YAN, W.; CHEN, T.; YANG, F.; ZHANG, X.; ZHAO, G.; LIU, J. - Ginsenoside Rd promotes non-amyloidogenic pathway of amyloid precursor protein processing by regulating phosphorylation of estrogen receptor alpha, *Life Sciences* 168 (2017) 16–23.

YUE, X.; LU, M.; LANCASTER, T.; CAO, P.; HONDA, S. I.; STAUFENBIEL, M.; HARADA, N.; ZHONG, Z.; SHEN, Y., LI, R. - Brain estrogen deficiency accelerates A $\beta$  plaque formation in an Alzheimer's disease animal model, *PNAS* 102:52 (2005) 19198-19203.

YUN, J.; YEO, I. J.; HWANG, C. J.; CHOI, D. Y.; IM, H. S.; KIM, J. Y.; CHOI, W. R.; JUNG, M. H.; HAN, S. B., HONG, J. T. - Estrogen deficiency exacerbates A $\beta$ -induced memory impairment through enhancement of neuroinflammation, amyloidogenesis and NF- $\kappa$ B activation in ovariectomized mice, *Brain Behavior, and Immunity* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.05.013>.

ZHAO, L.; WOODY, S. K.; CHHIBBER, A. - Estrogen receptor  $\beta$  in Alzheimer's disease: From mechanisms to therapeutics, *Ageing Research Reviews* 24 (2015) 178–190.