



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Matilde Isabel Ribeiro Pina

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Terapias Génica e Celular na Doença de Alzheimer” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação de Dra. Ana Leite, da Dra. Catarina Silva e da Professora Doutora Armanda Santos e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2020



UNIVERSIDADE DE  
**COIMBRA**

Matilde Isabel Ribeiro Pina

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Terapias Génica e Celular na Doença de Alzheimer” referentes à Unidade Curricular "Estágio", sob a orientação de Dra. Ana Leite, da Dra. Catarina Silva e da Professora Doutora Armanda Santos e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2020

## Declaração de Autoria

Eu, Matilde Isabel Ribeiro Pina, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2015246277, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Terapias Génica e Celular na Doença de Alzheimer” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 14 de setembro de 2020.

Matilde Isabel Ribeiro Pina

(Matilde Isabel Ribeiro Pina)

“Ouço passar o vento, e só de ouvir o vento passar, vale a pena ter nascido.”

Fernando Pessoa

## **Agradecimentos**

A quem me deu a força necessária durante a elaboração deste projeto e, também, durante estes 5 anos de aventuras, deixo as seguintes palavras de agradecimento.

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais pela educação que me transmitiram. Sem vocês, certamente, não seria o que sou hoje. Para ti, mãe, não existem palavras suficientes que igualem tudo aquilo que fizeste por mim.

Às minhas duas avós, que me ensinaram o que é amor, amizade e respeito.

Aos docentes da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por durante estes 5 anos permitirem uma aprendizagem consolidada.

À Professora Doutora Armanda Santos pela orientação dada na elaboração desta Monografia.

À Professora Doutora Isabel Vitória pela preocupação de me proporcionar a oportunidade de um estágio, em Indústria Farmacêutica.

Aos meus amigos, em especial àqueles que estão comigo desde o primeiro dia desta aventura, por me terem acompanhado nos bons e, principalmente, nos maus momentos.

À equipa da Farmalabor por me ter acolhido como uma família.

Por fim, a ti Coimbra que estarás, para sempre, no meu coração: “Segredos desta cidade, levo comigo p'rá vida”!

Obrigado!

## ÍNDICE

### Capítulo I: Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Abreviaturas .....	8
1. Introdução .....	9
2. Análise SWOT .....	10
2.1. Pontos Fortes .....	10
2.1.1. Planeamento do estágio .....	10
2.1.2. Localização e horário.....	10
2.1.3. O papel do <i>BackOffice</i> .....	11
2.1.4. O papel do <i>Robot</i> .....	12
2.1.5. Sistema de Reservas.....	13
2.1.6. Receituário .....	13
2.1.7. Atendimento ao público.....	14
2.2. Pontos Fracos .....	15
2.2.1. Gestão de <i>Stocks</i> .....	15
2.2.2. Escassa Preparação de Manipulados.....	16
2.3. Oportunidades.....	17
2.3.1. Formações .....	17
2.4. Ameaças .....	17
2.4.1. Contexto pandémico.....	17
2.4.2. Banalização da Profissão Farmacêutica .....	19
3. Conclusão .....	20
4. Referências Bibliográficas .....	21

### Capítulo 2: Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Lista de Abreviaturas.....	23
1. Introdução .....	24
2. Grupo Medinfar .....	25
3. Delineamento do estágio .....	25
4. Análise SWOT .....	27
4.1. Ponto Fortes .....	27
4.1.1. Integração na equipa da GQ .....	27
4.1.2. Consolidação dos conhecimentos adquiridos no MICF.....	28
4.1.3. Competências informáticas .....	28
4.2. Pontos Fracos .....	29
4.2.1. Ritmo de trabalho.....	29
4.3. Oportunidades.....	29
4.3.1. Futura saída profissional.....	29
4.3.2. Desenvolvimento de <i>soft skills</i> .....	30
4.4. Ameaças .....	30
4.4.1. O papel do Farmacêutico .....	30
5. Conclusão .....	31
6. Referências Bibliográficas .....	31

### **Capítulo 3: Monografia "Terapias Génica e Celular na Doença de Alzheimer"**

Lista de Abreviaturas.....	33
Resumo.....	35
1. Introdução.....	37
2. Doença de Alzheimer.....	38
2.1. Contextualização Histórica.....	39
2.2. Epidemiologia.....	40
2.3. Fisiopatologia.....	40
2.3.1. Hipótese Colinérgica.....	41
2.3.2. Hipótese Glutamatérgica.....	41
2.3.3. Hipótese da Cascata Amiloide.....	41
2.3.4. O papel das Neurotrofinas.....	44
2.4. Terapêutica.....	44
3. Terapia Génica: uma nova abordagem terapêutica.....	45
3.1. Veículos: O desafio na entrega de material genético.....	46
3.1.1. Vetores Não Virais.....	46
3.1.2. Vetores Virais.....	49
3.2. Terapia Génica em Doenças Neurodegenerativas.....	51
3.2.1. Vias de administração de vetores no SNC.....	51
3.2.2. Os Vetores mais eficientes para o SNC.....	52
3.3. Terapia Génica na Doença de Alzheimer.....	54
4. Terapia Celular.....	57
4.1. Terapia Celular em Doenças Neurodegenerativas.....	58
4.2. Terapia Celular na Doença de Alzheimer.....	59
5. Combinação das Terapias Génica e Celular.....	62
6. Considerações Finais.....	63
7. Referências Bibliográficas.....	65

## **Capítulo I**

### **Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária**



## **Abreviaturas**

**DT** - Diretora Técnica

**EC** - Estágio Curricular

**EPI** - Equipamentos de Proteção Individual

**FC** - Farmácia Coimbra

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

**MICF** - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**MM** - Medicamentos Manipulados

**MNSRM** - Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

**MSRM** - Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

**PA** - Princípios Ativos

**PVP** - Preços de Venda ao Público

**SARS-CoV-2** - Vírus Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2

**SNS** - Sistema Nacional de Saúde

**SOWT** - *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*

## I. Introdução

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) é um curso superior que engloba 5 anos de ensino, sendo o último semestre, do quinto ano, composto pela unidade de Estágio Curricular (EC), na qual o estágio em farmácia comunitária é obrigatório. Desta forma, dá-nos a oportunidade, finalistas do MICF, de presenciarmos o ambiente profissional, em contacto com os nossos futuros colegas, permitindo-nos adquirir uma visão realista e crua de como é o dia-a-dia da nossa profissão, enquanto farmacêuticos comunitários, e de que forma contribuímos para a rede de saúde do nosso país, na atualidade em que vivemos. De facto, a farmácia comunitária é considerada o último ponto no circuito do medicamento, por ser o local que permite implementar um contacto direto com cada utente e de forma a garantir o seu bem-estar (*Normas Orientadoras Unidade Curricular « Estágio » Mestrado Integrado Em Ciências, 2019/2020*).

Tendo isto em conta, trata-se de um semestre de grandes expectativas pessoais, que coloca à prova a nossa capacidade de executar, na prática profissional, a teoria adquirida nos anos anteriores. Para além disso, permite-nos finalizar o processo de aprendizagem dado pela faculdade, iniciar o nosso próprio processo de consciencialização individual relativamente ao percurso profissional, que queremos construir, e clarificar/esclarecer ideias pré-feitas.

Neste âmbito, seguir-se-á o relatório do EC em farmácia comunitária, que tive a oportunidade de realizar na Farmácia Coimbra (FC), localizada no Coimbra Shopping, na cidade de Coimbra. Esse estágio decorreu entre janeiro e agosto de 2020 e foi orientado pela Diretora Técnica (DT) da farmácia, a Dra. Ana Leite, e restante equipa, tendo sido interrompido a 13 de março e retomado a 3 de maio, devido ao contexto de pandemia que atravessamos.

A estrutura do relatório apresenta-se sob a forma de uma análise SOWT (*Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*). Esta abordagem tem como objetivo analisar os aspetos marcantes, desse período de estágio, de forma a poder implementá-los futuramente na minha prática profissional. Irei mencionar, do ponto de vista de uma avaliação interna o que, pessoalmente, considereei como os pontos mais fortes e mais fracos, e de um ponto de vista externo, as oportunidades e as ameaças que identifiquei durante esse período.

## **2. Análise SWOT**

### **2.1. Pontos Fortes**

#### **2.1.1. Planeamento do estágio**

No primeiro dia do EC fui chamada a reunir com a DT, a Dra. Ana Leite, que me informou acerca do delineamento do estágio. Esse iria realizar-se em duas grandes partes. Uma primeira em *BackOffice*, que durou cerca de 1 mês e 3 semanas, e uma segunda a atender ao balcão e a prestar aconselhamento farmacêutico, que duraria até ao final.

No entanto, este planeamento teve de ser ajustado devido à suspensão do estágio, derivada do contexto pandémico que se instalou e que coincidiu com a etapa de atendimento ao público. Quando retomado, foi-me dito que iria, de novo, desempenhar um papel mais ativo no *BackOffice*. Apesar do plano não ter correspondido ao delineamento inicial, senti, enquanto estagiária, durante todo o período de estágio, que as tarefas a desempenhar estavam bem definidas e que se desenrolou uma adaptação favorável. Ao estar projetado desta forma, o estágio, teve como objetivos possibilitar a passagem pelas várias tarefas e encargos do dia-a-dia da FC e permitir uma aprendizagem gradual, mas ao mesmo tempo consolidada.

#### **2.1.2. Localização e horário**

A FC localiza-se no interior do Coimbra Shopping que, por si só, é considerado uma área com elevado movimento comercial, uma vez que engloba um supermercado, várias lojas e uma zona de restauração bastante frequentada. Para além disso, a própria zona geográfica, mais especificamente, o Vale das Flores, traz vantagens devido à presença de escolas e à sua proximidade com o polo II da Universidade de Coimbra. Esses aspetos, em conjunto, fazem com que a FC tenha um fluxo e uma diversidade de clientes considerável, havendo horas do dia mais pronunciadas do que outras. Isso permitiu-me, enquanto estagiária, contactar com um ambiente de constante movimento, no que diz respeito à entrada e saída de utentes, e também com a elevada heterogeneidade dos seus perfis.

No que diz respeito ao horário de funcionamento, este é bastante alargado, estando a farmácia aberta das 9h às 23h. A implementação de turnos é feita de forma a haver, em cada turno, no mínimo, dois colaboradores prontos a atender ao público. No entanto, nas horas do dia em que os turnos coincidem há mais profissionais a realizar esta tarefa. O cruzamento dos diferentes turnos permitiu-me observar a colaboração entre colegas de forma a evitar-se esperas, por parte dos clientes, ou aglomerações dentro da farmácia. O estar presente em diferentes alturas do dia permitiu-me compará-las, entre si, em relação à rotina vivida na FC,

ou seja, por exemplo, no que diz respeito ao fluxo de utentes habituais e não habituais, à receção de encomendas de diferentes distribuidores, aos serviços farmacêuticos prestados como por exemplo o aconselhamento farmacêutico.

### **2.1.3. O papel do *BackOffice***

Inicialmente, comecei por ter contacto com tudo o que envolve o *BackOffice*. A primeira e principal tarefa que me foi atribuída foi a da receção e entrada de encomendas de produtos farmacêuticos. Isso permitiu-me contactar, desde o início, com o programa SIFARMA 2000<sup>®</sup>, o que acabou por me deixar bastante à vontade nessa vertente. Uma vez que se trata de uma farmácia com elevado número de vendas e fluxo de utentes, consequentemente, recebe das distribuidoras, com alguma frequência, encomendas de grande volume que obrigam despender tempo a rececionar. O processo envolve certificar se a quantidade de produtos recebidos corresponde à pedida, confirmar os prazos de validade, tendo sempre em conta que os produtos de menor prazo de validade são aqueles a que se dá prioridade, e verificar os Preços de Venda ao Público (PVP).

Este último ponto tem especial relevância porque interfere diretamente com as margens a aplicar aos produtos. Os Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM) apresentam PVPs pré-definidos, no entanto, continua a ser necessário verificar se surgem PVPs novos de forma a alterá-los. Em relação aos restantes produtos, como Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM), suplementos e produtos cosméticos, existe uma maior flexibilidade em estipular os PVPs. A regra passa por seguir a tendência das restantes farmácias que pertencem ao mesmo grupo. Para isso, faz-se uma pesquisa do *stock* remoto. Quando se trata de um produto novo, que ainda não tem ficha na farmácia e não está disponível nas restantes farmácias, implementa-se uma margem de 30%. No entanto, enquanto estagiária, mesmo seguindo esta estratégia, senti a necessidade de confirmar sempre o PVP final destes produtos com algum colega. Por vezes aconteceu a DT alterar a margem de forma a esta ser o mais rentável possível para a farmácia.

Além destas encomendas, a FC recebe encomendas diárias que, na maioria, derivam de reservas feitas, de produtos solicitados durante os atendimentos e que a farmácia não tinha disponíveis no momento. Neste caso, o prazo de validade, embora seja sempre algo a ter em conta, deixa de ter a mesma relevância uma vez que os produtos não se destinam a integrar o *stock* da farmácia. Para além de todo esse processo inerente às encomendas, por volta da mesma altura, contactei com todos os produtos, de que a farmácia dispõe, através de tarefas como a confirmação de *stocks* e de prazos de validade. Essas tarefas demonstraram-se bastante

úteis principalmente na interiorização da disposição quer MNSRM quer das diversas gamas de dermocosmética.

Mais à frente, ao iniciar o atendimento ao público, apercebi-me da importância desta primeira fase, uma vez que me forneceu as ferramentas necessárias para me sentir mais confiante. Além de evitar constrangimentos quanto à disposição dos produtos também permitiu que me apercebesse do dinamismo dentro da farmácia, quer entre colegas de equipa quer entre os utentes e colaboradores da FC.

#### **2.1.4. O papel do Robot**

Durante o *BackOffice* contactei de perto com o *robot* que a FC dispõe para a entrada de MSRM, uma ferramenta que reconheci, ao longo do estágio, como bastante útil na gestão da própria farmácia, mas que também pode apresentar inconvenientes. Por um lado, permite economizar tempo e espaço na arrumação dos MSRM e no momento da sua dispensa, uma vez que o farmacêutico apenas tem de se deslocar às saídas do *robot* para obter os MSRM que, durante o atendimento, foram solicitados. Inevitavelmente, com o auxílio do *robot*, torna-se mais fácil saber quais os MSRM de que a farmácia dispõe em determinado momento e as suas quantidades em *stock*. O *robot* também permite definir uma data como prazo de validade mínimo. Ou seja, todos os MSRM que são colocados dentro do *robot* e que tenham um prazo de validade superior, a essa data, automaticamente ficam reconhecidos como tais. Apenas é necessário proceder à alteração manual quando apresentam um prazo de validade inferior à data estabelecida. É mais um aspeto que contribui para a gestão eficiente do tempo.

Por outro lado, pelo facto de haver várias encomendas diárias e, também, devido à própria velocidade do *robot* na arrumação dos MSRM, pode acontecer que, em certos momentos, determinados MSRM ainda não tenham sido inseridos dentro do *robot* apesar de já estarem na posse da farmácia, o que pode levar a perções erradas dos respetivos *stocks*. Nessas situações, revelou-se um eficaz trabalho de equipa, por parte de todos, através da verificação, nas faturas das encomendas, de quais os MSRM que, entretanto, chegaram e de forma a não faltar, nos atendimentos, o que é solicitado pelos utentes.

Tendo sido responsável pela arrumação dos produtos, provenientes das encomendas, adquiri bastante experiência no manuseamento do *robot*, que se mostrou um importante auxiliar dessa tarefa.

### **2.1.5. Sistema de Reservas**

Pelo facto de se tratar de uma farmácia com um número elevado de clientes, torna-se pouco viável ter disponíveis todos os produtos farmacêuticos de forma a satisfazer, na hora, as necessidades de cada utente. Para contornar esse problema a farmácia faz uso, de forma recorrente, do sistema de reservas disponível no SIFARMA 2000<sup>®</sup>. Como estagiária competia-me, diariamente, fazer a gestão das reservas. Quando a reserva é criada, aparece com um *status* de “encomendado/aprovado” associado ao(s) produto(s) em questão. Na altura da receção de encomendas diárias, o SIFARMA 2000<sup>®</sup> vai indicar pela sigla “R” se existem, ou não, reservas associadas aos produtos que estão a ser rececionados. Compete a quem está a dar entrada, alterar o *status* da reserva para “recebido” e imprimir uma etiqueta com essa informação. Nessa etiqueta vão constar informações relativas ao utente a que se destina o produto, nomeadamente o número de telefone/telemóvel. A última etapa consiste em mandar um SMS padronizado aos utentes, a informar que já podem ir à farmácia levantar as suas reservas, e em arrumar, por ordem alfabética de nome, os produtos nas gavetas destinadas às reservas. Neste passo é preciso ter em conta a distinção entre as reservas pagas e não pagas. Na fase exclusiva de *BackOffice* foi-me permitido efetuar atendimentos (apenas) de levantamentos de reservas pagas, o que considerei positivo por permitir-me contactar com o público, antes mesmo de iniciar a fase de atendimento ao balcão.

### **2.1.6. Receituário**

Desde a primeira semana de estágio que verifiquei a existência de uma divisão bem delineada de tarefas entre os membros da equipa da FC. A validação do receituário é uma tarefa implementada diariamente, pela qual está responsável uma Farmacêutica, sendo feita em cada dia a validação das receitas do dia anterior.

A observação de perto, dessa tarefa, permitiu-me contactar com os diferentes tipos de receita existentes: as receitas eletrónicas, que podem ter um suporte em papel, ou não, e as receitas manuais. No que diz respeito a esse último tipo a sua validação passa por dois passos principais: i) verificar se todos os campos estão preenchidos corretamente, como por exemplo a assinalação do motivo de uso de receita manual, a assinatura do médico prescritor no sítio indicado para esse efeito, a data de prescrição e a sua validade, o nome do utente e dados associados, além de se ter em atenção se foi usado o mesmo tipo de letra; ii) validar se os medicamentos solicitados correspondem aos prescritos. Para isso, tem de se ter em atenção as formas farmacêuticas, as dosagens e o número e tamanho das embalagens prescritas (máximo 2 embalagens por linha).

Durante o atendimento, a validação de receitas manuais obriga a um conhecimento prévio dos diferentes planos de participação em vigor. Enquanto estagiária, quando me deparei com algum plano de participação sem ser o do Sistema Nacional de Saúde (SNS), necessitei, por falta de experiência, de confirmar sempre com um colega. Neste aspeto, considero que as receitas eletrónicas facilitam bastante, uma vez que a sua validação é feita de forma automática pelo sistema SIFARMA 2000®.

Essa é uma tarefa à qual reparei ser dada elevada importância, sendo meticulosamente bem executada por todos os membros da farmácia uma vez que certas receitas podem ser rejeitadas por erros de validação e o reembolso da participação, dado à farmácia pelo SNS ou outros órgãos de participação, ficar comprometido. O facto de esta tarefa me ter sido apresentada desde cedo foi algo positivo, que contribuiu para enriquecer a minha experiência. Da minha parte, quando me deparei, durante os atendimentos, com receitas manuais, apesar de fazer o esforço de descortinar por mim, procurei sempre a confirmação de um colega de equipa de forma a não prejudicar a farmácia.

### **2.1.7. Atendimento ao público**

Desde o primeiro dia que pude observar atendimentos atrás do balcão e as várias etapas seguidas no programa Sifarma2000®. Através do que via, tentava conjugar os possíveis aconselhamentos, que se adaptavam a cada situação e, por vezes, após terminados, fazia perguntas de forma a atingir conclusões mais concretas. Portanto, quando chegou a altura de iniciar essa fase do EC, não tive a sensação de que iria começar do zero.

Apesar de estar um pouco reticente quanto à minha adaptação, considerei que a passagem do *BackOffice* para o *FrontOffice* foi bem executada e positiva. À partida já sabia tratar-se de uma farmácia com um elevado número de atendimentos, por dia, em que a própria rapidez tem a sua importância. Tendo isso em mente, tentei sempre, ao longo dessa fase, manter um equilíbrio entre o tempo gasto e o tempo necessário aos processos de atendimento e aconselhamento de forma a nunca prejudicar nenhum utente no seu bem-estar. Divido em três momentos distintos a aprendizagem e experiência adquirida nessa fase:

- I. No início, assisti diariamente aos atendimentos de uma Farmacêutica, durante períodos mais prolongados e frequentes, o que me permitiu interiorizar a abordagem feita ao nível do aconselhamento farmacêutico e da intervenção farmacêutica, como, por exemplo, as terapêuticas estabelecidas como primeira linha nas situações que consideramos mais comuns e que levam os cidadãos à farmácia.

2. De seguida, rapidamente passei, eu própria, a realizar os atendimentos, embora tendo sempre a meu lado alguém a supervisionar e a dar-me as indicações que se mostrassem necessárias, o que me transmitiu segurança nesses primeiros dias.
3. Por fim, o último passo passou por atender sozinha o público, tendo no posto ao lado um(a) farmacêutico(a) que, apesar de também estar a atender, me pudesse prestar auxílio e intervir quando achasse necessário.

Este processo, que decorreu no espaço de poucos dias, ao estar articulado desta forma, fez com que a tarefa de atender ao público numa farmácia evoluísse de forma gradual e não repentina, dando-me mais tempo de adaptação. Tendo em consideração a pouca experiência, nesta atividade, sinto que correspondo às expectativas da equipa e que evolui de forma favorável. Infelizmente, por motivos alheios a todos nós, o contexto de pandemia levou a uma suspensão do estágio que coincidiu com essa altura. Caso contrário, teria ganho ainda mais autonomia, conhecimento e à-vontade ao balcão. Não obstante, apesar de interrompida a meio, foi nesta fase que retirei mais vantagens em competências profissionais específicas como trabalhar em equipa, gestão de tempo, negociação, entre outras, e, também, em competências pessoais como empatia e saber ouvir, que pretendo conservar e utilizar em experiências futuras. Por surpresa minha, foi também a fase que mais me surpreendeu, no sentido em que não esperava que me desse tanto prazer a colocar em prática. De forma objetiva e sucinta, contribuiu para o meu apreço pelo ato farmacêutico, em particular, nas farmácias comunitárias (Ordem dos Farmacêuticos, 1998).

## **2.2. Pontos Fracos**

### **2.2.1. Gestão de Stocks**

Gerir os *stocks* dos produtos presentes é um ponto fulcral para uma boa gestão global de uma Farmácia. O objetivo passa por adequar a rotatividade dos produtos de forma a ter disponíveis os que satisfaçam as necessidades dos utentes e não se acumularem produtos com pouca saída. Esta gestão é uma responsabilidade de todos os membros da equipa, contudo, a escolha dos produtos passa pela DT. Os produtos com maior saída provêm das encomendas de maior volume que estão à responsabilidade da DT. Os restantes são obtidos através das encomendas diárias juntamente com a utilização do sistema de reservas do SIFARMA 2000®. O facto de a farmácia receber uma grande variedade de clientes, por dia, dificulta esta gestão pormenorizada dos *stocks* dos produtos a ter disponíveis. A estratégia passa por ter “de tudo um pouco”.



Quando iniciei o atendimento ao balcão, foi-me explicado para ter sempre o cuidado de confirmar o *stock* dos medicamentos solicitados, antes de indicar que a farmácia os teria disponíveis de forma a não haver constrangimentos. Todavia, deparei-me, algumas vezes, com situações em que o *stock* indicado pelo sistema não correspondia ao *stock* real do produto, nomeadamente MSRM armazenados no *robot*, por exemplo, por ainda não terem sido colocados dentro do *robot*. Outra causa pode derivar de reservas mal geridas que impedem que os MSRM, em causa, passem para *stock* apesar de estarem disponíveis. A repercussão disto, no atendimento, foi de algum receio em dar informação errada aos clientes o que me levava a apelar à sua compreensão quando efetivamente acontecia.

De igual modo, em certos casos, em que me foi solicitada a verificação de *stocks* de MNSRM, suplementos e produtos cosméticos, deparei-me com valores que não coincidiam, nomeadamente em relação a produtos que teriam chegado recentemente à farmácia. Após várias tentativas, da minha parte, acabava por solicitar ajuda, chegando-se ao mesmo problema. Uma das explicações, frequentemente mais relacionada com produtos de dermocosmética, consistia em furto, ou seja, infelizmente esses produtos teriam sido levados ilicitamente. Um conjunto de fatores podem ser vistos como possíveis causas, nomeadamente a localização da FC, que se encontra dentro de um shopping comercial e/ou a disposição dos produtos que faz com que alguns estejam expostos à entrada com fácil acesso. No que diz respeito ao meu desempenho, ao me deparar com estas situações, acabava por sentir-me, de certa forma, impotente por ser algo que não tem uma solução imediata.

A melhoria desta gestão implica um trabalho contínuo, que pode incluir uma maior articulação entre a verificação periódica dos *stocks*, dos produtos presentes na farmácia, e a consulta das saídas, desses mesmos produtos, que podem ser verificadas através do SIFARMA.

### **2.2.2. Escassa Preparação de Manipulados**

A preparação de Medicamentos Manipulados (MM) é uma das atividades possíveis a serem desempenhadas por farmacêuticos, que se deve fazer reger pelas boas práticas a observar na preparação de medicamentos manipulados, aprovadas na Portaria n° 594/2004 (Ministério da Saúde, 2004).

Tendo em conta o conhecimento adquirido durante o MICEF, nomeadamente na Unidade Curricular Farmácia Galénica, tinha a expectativa de presenciar todo o processo envolvido nesta atividade. Após a prescrição do MM, compete ao farmacêutico a sua preparação através da fórmula galénica, com as matérias-primas necessárias e autorizadas, até à sua dispensa que

se deve fazer acompanhar da informação relativa à posologia/modo de utilização, condições de conservação e prazo de validade (Ministério da Saúde, 2004).

Durante todo o período de estágio, infelizmente, não tive a oportunidade de contactar com esta atividade uma vez que não presenciei solicitações de MM, levando-me a concluir não se tratar de algo com destaque no dia-a-dia da FC. Consequentemente, fica por colocar em prática esta vertente que, numa opinião pessoal, valoriza o papel do Farmacêutico na prestação de cuidados de saúde à população.

## **2.3. Oportunidades**

### **2.3.1. Formações**

Durante todo o meu período de estágio foi-me disponibilizada a oportunidade de participar nas formações realizadas pelos delegados que se deslocavam à farmácia. Essas formações tanto incidiram nos medicamentos comercializados pelas marcas como nas várias gamas de dermocosmética. Presencialmente, tive a oportunidade de ir a uma formação com convite do laboratório, da Pharma Nord, que se realizou no hotel Tryp em Coimbra. Essa formação teve o objetivo de dar a conhecer a gama completa dos suplementos que comercializam e, também, os suplementos recentemente introduzidos no mercado, com base em evidência científica. Por fim, após o confinamento, na altura em que o estágio foi retomado, também me foi dada a oportunidade de assistir às formações que seriam dadas pelos delegados na farmácia por via *online*.

Apesar de alguns dos colaboradores da FC já terem o conhecimento acerca desses produtos, enquanto estagiária considero que foi uma mais-valia por me ter permitido conhecer com mais detalhe as características e as indicações terapêuticas adequadas de cada produto em causa o que permite adquirir mais segurança no momento de dispensa e aconselhamento.

## **2.4. Ameaças**

### **2.4.1. Contexto pandémico**

No presente atravessamos um estado de pandemia, ou seja, encontra-se globalmente disseminada uma doença infecciosa causada pelo Vírus Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2). Os estagiários, em certa altura, receberam a informação, por parte da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), que possibilitou a suspensão do estágio, sem represálias, se se sentissem em risco. Apesar de também ter

retirado ensinamentos deste contexto, considere-o uma ameaça porque, em última análise, levou à interrupção deste Estágio Curricular.

A instalação do estado de pandemia, inevitavelmente, confirmou-me aquilo que é transmitido ao longo do MICE: é fundamental o papel das farmácias comunitárias na sociedade e na prestação dos cuidados de saúde. Efetivamente, os farmacêuticos são profissionais de saúde de primeira linha e na atual situação isto ainda se revela mais evidente aos meus olhos.

Desde o início do estágio que me apercebi de alguns utentes a adquirirem precocemente Equipamentos de Proteção Individual (EPI), nomeadamente, máscaras cirúrgicas ou de outro nível, luvas e preparações para desinfeção das mãos como o álcool ou álcool-gel. A certa altura, houve um momento de viragem, em que se passou de uma procura pontual para uma procura acentuada e posteriormente para uma procura exorbitante, muito em parte, devido às informações disponibilizadas pelos órgãos de comunicação. A este ponto, acrescentou-se o facto de se tratar de uma farmácia movimentada, o que culminou numa situação que descrevo como fora de controlo nos últimos dias em que estive presente, antes de o estágio ser suspenso, tornando-se impossível contabilizar a procura destes produtos por parte dos utentes. Para além dos EPI, vários MNSRM, principalmente os que apresentam como Princípios Ativos (PA) o paracetamol e o ibuprofeno, foram alvos desta procura, ao ponto de a FC ficar com *stocks* a zero.

Este aspeto, em particular, fez-me presenciar, de uma forma que considero radical e até chocante, como o ser humano reage perante tal contexto. Senti que, em certa altura, passou a vigorar a lei do “salve-se quem puder”. Muitos dos clientes mostraram-se dispostos a açambarcar EPI, quantos lhes fosse permitido, independentemente do aconselhamento farmacêutico prestado e do preço imposto. Foi, de longe, a altura que mais me colocou à prova ao longo deste estágio, porque atingiu os meus valores pessoais e tive de fazer uma eficiente gestão entre o que era a minha opinião e o que efetivamente me competia enquanto estagiária durante o atendimento dos utentes, de forma a garantir a satisfação das suas necessidades.

Foi também nessa altura que identifiquei uma oportunidade: a intervenção que o farmacêutico comunitário pode realizar junto da população, tanto acerca da aquisição dos EPI como da sua correta utilização, baseada na evidência científica. De um modo geral, considero que a equipa da FC, com base nas condições que disponha, fez os seus possíveis para responder de forma eficiente a esta procura, que não deixou de ser uma novidade para todos. Rapidamente os produtos, em questão, mostraram-se esgotados nos distribuidores com que a farmácia tem uma relação mais próxima. No entanto, a farmácia fez um esforço diário de tentar obter esses produtos e por vezes conseguiu. De imediato, adotou-se uma estratégia

que achei a mais correta: estabeleceu-se um limite máximo de unidades que poderiam ser vendidas a cada utente e colocou-se de parte os EPI a serem utilizados pelos profissionais da própria farmácia.

Isso leva-me a falar do plano de contingência adotado pela FC. Efetivamente, esta parte do estágio coincidiu com uma altura em que os próprios farmacêuticos tiveram de se adaptar a uma nova realidade. A Dra. Ana Leite disponibilizou, a todos, um dossiê com informação científica acerca do SARS-CoV-2, de forma a podermos esclarecer as dúvidas que surgissem, e informou a equipa sobre as novas regras a adotar, especialmente no que diz respeito à limpeza e higienização do estabelecimento, que se passaram a realizar com maior frequência. O ato de atender ao público passou a ter indicações adicionais, nomeadamente no aconselhamento sobre a própria pandemia, e os serviços prestados aos utentes foram reduzidos, como, por exemplo, a medição de parâmetros bioquímicos. A mim, enquanto estagiária, foi-me dito que voltaria a desempenhar mais tarefas relativas ao *BackOffice* e menos ao balcão. Nesse aspeto, este contexto, impossibilitou-me de completar a aprendizagem que ainda era precoce. De facto, foi um período esgotante tanto a um nível físico, devido a um maior número de encomendas de elevado volume, como psicológico. Foi uma situação extraordinária que obrigou esta farmácia, como tantas outras, a alterar radicalmente a sua rotina diária, o que levou a uma mudança do ambiente. A pressão tornou-se visível, quer por parte dos utentes quer da própria equipa.

Quando regresssei à FC, mais especificamente no mês de maio, a organização sofreu alterações e, apesar de ainda ser um contexto de pandemia, o ambiente já era de maior segurança. Os colaboradores foram distribuídos por dois turnos, que não se cruzam, e trabalham em dias diferentes. No que diz respeito aos EPI, os *stocks* já estavam abastecidos e havia placas de acrílico aos balcões. Apenas era permitido a permanência de 3 utentes, em simultâneo, dentro da farmácia. Dito isto, considero que são estas situações que revelam a capacidade de adaptação e prevalência por parte dos profissionais de saúde e ter presenciado, ao vivo, estes extremos, deu-me uma experiência que considero inigualável num futuro próximo, a nível profissional e pessoal. De certa forma, já não seremos “apanhados de surpresa”.

#### **2.4.2. Banalização da Profissão Farmacêutica**

Após este estágio, de forma generalizada, divido os utentes da farmácia comunitária em dois grandes perfis distintos: os que vão com a consciência de que vão adquirir medicamentos e com o objetivo de ter um aconselhamento farmacêutico e os que comparam a ida à farmácia

com a ida a uma loja. Tendo em conta o contexto da FC, que é o de estar dentro de um Shopping comercial, muitos dos utentes com que me deparei tinham um maior interesse em adquirir os produtos, de que necessitavam, e não em ter um aconselhamento farmacêutico personalizado. Houve, inclusive, situações em que deparei com a desvalorização dada ao ato farmacêutico, ou seja, a falta de consciência da responsabilidade que está subjacente ao ato de cedência de MSRM, MNSRM e outros produtos. A nível pessoal, apesar de já ter consciência deste facto, presenciá-lo foi algo que me entristeceu. Vários utentes demonstraram uma opinião com conotação negativa em relação aos farmacêuticos, com comentários, por exemplo, sobre considerar-se o lucro prioritário e não se privilegiar a escolha do melhor produto para cada pessoa.

A ameaça está na proliferação desta desvalorização, no que toca à aquisição de produtos farmacêuticos e aconselhamento dado pelo farmacêutico. De facto, a tendência atual consiste numa evolução dos métodos de entrega de produtos ao domicílio, inclusive, produtos farmacêuticos, o que pode fazer com que as pessoas comparem a aquisição destes produtos com todos os outros. No entanto, a indicação farmacêutica e o diálogo personalizado não são substituíveis. Compete a nós, futuros e atuais farmacêuticos, transmitir a importância da profissão e salvaguardar a nossa posição, enquanto profissionais de saúde, perante os olhos da população.

### **3. Conclusão**

Após terminado o estágio em farmácia comunitária, fica mais perceptível a sua importância. Inevitavelmente, é o momento que nos permite colocar em prática aquilo que consolidamos durante 5 anos de ensino e que nos dá a sensação de responsabilidade que a profissão farmacêutica implica. No geral, o estágio proporcionou-se de forma favorável e teve as condições necessárias para a aprendizagem expectável, no entanto o facto de o delineamento ter sido ajustado, devido ao contexto pandémico, tornou essa aprendizagem descontínua, ou seja, com interrupções. Esse facto pode ser visto de duas formas distintas: por um lado tornou o estágio num processo de várias etapas separadas, mas, por outro, revelou o papel que a farmácia e os seus colaboradores têm na saúde e também, na vida pessoal dos utentes que a visitam. Por último, termino esta etapa marcante da minha vida com a certeza do valor que é ser farmacêutico e que é necessário um estudo e atualização constantes de forma a se realizar um atendimento personalizado, sempre com o objetivo final de satisfazer, da melhor forma possível, as necessidades dos utentes.

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

FACULDADE DE FÁRMACIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA - **Normas Orientadoras Unidade Curricular “ Estágio ” Mestrado Integrado Em Ciências Farmacêuticas.** (2019/2020).

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Portaria nº. 594/2004. **Diário da República.** (2004) 3441–3445.

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos.** (1998) 1–9.

## **Capítulo 2**

### **Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica**

## **Lista de Abreviaturas**

**BPD** - Boas Práticas de Distribuição

**BPF** - Boas Práticas de Fabrico

**BPL** - Boas Práticas de Laboratório

**CAPAS** - Ações Corretivas e Preventivas

**CMO** - *Contract Manufacturing Organization*

**CQ** - Controlo de Qualidade

**EC** - Estágio Curricular

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

**GGQ** - Gestão e Garantia de Qualidade

**GQ** - Garantia da Qualidade

**MICF** - Mestrado Integrado de Ciências Farmacêuticas

**OOS** - *Out Of Specification*

**RQP** - Revisão da Qualidade do Produto

**SOWT** - *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*



## I. Introdução

A Indústria Farmacêutica é uma atividade que surgiu com o objetivo de estabelecer empresas destinadas à produção de medicamentos. Para além disso, é também a atividade que permite a investigação e o desenvolvimento de novos medicamentos com a finalidade de disponibilizar tratamentos e eventuais curas das variadas doenças, aumentar a prestação de cuidados de saúde e a qualidade de vida dos cidadãos.

No Mestrado Integrado de Ciências Farmacêuticas (MICF), contactamos com esta temática, ao longo do programa curricular, como sendo uma das possíveis saídas profissionais. Nas disciplinas de tecnologia farmacêutica I, II e III é-nos ensinado as diferentes formas farmacêuticas e os métodos implícitos na sua produção, na disciplina de Assuntos Regulamentares as questões regulamentares e na disciplina de Gestão e Garantia de Qualidade (GGQ) a vertente da qualidade.

A disciplina Estágio Curricular (EC), pertencente ao último semestre do 5º ano, dá a oportunidade de, para além do estágio obrigatório em farmácia comunitária, iniciar um estágio numa Indústria Farmacêutica, através dos protocolos que a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) tem estabelecidos. No meu caso, por se tratar de uma saída profissional que ao longo do meu percurso académico sempre me despertou interesse, fiz questão de aproveitar esta oportunidade.

Neste âmbito, seguir-se-á o relatório do EC em Indústria Farmacêutica, que tive a oportunidade de realizar na Farmalabor - Produtos Farmacêuticos, S.A, mais especificamente no departamento da Garantia da Qualidade (GQ). A estrutura do relatório apresenta-se sob a forma de uma análise SOWT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*). Esta abordagem tem como objetivo analisar os aspetos marcantes, desse período de estágio, de forma a poder implementá-los futuramente na minha prática profissional. Irei mencionar, do ponto de vista de uma avaliação interna o que, pessoalmente, considerei como os pontos mais fortes e mais fracos, e de um ponto de vista externo, as oportunidades e as ameaças que identifiquei durante esse período.

## **2. Grupo Medinfar**

A Medinfar é um grupo farmacêutico de origem portuguesa, fundado em 1970, do qual fazem parte diferentes setores, tais como: Consumer Health, Dvine, Farmalabor, Farma, Genéricos Portugueses (GP) e Medinfar sorológico. O foco desta empresa passa pelo desenvolvimento de um circuito que vai desde a investigação, desenvolvimento e fabrico de produtos, à sua distribuição e comercialização. Em 2020, a empresa completou 50 anos de mercado (Medinfar, 2020).

A Farmalabor, situada em Condeixa-a-Nova, é a Unidade de Produção Industrial do grupo Medinfar e passou a fazer parte do grupo em 2001. Para além de ser responsável pela produção de medicamentos, também se dedica à produção de cosméticos e suplementos alimentares. A Farmalabor é considerada uma *Contract Manufacturing Organization (CMO)*, isto é, estabelece contratos com outras empresas no que diz respeito ao fabrico dos seus produtos não sendo considerada uma organização detentora de produtos próprios. Pelo facto de pertencer ao grupo Medinfar, uma grande parte dos produtos que são fabricados na Farmalabor pertencem ao grupo, no entanto, também fabrica a contrato com outras empresas nacionais e internacionais.

A gama de produtos fabricados na Farmalabor é consideravelmente larga e abrangente no que diz respeito às possíveis formas farmacêuticas. Na totalidade, são fabricadas formas solidas, líquidas e pastosas.

Devido a isso, trata-se de uma Unidade Industrial certificada em termos de Qualidade através da implementação da norma ISO9001, em termos de Ambiente através da norma ISO14001 e Higiene e Segurança do trabalho através da norma OHSAS18001. A adoção destas normas permite à Farmalabor cumprir as Boas Práticas de Fabrico (BPF), as Boas Práticas de Laboratório (BPL) e as Boas Práticas de Distribuição (BPD). O objetivo final é garantir um trabalho centrado na Qualidade e satisfação do cliente conseguindo, simultaneamente, garantir a Segurança de todos os trabalhadores e uma contribuição positiva para o Ambiente.

## **3. Delineamento do estágio**

Inicialmente, o meu EC, em Indústria Farmacêutica, estava acordado com outra empresa. Devido ao contexto pandémico que se instalou, esse foi cancelado surgindo a oportunidade de realizar o estágio na Farmalabor - Produtos Farmacêuticos, S.A. Após confirmação do EC, foi-me transmitido que se iria realizar no departamento do Controlo de Qualidade (CQ) no entanto, quando no primeiro dia cheguei à empresa, foi-me dito que seria no departamento

de Garantia da Qualidade (GQ). Por se tratar de uma área em que me sentia menos confortável, em termos de conhecimentos, deixou-me reticente, mas rapidamente aceitei a proposta e considerei como uma oportunidade de aprendizagem.

O estágio iniciou-se a 25 de maio e terminou a 25 de agosto, tendo sido orientado pela Dra. Catarina Silva. No primeiro dia foi-me dada uma breve formação no que diz respeito às instalações da Farmalabor e cumprimentos das BPF. Após essa formação tive um primeiro contacto com um conjunto de conceitos e termos diariamente utilizados no departamento da GQ, juntamente com as tarefas pelas quais os colaboradores do departamento são responsáveis.

Nos dias seguintes, o objetivo passou por me disponibilizar o acesso a alguns procedimentos gerais da qualidade. No decorrer do estágio, foi-me, inclusive, pedido para analisar e sugerir uma possível revisão do procedimento referente ao circuito interno dos medicamentos psicotrópicos. Após este contacto com alguns dos procedimentos e conceitos mais utilizados, fui informada acerca do delineamento dos 3 meses de estágio. Resumidamente, considero que o estágio se dividiu nas três principais tarefas seguintes:

- Preenchimento dos campos dos documentos de Revisão da Qualidade do Produto (RQP) associados a cada produto fabricado na empresa: este documento tal como o nome indica, trata-se de um documento de revisão da qualidade que é elaborado anualmente com o objetivo de compilar os dados relativos à qualidade de todos os lotes nesse período produzidos, para determinado produto. O objetivo é juntar dados que permitam, ao enviar ao cliente, uma análise do histórico dos produtos.
- Participação em investigações decorrentes de desvios de produtos: quando num produto, após os ensaios realizados no CQ, se verifica valores não conformes em determinados parâmetros de libertação (parâmetros a serem cumpridos e que possibilitam a libertação de um lote de determinado produto), considera-se que estamos perante resultados fora das especificações, OOS (*out of specification*). Um OOS fechado e validado origina a abertura de um desvio. No entanto os desvios podem ter outras origens, nomeadamente, relacionadas com os equipamentos utilizados no fabrico dos produtos, com as matérias-primas utilizadas e com alterações ao processo de fabrico. Um desvio pode ter um carácter mais interno, de forma a ficar registada a ocorrência ou um carácter mais externo, ou seja, ter de ser comunicado ao cliente aquando a libertação do lote associado ao desvio. O principal objetivo das investigações adotadas passa por concluir acerca de uma possível causa-raiz do desvio.

Para isso é feito o levantamento de um histórico robusto de lotes anteriores de forma a ser possível fazer uma comparação válida com o lote associado ao desvio. Após uma causa identificada, é da responsabilidade da GQ assegurar a distribuição de medidas corretivas e preventivas (CAPAS) aos diferentes departamentos envolvidos e avaliar, posteriormente, a sua implementação e eficácia. Este processo no fim, tem o objetivo de garantir a qualidade do produto no consumidor final, o utente. Este tema foi um dos em que participei mais durante o período de estágio e foi, também, o que me despertou maior interesse pessoal.

- Compilação de todas as CAPAS de 2020 provenientes de desvios, reclamações e controlos de alterações para os produtos em causa: grande parte do meu estágio passou pela criação de um ficheiro capaz de compilar todas as CAPAS permitindo, rapidamente, identificar visualmente os seus *status* (implementadas ou por implementar). Para além da identificação, o ficheiro também se destinou ao *follow up* dessas mesmas ações, ou seja, confirmar efetivamente se estão implementadas e verificar se, de facto, foram adequadas a cada situação. Esse acompanhamento, muitas das vezes, implica inspecionar visualmente, no terreno, para além do registo. Futuramente, o ficheiro deverá ser adotado de forma a permitir, para além do *follow up*, uma análise da eficácia das CAPAS. Enquanto estagiária, ao desempenhar esta tarefa, senti que o trabalho por mim realizado foi efetivamente útil e com valor acrescentado, de forma a melhorar o desempenho da equipa da GQ.

## **4. Análise SWOT**

### **4.1. Ponto Fortes**

#### **4.1.1. Integração na equipa da GQ**

Um dos pontos que considero mais importante ao longo do período deste estágio, foi, sem dúvida, a forma calorosa como fui aceite e recebida por parte das minhas orientadoras de estágio e restante equipa da GQ. Consiste numa equipa jovem, ativa e dinâmica em que se privilegia a boa comunicação entre os diferentes colaboradores. Sinto que foi um privilégio ter feito parte de uma equipa onde existe grande respeito pelo trabalho uns dos outros. Ao estar inserida neste ambiente, pude presenciar que com um bom meio envolvente é possível atingir bons resultados.

No que diz respeito às tarefas que me foram solicitadas, o facto de me sentir num ambiente confortável facilitou a minha adaptação e aumentou a minha vontade de contribuir positivamente para o desempenho global da equipa. Para além da sensação de bem-estar, outro aspeto positivo consistiu na importância que foi dada ao meu trabalho. O facto de sentir que as tarefas por mim desempenhadas tinham impacto direto nas decisões da equipa fez-me sentir numa posição que vai para além da posição de estagiária. Com o passar das semanas, o facto de me sentir cada vez mais parte da equipa transpareceu e foi-me dada, também, mais autonomia e sentido de responsabilidade nas tarefas solicitadas.

#### **4.1.2. Consolidação dos conhecimentos adquiridos no MICF**

Apesar de na disciplina de GGQ serem abordados conceitos relacionados com a qualidade, como as normas ISO, a verdade é que, ao estar inserida na realidade de uma Indústria Farmacêutica, deparei-me com assuntos totalmente desconhecidos. Tendo presente as bases transmitidas durante o MICF, a Farmalabor permitiu-me colocar em prática a aprendizagem teórica adquirida e ganhar experiência no terreno.

Ao ter feito parte da GQ tive a oportunidade de contactar com os restantes departamentos da empresa, nomeadamente com a produção, uma vez que no decorrer de investigações de desvios muitas das vezes é necessário ir ao terreno apurar possíveis causas, com o CQ, no que diz respeito a resultados de ensaios, quer realizados ao longo do processo de produção quer realizados já nos produtos acabados, com o Planeamento e com a Manutenção. Todos estes departamentos trabalham com o mesmo objetivo final e têm de estar em constante comunicação entre si, de forma a coordenar os compromissos acordados com os diferentes clientes. O contacto com estas diferentes áreas possibilitou-me ter uma noção mais realista do ciclo de vida de um medicamento e, também, de um cosmético dentro de uma Unidade de Produção Industrial.

Paralelamente, o facto de esta ser uma Indústria com um portfólio de produtos elevado e abrangente, faz com que possua os vários equipamentos necessários aos vários métodos de fabrico. Enquanto estagiária, considero que a diversidade de processos de fabrico e produtos com que me deparei, deu-me uma bagagem mais consolidada que, até à data, era maioritariamente teórica.

#### **4.1.3. Competências informáticas**

Na realização da maioria das tarefas que me foram solicitadas, nomeadamente o levantamento de dados dos variados temas, o programa preferencialmente utilizado foi o

Excel<sup>®</sup>, muitas das vezes associado ao tratamento estatístico necessário. A minha aptidão no que diz respeito a este programa em específico era básica e considero que teve uma evolução elevada e favorável. Atualmente, devido à ajuda da equipa da GQ, considero que utilizo com maior aproveitamento as ferramentas disponíveis neste programa. Ao longo do estágio tive, também, acesso a outros programas utilizados internamente pela empresa, como bases de dados e bases de documentação disponibilizada pelas clientes. Resumidamente, foi um período no qual desenvolvi as minhas competências informáticas, algo que certamente irei colocar em prática no meu futuro profissional.

## **4.2. Pontos Fracos**

### **4.2.1. Ritmo de trabalho**

O ritmo de trabalho acelerado é algo transversal a todos os departamentos da empresa. Para alguém que está a iniciar a sua vida profissional, como é o caso dos estagiários, estar sujeito a um ambiente com um ritmo tão acelerado pode ter algum impacto negativo. De facto, houve ocasiões em que gostaria de ter sido mais perfeccionista no que apresentei e ter-me sentido mais confortável dentro dos temas em causa. Contudo, estar sujeita a este ritmo fez-me aprender a realizar uma melhor e mais eficaz gestão do meu tempo diário. Em última análise, considero que o *stress* inerente a este ritmo, apesar de em demasia não ser benéfico, deu-me motivação para apresentar o melhor trabalho possível no tempo estabelecido.

## **4.3. Oportunidades**

### **4.3.1. Futura saída profissional**

Com base nas experiências ao longo destes 5 anos de MICF, sempre quis confirmar que a visão que tinha acerca de como é trabalhar numa Indústria Farmacêutica era a correta, uma vez que sempre foi um dos meus maiores interesses no que diz respeito a saídas profissionais.

Dada a oportunidade de estagiar na Farmalabor, presenciei que trabalhar numa empresa destinada à produção de medicamentos é um desafio enorme por todas as questões regulamentares e económicas subjacentes. Para além da vertente farmacêutica é preciso ter, também, uma visão de gestão. O facto de os medicamentos terem legislação própria torna a resolução dos mais variados problemas urgente e imediata. Com isso, as capacidades dos diferentes profissionais da empresa têm de estar alinhadas de forma a se assegurar a eficácia, qualidade e segurança dos produtos fabricados e, em simultâneo, a satisfação dos clientes.

Posto isto, terminado este estágio, as minhas expectativas para além de correspondidas, foram superadas. Enquanto estagiária considero que retirei a máxima aprendizagem possível e o interesse em seguir por este caminho ficou mais enaltecido.

#### **4.3.2. Desenvolvimento de *soft skills***

Uma oportunidade que este estágio me ofereceu foi o desenvolvimento e aperfeiçoamento de várias *soft skills*, nomeadamente autonomia, gestão de tempo, poder crítico e trabalho em equipa. O pensamento crítico foi, sem dúvida, a *soft skill* mais exigente e mais trabalhada durante o período deste estágio. O facto de me ser solicitado, por várias vezes, a compilação de dados, no decorrer de investigações, obrigou-me a ter um olhar crítico. Para chegar a conclusões concretas, na maioria das vezes, foi preciso questionar todo um processo anterior de forma a determinar quais as variáveis possíveis de influenciar os dados a recolher. Esta, para além de ter sido uma das tarefas que mais prazer me deu a desenvolver, deu-me ferramentas essenciais a serem utilizadas no decorrer da minha vida profissional.

#### **4.4. Ameaças**

##### **4.4.1. O papel do Farmacêutico**

O Farmacêutico é considerado o profissional do medicamento. Sendo a Farmalabor uma Unidade de Produção de medicamentos seria de esperar que uma elevada porção dos seus colaboradores tivessem a formação académica farmacêutica. Contudo, na realidade, existem vários profissionais na empresa que não possuem esta formação, nomeadamente na GQ. Na génese desta situação, que é comum a outras Indústrias Farmacêuticas, pode estar a falta do acompanhamento entre o plano de estudos do MICF e a constante evolução das diversas áreas desta atividade. Contudo, compete a nós, futuros e atuais farmacêuticos, transmitir aquilo que nos diferencia dos outros profissionais e salvaguardar a nossa posição, enquanto profissionais de saúde, nesta atividade.

## 5. Conclusão

Após 3 meses de estágio, ainda que num contexto atípico de pandemia, o balanço final que faço é extremamente positivo. Apesar de inicialmente não estar programado um estágio no departamento da GQ, atualmente, considero que foi uma reviravolta favorável uma vez que, do que conheci, acabei por me identificar mais com o trabalho realizado neste departamento.

Este primeiro contacto com a Indústria Farmacêutica foi das experiências mais enriquecedoras e acarinhadas que vivi, até à data. Não só pelo facto de me ter posto à prova em vários aspetos como, por exemplo, na gestão do stress, como também por me ter permitido conhecer algo que me daria, num futuro, prazer em executar como profissão.

Resta-me agradecer, com grande carinho, a toda a equipa da Farmalabor que me recebeu de braços abertos mostrando-se sempre disponível a ajudar e proporcionando um ambiente profissional de excelência o que, possibilitou trazer ao de cima as minhas qualidades.

## 6. Referências Bibliográficas

MEDINFAR. **O Grupo**. (2020). [Consultado a 20/08/2020]. Disponível na Internet: <http://www.medinfar.pt/>



## **Capítulo 3**

### **Monografia**

**“Terapias Génica e Celular na Doença de Alzheimer”**

## Lista de Abreviaturas

- AAV** - Vírus adeno-associado (do inglês *Adeno-associated viroses*)
- ACh** - Acetilcolina (do inglês *AcetylCholine*)
- AChE** - Acetilcolinesterase (do inglês *Acetylcholinesterase*)
- Ad** - Adenovírus
- ADI** - *Alzheimer's Disease International*
- ApoE** - Apolipoproteína E
- APOE4** - Alelo  $\epsilon 4$  do gene que codifica a Apolipoproteína E
- A $\beta$**  - Beta amilóides
- BHE** - Barreira Hematoencefálica
- BM-MSCs** - Células Estaminais Mesenquimais derivadas de Medula Óssea (do inglês *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*)
- BDNF** - Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês *Brain-derived Neurotrophic Factor*)
- SC** - Células Estaminais (do inglês *Stem Cells*)
- ChAT** - Colina Acetiltransferase (do inglês *Choline Acetyltransferase*)
- DAE** - Doença de Alzheimer Esporádica
- DAF** - Doença de Alzheimer Familiar
- ESCs** - Células Estaminais Embrionárias (do inglês *Embryonic Stem Cells*)
- hESCs** - Células Estaminais Embrionárias humanas (do inglês *Human Embryonic Stem Cells*)
- hMSCs** - Células Estaminais Mesenquimais humanas (do inglês *Human Mesenchymal stem cells*)
- hNSCs** - Células Estaminais Neurais humanas (do inglês *Human Neural Stem Cells*)
- HSCs** - Células Estaminais Hematopoiéticas (do inglês *Haematopoietic Stem Cells*)
- HSV** - Herpes-vírus simples (do inglês *Herpes Simplex Virus*)
- IPSCs** - Células Estaminais Pluripotentes Induzidas (do inglês *Induced Pluripotent Stem Cells*)
- IT** - Intratecal
- IV** - Intravenosa
- LCR** - Líquido cefalorraquidiano
- LMSCs** - Células Estaminais Mesenquimais Longitudinais (do inglês *Longeveron Mesenchymal Stem Cells*)
- LV** - Lentivírus
- MLV** - Vírus da Leucemia Murina de Moloney (do inglês *Murine Leukemia Viroses*)
- MSCs** - Células Estaminais Mesenquimais (do inglês *Mesenchymal stem cells*)
- NFTs** - Tranças Neurofibrilares (do inglês *Neurofibrillary Tangles*)
- NGF** - Fator neurotrófico neuronal (do inglês *Nerve Growth Factor*)

**NPs** - Nanopartículas

**NSCs** - Células Estaminais Neurais (do inglês *Neural Stem Cells*)

**NT-3** - Neurotrofina-3

**NT4/5** - Neurotrofina 4/5

**NTs** - Neurotrofinas

**ORFs** - Sequências de leitura aberta (do inglês *Open Reading Frames*)

**PAMAM** - Dendrímero poli (amidoamina)

**PEG** - Polietilenoglicol

**PPA** - Proteína Precursora de Amiloide

**PPI** - Dendrímero poli (imina propileno)

**PSEN 1** - gene codifica Presenilina 1

**PSEN 2** - gene codifica Presenilina 2

**rAAV** - Virus adeno-associado recombinante (do inglês *recombinant Adeno-Associated Virus*)

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**TC** - Terapia Celular

**TG** - Terapia Génica

**VE** - Vesículas Extracelulares

**ZSG** - Zona SubGranular

**ZSV** - Zona SubVentricular

## Resumo

A Doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa de etiologia desconhecida. A fisiopatologia desta doença apresenta várias hipóteses explicativas, sendo a mais aceita a hipótese da cascata amiloide. A terapêutica, atualmente instituída atua meramente a nível sintomático e não impede a progressão da doença. Novas abordagens terapêuticas, no âmbito da medicina moderna, têm vindo a ganhar relevância na investigação farmacêutica, nomeadamente terapias génicas e celulares. A terapia génica ambiciona, numa única administração, expressar genes terapêuticos que permitam a regressão da doença. Para isso, esforços são feitos no *design* do veículo de entrega mais eficiente e na via de administração mais segura. Os vetores mais utilizados são virais, no entanto as nanopartículas surgem como agentes de entrega não virais promissores. Por outro lado, a terapia celular permite estimular a sobrevivência de neurónios ou substituí-los por células saudáveis. A combinação de ambas as terapias pode vir a revelar-se um sucesso e consiste na utilização de células estaminais como veículos de transporte e expressão de transgenes devido à sua longevidade. Tanto a terapia génica como a terapia celular possuem ensaios clínicos a decorrer no âmbito da Doença de Alzheimer e passos importantes têm sido alcançados como a confirmação de segurança. O expectável é obter-se resultados favoráveis de eficácia nestas abordagens terapêuticas e desenvolve-se uma possível cura.

**Palavras-chave:** Doença de Alzheimer, Terapia Génica, Transgenes, Vetores, Nanopartículas, Terapia celular, Células Estaminais, Ensaios Clínicos.

## **Abstract**

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease of unknown etiology. The pathophysiology of this disease presents several explanatory hypotheses, the most accepted of which is the amyloid cascade hypothesis. The currently instituted therapy acts merely at a symptomatic level and does not prevent the progression of the disease. New therapeutic approaches in the field of modern medicine have been gaining relevance in pharmaceutical research, namely gene and cellular therapies. Gene therapy aims at a single administration to express therapeutic genes that allow the disease to regress. The viral vectors are the most used, however the nanoparticles appear as promising non-viral delivery agents. On the other hand, cell therapy makes it possible to stimulate the survival of neurons or replace them with healthy cells. The combination of both therapies may prove to be a success and consists of the use of stem cells as vehicles for the transport and expression of transgenes due to their longevity. Both gene therapy and cell therapy have ongoing clinical trials in the context of Alzheimer's Disease and important steps have been taken as confirmation of safety. The expectation is to obtain favorable results of efficacy for these therapeutic approaches and a possible cure.

**Keywords:** Alzheimer's Disease, Gene Therapy, Transgenes, Vectors, Nanoparticles, Cell Therapy, Stem Cells, Clinical Trials.

## **I. Introdução**

Em Portugal, as percentagens de população jovem e ativa, até aos 64 anos de idade, diminuíram. Simultaneamente, a população idosa, acima dos 65 anos de idade, aumentou o que levou a um crescimento do índice de envelhecimento. Na prática, existe um maior número de idosos do que jovens no nosso país (Estatísticas Demográficas - 2018, 2018). Este aumento significativo da esperança média de vida da população deve-se a uma evolução generalizada na prestação de cuidados de saúde. Uma vez que o envelhecimento provoca o declínio das capacidades cognitivas é considerado um fator de risco para o aparecimento de doenças neurodegenerativas, nomeadamente a Doença de Alzheimer (DA). Neste contexto, tornou-se pertinente incluir a DA no âmbito da investigação farmacêutica dos grandes laboratórios e indústrias, a nível global (Palomer *et al.*, 2016).

Neste enquadramento, sob a orientação da Professora Doutora Armanda Santos, desenvolvi a monografia, que se segue, intitulada de “Terapias Génica e Celular na Doença de Alzheimer”. O foco nas novas abordagens terapêuticas resulta do particular interesse na investigação que pretende descobrir como controlar esta doença crónica e, subsequentemente, como interromper a sua progressão exponencial e, até ao momento, irreversível.

No primeiro capítulo faz-se uma contextualização e caracterização da DA. Os capítulos seguintes incidem nas Terapias Génica e Celular e as suas respetivas aplicações em doenças do foro neurológico, de forma a descrever os avanços já alcançados. Nessa perspetiva, abordei os pontos críticos relativos à implementação destas terapias em humanos e que levam à formulação de algumas questões, tais como: Estas abordagens terapêuticas, com base nos ensaios já realizados, mostraram-se seguras e eficazes? Quais os desafios inerentes a cada terapia? Serão possíveis de implementar na prática clínica e na realidade atual? De forma a se obter respostas, realizei uma revisão dos ensaios clínicos já publicados e sugiro a possibilidade de se recorrer à combinação de ambas as terapias com o intuito de se reforçar as vantagens de ambas.

## 2. Doença de Alzheimer

De acordo com a versão I0 da Classificação Internacional de Doenças (CID-I0), publicada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a DA é definida como uma doença neurodegenerativa primária de etiologia desconhecida que se desenvolve de forma lenta e constante durante um período de anos (World Health Organization, 1992).

Sucintamente, a DA em termos fisiológicos origina perda neuronal, ou seja, leva à morte de células nervosas em zonas características do cérebro nomeadamente nos lobos temporais e frontais, no hipocampo, na substância inominada e no cerúleo. Consequentemente verifica-se uma perda de sinapses entre as células dessas regiões, o que leva a uma limitação da neurotransmissão e ao aparecimento dos sintomas clínicos. Esses, por sua vez, culminam naquilo que se define como síndrome de demência. Atualmente, a DA é considerada como a principal causa de demência nos idosos sendo responsável por 50 a 75% dos casos. Todavia, a presença deste síndrome por si só não nos permite fazer um diagnóstico da DA, uma vez que a demência pode ter múltiplas causas (Gale, Acar e Daffner, 2018; World Health Organization, 1992).

Esta doença é, habitualmente, classificada quanto ao seu aparecimento, em duas formas distintas:

- Doença de Alzheimer Familiar (DAF), a forma menos frequente e que se manifesta, em regra, em indivíduos com menos de 65 anos de idade. É considerada uma doença hereditária autossômica dominante para a qual já foram identificadas mutações genéticas envolvidas na sua etiologia, nomeadamente nos genes que codificam a Proteína Precursora Amiloide (PPA) no cromossoma 21, a Presenilina 1 (PSEN 1) no cromossoma 14 e a Presenilina 2 (PSEN 2) no cromossoma 1 (Bondi *et al.*, 2018; Tellechea *et al.*, 2018).

- Doença de Alzheimer Esporádica (DAE), a forma que mais prevalece e caracterizada por ter um início tardio, após os 65 anos de idade. Não tendo a sua etiologia descrita de forma objetiva, pensa-se ser o resultado de uma relação complexa entre fatores tanto genéticos como ambientais. O gene que codifica a Apolipoproteína E (ApoE), mais especificamente, o alelo  $\epsilon 4$  desse gene (APOE4) é considerado um fator de risco genético associado a esta forma, sendo, atualmente, considerado como um dos maiores fatores de risco da DA (Lane, Hardy e Schott, 2018; Tellechea *et al.*, 2018; Safieh, Korczyn e Michaelson, 2019).

Ambas as formas desenvolvem as mesmas características patológicas. Um indivíduo com DA apresenta as suas funções cognitivas afetadas, principalmente a memória, a linguagem o raciocínio e a capacidade de executar tarefas. No dia-a-dia isso irá refletir-se tanto a nível funcional como comportamental uma vez que, apesar de se tratar de um processo lento e

progressivo, é, simultaneamente, irreversível face às opções terapêuticas disponíveis. Com o objetivo de melhorar a qualidade de vida e, possivelmente, de se desenvolver uma cura, várias abordagens terapêuticas não convencionais têm sido alvo de investigação global, como será referido nos seguintes capítulos (Falco, De *et al.*, 2016).

## **2.1. Contextualização Histórica**

A doença neurodegenerativa, à qual atualmente chamamos de DA, foi descrita pela primeira vez, no que diz respeito aos seus sintomas, por Alois Alzheimer, um psiquiatra intitulado como o fundador da neuropatologia em geral. De facto, em 1907, através de uma publicação, descreveu os sintomas presentes em uma paciente de 51 anos, nomeadamente a rápida perda de memória e a desorientação, seguidas de depressão e alucinações. Mencionou ainda, que no exame histológico feito ao cérebro dessa paciente, após a sua morte, observou placas senis e Tranças Neurofibrilares (NFTs), ambas reconhecidas, nos dias de hoje, como marcadores neuropatológicos da DA. Ainda assim, Alois Alzheimer permaneceu com a dúvida de estar, ou não, perante a caracterização de uma nova doença do foro neurológico (Barnett, 2019; Bondi *et al.*, 2018; Zilka e Novak, 2006). Foi em 1910, que Emil Kraepelin, um dos principais psiquiatras da época, no seu Livro de Psiquiatria, utilizou pela primeira vez o termo DA para se referir a uma doença independente e sem ser necessariamente uma consequência do envelhecimento (Barnett, 2019). Em 1976, um estudo realizado por Robert Katzman, deu origem a uma reviravolta marcante: concluiu-se que a DA foi a quarta principal causa de morte entre os idosos (Bondi *et al.*, 2018).

Na década de 1990, a atenção estava virada para a caracterização dos défices neuropsicológicos presentes em indivíduos com DA de forma a estabelecer critérios de diagnóstico mais precisos e a identificar as áreas cerebrais afetadas pela doença. Sendo o défice de memória um dos primeiros a manifestar-se, concluiu-se que os lobos temporais destes indivíduos estariam afetados (Bondi *et al.*, 2018).

Com a mudança de século, também se deu uma mudança no foco da investigação. A atenção passou a incidir na fase prodromal, ou seja, no conjunto de sintomas que antecedem os sintomas específicos da DA. Este redirecionamento de foco permitiu identificar indivíduos que poderão vir a ser potenciais doentes sem ainda serem considerados sintomáticos (Bondi *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, a investigação permitiu identificar, de forma mais objetiva, os biomarcadores associados a esta patologia. Juntamente com o aparecimento dos métodos de neuroimagem como a tomografia por emissão de positrões, tornou-se possível detetar,



precocemente, alterações associadas à DA. Todos esses avanços tornaram exequível o diagnóstico precoce da DA assim como a sua diferenciação relativamente a outras patologias possíveis de causar demência (Bondi *et al.*, 2018).

## **2.2. Epidemiologia**

O avanço nas técnicas de diagnóstico tornou possível realizarem-se estimativas mais fiáveis de prevalência e incidência da DA. A DAE apresenta uma incidência global de 1-3% e uma prevalência de 10-30% na população idosa, acima dos 65 anos de idade. No que diz respeito à população acima dos 90 anos de idade, os dados são considerados pouco fiáveis pelo facto de certos marcadores da DA serem comuns ao processo natural de envelhecimento (Masters *et al.*, 2015).

Todos os anos, a *Alzheimer's Disease International* (ADI) publica um Relatório a informar acerca da evolução global desta patologia. O Relatório Mundial de Alzheimer, de 2019, revela que existem cerca de 50 milhões de pessoas com demência espalhadas globalmente. A estimativa é que este número aumente para 82 milhões em 2030 e para cerca de 152 milhões em 2050.

## **2.3. Fisiopatologia**

A DA é considerada multifatorial, o que implica considerarem-se vários mecanismos fisiopatológicos que podem estar associados ao seu desenvolvimento. À medida que foram surgindo avanços na investigação da etiologia desta doença, foram-se desenvolvendo, também, novas hipóteses a respeito da sua fisiopatologia.

Nos últimos anos, a DA é caracterizada através de marcadores neuropatológicos, nomeadamente: perdas neuronais e sinápticas seletivas que culminam numa diminuição da massa cerebral; neuroinflamação; depósitos proteicos insolúveis de peptídeos Beta Amilóides (A $\beta$ ), designados de placas senis, no espaço extracelular; agregados da proteína Tau hiperfosforilada, que se intitulam de NFTs no espaço intracelular. Os depósitos de A $\beta$  podem existir nos cérebros de idosos sem sintomas clínicos, no entanto indivíduos com DA apresentem, normalmente, mais que um marcador neuropatológico em simultâneo (Masters *et al.*, 2015).

Tendo isso em conta, desenvolveram-se hipóteses que sustentam que os mecanismos moleculares que originam estes marcadores levam ao desenvolvimento da DA, assumindo-se, cada vez mais, que se encontram interligados entre si (Masters *et al.*, 2015; Scheltens *et al.*, 2016).

### **2.3.1. Hipótese Colinérgica**

Sendo a perda neuronal progressiva uma das principais características desta doença e estando, na maioria, associada a neurónios colinérgicos, assumiu-se uma relação entre o défice desses neurónios e o desenvolvimento da doença. Essa premissa desencadeou uma hipótese, considerada a mais antiga no que diz respeito à fisiopatologia da DA, a hipótese colinérgica. Há bastante tempo que são reconhecidos os papéis desempenhados por estes neurónios e pelo neurotransmissor Acetilcolina (ACh) nos processos de memória e de aprendizagem. Vários estudos indicam que os défices na quantidade da Colina Acetiltransferase (ChAT), enzima responsável pela síntese da ACh no córtex e hipocampo, e na quantidade de neurónios colinérgicos no núcleo basal de Meynert, são predominantes na DA. Esta hipótese relaciona esses défices com o grau do défice cognitivo, assumindo-os como proporcionais, no sentido em que quanto maior for o défice do sistema colinérgico maior será o défice cognitivo (Falco, De *et al.*, 2016).

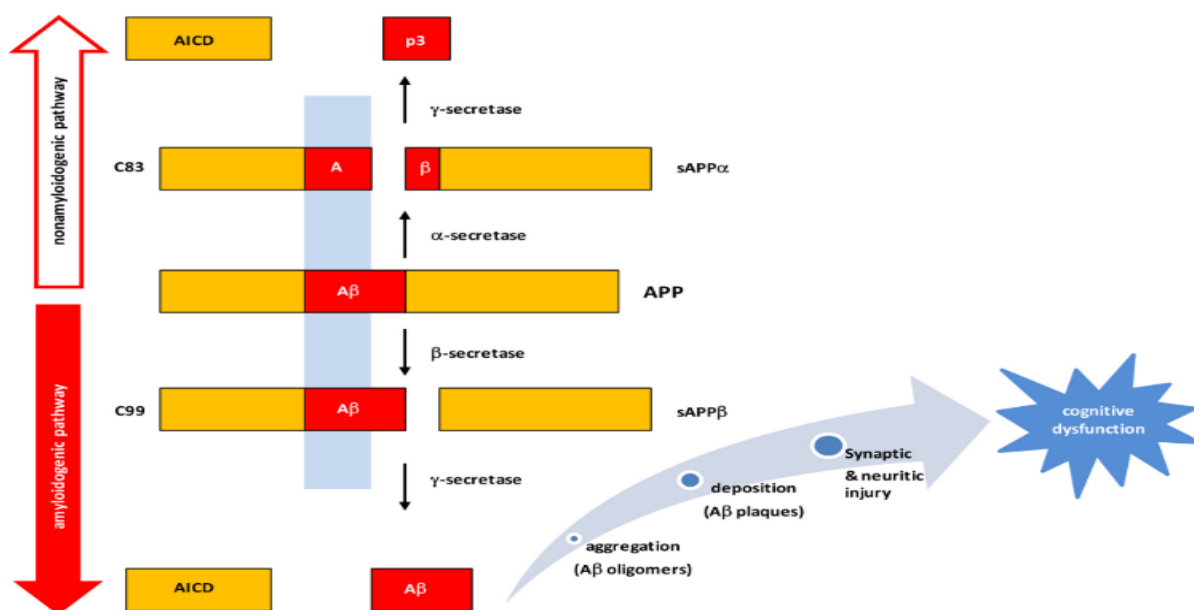
### **2.3.2. Hipótese Glutamatérgica**

O glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório do Sistema Nervoso Central (SNC) e atua em 3 tipos de recetores ionotrópicos: o recetor N-metil-D-Aspartato (NMDA), o recetor ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) e o recetor cainato. Esta hipótese defende que, em determinadas condições de metabolismo celular, pode ocorrer uma interação excessiva entre o glutamato e os recetores NMDA. Isso demonstra ter impacto a nível das concentrações intracelulares de cálcio, que ao estarem elevadas provocam maior excitabilidade neuronal, o que culmina em mecanismos de morte neuronal (Falco, De *et al.*, 2016).

### **2.3.3. Hipótese da Cascata Amiloide**

A PPA é uma proteína transmembranar presente em várias células do ser humano, como por exemplo nos neurónios, exercendo um papel na plasticidade sináptica. É também a proteína, a partir da qual, através de clivagens proteolíticas sucessivas, surgem os peptídeos A $\beta$ . As enzimas responsáveis, por este processo, intitulam-se de secretases  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . A clivagem consecutiva pelas  $\beta$ -secretase e  $\gamma$ -secretase constitui a via amiloidogénica, ou seja, leva à formação de peptídeos A $\beta$ , enquanto que a clivagem consecutiva pelas  $\alpha$ -secretase e  $\gamma$ -secretase é uma via não amiloidogénica que impossibilita a formação desses mesmo peptídeos (Figura 1). Os peptídeos resultantes podem ter uma cadeia de 38 a 43 aminoácidos, dependendo do local de clivagem da PPA. No processo de síntese dos peptídeos A $\beta$ , uma

relevância adicional é dada ao papel da enzima  $\gamma$ -secretase uma vez que a sua subunidade catalítica pode ser constituída pela proteína presenilina 1 ou presenilina 2 (Faustino, Rijo e Reis, 2017; Masters *et al.*, 2015; Scheltens *et al.*, 2016).

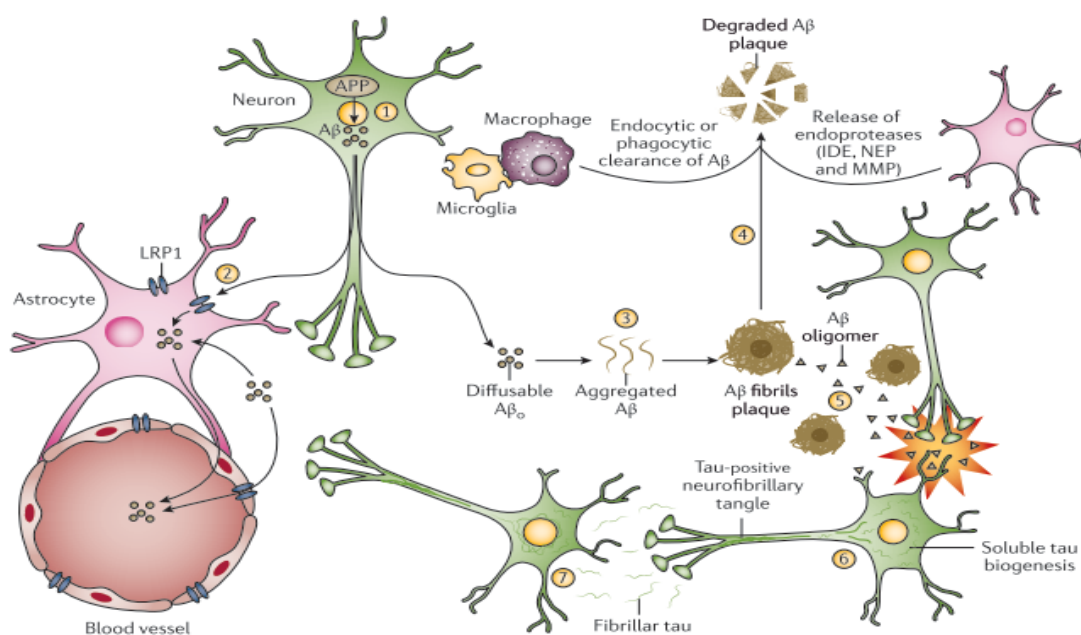


**Figura 1: Clivagem proteolítica da PPA.** O primeiro passo da clivagem pode ser realizado pela  $\alpha$  ou  $\beta$ -secretase iniciando-se as vias amiloidogénica ou não amiloidogénica. No segundo passo atua a enzima  $\gamma$ -secretase que na via amiloidogénica dá origem a peptídeos A $\beta$  que, posteriormente, se podem agregar e depositar na forma de placas senis, contribuindo para o desenvolvimento da DA (Adaptado de Faustino, Rijo e Reis, 2017).

A hipótese da cascata amiloide foi sustentada, inicialmente, por estudos realizados em indivíduos com DAF, isto é, indivíduos nos quais se confirmou a presença de mutações nos genes PSEN1, PSEN2 e no gene que codifica a PPA. A influência das mutações estudadas consiste num aumento da quantidade de peptídeos A $\beta$  sintetizados e/ou com características suscetíveis de promover a formação de agregados. Embora o peptídeo A $\beta$ 40 seja predominante, a sua tendência para formar agregados é menor quando comparado com o peptídeo A $\beta$ 42. Para esse efeito, os peptídeos, passam de monómeros a oligómeros, envolvendo mudanças nas suas conformações, podendo depositar e dar origem às placas senis. A formação destes agregados leva a uma ativação da microglia que desencadeia a libertação de várias citocinas pró-inflamatórias o que origina um ambiente de neuroinflamação. Para além disso, estas placas podem funcionar como reservatórios de oligómeros A $\beta$ , que quando libertados exercem neurotoxicidade na medida em que incentivam uma cascata de mecanismos que conduzem à morte celular dos neurónios. Um exemplo consiste na indução

da formação de NFTs, que permanece ainda desconhecido (Figura 2) (Faustino, Rijo e Reis, 2017; Masters *et al.*, 2015).

A proteína Tau é uma proteína normalmente solúvel com um papel importante na estabilização dos microtúbulos dos neurónios. A hiperfosforilação da tau leva à perda de função no citoesqueleto de microtúbulos e ao desencadeamento de uma cascata de eventos que culminam no aparecimento de NFTs. O facto destas serem também encontrados no quadro de outras patologias neurológicas sugere que se trata de uma consequência, que provêm do desenvolvimento da DA, e não de uma causa principal (Cao *et al.*, 2018; Falco, De *et al.*, 2016). Existem diversos estudos que apontam o aumento dos níveis dos peptídeos A $\beta$  como o responsável pela hiperfosforilação da proteína tau, no entanto, é algo que ainda está por explicar e que suscita dúvidas. Curiosamente, o inverso ainda não foi comprovado, mutações exclusivamente no gene que codifica a proteína tau não levam a uma acumulação de peptídeos A $\beta$  (Falco, De *et al.*, 2016).



**Figura 2: Mecanismos moleculares envolvidas na hipótese da cascata amiloide.** 1) Síntese dos peptídeos A $\beta$  a partir da PPA; 2) os peptídeos A $\beta$  resultantes podem ser capturados por astrócitos e libertados para o sistema vascular; 3) uma porção de peptídeos A $\beta$  pode formar agregados no espaço extracelular e, posteriormente, depositarem-se na forma de placas senis; 4) as placas senis podem ser degradadas por clearance endocítica ou fagocítica através de macrófagos e microglia ou por endoproteases libertadas por astrócitos; 5) alguns peptídeos A $\beta$  na forma de oligómeros podem dissociar-se das placas senis e exercer toxicidade ao nível de neurónios adjacentes levando à agregação da proteína Tau (por mecanismos ainda desconhecidos); 6) a hiperfosforilação da proteína Tau origina NFTs; 7) os NFTs podem ser libertados e capturados por neurónios saudáveis propagando-se mecanismos que levam à morte celular (Adaptado de Masters *et al.*, 2015).

### **2.3.4. O papel das Neurotrofinas**

As Neurotrofinas (NTs) consistem em proteínas ou peptídeos que desempenham um papel relevante no desenvolvimento, na diferenciação e na sobrevivência das células do SNC. Atuam como fatores de crescimento a nível da neurogênese endógena, ou seja, através dos seus mecanismos de sinalização estimulam a formação de neurónios e previnem mecanismos de morte celular. Podem ser divididas em 4 tipos: Fator Neurotrófico Neuronal (NGF), Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), Neurotrofina-3 (NT-3) e Neurotrofina-4/5 (NT4/5) (Faustino, Rijo e Reis, 2017).

Recentemente, vários estudos têm sido planeados com o objetivo de se observar o impacto que os défices em NTs podem causar, principalmente em relação ao NGF e ao BDNF. Uma hipótese, que tem vindo a surgir, considera que a diminuição desses fatores neurotróficos no cérebro dos indivíduos com DA pode ser o elo de ligação, a montante, entre as hipóteses colinérgica e da cascata amiloide. De facto, a neurodegeneração é uma marca desta doença e uma vez que as NTs apresentam características neuroprotetoras, através dos seus mecanismos de sinalização, são consideradas alvos de abordagens terapêuticas promissoras, nomeadamente de Terapia Génica (TG) como será referido nos capítulos seguintes (Faustino, Rijo e Reis, 2017).

### **2.4. Terapêutica**

As abordagens terapêuticas consideradas atualmente na prática clínica têm por base as várias hipóteses da fisiopatologia da DA, principalmente as hipóteses colinérgica e glutamatérgica. Os medicamentos administrados atuam proporcionando um alívio a nível dos sintomas clínicos e não na causa-raiz propriamente dita. Existem duas classes terapêuticas disponíveis: i) os inibidores da acetilcolinesterase (AChE) que, tal como o nome indica, vão inibir a ação desta enzima responsável pela hidrólise da ACh. Desta forma, pretende-se aumentar os níveis deste neurotransmissor na fenda sináptica. Exemplos de fármacos desta classe são o donepezil, rivastigmina e a galantamina; ii) os antagonistas de NMDAR que provocam um bloqueio a nível desses recetores impossibilitando o influxo de cálcio pelo canal do receptor. A memantina é o único fármaco desta classe aprovado e é prescrito em casos de DA moderada a severa. Habitualmente é bem tolerada já existindo uma formulação de libertação modificada (Falco, De et al., 2016).

### 3. Terapia Génica: uma nova abordagem terapêutica

O mapeamento da sequência do genoma Humano é, de facto, considerado um marco histórico e visto como algo que impulsionou o avanço em várias áreas científicas, nomeadamente na genética. Este avanço, ao fundir-se com o aprofundamento do conhecimento acerca dos genes envolvidos em diversas patologias, deu origem a um redirecionamento terapêutico, isto é, passou a considerar-se possível uma intervenção a nível desses mesmos genes (Oliveira *et al.*, 2018).

Nesta linha, a TG começou por ser uma abordagem investigada em doenças monogénicas, doenças causadas por mutações num único gene, com o objetivo de se adicionar cópias corretas, dos genes em causa, em células-alvo. Atualmente, as doenças adquiridas e multifatoriais, como é o caso da DA, são também vistas como alvos desta abordagem, uma vez que a maioria das terapêuticas convencionais adotadas atuam ao nível dos sintomas e não na progressão da doença ou na cura propriamente dita (Linden, 2010; Oliveira *et al.*, 2018).

Trata-se de uma abordagem terapêutica, relativamente recente, que surgiu no seguimento de várias descobertas tecnológicas, nomeadamente, a tecnologia do DNA recombinante que, sucintamente, consiste numa sequência de DNA artificial mediante a ligação de várias sequências de DNA, obtida através de enzimas de restrição capazes de cortar fragmentos de DNA em pontos específicos. O objetivo é constarem no DNA recombinante os genes terapêuticos de interesse, sendo esses designados de transgenes, uma vez que vão ser transferidos para um organismo.

Dito isto, torna-se perceptível que o conceito teórico de TG é relativamente simples, mas, no entanto, a sua aplicação na prática é considerada o oposto. Existem várias variáveis a ter em conta para se obter uma TG de sucesso, entre elas, o veículo utilizado para a transferência eficiente dos transgenes e a identificação e acessibilidade das células-alvo nos hospedeiros (Gonçalves e Paiva, 2017).

Esta última variável leva a que seja feita uma distinção entre dois tipos de TG possíveis de se aplicar: i) TG de células germinativas onde, como o nome indica, o alvo são células germinativas e as modificações que surgem da terapia são transmitidas à descendência; ii) TG de células somáticas onde a transferência de genes é feita somente em células somáticas e não afetará as gerações subsequentes. Esta última pode ser dividida em duas categorias: TG *ex vivo* em que as células são retiradas do hospedeiro, isoladas, geneticamente modificadas e, posteriormente, transplantadas; TG *in vivo* em que as células são geneticamente modificadas estando ainda dentro do hospedeiro (Gonçalves e Paiva, 2017).

### **3.1. Veículos: O desafio na entrega de material genético**

Desde o momento que o material genético começou a ser visto como uma opção terapêutica, efetuaram-se várias tentativas na sua entrega às células-alvo pretendidas. Esse obstáculo inicial fez com que os resultados dos primeiros estudos não correspondessem às expectativas, concluindo-se tratar de um desafio relevante, ao ponto de afetar todo o processo (Gonçalves e Paiva, 2017). Rapidamente, observou-se que a entrega direta de sequências de DNA na sua forma pura não seria viável, uma vez que o nosso organismo dificulta a sua passagem através das membranas plasmáticas, como mecanismo de defesa, de forma a não ocorrerem alterações no genoma. Consequentemente, surgiu a necessidade de se recorrer a vetores, que na prática são agentes capazes de transportar transgenes, permitindo a sua transferência e expressão nas células-alvo de forma segura e eficaz (FÉCCHIO, MACEDO e RICCI, 2018; Gonçalves e Paiva, 2017; Oliveira *et al.*, 2018).

A escolha de vetores, independentemente da categoria a que pertencem, implica ter em conta certos requisitos, tais como: i) a imunogenicidade e toxicidade que podem desencadear, pois, de facto, é necessário que não sejam reconhecidos pelo sistema imunológico dos hospedeiros de modo a não desencadearem reações imunológicas, que, no pior dos casos, podem levar à morte; ii) a compatibilidade entre o transgene a transportar e o tipo de vetor, por exemplo, no que diz respeito ao peso molecular; iii) a capacidade de induzirem a expressão do transgene nas células-alvo; iv) a viabilidade de se obterem, purificados, em quantidades significativas para, futuramente, se produzirem em grande escala (Gonçalves e Paiva, 2017).

O objetivo final é escolher-se o vetor o mais compatível possível com o transgene a transferir, para que possa ser corretamente expresso nas células do hospedeiro, se possível, permanentemente. Para esse efeito, consoante o caso, pode-se usar vetores não virais ou vetores virais (FÉCCHIO, MACEDO e RICCI, 2018; Gonçalves e Paiva, 2017; Oliveira *et al.*, 2018).

#### **3.1.1. Vetores Não Virais**

No caso de se recorrer a vetores não virais, torna-se necessário aplicar métodos que facilitem o processo de transfeção, ou seja, de entrada de material genético nas células-alvo, podendo ser distinguidos em duas categorias: os métodos físicos e os métodos químicos. Os métodos físicos atuam a nível das membranas plasmáticas, isto é, vão provocar um aumento temporário da permeabilidade através de processos físicos como a microinjeção, a eletroporação e a aplicação de ultrassons. Apesar de serem métodos relativamente simples não conferem proteção aos transgenes contra a ação de nucleases (enzimas intracelulares

capazes de metabolizar material genético). Os métodos químicos, por sua vez, utilizam compostos químicos sintéticos ou naturais catiónicos que interagem com os genes. A carga positiva destes compostos vai interagir com a carga negativa dos genes terapêuticos a transportar formando-se vetores eletrostaticamente estáveis. Para além disso, o vetor ao possuir carga positiva não irá sofrer repulsão eletrostática, ocasionada pela carga negativa dos grupos fosfatos dos fosfolípidos, que constituem as membranas celulares, permitindo a sua passagem (Athanasopoulos, Munye e Yáñez-Muñoz, 2017; Phelan, 2018).

### **3.1.1.1. Plasmídeos, Lipoplexos, Poliplexos e Lipopoliplexos**

Os plasmídeos foram dos primeiros vetores não virais a serem utilizados. São moléculas de DNA circular e cadeia dupla, existentes em bactérias, que se multiplicam de forma independente do DNA presente no cromossoma bacteriano. São considerados estruturas relativamente simples nas quais, através de técnicas de DNA recombinante, se pode inserir transgenes. Para isso recorre-se às enzimas de restrição e à enzima DNA ligase, que tem a função de unir os genes alvo isolados ao plasmídeo. Como resultado, obtém-se um plasmídeo recombinante que, de uma forma geral, apresenta na sua estrutura: i) um promotor que regula a transcrição do transgene; ii) o transgene terapêutico que se pretende expressar; iii) uma sequência que sinaliza o fim da transcrição. O entrave no uso de plasmídeos, na TG, consiste na resistência que as células conferem à sua passagem devido à repulsão eletrostática (Linden, 2010; Phelan, 2018).

Para se contornar, esse problema, pode-se utilizar os métodos físicos já mencionados, com o objetivo de fragilizar as membranas plasmáticas e levar à abertura de poros. Outra estratégia passa por colocar uma quantidade consideravelmente elevada do plasmídeo recombinante na vizinhança das células-alvo, para que a quantidade capaz de atravessar as membranas seja suficiente para expressar o transgene na quantidade desejada. Por fim, existe ainda, a possibilidade de se recorrer aos métodos químicos com o objetivo de adicionar componentes aos plasmídeos, formando-se complexos que, na grande maioria, são capturados pelas células por endocitose. Estes, consoante o seu tamanho e estrutura, vão ter comportamentos diferentes podendo atuar como Nanopartículas (NPs) no caso de possuírem um tamanho entre 0-100 nm. Nesta estratégia é necessário ter-se em conta que os complexos formados têm duas barreiras críticas a ultrapassar: as membranas celulares das células-alvo e as membranas dos endossomas, após endocitose, para que ocorra libertação do material genético no citoplasma das células. No caso deste último passo não ocorrer, o vetor com o



material genético é degradado por lisossomas, durante a digestão intracelular, não se verificando a ação terapêutica desejada (Linden, 2010; Phelan, 2018).

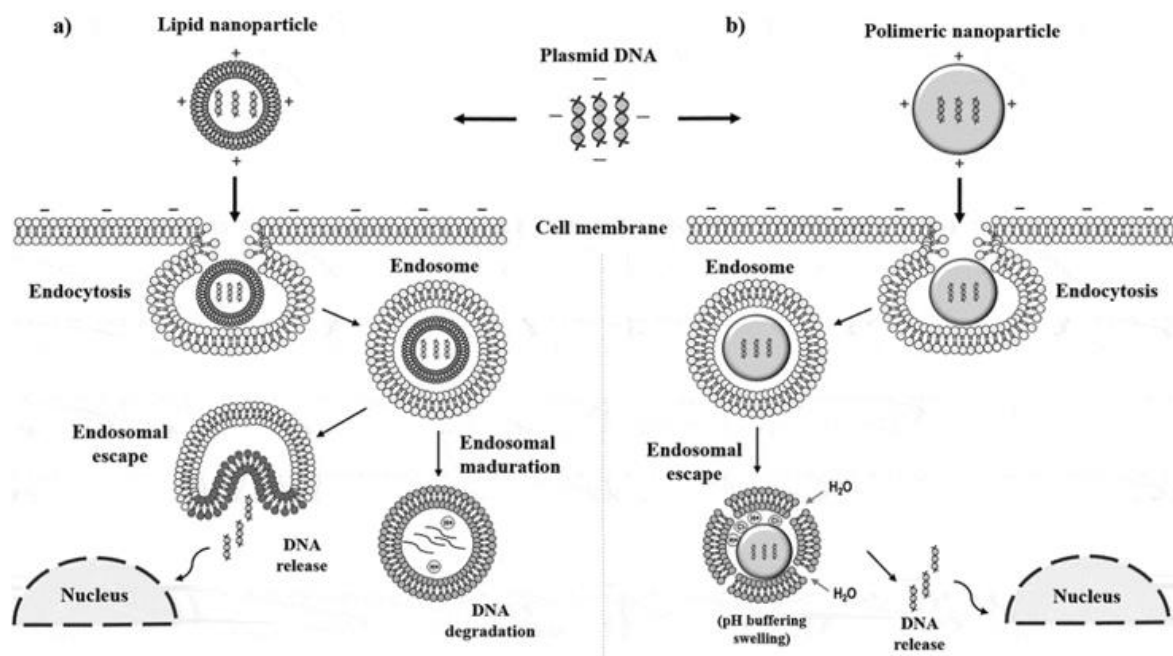
Os lipoplexos são vetores não virais de estrutura esférica constituídos por plasmídeos cobertos por lipossomas aos quais se adicionam lípidos de carga positiva, negativa ou neutra. Os mais utilizados, até à data, são os catiónicos por evitarem a repulsão eletrostática a nível das membranas celulares, como já mencionado anteriormente, promovendo a endocitose. No que diz respeito à libertação do material genético para o citoplasma das células, nestes complexos para além de lípidos catiónicos, adiciona-se lípidos neutros à sua composição. Esses, devido às suas propriedades, levam o complexo a adotar uma estrutura hexagonal, o que torna a transfeção mais eficiente (Athanasopoulos, Munye e Yáñez-Muñoz, 2017; Oliveira *et al.*, 2018; Pichon, Billiet e Midoux, 2010).

Na mesma linha, surgiram os poliplexos, complexos constituídos por plasmídeos e polímeros catiónicos. Por possuírem um tamanho à escala nanométrica, até 100 nm, são considerados nanotransportadores que facilitam a condensação do material genético e consequentemente, a sua passagem pelas membranas celulares. Neste caso, o mecanismo de saída do complexo do endossoma suscita dúvidas e vai depender das propriedades do polímero utilizado. Uma das hipóteses mais aceites, a hipótese da esponja de protões, defende que após a formação do endossoma a bomba de protões presente na sua membrana, vai permitir a entrada de protões com o objetivo de diminuir o pH do meio (passo necessário à digestão intracelular). Os polímeros ao terem grupos funcionais, nas suas cadeias poliméricas, possíveis de serem protonados, captam esses protões. Consequentemente, ocorre mais influxo de protões o que leva à criação de um gradiente osmótico e a um aumento da água no interior do endossoma que culmina na rutura da sua membrana (Oliveira *et al.*, 2018; Pichon, Billiet e Midoux, 2010).

Por fim, existe ainda a possibilidade de fazer uso das vantagens de ambos, através da adição de lípidos que favorecem a passagem pela membrana das células e polímeros que favorecem a condensação em escala nano. Essas estruturas designam-se lipopoliplexos e são mais estáveis e mais eficientes na transfecção. O objetivo passa por se atingir o *design* ótimo destes tipos de vetores não virais que permita uma passagem pelas barreiras celulares e uma transfeção eficientes (Athanasopoulos, Munye e Yáñez-Muñoz, 2017; Oliveira *et al.*, 2018). A Figura 3 ilustra os métodos de transfecção destes vetores.

Os vetores não virais apresentam vantagens como fácil produção em grande escala, a incorporação de genes de variadas dimensões e a baixa imunogenicidade por não possuírem componentes de origem viral. Devido a essas características, são veículos utilizados na transfeção de transgenes em células isoladas específicas. No entanto, apesar de relevantes,

estas vantagens não ultrapassam a eficácia que os vetores virais apresentam na entrega de genes terapêuticos, o que faz com que sejam pouco utilizados quando o alvo se trata de órgãos complexos como, por exemplo, o cérebro (Athanasopoulos, Munye e Yáñez-Muñoz, 2017; Linden, 2010).



**Figura 3: Métodos de transfecção de vetores não virais:** a) entrada de nanopartícula lipídica (a) e polimérica (b) na célula-alvo por endocitose. Em ambos os casos, tem de ocorrer liberação do material genético no citoplasma da célula (Adaptado de Tejeda-Mansir, García-Rendón e Guerrero-Germán, 2019).

### 3.1.2. Vetores Virais

Os vetores virais são, até à data, os mais utilizados nos ensaios clínicos de TG e, tal como o nome indica, provêm da manipulação de vírus. Neste caso, para a transdução de genes faz-se uso do próprio mecanismo de sobrevivência destes microrganismos, que passa por infectar as células-alvo, com a finalidade de integrarem no genoma do hospedeiro os seus próprios genes virais para que sejam expressos e se possam originar novas cópias do vírus, isto é, novos microrganismos. Tendo isso em conta, surgiu o conceito de reorganizar o genoma viral, para se eliminar os genes responsáveis por conferir patogenicidade e envolvidos na proliferação, mantendo apenas aqueles necessários à invasão celular e levando à criação de espaço para a adição dos transgenes de interesse. Após construção do vetor, a sua entrada nas células ocorre através de interações que se estabelecem entre proteínas virais expressas nos capsídeos dos vetores e os recetores expressos nas superfícies das células-alvo. Uma vez o

vetor internalizado, segue-se a entrega do material genético ao núcleo das células (FÉCCHIO, MACEDO e RICCI, 2018; Oliveira *et al.*, 2018).

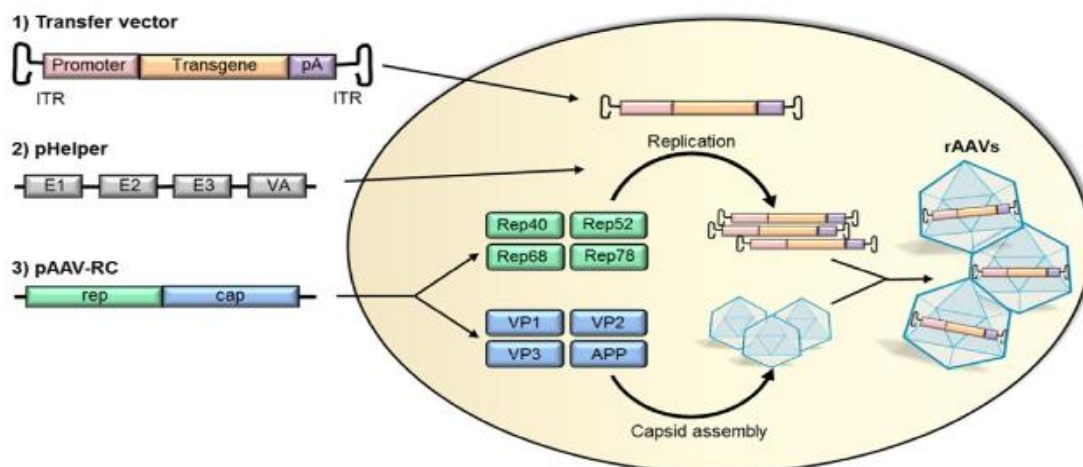
Apesar de este processo estar cada vez mais otimizado e a capacidade natural de invasão celular, que os vírus fornecem, ser bastante útil, na prática, existem sempre riscos associados como os de genotoxicidade e de infeção, que devem ser tidos em conta na escolha do tipo de vetor viral. Outras desvantagens consistem na limitação do tamanho do transgene a incorporar no vetor viral e o facto de a produção em grande escala ser mais complexa (Oliveira *et al.*, 2018). Os mais utilizados, em TG, são os seguintes: Lentivírus (LV), Vírus Herpes-simplex (HSV), Adenovírus (Ad) e Vírus Adeno-Associados (AAV), sendo que cada tipo apresenta características distintas, nomeadamente, no peso molecular do transgene a incorporar, na capacidade de integrarem os transgenes no genoma das células-alvo e no tempo da expressão que proporcionam (Tabela 1).

**Tabela 1: Características dos vetores virais** (Gonçalves e Paiva, 2017).

	LV	HSV	Ad	AAV
Peso molecular do transgene	10 kB	> 30 kB	~ 30 kB	~ 4.6 kB
Integração no genoma das células-alvo	Sim	Sim	Não	Raro
Duração da expressão	Longa	Transitória	Transitória	Longa (nas células descendentes)

Devido às características dos AAV, nomeadamente assegurarem uma expressão longa, torna-se pertinente mencionar, resumidamente, como são utilizados de maneira a veicularem os genes pretendidos. O seu genoma possui duas sequências, rep e cap, designadas de sequências de leitura aberta (ORFs) (Figura 4). A sequência rep vai codificar proteínas necessárias à replicação viral, enquanto que a sequência cap codifica proteínas estruturais do capsídeo viral. Consoante as proteínas do capsídeo, estes vírus podem ser divididos em diferentes serotipos. A produção de vetores AAV recombinantes (rAAV), isto é, que contenham os transgenes, pode ocorrer pelo método da transfecção tripla. Neste método 3 intervenientes são colocados em células destinadas a esta produção: i) um plasmídeo com os genes rep e cap que irá ser responsável por transcrever as proteínas do capsídeo e pelo empacotamento final do AAV geneticamente modificado; ii) um plasmídeo auxiliar, designado por plasmídeo *helper*, que vai fornecer genes adenovirais que contribuem para a replicação do genoma; iii) um plasmídeo constituído pelo transgene cuja transcrição é regulada por um promotor (Figura 4). No final, obtem-se rAAV que não possuem qualquer gene viral sendo,

posteriormente, produzidos em elevadas quantidades (Saraiva, Nobre e Pereira de Almeida, 2016).



**Figura 4: Processo de produção de vetores rAAV.** Para a produção são necessários 3 plasmídeos: o plasmídeo responsável pela expressão do transgene (1); o plasmídeo auxiliar (2) e o plasmídeo responsável pela expressão de proteínas estruturais (3). Como resultado final obtém-se rAAVs (Adaptado de Saraiva, Nobre e Pereira de Almeida, 2016).

### 3.2. Terapia Génica em Doenças Neurodegenerativas

O potencial da TG ser utilizada como ferramenta no tratamento e, eventualmente, cura de doenças neurodegenerativas, como a DA, é cada vez mais reconhecido. No caso do SNC é preciso ter em conta que as células-alvo se encontram em tecido neuronal. Isso aumenta a preocupação no que diz respeito à segurança e toxicidade, para além dos fatores críticos, vetor e via de administração, a ter em conta.

#### 3.2.1. Vias de administração de vetores no SNC

Ao considerar as vias de administração passíveis de utilizar na entrega de agentes terapêuticos ao SNC, torna-se pertinente descrever, resumidamente, a estrutura da Barreira Hematoencefálica (BHE), uma vez que é a barreira que confere proteção ao cérebro. Trata-se de uma barreira que é constituída por astrócitos, pericitos e células endoteliais estreitamente unidas por junções celulares do tipo oclusivo. A maioria dos medicamentos não ultrapassa a BHE verificando-se o mesmo para a maioria dos vetores, o que faz com que seja necessário um esforço cada vez mais significativo em aperfeiçoar o mecanismo de passagem por esta barreira (Pérez-Martínez, Carrión e Cea, 2012).

Para a entrega de vetores ao SNC existem possibilidades distintas, sendo que o pretendido seria uma via não invasiva e que assegurasse o direcionamento às células-alvo. A

administração indireta faz-se com recurso à via Intravenosa (IV) que apesar de ser menos invasiva apresenta um enorme entrave, a obrigatoriedade de o vetor atravessar a BHE. Para além deste aspeto, a administração por esta via acarreta um maior risco de efeitos *off-target*, ou seja, o risco do transgene ser entregue e expresso em células não alvo, podendo levar a efeitos contrários aos pretendidos e a necessidade de administrar uma dose mais elevada para se atingir a dose terapêutica pretendida nas células-alvo (Sudhakar e Richardson, 2019).

Por outro lado, estes inconvenientes ficam ultrapassados ao considerar uma administração direta através da via intratecal (IT), em que se realizam injeções no LCR, ou através da via intraparenquimatosa em que se recorre a injeções estereotáxicas via cirurgia tendo como alvo regiões específicas do SNC. Neste caso, o vetor apenas é entregue às células da região administrada, no entanto através do transporte axonal pode atingir os neurónios circundantes. Esse mecanismo de transporte permite a movimentação de moléculas do corpo celular dos neurónios para e ao longo dos seus axónios, podendo ser anterógrado ou retrógrado (Pérez-Martínez, Carrión e Cea, 2012; Sudhakar e Richardson, 2019).

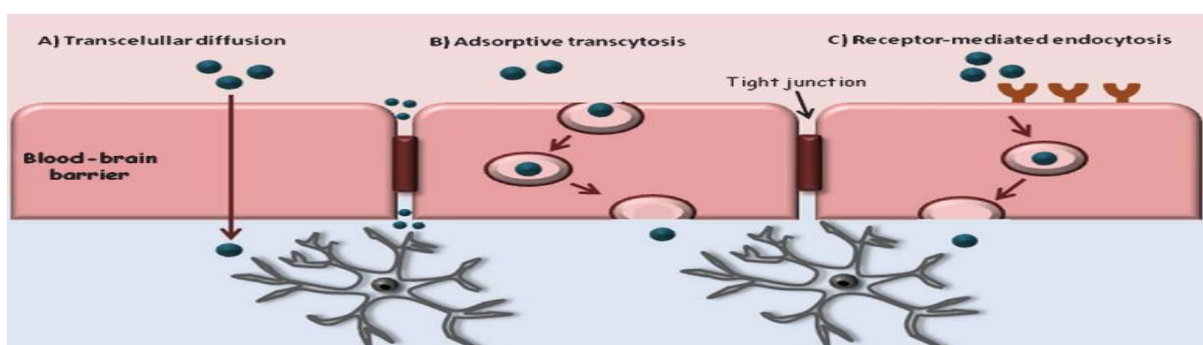
A via intranasal é outra via de administração que tem sido amplamente investigada para se administrar agentes terapêuticos no SNC uma vez que, para além de contornar a BHE, é, simultaneamente, considerada uma via não invasiva. Como vantagem possui uma elevada vascularização, o que permite uma absorção e entrega às células do SNC extremamente rápida e diminui a exposição sistémica, logo os efeitos adversos. No entanto, uma administração crónica pode levar à destruição da mucosa nasal (Faustino, Rijo e Reis, 2017).

### **3.2.2. Os Vetores mais eficientes para o SNC**

Assumindo que o recurso a vetores não virais apenas possibilita uma expressão transitória, os vetores mais utilizados derivam de vírus por se ambicionar alcançar o objetivo de, numa única administração, se obter uma expressão prolongada. Dentro dos virais recorre-se maioritariamente aos AAV, sendo também uma opção os LV. A principal diferença, entre estes, consiste na capacidade de integração no genoma do hospedeiro que, teoricamente, será o pretendido por se atingir uma expressão permanente e não temporária (Tabela 1). No entanto, é uma característica para a qual se deve avaliar o rácio risco-benefício, uma vez que aumenta consideravelmente a probabilidade de ocorrerem mutações, ao nível do material genético das células do hospedeiro. Apesar dos AAV não possuírem esta capacidade, verifica-se que asseguram uma expressão do transgene estável. A escolha do serotipo vai ter influência nas interações que se estabelecem com os recetores das células-alvo e no tipo de transporte axonal efetuado, ou seja, o pretendido é que o serotipo em causa possua proteínas que sejam

reconhecidas pelos recetores expressos nas células-alvo de forma a possibilitar a entrega e expressão do transgene (Flotte, 2004; O'Connor e Boulis, 2015; Sudhakar e Richardson, 2019). O AAV2 tem sido o serotipo privilegiado nos ensaios clínicos decorrentes de doenças neurodegenerativas, como a DA, como se irá verificar no ponto seguinte (3.3.). Visto ser um vetor viral, cujo mecanismo de transporte é anterógrado, é expectável que a expressão do transgene ocorra nos neurónios da região administrada e nos neurónios a jusante. A tendência está na utilização de rAAV, visto que estes vetores possuem as vantagens dos vetores virais sem conterem nenhum gene viral capaz de provocar patogenicidade (O'Connor e Boulis, 2015; Sudhakar e Richardson, 2019).

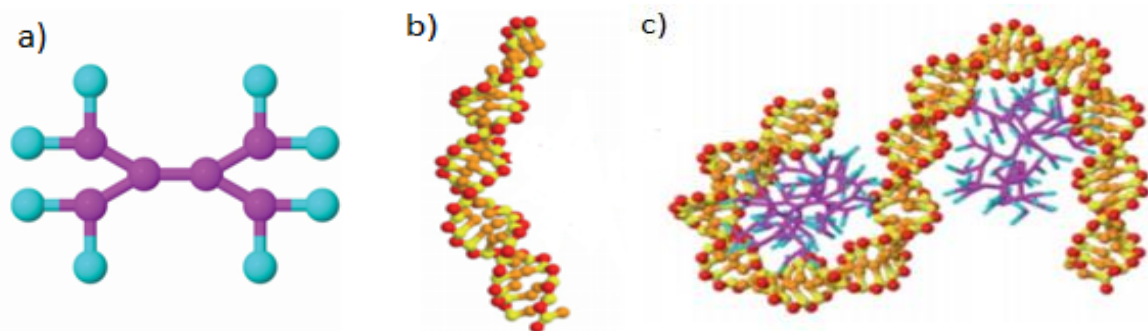
Apesar dos vetores virais serem, até à data, a escolha de eleição como veículos, apresentam os inconvenientes já mencionados (ponto 3.1.2.). Nesse sentido, ocorreram avanços recentes na construção de vetores não virais, nomeadamente Nanopartículas (NPs). Os aspetos a se ter em conta aquando da construção das NP foram mencionados no ponto 3.1.1.1. sendo os poplplexos um exemplo de NPs. Contudo, nestas doenças as células-alvo encontram-se no SNC e é necessário, também, considerar a estrutura da BHE. O mecanismo de transporte, utilizado pelas NPs para atravessar esta barreira, vai depender do seu peso molecular podendo ocorrer por difusão simples, transcitose (um mecanismo de transporte que combina endocitose e exocitose) ou via recetores (Figura 5). A transcitose pode ser dificultada pela atividade de bombas de efluxo, como a glicoproteína-p que consiste numa proteína, presente nas membranas de células nervosas, responsável por expulsar fármacos de volta ao sangue. Uma estratégia para facilitar a passagem das NPs consiste na ligação de diferentes compostos na sua superfície, nomeadamente peptídeos e proteínas endógenas como o angiopép-2 e a transferrina, respetivamente. Esses ligantes vão atuar ao nível de recetores expressos na superfície das células endoteliais cerebrais permitindo a entrada das NP por endocitose mediada por recetores (Pérez-Martínez, Carrión e Cea, 2012).



**Figura 5: Mecanismos de passagem de nanopartículas pela barreira hematoencefálica:** a) difusão simples; b) transcitose; c) endocitose via recetores (Adaptado de Pérez-Martínez, Carrión e Cea, 2012).

Vários dados obtidos, até à data, apontam os dendrímeros como as NPs mais promissoras a utilizar na TG. São estruturas ramificadas constituídas por um núcleo seguido de várias camadas repetidas de monómeros, sendo que cada camada aumenta o número de unidades relativamente à anterior. Consoante o número de camadas adicionadas, são classificados em dendrímeros de primeira geração, segunda geração, terceira geração e assim sucessivamente. Virados para o exterior, os monómeros possuem grupos funcionais responsáveis pela interação com outras moléculas. A possibilidade de adicionar grupos funcionais diferentes origina dendrímeros diferentes. Um exemplo, são os dendrímeros poli (amidoamina) (PAMAM) constituídos por subunidades de amida que ao terem carga positiva formam complexos estáveis com transgenes a transportar (Figura 6). Têm sido consideravelmente utilizados em estudos pré-clínicos, como vetores não virais para o transporte e expressão, por exemplo, de NTs. No entanto, observou-se provocarem citotoxicidade. Outro exemplo, são os dendrímeros poli (imina propileno) (PPI) que demonstraram menor citotoxicidade (Boas e Heegaard, 2004; Faustino, Rijo e Reis, 2017).

Um estudo em linhas celulares com G5-PPI demonstrou que, numa determinada concentração, pode interagir com oligómeros de peptídeos A $\beta$  alterando a sua estrutura e prevenindo a formação de agregados. Nesta perspetiva, este tipo de dendrímero pode, futuramente, ser administrado como agentes anti-amiloidogénicos não citotóxicos, exercendo diretamente um efeito terapêutico, para além de serem utilizados como vetores em TG (Klementieva *et al.*, 2011).



**Figura 6: Ligação entre dois dendrímeros poli (amidoamina) de quarta geração (G4-PAMAM) e cadeia dupla de DNA:** a) monómero base de um dendrímero poli (amidoamina); b) cadeia dupla de DNA do transgene; c) ligação entre dois dendrímeros poli (amidoamina) de quarta geração (G4-PAMAM) e o transgene (Adaptado de Yu e Larson, 2014).

### 3.3. Terapia Génica na Doença de Alzheimer

Seja qual for o mecanismo etiológico considerado na DA, o desenvolvimento da doença origina neurodegeneração, portanto, uma abordagem terapêutica pode incluir a estimulação

da regeneração das áreas cerebrais afetadas. Para isso, recorre-se a moléculas que possuam a capacidade de induzir a neurogênese e plasticidade cerebral, como as NTs (Kazim *et al.*, 2014; Markus, Patel e Snider).

Vários estudos em animais demonstraram que estes fatores de crescimento apresentam a capacidade de melhorar a função dos neurónios, nomeadamente, neurónios colinérgicos presentes no prosencéfalo basal, provocando um aumento da neurogênese e plasticidade neuronal. Tendo por base os bons resultados de segurança dos ensaios pré-clínicos, os ensaios clínicos realizados, até à data, na DA com aplicação de TG recorrem maioritariamente a genes que codificam NTs, mais especificamente o NGF (Kazim *et al.*, 2014; Sudhakar e Richardson, 2019).

Um ensaio clínico de fase I (NCT00017940), com 8 indivíduos com DA, utilizou técnicas de TG *ex vivo* com o objetivo de proteger os neurónios colinérgicos da degeneração e simultaneamente aumentar as suas funções. O protocolo consistiu em modificar fibroblastos autólogos de forma a expressarem o NGF através do uso de vetores derivados do Vírus da Leucemia Murina de Moloney (MLV). Esses fibroblastos foram, posteriormente, introduzidos diretamente na região cerebral alvo. Os resultados foram positivos, uma vez que, após uma monitorização, verificou-se uma melhoria no declínio cognitivo e não se registaram efeitos adversos. Para além disso, a autópsia realizada ao cérebro de um indivíduo que participou no estudo demonstrou um aumento dos níveis de NGF (Tuszynski *et al.*, 2005).

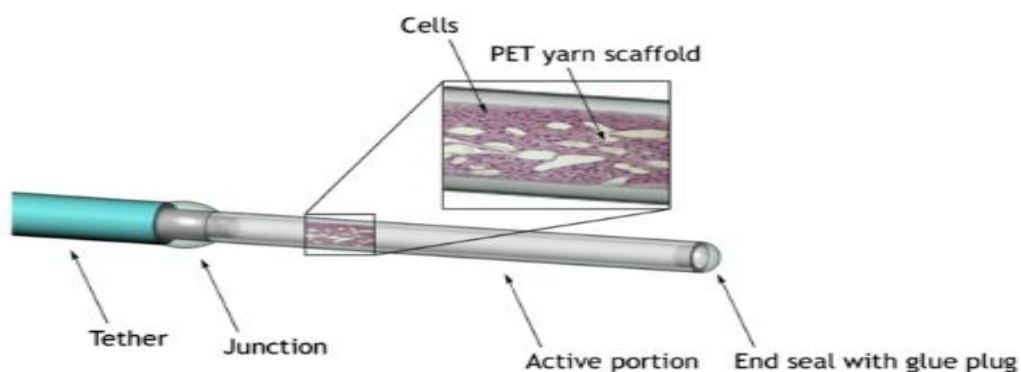
Outro ensaio de fase I (NCT00087789), neste caso realizado através de TG *in vivo*, já dado como terminado, teve como objetivo analisar a segurança, tolerabilidade e atividade biológica da administração do sistema AAV2-NGF (CERE-110). Essa, por sua vez, ocorreu através de injeções estereotáxicas diretas no núcleo basal de Meynert, uma região cerebral com elevada quantidade de neurónios colinérgicos, de forma a promover a expressão do NGF permanentemente. Apesar de se conhecer os riscos inerentes ao uso de uma via de administração cirúrgica, os autores do estudo argumentaram que o prognóstico da DA, por si só, já é bastante reservado. Os resultados mostraram que a entrega do CERE-110 por via cirúrgica foi segura e bem tolerada e que a expressão do NGF bioativo se prolongou por anos. As conclusões, acerca do declínio cognitivo, foram pouco claras por se tratar de uma amostra de participantes reduzida (Rafii *et al.*, 2014).

Após segurança comprovada, iniciou-se o ensaio de fase II (NCT00876863), com o objetivo de fornecer informações acerca da eficácia. Para isso, utilizou-se uma amostra maior de 50 pacientes, dos quais a uma metade se administrou cirurgicamente o CERE-110 e à outra metade foi realizada uma cirurgia placebo. Os resultados confirmaram a segurança da administração do fármaco. No que diz respeito à eficácia, considerou-se, novamente, a



amostra insuficiente para tirar elações. Várias explicações possíveis foram dadas, como um direcionamento errado do vetor para a região-alvo (visto que análises a cérebros do ensaio de fase anterior demonstraram isso mesmo), a possibilidade de, mesmo com um direcionamento certo, não se verificar eficácia devido a um estado avançado da patologia ou os fatores neurotróficos, como o NGF, não serem suficientes para interromper a progressão da doença. Não obstante, o estudo foi bastante relevante no sentido que demonstrou ser viável realizar-se um ensaio clínico controlado e duplo-cego com recurso a cirurgia na DA, o que permite projetar estudos futuros (Rafii *et al.*, 2018).

O facto de se utilizar o método de TG *in vivo* acarreta riscos, como o aparecimento de modificações genéticas não desejadas nas células-alvo e um descontrolo na libertação da substância terapêutica. Como forma de se limitar os riscos, um grupo de investigadores desenvolveu um implante polimérico que faz uso de uma tecnologia de entrega de células encapsuladas (BCE) (Figura5). O implante contém células humanas geneticamente modificadas para expressarem o NGF, sendo encapsuladas por uma membrana semi-permeável, que previne a rejeição por parte do sistema imunitário do hospedeiro e permite a difusão de nutrientes e oxigénio. O recurso a este implante, como alternativa aos métodos *in vivo* e *ex vivo* de TG, apresenta vantagens tais como o controlo da libertação de NGF, uma vez que pode ser removido do cérebro, e o baixo risco de toxicidade e mutações visto que as células-alvo não são modificadas geneticamente (Eyjolfsson *et al.*, 2016).



**Figura 7: Estrutura do implante NGF-BCE.** O implante é constituído por um cateter, uma junção que faz a união entre o cateter e a porção ativa e uma ponta final selada (Adaptado de Eyjolfsson *et al.*, 2016).

Dadas as vantagens desta abordagem, foi desenvolvido um ensaio clínico de fase I (NCT01163825), com duração de 12 meses, em que o implante foi administrado cirurgicamente a indivíduos com DA leve a moderada com o propósito de se avaliar a segurança e tolerabilidade. Durante os primeiros meses os doentes foram administrados com implantes de NGF-BCE de primeira geração. Os resultados, correspondentes a esse período,

relataram segurança, mas uma liberação de NGF baixa, apesar de detetável, e problemas na sobrevivência das células encapsuladas. Conseqüentemente, desenvolveu-se um implante NGF-BCE de segunda geração que foi utilizado nos meses seguintes (Eyjolfsson *et al.*, 2016).

Em relação à melhoria da função cognitiva, associada a este método de terapia, os autores concluíram ser necessário realizar-se ensaios controlados aleatórios durante, pelo menos, 18 meses. Atualmente, este ensaio encontra-se em estado “desconhecido” o que significa que não foi verificado nos últimos 2 anos. Em conclusão, observou-se que a utilização do sistema NGF-BCE foi tolerável e segura, o que apoia o recurso a esta tecnologia em estudos futuros na DA ou noutras doenças neurodegenerativas (Eyjolfsson *et al.*, 2016).

**Tabela II:** Ensaios clínicos com recurso a Terapia Génica realizados na Doença de Alzheimer e os respetivos estados.

Número de Identificação do Ensaio Clínico	Fase	Patologia	Método de Terapia Génica	Tipo de Vetor	Gene Terapêutico	Estado do Ensaio Clínico
NCT00017940	I	Doença de Alzheimer	Ex vivo	MLV	NGF	Completo
NCT00087789	I	Doença de Alzheimer	In vivo	AAV2	NGF	Completo
NCT00876863	II	Doença de Alzheimer	In vivo	AAV2	NGF	Completo
NCT01163825	I	Doença de Alzheimer	Implante NGF-BCE	BCE	NGF	Desconhecido

#### 4. Terapia Celular

A Terapia Celular (TC) tem como princípio base a administração de células, normalmente intactas, a um hospedeiro. O seu desenvolvimento deu-se no seguimento da medicina regenerativa com o objetivo de regenerar tecidos, substituindo-se células danificadas por células saudáveis (Borojevic, 2008; Wei *et al.*, 2013).

Habitualmente, as células utilizadas para este fim, possuem a capacidade de se dividirem indefinidamente e de, mediante estimulação adequada, se diferenciarem noutros tipos de células, sendo designadas de células estaminais (SC). Estas, podem ser divididas em duas categorias distintas, consoante a sua origem: i) células estaminais embrionárias (ESCs), com uma potência celular totipotente, capazes de dar origem a células de todos os tipos de tecidos de um organismo; ii) SC não embrionárias que, em regra, são multipotentes, ou seja, capazes de se diferenciarem nas células dos tecidos de que provêm, como por exemplo, as Células Estaminais Hematopoiéticas (CEH), as células estaminais neuronais (NSCs) e as células estaminais mesenquimais (MSCs) (Borojevic, 2008).

No caso de se recorrer a SC não embrionárias autólogas, diminui-se consideravelmente o risco de se desencadear reações imunológicas após transplantação no hospedeiro. Já em relação às ESCs, esse risco é evidente, para além das questões éticas envolvidas no seu manuseamento.

Até certa altura considerou-se que células diferenciadas não poderiam retornar a um estado indiferenciado. Com a descoberta da possibilidade de se induzir pluripotência, verificou-se o oposto. Essa tecnologia, através do uso de fatores de transcrição específicos, permite reprogramar células somáticas e diferenciadas de forma a ganharem pluripotência, dando origem às chamadas células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs) (Vasic, Barth e Schmidt, 2019). Desta forma, questões éticas ficam ultrapassadas, uma vez que as células provêm do próprio hospedeiro. Contrariamente, uma outra preocupação relacionada com o uso de SC mantém-se: a possibilidade de se desencadear uma divisão celular descontrolada destas células, podendo culminar em células tumorais. Nesse contexto, as MSCs são uma das fontes de células mais utilizadas em ensaios de fase I e II, uma vez que ao serem multipotentes, apresentam uma potência celular inferior à totipotência e pluripotência das ESCs e iPSCs respetivamente e, conseqüentemente, um menor risco (Wei *et al.*, 2013).

#### **4.1. Terapia Celular em Doenças Neurodegenerativas**

No caso de se considerar a TC como uma estratégia terapêutica em doenças neurodegenerativas, é necessário ter-se em conta os vários tipos de células especializadas e as funções que desempenham, com o propósito de manter a homeostase do SNC. Muito resumidamente, as células gliais conferem suporte, nutrientes, regulam a neurotransmissão e medeiam as respostas imunológicas. Essas, dividem-se em microglia, com funções idênticas aos macrófagos, cujas ramificações permitem detetar e remover agentes patogénicos, e em macroglia, correspondendo aos astrócitos e oligodendrócitos (Vasic, Barth e Schmidt, 2019).

A deteção de NSCs, em determinadas regiões do cérebro humano adulto, mais especificamente na Zona SubGranular (ZSG) do giro dentado do hipocampo e na Zona SubVentricular (ZSV) das paredes laterais dos ventrículos, levou a concluir que o processo de neurogénese endógeno, isto é, a formação de novas células cerebrais, ocorre não só durante o desenvolvimento, mas também numa fase posterior. Isso abriu perspectivas no sentido de se considerar a estimulação desse processo algo alcançável. Tendo isso em conta, em doenças onde se verifica perda neuronal acentuada, como uma das principais características, como é o caso da DA, a aplicação da TC pode ser utilizada com os objetivos de estimular ou regenerar redes neuronais. Para isso recorre-se a SC, passíveis de manusear *in vitro*, com o objetivo de

se diferenciarem em neurónios saudáveis, em células precursoras de neurónios, em células gliais ou de libertarem fatores de crescimento, que possam ser administradas no hospedeiro de forma segura e eficaz.

Esta abordagem terapêutica tem também variáveis que devem ser consideradas, como por exemplo, a fonte de SC. Nas doenças neurodegenerativas as fontes mais utilizadas em ensaios, principalmente em modelos animais, são as ESCs, NSCs, MSCs e iPSCs (Vasic, Barth e Schmidt, 2019). Outra questão consiste na sobrevivência das células. Para se contornar este obstáculo utilizou-se, em ensaios pré-clínicos, a estratégia de adicionar fatores de crescimento, nomeadamente o BDNF. Desta forma, obtém-se um sinergismo, no sentido em que os fatores neurotróficos favorecem a sobrevivência destas células e estas ao se multiplicarem e diferenciarem podem produzir mais fatores neurotróficos. Todavia, permanece a questão de elevada importância de como controlar a divisão celular (Duncan e Valenzuela, 2017; Vasic, Barth e Schmidt, 2019).

#### **4.2. Terapia Celular na Doença de Alzheimer**

Muitos dos doentes com Alzheimer após o diagnóstico já apresentam marcas neuropatológicas acentuadas tais como placas senis, NFTs e neurodegeneração. A TC surge como uma alternativa que promove a manutenção dos neurónios sobreviventes e/ou a sua substituição por células saudáveis. Portanto, existem duas formas possíveis de aplicar TC, uma delas, faz uso de SC geneticamente modificadas e capazes de transmitirem sinais parácrinos, ou seja, libertarem NTs para as células vizinhas de forma a estimular a neurogénese endógena. Apesar de atrativa, esta possibilidade apresenta complicações, uma delas é o facto da neurogénese na ZSG e na ZSV, por si só, diminuir com o avançar da idade e por outro lado, há perda de NSCs e neurónios no hipocampo. Nessas condições, a atuação das NTs pode não originar os resultados pretendidos. Outra possibilidade passa pela reparação de redes neuronais. Para isso recorre-se à capacidade de SC se diferenciarem em células nervosas e, após transplantadas, substituírem os circuitos neuronais em falta (Duncan e Valenzuela, 2017; Vasic, Barth e Schmidt, 2019).

No caso das ESCs humanas (hESCs), os ensaios pré-clínicos, já realizados utilizaram, principalmente, modelos experimentais de roedores com DA e demonstraram, até à data, resultados positivos. Contudo, a pluripotência destas células acarreta riscos elevados. De forma a prevenir um crescimento descontrolado, recorre-se a uma pré-diferenciação das ESCs. Com base nessa estratégia, realizaram-se estudos *in vitro* em que numa primeira etapa se diferenciaram as ESCs em NSCs ou em células de eminência ganglionar medial, um tipo de

células estaminais que originam neurónios durante o desenvolvimento. Numa segunda etapa, as células foram transplantadas em modelos animais. Os resultados de ambos os estudos revelaram que se obtiveram neurónios colinérgicos e GABAérgicos saudáveis e melhorias a nível da memória. Apesar deste potencial demonstrado, as complicações éticas inerentes ao uso de ESCs permanecem e dificultam a realização de ensaios clínicos (Duncan e Valenzuela, 2017; Liu *et al.*, 2013).

Para NSCs humanas (hNSCs) foram, igualmente, realizados ensaios pré-clínicos que relataram resultados promissores. Ao serem transplantadas, cirurgicamente, comprovou-se a sobrevivência das células e a sua diferenciação em neurónios. Para além disso, verificaram-se melhorias a nível da neuroinflamação, plasticidade neuronal e uma diminuição nos níveis dos marcadores da DA. Embora estes mecanismos não estejam totalmente elucidados pensa-se que advêm dos sinais parácrinos, nomeadamente libertação de fatores neurotróficos, em simultâneo com a diferenciação direta destas células (Duncan e Valenzuela, 2017; Lee *et al.*, 2015).

As MSCs humanas (hMSCs) são, no momento, o tipo de SC mais usadas na investigação, devido à sua multipotência, por serem de fácil manipulação e relatadas como pouco tóxicas e imunologicamente estáveis. Outra característica, consiste em serem capazes de atravessar a BHE, logo poderem ser administradas por via IV, uma via menos invasiva em comparação com injeções diretas no SNC, como acontece na administração das restantes SC. Estas células podem derivar do cordão umbilical, mas também existem em tecidos do organismo adulto como na medula óssea e no tecido adiposo. Os estudos pré-clínicos, com resultados publicados, demonstraram a diferenciação das MSCs em células do SNC e capazes de expressar neurotransmissores e NTs, como o BDNF e o NGF. Consequentemente, ao serem transplantadas provocaram um aumento da neurogénese, do desempenho cognitivo e simultaneamente, uma diminuição dos níveis dos marcadores da DA (peptídeos A $\beta$  e NFTs) e de citocinas pró-inflamatórias. Outra particularidade está na possibilidade de libertarem vesículas extracelulares (VE). Uma abordagem, no futuro, poderá passar por modificar geneticamente estas células para que libertem VE contendo outros agentes terapêuticos. A maior desvantagem está na baixa taxa de diferenciação direta em neurónios que é observada comparativamente com outras células estaminais, verificando-se uma maior predisposição em originarem células gliais (Duncan e Valenzuela, 2017; Vasic, Barth e Schmidt, 2019).

Num estudo clínico, de fase I (NCT01297218), administrou-se por injeção intracranial NEUROSTEM<sup>®</sup>-AD, MSCs obtidas a partir de sangue do cordão umbilical humano, nos hipocampos e *precuneus* de indivíduos com DA. O objetivo foi analisar a segurança e a tolerabilidade associadas à injeção estereotáxica cirúrgica na entrega destas células e definir

uma dose máxima tolerada envolvendo uma monitorização dos indivíduos de 12 semanas. Após essa verificação desenvolveu-se, numa segunda etapa e com os mesmos indivíduos, um estudo de monitorização a longo prazo (NCT01696591) com o intuito de incluir uma análise da eficácia que se encontra em estado desconhecido. O ensaio de fase II (NCT02054208), atualmente em recrutamento, trata-se de um ensaio duplo cego e controlado com um placebo e tem o objetivo de obter dados acerca da viabilidade destes ensaios e a eficácia desta terapêutica na clínica (Kim *et al.*, 2015).

Outro ensaio, de fases I e II (NCT03117738), já dado como completo, foi projetado com o objetivo de se avaliar a segurança e a eficácia decorrentes da administração IV do AstroStem, MSCs derivadas de tecido adiposo autólogo. Este estudo foi aleatório, duplo-cego e controlado com um placebo. O protocolo foi repetido 9 vezes num período de 2 semanas (Vasic, Barth e Schmidt, 2019).

Em comum, estes ensaios clínicos concluíram que esta abordagem terapêutica é segura e estável, no entanto, ficou claro o desafio de se avaliar a eficácia de forma objetiva a nível da regressão da doença. Uma solução possível consiste no desenho de ensaios futuros com amostras maiores de pacientes com DA, e em adotar um período de monitorização mais prolongado. Estes ensaios também permitiram verificar que o tempo de sobrevivência destas células estaminais é curto e que formas de contornar esse obstáculo têm de ser consideradas (Vasic, Barth e Schmidt, 2019).

Para além destes, outros ensaios clínicos estão a decorrer. Um, de fase I (NCT02600130), onde se irá administrar por via IV, MSCs Longitudinais (LMSCs) ou placebo a 25 indivíduos com DA e realizar um acompanhamento de várias semanas após a administração. O objetivo é avaliar a segurança, mas também a eficácia desta terapêutica (Vasic, Barth e Schmidt, 2019). Por fim, um ensaio clínico de fase I (NCT03724136), ainda em recrutamento, irá utilizar a abordagem inovadora da administração de MSCs isoladas a partir de medula óssea (BM-MSCs), pela via intranasal, de forma a facilitar a entrega dessas células (Vasic, Barth e Schmidt, 2019).

**Tabela III:** Ensaios clínicos a decorrerem com recurso a células mesenquimais humanas na Doença de Alzheimer.

Número de Identificação do Ensaio Clínico	Fase	Patologia	Células administradas	Estado do Ensaio Clínico
NCT01297218 NCT01696591	I	Doença de Alzheimer	NEUROSTEM®-AD	Completo Desconhecido
NCT02054208	II	Doença de Alzheimer		Em recrutamento
NCT02600130	I	Doença de Alzheimer	LMSCs	Ativo
NCT03117738	I / II	Doença de Alzheimer	AstroStem	Completo
NCT03724136	I	Doença de Alzheimer	BM-MSCs	Em recrutamento

## 5. Combinação das Terapias Génica e Celular

Apesar das Terapias Génica e Celular serem terapêuticas diferentes no sentido que a primeira envolve manipulação do material genético através de técnicas de DNA recombinante e a segunda não, pode-se adotar uma combinação de ambas de forma a usufruir das vantagens de cada uma. Essa combinação consiste em aplicar técnicas de TG *ex vivo*, ou seja, isolar células com determinadas características como por exemplo, células estaminais, nas quais são introduzidos vetores contendo os genes terapêuticos de interesse a expressar e administrar às células resultantes no hospedeiro (Linden, 2010).

As Células Estaminais Hematopoiéticas (HSCs) têm sido largamente usadas com este propósito, por possuírem um potencial elevado de longevidade. São células usadas na terapêutica de várias doenças do sistema imunológico. No entanto, é necessário um dador compatível e o risco de morbilidade está sempre presente. Para se ultrapassar essas questões as células são isoladas e colocadas em contacto com os vetores que possuem os transgenes terapêuticos. Como se pretende que sejam expressos nas células descendentes, o processo passa por introduzi-los na cromatina celular. Desta forma as células ficam, futuramente, corrigidas. Existem exemplos de ensaios clínicos que obtiveram sucesso realizados no âmbito da imunodeficiência combinada grave que em alternativa à falta de dadores, se utilizaram os genes mediante TG para correção da patologia (Naldini, 2015).

Ou seja, esta combinação já demonstrou, na prática clínica. No que diz respeito a doenças neurodegenerativas esta abordagem terapêutica já foi estudada em linhas celulares e modelos animais. Um exemplo, foi um estudo realizado em modelos de rato com DA onde se administrou NSCs geneticamente modificadas com vetores rAAV2 capazes de expressar NGF.

Os resultados obtidos revelaram que a expressão de NGF foi elevada a longo prazo. Esta abordagem permite um sinergismo uma vez que, para além de se aumentar a quantidade de NGF, que por sua vez estimula a sobrevivência das células nervosas na região alvo, as NSCs também se diferenciam e substituem os neurónios em falta. Simultaneamente, não se observou o aparecimento de células tumorais ou imunogenicidade. Tendo em conta estes dados, pode-se concluir que as NSCs podem funcionar em TG como sistemas de entrega eficientes e de valor acrescentado no SNC (Faustino, Rijo e Reis, 2017; Wu *et al.*, 2008).

Outra aplicação desta combinação ocorre num sentido oposto, mais especificamente, no desenvolvimento de iPSCs. Para isso, introduz-se vetores com transgenes específicos em células somáticas, com o objetivo de expressarem fatores de transcrição e estimularem a reprogramação celular (Gonçalves e Paiva, 2017).

## **6. Considerações Finais**

A DA é uma das doenças neurodegenerativas mais investigada por, indiscutivelmente, provocar uma diminuição acentuada da qualidade de vida de quem a desenvolve e, por se estimar uma evolução epidemiológica devastadora. No que diz respeito aos marcadores patológicos e aos mecanismos envolvidos na fisiopatologia, as hipóteses consideradas têm sofrido reformulações e a tendência está em se considerar uma complementaridade entre vários processos deletérios.

Os estudos mais recentes têm apostado em estratégias que atuem na regressão desta patologia, considerada incurável, visto que as terapêuticas, atualmente prescritas na clínica, atuam meramente a nível sintomático. Neste contexto, surgem as terapias génica e celular como hipóteses promissoras. Estas terapias são facilmente distinguidas entre si, mas apresentam desafios em comum. Em ambas são relatados ensaios pré-clínicos de sucesso, no entanto, a maioria dos ensaios clínicos realizados até à data não corresponderam às expectativas. A justificação desse fenómeno é atribuída a todas as variáveis envolvidas na extrapolação destas abordagens terapêuticas de animais para humanos.

A TG é uma tecnologia relativamente recente, de carácter experimental, na qual se deposita elevada esperança, mas que teve, até agora, um percurso atribulado. Os ensaios realizados mais recentemente revelam segurança o que confirma a possibilidade de instituir esta terapêutica na clínica. No entanto, a eficácia fica aquém das expectativas. O principal obstáculo está, principalmente, no direccionamento correto dos transgenes às células-alvo, o que implica uma escolha acertada do vetor e via de administração a utilizar. É neste sentido que surgem as NPs como possíveis veículos a utilizar. Estas, são estruturas possíveis de



personalizar através da adição de compostos químicos de forma a otimizar o processo de entrega dos agentes terapêuticos. Num futuro próximo, pretende-se descobrir a estrutura do vetor ideal que permita, através de uma única administração, uma expressão permanente do transgene, sem induzir efeitos *off-target* e toxicidade nas células do SNC. Uma vez esse objetivo atingido, a eficácia poderá ser avaliada de forma fiável e concreta.

Na TC depositam-se, também, largas expectativas, com ensaios clínicos de fase I a decorrerem em indivíduos com DA e, tal como na TG, a segurança foi, até à data, garantida. Nesta terapia a escolha do tipo de SC a administrar é fundamental, sendo as MSCs as mais promissoras. Simultaneamente, tem de ser assegurado um controlo na capacidade de divisão destas células. Um entrave na retirada de conclusões acerca da eficácia desta abordagem, consiste no facto de os ensaios clínicos serem de longa duração, ou seja, implicarem monitorizações de vários anos (Sudhakar e Richardson, 2019; Vasic, Barth e Schmidt, 2019).

Ao estarem identificadas as variáveis suscetíveis de interferir na *performance* de cada uma destas terapias torna-se possível ambicionar a otimização. Nesse seguimento, enormes benefícios podem surgir pela combinação de ambas. O objetivo passa por estabelecer sinergismos entre terapias génicas e celulares, por exemplo, ao utilizar-se SC como veículos de transporte e expressão de genes específicos para se garantir uma expressão mais viável e estável, já demonstrado em ensaios pré-clínicos. Contudo, ambas as terapias recorrem a vias invasivas e apresentam custos elevados de desenvolvimento e produção o que torna pouco realista a utilização em grande escala de forma a atingir todos os indivíduos com DA (Faustino, Rijo e Reis, 2017).

Futuramente, nos vários centros de investigação, através dos avanços alcançados, pretende-se contornar as variáveis já mencionadas e obter resultados positivos dos ensaios a decorrer com vista ao estudo da eficácia. Por fim, o último passo, ambiciona atingir numa única abordagem terapêutica o desenvolvimento de uma possível cura e implementá-la, em larga escala, de forma a incluir todos os indivíduos diagnosticados com esta doença incapacitante.

## 7. Referências Bibliográficas

ATHANASOPOULOS, Takis; MUNYE, Mustafa M.; YÁÑEZ-MUÑOZ, Rafael J. - Nonintegrating Gene Therapy Vectors. **Hematology/Oncology Clinics of North America**. 31:5 (2017) 753–770.

BARNETT, Richard - Alzheimer's disease. **The Lancet**. . 393:10181 (2019) 1589.

BOAS, Ulrik; HEEGAARD, Peter M. H. - Dendrimers in drug research. **Chemical Society Reviews**. . 33:1 (2004) 43–63.

BONDI, Mark W. *et al.* - [報告文獻] 09 HHS Public Access. **The Journal of Clinical Investigation**. 23:(2018) 818–831.

BOROJEVIC, Radovan - T erapias Celulares e Bioengenharia Cell Therapies and Bionengineering. **Gazeta Médica da Bahia**. 78:Supl. 1 (2008) 42–46.

CAO, Jiqing *et al.* - Advances in developing novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease. **Molecular Neurodegeneration**. 13:1 (2018) 1–20.

DUNCAN, Thomas; VALENZUELA, Michael - Alzheimer's disease, dementia, and stem cell therapy. **Stem Cell Research and Therapy**. 8:1 (2017) 1–9.

EYJOLFSDOTTIR, Helga *et al.* - Targeted delivery of nerve growth factor to the cholinergic basal forebrain of Alzheimer's disease patients: Application of a second-generation encapsulated cell biodelivery device. **Alzheimer's Research and Therapy**. 8:1 (2016) 1–11.

FALCO, Anna DE *et al.* - Doença de Alzheimer: Hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Química Nova**. 39:1 (2016) 63–80.

FAUSTINO, Célia; RIJO, Patrícia; REIS, Catarina Pinto - Nanotechnological strategies for nerve growth factor delivery: Therapeutic implications in Alzheimer's disease. **Pharmacological Research**. 120:2017) 68–87.

FÉCCHIO, DÂNIA CAROLINE; MACEDO, LUCIANA CONCI; RICCI, GLÉIA C. LAVERDE - UNINGÁ Review = Revista UNINGÁ. **Revista Uningá Review**. 21:1 (2018) 44–49.

FLOTTE, T. R. - Gene therapy progress and prospects: Recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. **Gene Therapy**. 11:10 (2004) 805–810.

GALE, Seth A.; ACAR, Diler; DAFFNER, Kirk R. - Dementia. **American Journal of Medicine**. 131:10 (2018) 1161–1169.

- GONÇALVES, Giulliana Augusta Rangel; PAIVA, Raquel De Melo Alves - Gene therapy: advances, challenges and perspectives. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**. 15:3 (2017) 369–375.
- KAZIM, Syed Faraz *et al.* - Disease modifying effect of chronic oral treatment with a neurotrophic peptidergic compound in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Disease**. 71:2014) 110–130.
- KIM, Hee Jin *et al.* - Stereotactic brain injection of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells in patients with Alzheimer's disease dementia: A phase I clinical trial. **Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions**. 1:2 (2015) 95–102.
- KLEMENTIEVA, Oxana *et al.* - Dense shell glycodendrimers as potential nontoxic anti-amyloidogenic agents in Alzheimer's disease. Amyloid-dendrimer aggregates morphology and cell toxicity. **Biomacromolecules**. 12:11 (2011) 3903–3909.
- LANE, C. A.; HARDY, J.; SCHOTT, J. M. - Alzheimer's disease. **European Journal of Neurology**. 25:1 (2018) 59–70.
- LEE, Il Shin *et al.* - Human neural stem cells alleviate Alzheimer-like pathology in a mouse model. **Molecular Neurodegeneration**. 10:1 (2015) 1–16.
- LINDEN, Rafael - Terapia gênica: O que é, o que não é e o que será. **Estudos Avancados**. 24:70 (2010) 31–69.
- LIU, Yan *et al.* - Medial ganglionic eminence-like cells derived from human embryonic stem cells correct learning and memory deficits. **Nature Biotechnology**. 31:5 (2013) 440–447.
- MARKUS, Annette; PATEL, Tushar D.; SNIDER, William D. - Markus, curr opin neurobiol, 2002. 3:[s.d.] 523–531.
- MASTERS, Colin L. *et al.* - Alzheimer's disease. **Nature Reviews Disease Primers**. 1:2015) 1–18.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE - Portaria n°. 594/2004. **Diário da República**. 2004) 3441–3445.
- NALDINI, Luigi - Gene therapy returns to centre stage. **Nature**. 526:7573 (2015) 351–360.
- O'CONNOR, Deirdre M.; BOULIS, Nicholas M. - Gene therapy for neurodegenerative diseases. **Trends in Molecular Medicine**. 21:8 (2015) 504–512.
- OLIVEIRA, Bárbara De Alencar *et al.* - Vetores virais para uso em terapia gênica. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. 9:2 (2018) 55–64.

PALOMER, Ernest *et al.* - Aging Triggers a Repressive Chromatin State at Bdnf Promoters in Hippocampal Neurons. **Cell Reports**. 16:11 (2016) 2889–2900.

PÉREZ-MARTÍNEZ, Francisco C.; CARRIÓN, Blanca; CEA, Valentín - The use of nanoparticles for gene therapy in the nervous system. **Journal of Alzheimer's Disease**. 31:4 (2012) 697–710.

PHELAN - HHS Public Access. **Physiology & behavior**. 176:1 (2018) 139–148.

PICHON, Chantal; BILLIET, Ludivine; MIDOUX, Patrick - Chemical vectors for gene delivery: Uptake and intracellular trafficking. **Current Opinion in Biotechnology**. 21:5 (2010) 640–645.

RAFII, Michael S. *et al.* - A phase I study of stereotactic gene delivery of AAV2-NGF for Alzheimer's disease. **Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association**. 10:5 (2014) 571–581.

RAFII, Michael S. *et al.* - Adeno-associated viral vector (serotype 2)-nerve growth factor for patients with Alzheimer disease a randomized clinical trial. **JAMA Neurology**. 75:7 (2018) 834–841.

SAFIEH, Mirna; KORCZYN, Amos D.; MICHAELSON, Daniel M. - ApoE4: an emerging therapeutic target for Alzheimer's disease. **BMC Medicine**. 17:1 (2019) 1–17.

SARAIVA, Joana; NOBRE, Rui Jorge; PEREIRA DE ALMEIDA, Luis - Gene therapy for the CNS using AAVs: The impact of systemic delivery by AAV9. **Journal of Controlled Release**. 241:2016) 94–109.

SCHELTENS, Philip *et al.* - Alzheimer's disease. **The Lancet**. 388:10043 (2016) 505–517.

SUDHAKAR, Vivek; RICHARDSON, R. Mark - Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases. **Neurotherapeutics**. 16:1 (2019) 166–175.

TEJEDA-MANSIR, Armando; GARCÍA-RENDÓN, Aurora; GUERRERO-GERMÁN, Patricia - Plasmid-DNA lipid and polymeric nanovaccines: a new strategic in vaccines development. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**. 35:1 (2019) 46–68.

TELLECHEA, P. *et al.* - Early- and late-onset Alzheimer disease: Are they the same entity? 33:4 (2018) 244–253.

TUSZYNSKI, Mark H. *et al.* - A phase I clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. **Nature Medicine**. 11:5 (2005) 551–555.

VASIC, Verica; BARTH, Kathrin; SCHMIDT, Mirko H. H. - Neurodegeneration and neuro-

regeneration— Alzheimer's disease and stem cell therapy. **International Journal of Molecular Sciences**. 20:17 (2019).

WEI, Xin *et al.* - Mesenchymal stem cells: A new trend for cell therapy. **Acta Pharmacologica Sinica**. . 34:6 (2013) 747–754.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - **The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders: Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines**

WU, Shuliang *et al.* - Neural stem cells improve learning and memory in rats with Alzheimer's disease. **Pathobiology**. 75:3 (2008) 186–194.

YU, Shi; LARSON, Ronald G. - Monte-Carlo simulations of PAMAM dendrimer-DNA interactions. **Soft Matter**. 10:29 (2014) 5325–5336.

ZILKA, N.; NOVAK, M. - The tangled story of Alois Alzheimer. **Bratislavské lekárske listy**. 107:9–10 (2006) 343–345.