



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Pedro José Moreira Sobral

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Terapia Molecular em Doenças Neurodegenerativas: rAAVs e Doença de Alzheimer” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Ana Pimentel, da Dra. Dina Lopes e do Professor Doutor Sérgio Simões 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 2018



FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Pedro José Moreira Sobral

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Terapia Molecular em Doenças Neurodegenerativas: rAAVs e Doença de Alzheimer” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Ana Pimentel, da Dra. Dina Lopes e do Professor Doutor Sérgio Simões e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas


Setembro 2018

Declaração de Autoria

Eu, Pedro José Moreira Sobral, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2013136832, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Terapia Molecular em Doenças Neurodegenerativas: rAAVs e Doença de Alzheimer” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer informação 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, 05 de setembro de 2018.



(Pedro José Moreira Sobral)

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são”

Aristóteles

Agradecimentos

Tenho de agradecer aos meus pais a oportunidade que me deram em estudar numa das melhores e mais prestigiadas instituições de ensino da Europa, como é a Universidade de Coimbra. Sem eles, nada disto teria sido possível.

Ao corpo docente e não-docente da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por todos os ensinamentos transmitidos durante estes cinco anos de curso e, em especial, ao Professor Doutor Sérgio Simões, por todo o apoio prestado na realização desta monografia.

Aos meus colegas de curso, aos amigos e sobretudo à minha namorada, por terem tornado esta etapa da minha vida uma experiência única e desafiante. Desejo-lhes toda a sorte para o seu futuro profissional e pessoal.

Finalmente, deixo aqui os meus mais sinceros agradecimentos a todos os colaboradores da Farmácia São Sebastião e da Direção de Avaliação de Medicamentos do INFARMED, I.P. por todo o profissionalismo, acolhimento e transmissão de conhecimentos.

ÍNDICE

Parte A - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas	- 9 -
1. Introdução	- 10 -
2. Enquadramento da Farmácia São Sebastião	- 10 -
3. Análise SWOT	- 11 -
3.1. Pontos Fortes (Strengths)	- 12 -
3.1.1. Ambiente profissional da farmácia e integração na equipa de trabalho	- 12 -
3.1.2. Integração gradual nas tarefas da farmácia e autonomia no trabalho.....	- 12 -
3.1.3. Prestação de serviços farmacêuticos e medição de parâmetros fisiológicos e bioquímicos	- 14 -
3.1.4. Preparação de medicamentos.....	- 15 -
3.1.4.1. Preparações extemporâneas	- 15 -
3.1.4.2. Medicamentos manipulados.....	- 15 -
3.1.5. Sistema informático – <i>Sifarma2000</i> [®]	- 16 -
3.1.6. Utentes fidelizados	- 17 -
3.1.7. Técnicas de <i>merchandising</i>	- 17 -
3.1.8. Contacto com delegados de informação médica	- 18 -
3.1.9. Contacto com o público e aconselhamento em automedicação.....	- 18 -
3.2. Pontos Fracos (Weaknesses)	- 19 -
3.2.1. Sazonalidade do estágio	- 19 -
3.2.2. Dificuldade em associar nomes comerciais aos princípios ativos.....	- 19 -
3.2.3. Lacunas no conhecimento de alguns produtos.....	- 20 -
3.3. Oportunidades (Opportunities)	- 20 -
3.3.1. Posição no Sistema de Saúde Português	- 20 -
3.3.2. Ações de Formação – formação contínua do farmacêutico.....	- 21 -
3.3.3. Cartão Saúde	- 21 -
3.3.4. Divulgação nas redes sociais e em jornais	- 22 -
3.4. Ameaças (Threats)	- 22 -
3.4.1. Crise económico-financeira	- 22 -
3.4.2. Locais de venda de MNSRM	- 23 -
4. Casos Clínicos	- 24 -
4.1. Caso Clínico I	- 24 -

4.2. Caso Clínico 2.....	- 24 -
5. Conclusão.....	- 25 -
6. Referências Bibliográficas.....	- 26 -

Parte B - Relatório de Estágio no INFARMED, I.P.

Lista de Abreviaturas.....	- 28 -
1. Introdução.....	- 29 -
2. Enquadramento do INFARMED, I.P.	- 29 -
2.1. Direção de Avaliação de Medicamentos - Unidade de Introdução no Mercado (DAM- UIM)	- 30 -
3. Análise SWOT	- 31 -
3.1. Pontos Fortes (Strengths).....	- 32 -
3.1.1. Ambiente profissional e integração na equipa de trabalho da DAM-UIM.....	- 32 -
3.1.2. Aplicação de conhecimentos adquiridos ao longo do MICF	- 32 -
3.1.3. Consolidação e desenvolvimento de competências informáticas	- 32 -
3.1.4. Contacto com inúmeras entidades	- 33 -
3.1.5. Visita ao Laboratório Europeu de Referência.....	- 33 -
3.2. Pontos Fracos (Weaknesses).....	- 33 -
3.2.1. Duração curta do estágio	- 33 -
3.2.2. Sobrecarga dos colaboradores.....	- 34 -
3.3. Oportunidades (Opportunities).....	- 34 -
3.3.1. Realização de um segundo Estágio Curricular	- 34 -
3.3.2. Papel do Farmacêutico no INFARMED, I.P.	- 34 -
3.4. Ameaças (Threats).....	- 35 -
3.4.1. Escassez de recursos humanos.....	- 35 -
3.4.2. A deslocalização do INFARMED, I.P.....	- 35 -
4. Conclusão	- 36 -
5. Referências Bibliográficas.....	- 37 -

Parte C - Monografia “Terapia Molecular em Doenças Neurodegenerativas: rAAVs e Doença de Alzheimer”

Lista de Abreviaturas.....	- 39 -
-----------------------------------	---------------

Resumo	- 40 -
1. Introdução	- 41 -
2. Terapia Molecular	- 42 -
2.1. Definição e aplicação.....	- 42 -
2.2. Contextualização histórica: o que correu bem e menos bem.....	- 43 -
2.3. Aspectos atuais da Terapia Molecular	- 47 -
3. Terapia Génica do SNC	- 48 -
3.1. Fatores críticos para uma terapia génica de sucesso	- 48 -
3.1.1. Escolha do gene terapêutico	- 48 -
3.1.2. Seleção do vetor	- 49 -
3.1.3. Otimização da via de administração	- 52 -
3.1.3.1. Administração <i>in vivo</i> de vetores virais recombinantes.....	- 53 -
3.1.3.2. Terapia génica <i>ex vivo</i> para doenças do SNC	- 55 -
3.2. Vírus Adeno-Associados (AAVs)	- 55 -
3.2.1. Características gerais dos AAVs	- 55 -
3.2.2. Utilização de rAAVs na terapia génica do SNC.....	- 56 -
3.2.3. Vantagens e limitações dos rAAVs	- 57 -
3.2.4. Transferência não-invasiva de genes para o SNC.....	- 58 -
3.3. Terapia génica na Doença de Alzheimer	- 59 -
3.3.1. Terapia génica baseada na “hipótese amiloide”	- 60 -
3.3.2. Terapia génica com APOE.....	- 60 -
3.3.3. Terapia génica com ACAT	- 60 -
3.3.4. Terapia génica com CYP46A1	- 60 -
3.3.5. Terapia génica com citocinas anti-inflamatórias.....	- 61 -
3.3.6. Terapia génica com recurso à via não amiloidogénica do metabolismo da APP	- 61 -
3.3.7. Terapia génica com FKBP1b.....	- 61 -
3.3.8. Terapia génica com fatores neurotróficos de crescimento	- 62 -
4. Questões éticas e de segurança subjacentes à Terapia Molecular	- 63 -
5. Conclusão	- 63 -
6. Referências Bibliográficas	- 65 -
Anexos	- 71 -

Parte A

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas

DCI – Denominação Comum Internacional

DT – Diretora Técnica

IMC – Índice de Massa Corporal

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamento não sujeito a receita médica

MSRM – Medicamento sujeito a receita médica

PVP – Preço de Venda ao Público

RCM – Resumo das Características do Medicamento

SNS – Serviço Nacional de Saúde

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

VALORMED – Sociedade Gestora de Resíduos de Embalagens e Medicamentos Fora de Uso

I. Introdução

A Farmácia Comunitária apresenta-se como um dos locais de promoção e educação para a saúde mais importantes a nível nacional, sendo muitas vezes o primeiro local a que os portugueses recorrem em questões de saúde. Por isso, torna-se essencial uma formação de qualidade do Farmacêutico Comunitário como especialista do medicamento, que permita uma prestação de serviços de cuidados de saúde e de informação adequada e com qualidade ao utente. De facto, a sua atividade ultrapassa largamente a dispensa de medicamentos, podendo até ser caracterizado como um agente de saúde pública, cuja principal função é assegurar o bem-estar da população.

O plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) inclui um Estágio Curricular em Farmácia Comunitária que funciona como uma ponte entre o ensino e a vida profissional, permitindo aos estudantes a consolidação dos conhecimentos adquiridos durante os cinco anos de formação académica e a sua integração no exercício profissional.

O meu Estágio Curricular foi realizado na Farmácia São Sebastião, em Coimbra, sob a orientação da Dra. Ana Pimentel, que em conjunto com o resto da sua equipa de trabalho, me proporcionaram um estágio bastante enriquecedor entre 8 de janeiro e 27 de abril de 2018.

Tal como vem referido nas “Normas Orientadoras de Estágio do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas”¹, o presente relatório vai apresentar uma análise SWOT (acrónimo de Pontos Fortes (*Strengths*), Pontos Fracos (*Weaknesses*), Oportunidades (*Opportunities*) e Ameaças (*Threats*)), cujo objetivo é sintetizar uma análise crítica relativa à frequência e integração da aprendizagem no estágio, bem como à adequação do curso às perspetivas profissionais futuras.

Também serão incluídos casos clínicos que valorizaram a minha aprendizagem e permitiram a integração dos meus conhecimentos teóricos na prática da frequência de estágio.

2. Enquadramento da Farmácia São Sebastião

A Farmácia São Sebastião situa-se na Avenida Dr. Elísio de Moura, na freguesia de Santo António dos Olivais em Coimbra, com 38936 habitantes (INE 2011)², sendo a maior freguesia da região Centro. O seu horário de funcionamento é de segunda a sexta-feira, das 9h às 20h, sem encerramento para almoço, e aos sábados, das 9h às 14h. A farmácia encontra-se de serviço permanente de 20 em 20 dias, garantindo assim o acesso dos utentes aos produtos e medicamentos durante 24h.

No Anexo I (Figuras 1, 2 e 3) são apresentadas fotografias do exterior e do interior da farmácia, bem como uma representação da sua localização em Coimbra.

3. Análise SWOT

A Análise SWOT é uma ferramenta de gestão de auxílio à tomada de decisões, passível de divisão em duas componentes: a interna e a externa. A componente interna procura descrever os aspetos que valorizaram o meu estágio (Pontos Fortes) e aqueles que, a meu ver, dificultaram a sua realização (Pontos Fracos). Por outro lado, a componente externa engloba as Oportunidades e as Ameaças, representando as perspetivas futuras de evolução do mercado em que se situam as farmácias comunitárias portuguesas, e em especial a Farmácia São Sebastião.

Tabela 1: Análise SWOT do Estágio Curricular na Farmácia São Sebastião

Strengths (Pontos Fortes)	Weaknesses (Pontos Fracos)
<ul style="list-style-type: none">➤ Ambiente profissional da farmácia e integração na equipa de trabalho➤ Integração gradual nas tarefas da farmácia e autonomia no trabalho➤ Prestação de serviços farmacêuticos e medição de parâmetros fisiológicos e bioquímicos➤ Preparação de medicamentos➤ Sistema informático – <i>Sifarma2000</i>[®]➤ Utentes fidelizados➤ Técnicas de <i>merchandising</i>➤ Contacto com delegados de informação médica➤ Contacto com o público e aconselhamento em automedicação	<ul style="list-style-type: none">➤ Sazonalidade do estágio➤ Dificuldade em associar nomes comerciais e princípios ativos➤ Lacunas no conhecimento de alguns produtos
Opportunities (Oportunidades)	Threats (Ameaças)
<ul style="list-style-type: none">➤ Posição no Sistema de Saúde Português➤ Ações de Formação – formação contínua do farmacêutico➤ Cartão Saúde➤ Divulgação nas redes sociais e em jornais	<ul style="list-style-type: none">➤ Crise económico-financeira➤ Locais de venda de MNSRM

3.1. Pontos Fortes (Strengths)

3.1.1. Ambiente profissional da farmácia e integração na equipa de trabalho

A Farmácia São Sebastião apresenta um ambiente exigente e muito profissional, onde cada elemento da equipa de trabalho se dedica ao máximo na prestação de serviços com qualidade aos utentes, e zela pelo bom funcionamento do estabelecimento.

A equipa de trabalho da Farmácia São Sebastião é constituída por quatro farmacêuticos, onde se englobam a Diretora Técnica (DT) e a Farmacêutica Substituta. Toda a equipa apresenta um elevado nível de qualificação. De facto, ter assistido aos seus atendimentos foi um dos métodos mais importantes de aprendizagem, pois pude recolher informação sobre vários produtos e patologias. Neste sentido, todos os colaboradores contribuíram para a minha aprendizagem, esclarecendo sempre todas as dúvidas que eu tinha, e com o decorrer do estágio fui-me sentindo cada vez mais integrado na equipa de trabalho. Outra forma que contribuiu bastante para a minha aprendizagem foram os materiais de apoio que a Farmácia São Sebastião tinha disponíveis, tais como a Farmacopeia Portuguesa, o Prontuário Terapêutico, o Manual de Medicamentos não Prescritos, e o Manual de Suporte Básico de Vida, que eu ia estudando nos tempos de menor movimento da farmácia, principalmente nas primeiras semanas do estágio, e que me ajudaram bastante a recordar alguns conhecimentos. O acesso à *Internet* e ao *Sifarma2000*[®] também me disponibilizou, de uma forma mais rápida, informação sobre os diversos produtos.

Assim, considero que o ambiente profissional da Farmácia São Sebastião foi bastante favorável ao bom desenvolvimento do meu estágio, e a integração gradual na equipa de trabalho permitiu-me ganhar um sentido de responsabilidade profissional nas diversas tarefas que realizava, aumentando a minha confiança no trabalho diário.

3.1.2. Integração gradual nas tarefas da farmácia e autonomia no trabalho

Quando iniciei o meu estágio na Farmácia São Sebastião em janeiro, já me encontrava familiarizado com algumas tarefas típicas de uma farmácia comunitária, nomeadamente a receção de encomendas, em virtude do estágio de verão que realizara no ano anterior na Farmácia Estádio, também em Coimbra. Ainda assim, foi vontade minha e da Diretora Técnica (DT) que começasse o estágio precisamente por esta tarefa, para que me familiarizasse com os produtos de maior rotação da farmácia e respetivos locais de armazenamento, e só depois iniciaria o atendimento ao balcão.

Assim, no primeiro mês de estágio, as minhas tarefas debruçaram-se essencialmente na receção de encomendas e respetivo armazenamento dos produtos. O principal fornecedor da Farmácia São Sebastião é a Cooperativa Farmacêutica Plural, mas também se recebiam

produtos da *Alliance Healthcare*, e inclusive, por vezes, dos próprios Laboratórios (como por exemplo da *Alter Genéricos*). Aliado à tarefa de receção de encomendas, eu tentava recolher o máximo de informação acerca dos produtos existentes na farmácia, procurando na *Internet* o respetivo Resumo das Características do Medicamento (RCM) e estudando a documentação científica presente na farmácia. Quando a minha dúvida permanecia, consultava os colaboradores da farmácia, que mostraram sempre a máxima disponibilidade para me ajudar. Outra vantagem de ter iniciado o meu estágio pela receção de encomendas, foi ter tido um contacto mais aprofundado, do que aquele que tivera no meu estágio de verão, com o sistema informático *Sifarma2000*[®], no qual era realizada a tarefa de receção. Só após a verificação e atualização do prazo de validade dos produtos no sistema, confirmação dos Preços de Venda ao Público (PVPs) de cada produto, e confirmação do valor total e número de embalagens, é que procedia ao armazenamento dos produtos. As únicas exceções foram os medicamentos com condições especiais de conservação, que eram rececionados e imediatamente armazenados, fazendo-se assim a manutenção da cadeia de frio e assegurando-se a sua qualidade.

São vários os critérios que a Farmácia São Sebastião tem em conta para que a procura de um produto específico seja rápida e sem erros, nomeadamente o agrupamento dos produtos por ordem alfabética (sem distinção entre medicamentos de marca e genéricos), por forma farmacêutica, por ordem crescente de dosagem, cumprimento da regra *first in, first out* (os produtos com menor prazo de validade são os primeiros a sair), os medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) ao alcance visual dos utentes, e os medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) fora do alcance visual e físico dos utentes. Ao longo deste primeiro mês de estágio fui memorizando o local de armazenamento dos diversos produtos, o que me facilitou bastante o atendimento ao balcão na segunda fase do meu estágio.

Embora a receção de encomendas estivesse a meu cargo, eram os colaboradores da farmácia que marcavam os preços de produtos de venda livre, quando necessário. Quando existia alguma irregularidade, como produtos não faturados e enviados, ou faturados e não enviados, ou ainda danificados, procedia-se de imediato à reclamação e/ou devolução dos produtos em causa. Como era eu que estava a dar entrada dos produtos, geralmente também era eu que detetava essas irregularidades, mas as reclamações e/ou devoluções não eram efetuadas por mim. A tarefa de receção de encomendas foi ao longo de todo o estágio da minha responsabilidade, tendo sempre sido verificada pela restante equipa de trabalho.

Após o primeiro mês de estágio, comecei a assistir a mais atendimentos e a observar o modo como a equipa de trabalho utilizava o sistema informático no atendimento ao utente. Comecei então a realizar alguns atendimentos com o auxílio da DT, e ao fim de alguns dias já

me sentia à vontade para começar a atender sozinho. A partir desse momento, foi-me conferido um elevado grau de autonomia nas minhas funções, aumentando assim o meu sentido de responsabilidade.

As situações mais comuns com as quais me deparei foram a cedência de MSRM com apresentação da receita médica, e a cedência de medicamentos de venda livre por indicação farmacêutica. Durante os meus atendimentos, tentei sempre fazer o melhor aconselhamento farmacêutico, e tive a oportunidade de realizar algumas encomendas instantâneas pelo sistema informático, de modo a corresponder aos pedidos dos utentes.

Em conclusão, considero que o plano de estágio, na sua generalidade, estava muito bem organizado, e senti que a minha função na equipa de trabalho estava bem definida. O facto de ter começado com as tarefas mais simples permitiu-me ganhar confiança no meu trabalho, e penso ter sempre correspondido com o desenvolvimento esperado durante todo o período de estágio.

3.1.3. Prestação de serviços farmacêuticos e medição de parâmetros fisiológicos e bioquímicos

A Farmácia São Sebastião apresenta um elevado número de serviços farmacêuticos à disposição dos utentes. De facto, durante o meu estágio pude contactar com vários destes serviços, tais como o Programa Troca de Seringas “Diz Não a Uma Seringa em Segunda Mão”³, consultas de nutrição e dietética, medição de parâmetros fisiológicos e bioquímicos, recolha de embalagens vazias e de medicamentos fora de uso, em colaboração com a Sociedade Gestora de Resíduos de Embalagens e Medicamentos Fora de Uso (VALORMED)⁴, administração de vacinas e medicamentos injetáveis, preparação da caixa semanal de medicação crónica, e entrega ao domicílio.

Considero a participação nestes serviços um ponto bastante forte do meu estágio, porque eles demonstram a polivalência de uma farmácia comunitária como local não apenas de dispensa de medicamentos, mas também como prestador de serviços de saúde. Esta polivalência de atividades desenvolvidas permite uma maior fidelização dos utentes, aumentando a satisfação dos mesmos e o movimento diário da farmácia.

A medição de parâmetros fisiológicos e bioquímicos foi o serviço farmacêutico com o qual pude contactar mais vezes. Na Farmácia São Sebastião faz-se a medição da glicémia, colesterol total, triglicéridos e pressão arterial (parâmetro que media mais frequentemente). Relativamente a este, a sua medição era realizada num espaço calmo e adequado, separado da zona de atendimento ao público, de modo a garantir a privacidade do utente. A farmácia tem ainda à disposição uma balança na zona de atendimento ao público que mede a altura, o peso

e calcula o Índice de Massa Corporal (IMC), permitindo ao utente o seu autocontrolo, já que lhe é dispensado um boletim de registo após utilizar o aparelho.

3.1.4. Preparação de medicamentos

3.1.4.1. Preparações extemporâneas

Certos medicamentos, tais como alguns antibióticos, são comercializados sob a forma de pó liofilizado que necessitam de ser transformados em suspensões orais (forma farmacêutica final) aquando da sua administração. Para impedir que haja erros de dosagem derivados de uma diluição mal efetuada, no momento da cedência era perguntado aos utentes se pretendiam que fosse realizada a diluição com água purificada ali na farmácia. A resposta foi sempre positiva, pelo que durante o meu estágio na Farmácia São Sebastião pude observar várias vezes a preparação deste tipo de medicamentos.

No ato da dispensa, informava-se o utente não só sobre o curto prazo de utilização da suspensão oral e as suas condições de conservação, mas também sobre a necessidade de agitar bem o frasco antes de usar. Como se tratava de antibióticos, também se informava sobre a necessidade de realizar o tratamento até ao fim, de modo a diminuir o risco de aparecimento de resistências bacterianas.

3.1.4.2. Medicamentos manipulados

Em virtude da evolução da Indústria Farmacêutica, os medicamentos manipulados têm cada vez menos representatividade. No entanto, a preparação destes medicamentos continua a justificar-se em casos de personalização da terapêutica, de preenchimento de lacunas terapêuticas, ou quando a forma farmacêutica não é comercializada.

Entende-se como “medicamento manipulado” qualquer fórmula magistral ou preparado oficial, elaborado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico, a partir de matérias-primas existentes na farmácia, e utilizando material de laboratório adequado num local próprio para a preparação de manipulados (o laboratório), respeitando sempre as “Boas práticas a observar na preparação de medicamentos manipulados em farmácia de oficina e hospitalar”⁵. O material de laboratório existente na Farmácia São Sebastião cumpre a Deliberação nº 1500/2004, de 7 de Dezembro⁶.

A preparação do medicamento manipulado inicia-se com a interpretação da receita médica, seguida da seleção das matérias-primas necessárias e do processo de manipulação propriamente dito. Uma vez realizado, os medicamentos manipulados são acondicionados, e o recipiente escolhido deve ser obrigatoriamente rotulado.

Durante o meu estágio na Farmácia São Sebastião pude observar a preparação de vários medicamentos manipulados, tais como cápsulas de ivermectina, cápsulas de dapsona, pomadas de enxofre, entre outros, e ainda realizar uma preparação de pomada de vaselina salicilada. Todos os medicamentos manipulados preparados na Farmácia São Sebastião carecem do preenchimento de uma ficha de preparação, onde fica registado os materiais e matérias-primas utilizadas, o protocolo usado e o cálculo do Preço de Venda ao Público (PVP). Tive a oportunidade de preencher várias destas fichas que me permitiram perceber como é feito o controlo do *stock* de matérias-primas e como é calculado o PVP destes medicamentos. No Anexo II (Figuras 4, 5, 6, 7 e 8) está representada uma ficha de preparação de pomada de vaselina salicilada a 2%, com o respetivo rótulo e cálculo do PVP. O ácido salicílico na concentração de 2% tem uma ação queratoplástica, e por isso promove a regeneração da camada córnea da pele. Assim, a pomada tem indicação terapêutica para casos de úlceras crónicas e estados descamativos. Como o ácido salicílico também tem ação bacteriostática e fungicida, a pomada também é utilizada no tratamento tópico de infeções fúngicas da pele (tinhas, etc.), muitas vezes associado a outros antifúngicos ⁷.

Considero este um dos pontos mais fortes do meu estágio na Farmácia São Sebastião, já que a preparação de medicamentos manipulados é cada vez mais escassa nas farmácias comunitárias, e poder ter contactado com esta área foi sem dúvida uma experiência surpreendente e enriquecedora para o meu futuro.

3.1.5. Sistema informático – *Sifarma2000*[®]

O sistema informático utilizado na Farmácia São Sebastião é o *Sifarma2000*[®], o *software* de gestão mais utilizado entre as farmácias comunitárias nacionais. Por isso, considero este um ponto bastante forte do meu estágio pois a aprendizagem adquirida sobre o sistema vai, de certeza, ser importante para o meu futuro no mercado de trabalho.

Na Farmácia São Sebastião, o *Sifarma2000*[®] apresenta-se como uma ferramenta indispensável ao bom funcionamento diário da farmácia. São várias as funções que o sistema pode realizar, destacando-se a gestão de todos os produtos da farmácia, desde a sua entrada até à sua saída (dispensa ao utente ou devolução), controlo de *stock*, gestão dos prazos de validade, correção de preços dos produtos e etiquetagem dos mesmos. Não obstante, o sistema também é utilizado como auxiliar durante os processos de conferência de receituário e faturação.

Mas é no atendimento ao público que me apercebi que o *Sifarma2000*[®] adquire uma importância especial. De facto, o sistema permite a criação de fichas de dados dos utentes, contendo não só dados biográficos, como também o histórico de compras de cada utente.

Desta forma, o farmacêutico sabe quais os medicamentos que o utente costuma levar e consegue realizar um atendimento mais personalizado. Do mesmo modo, cada produto tem no *Sifarma2000*[®] uma ficha com informações detalhadas, permitindo a deteção de contra-indicações e interações medicamentosas, auxiliando assim o farmacêutico no ato de aconselhamento e dispensa ao utente.

Graças a sistemas informáticos deste tipo, o trabalho dos farmacêuticos fica mais completo, na medida em que conseguem ajudar na resolução de problemas e garantem que os medicamentos que os utentes levam são os medicamentos corretos.

3.1.6. Utentes fidelizados

Durante o meu estágio na Farmácia São Sebastião, rapidamente me apercebi que a maioria dos utentes que frequentam a farmácia são utentes habituais com ficha guardada no sistema informático. A Farmácia São Sebastião confere uma importância enorme a esta ficha pois ela guarda o historial clínico de cada utente, tornando o atendimento mais cómodo e individualizado. Desta forma, estabelece-se uma relação de confiança entre o utente e o farmacêutico, aumentando assim a satisfação de ambos.

Grande parte dos utentes da Farmácia São Sebastião são moradores das zonas residenciais próximas da farmácia, e durante o meu estágio, pude constatar que procuram bastante aconselhamento farmacêutico. De facto, a maioria são idosos polimedicados com doenças crónicas, pelo que, principalmente na fase final do meu estágio, participei também no acompanhamento farmacoterapêutico destes utentes, tentando sempre ter atenção a possíveis interações medicamentosas e à deteção de possíveis reações adversas aos medicamentos.

3.1.7. Técnicas de *merchandising*

Durante o meu estágio na Farmácia São Sebastião, tive a oportunidade de participar na implementação de variadas técnicas de *merchandising* que visaram não só uma maior rotação de *stock*, mas também um reforço da imagem da farmácia e a atração de mais utentes. O *merchandising* é visto como “a venda sem palavras”, e compreende qualquer técnica que proporcione melhor visibilidade de produtos ou serviços, com o objetivo final de motivar a decisão de compra do utente e adquirir um ganho económico para a farmácia. De facto, participei juntamente com a restante equipa de trabalho na organização apelativa de lineares, na colocação de produtos inovadores ou de promoções de produtos em zonas quentes da farmácia, e na decoração de montras.

Estas técnicas foram realizadas principalmente em datas comemorativas que ocorreram durante o meu estágio, e de facto verificou-se um aumento das vendas dos produtos em

destaque, já que a tendência para a compra impulsiva por parte dos utentes também aumentava. Não obstante, embora não fosse eu a realizar, também se publicitavam as devidas promoções dos produtos na página oficial da Farmácia São Sebastião no *Facebook*, para que o número de pessoas abrangidas por estas promoções fosse ainda maior.

3.1.8. Contacto com delegados de informação médica

Foram várias as vezes que pude contactar com delegados de informação médica durante o meu estágio na Farmácia São Sebastião. Considero as suas visitas à farmácia como uma grande oportunidade que eu tive para poder contactar com uma área diferente relacionada com a área de farmácia comunitária, e poder aprender mais sobre um determinado grupo de produtos.

Foi durante este estágio que presenciei, pela primeira vez, uma reunião com um delegado de informação médica, e fiquei surpreendido pela forma convincente como é dispensada a informação básica sobre o produto e/ou produtos em causa. Geralmente são produtos novos, ou promoções de produtos já no mercado, os quais eram alvo de técnicas de propaganda de modo a realçar as características monetárias ou terapêuticas que os diferenciavam dos restantes produtos concorrentes.

De um modo geral, permitiu que eu aprofundasse os meus conhecimentos sobre estes produtos (tais como informações que devem ser prestadas ao utente no ato de dispensa), o que me ajudou enquanto fazia atendimentos ao balcão. Também permitiu que eu adquirisse novos conhecimentos sobre as estratégias de aprovisionamento numa farmácia comunitária, como por exemplo, a realização de compras diretas aos Laboratórios.

3.1.9. Contacto com o público e aconselhamento em automedicação

A capacidade de diálogo e empatia são essenciais para o bom exercício da profissão farmacêutica. De facto, o farmacêutico é um profissional de saúde com um contacto privilegiado de proximidade com os utentes, e para que o atendimento seja de qualidade, são necessárias aptidões sociais e competências de diálogo. É necessário manter sempre uma postura e uma imagem cuidadas, e fazer todos os esforços para garantir que a mensagem pretendida é devidamente entendida pelo utente. Foram várias as vezes que eu, ao fazer o atendimento, escrevi a posologia em etiquetas e as coleí nas caixas dos medicamentos dos utentes, de modo a garantir que eram tomados no momento certo, principalmente quando atendia utentes idosos.

Outro aspeto importante da profissão é o facto de ter de estar continuamente atualizada. A medicina e a farmácia são áreas de saúde em contínua atualização, e cabe aos

profissionais de saúde estudarem o conhecimento mais atual para poderem fazer o melhor aconselhamento aos utentes, tanto em casos de automedicação, como em casos de medicação prescrita. De facto, a dispensa de medicamentos de venda livre está a tornar-se cada vez mais frequente, e a aposta na automedicação por parte dos utentes pode tornar-se vantajosa para eles, porque, por um lado, escusam de recorrer a consultas médicas em casos de “situações menores”, ou quando existe dificuldade de uma consulta médica em tempo oportuno, e por outro, o Serviço Nacional de Saúde (SNS) fica menos sobrecarregado ⁸.

Desta forma, torna-se facilmente perceptível a extrema importância que o farmacêutico adquire em casos de automedicação, uma vez que esta pode mascarar sintomas de uma doença potencialmente mais grave, pode dificultar diagnósticos e favorecer o aparecimento de reações adversas. Assim, o farmacêutico deve promover uma automedicação responsável, para sintomas e afeções que não necessitem de consulta médica, autolimitadas e tratadas até cinco dias ⁹. Durante o meu estágio na Farmácia São Sebastião, pude contactar com vários casos de automedicação, nos quais tentei sempre fazer o melhor aconselhamento farmacêutico.

3.2. Pontos Fracos (Weaknesses)

3.2.1. Sazonalidade do estágio

Como referi no início do presente relatório, o meu estágio decorreu entre 8 de janeiro e 27 de abril de 2018, compreendendo, por isso, maioritariamente meses pertencentes à estação do Inverno. De facto, isso refletiu-se nos medicamentos mais requisitados pelos utentes, de onde se destacam descongestionantes nasais, anti-histamínicos, pastilhas para a tosse, e antigripais. Neste sentido, considero que não tive um contacto tão focado com produtos mais vendidos noutras estações, como protetores solares ou repelentes de insetos na estação do Verão.

3.2.2. Dificuldade em associar nomes comerciais aos princípios ativos

Nas primeiras semanas de estágio, a minha maior dificuldade foi a associação dos nomes comerciais aos princípios ativos dos medicamentos, em Denominação Comum Internacional (DCI). Foram várias as vezes em que me eram pedidos por telefone, ou no balcão de atendimento, medicamentos pelo seu nome comercial, pelo que eu necessitava de consultar o *Sifarma2000*[®] e/ou os respetivos RCMs de modo a ver esclarecidas as minhas dúvidas sobre os medicamentos em causa.

De facto, alguns fatores potenciaram esta minha dificuldade, tais como o facto de vários nomes comerciais poderem existir para a mesma DCI, ou o facto de existir um elevado

número de medicamentos disponíveis no mercado. Penso que a formação académica prestada no MICF passa um pouco ao lado desta problemática, pois durante a nossa formação lidamos quase sempre com as DCIs dos medicamentos, e a realidade numa farmácia comunitária é diferente.

No entanto, após algumas semanas, comecei a memorizar os diferentes nomes comerciais e a prestar um melhor e mais eficaz atendimento ao utente.

3.2.3. Lacunas no conhecimento de alguns produtos

Nas primeiras semanas do meu estágio senti que não tinha o conhecimento mais completo sobre certos produtos vendidos na Farmácia São Sebastião, com especial destaque para alguns produtos dermocosméticos e produtos de puericultura. A razão para esta lacuna no meu conhecimento sobre estes produtos é, entre outras, o extenso leque de marcas existentes que se encontram em constante renovação. De facto, quando comecei a atender, sempre que um utente pretendia aconselhamento farmacêutico sobre estes produtos, eu não era capaz de o atender com a devida qualidade e acabava por pedir ajuda a um colaborador da farmácia. No entanto, após estas semanas de maior aprendizagem, consegui memorizar as principais indicações de cada um destes produtos, e corresponder aos pedidos dos utentes, fornecendo um atendimento mais completo.

3.3. Oportunidades (*Opportunities*)

3.3.1. Posição no Sistema de Saúde Português

A farmácia comunitária apresenta-se atualmente como um elemento fulcral no Sistema de Saúde Português, sendo muitas vezes o local de preferência dos utentes quando necessitam de ver esclarecidas dúvidas sobre a sua medicação, ou até em casos de urgência médica. Neste sentido, acredito que a maior oportunidade das farmácias comunitárias portuguesas é precisamente apostar na sua centralidade no sistema de saúde. Assim, a farmácia comunitária deve apostar na formação contínua dos seus colaboradores para que sejam capazes de fornecer sempre o melhor atendimento ao utente. Do mesmo modo, deve apostar em serviços farmacêuticos que a diferenciem dos demais pontos de venda de medicamentos, nomeadamente a revisão da medicação e o acompanhamento farmacoterapêutico.

Durante o meu estágio na Farmácia São Sebastião, pude partilhar desta vontade dos colaboradores em manter a farmácia comunitária no pódio das opções dos portugueses. Ao manter esta posição de preferência entre os portugueses, a confiança e a fidelização dos seus

utentes são mais facilmente alcançadas, aumentando os benefícios, tanto para o utente, como para a farmácia.

3.3.2. Ações de Formação – formação contínua do farmacêutico

Para que o farmacêutico preste sempre o melhor serviço ao utente, ele tem de se manter atualizado, de tal modo, que a formação contínua é um dos pilares onde assenta o exercício da profissão. Neste sentido, durante o meu estágio na Farmácia São Sebastião, tive a oportunidade de participar em diversas formações, internas e externas pós-laborais, permitindo que eu adquirisse novos conhecimentos e consolidasse outros já adquiridos. De facto, estas ações de formação prestadas pelas empresas pretendem divulgar novas informações sobre os seus produtos em circulação, técnicas de *marketing* e dicas sobre como dar um melhor aconselhamento ao utente dos produtos em causa.

Assim, tive a oportunidade de assistir a formações da *Caudalie*[®] e da *Papillon*[®] na farmácia, e ainda participar no I Ciclo de Conferências da Academia *LEO Pharma*[®], cujo tema principal foi a psoríase, nomeadamente no que respeita a fisiopatologia, diagnóstico, tratamento e papel do farmacêutico no apoio aos doentes. Não obstante, devo referir também que durante o meu estágio na Farmácia São Sebastião usufruí de um elevado nível de formação prestado por todos os colaboradores da farmácia, que contribuiu para a aprendizagem de conhecimentos que considero imprescindíveis no meu futuro profissional.

3.3.3. Cartão Saúde

O Cartão Saúde é um cartão de pontos integrado no Programa das Farmácias Portuguesas onde todas as compras que o utente realizar em produtos de saúde e bem-estar, MNSRM e serviços farmacêuticos se traduzem em pontos que podem ser trocados diretamente por produtos constantes no catálogo de pontos, ou podem ser transformados em vales de dinheiro ¹⁰.

De facto, este cartão traz bastantes benefícios ao utente. Desde logo, aumenta a poupança na conta da farmácia e permite a criação de uma conta familiar, onde todos os membros da família acumulam pontos. Também confere promoções exclusivas e benefícios na rede de empresas-parceiras, bem como o acesso ao Saúde no telemóvel e *Internet* ¹¹.

Foram várias as vezes que criei perfis de Cartões Saúde no *Sifarma2000*[®] durante o estágio, e apercebi-me da importância e da vasta utilização que os utentes dão a este cartão. Por isso, acredito que o Cartão Saúde se torna numa excelente oportunidade para as farmácias comunitárias portuguesas, pois não só promove a fidelização do utente, mas também a divulgação de produtos de saúde e bem-estar, contribuindo para a saúde pública.

3.3.4. Divulgação nas redes sociais e em jornais

A Farmácia São Sebastião tem uma página na rede social *Facebook* que utiliza com bastante regularidade, e durante o meu estágio, pude observar nela várias vezes a exposição de informações sobre novos produtos e promoções. Do mesmo modo, pude presenciar a publicitação da Farmácia São Sebastião no *Diário de Coimbra*, edição de 27 de fevereiro de 2018, onde se pretendeu destacar alguns pontos fortes da farmácia, tais como entregas ao domicílio, veterinária, nutrição, preparação de manipulados e venda online. No Anexo III (Figura 10) apresento a correspondente página do Jornal.

Acredito que a utilização destes meios de comunicação são uma boa oportunidade que as farmácias comunitárias devem aproveitar e investir, para poderem divulgar os seus produtos e serviços diferenciadores dos demais locais de venda de medicamentos, de modo a atingir o maior número de pessoas possível.

3.4. Ameaças (*Threats*)

3.4.1. Crise económico-financeira

Em virtude das medidas de austeridade, decorrentes da crise económica em que nos encontramos, tem-se vindo a assistir a grandes mudanças no setor da saúde. De facto, o setor farmacêutico foi particularmente afetado, e pude verificar durante o meu estágio na Farmácia São Sebastião que a implementação destas medidas de austeridade provocou ajustes nos preços dos produtos e menores escalões de comparticipação, resultando assim em preços mais elevados para o utente.

Infelizmente, pude presenciar durante o meu estágio alguns casos em que estas mudanças de preços obrigavam os utentes a prescindir dos medicamentos por se terem tornado demasiado caros, e por isso, a comprometer o seu tratamento. Este ponto causava descontentamento por parte dos utentes, por um lado, por terem dificuldade em perceber que é um problema que transcende a farmácia, e por outro, porque muitas vezes deixavam de aviar a receita completa por não terem possibilidade de pagamento. Ainda assim, a Farmácia São Sebastião soube encarar bem esta ameaça. De facto, a farmácia realizava algumas vendas a crédito aos utentes fidelizados nestas situações, de modo a que o tratamento farmacológico não fosse interrompido pela impossibilidade financeira dos utentes. Acredito que esta atitude da farmácia aumentava a satisfação e fidelização destes utentes.

Esta crise económica, para além de afetar os utentes, também afeta a própria farmácia. De facto, não só passou a ser mais difícil ter uma maior diversidade de *stock*, como também passaram a existir casos de medicamentos ou produtos iguais em *stock*, mas com preços diferentes, podendo originar momentos de desconforto entre o farmacêutico e o utente

durante o atendimento. Neste sentido, levo do meu estágio na Farmácia São Sebastião um exemplo de uma excelente gestão económico-financeira, na medida em que o *stock* dos produtos era continuamente monitorizado, e todas as alterações de preços eram sempre devidamente sinalizadas para todos os colaboradores.

Do mesmo modo, a crise atingiu também os armazenistas de medicamentos. Como as margens de lucro estão cada vez menores, muitos medicamentos encontravam-se esgotados, por vezes, durante meses. Isto causava algum descontentamento e preocupação por parte dos utentes. Neste sentido, a Farmácia São Sebastião utilizava a Via Verde do Medicamento ¹², com recurso ao programa informático *Sifarma2000*[®], permitindo que o medicamento sem *stock* na farmácia fosse rececionado em tempo útil, e dispensado ao utente. Deste modo, era assegurada a disponibilidade destes medicamentos e o utente não ficava prejudicado.

Assim, considero que a função do farmacêutico está a ficar limitada por estas ameaças, onde muitas vezes não consegue agir da maneira que gostaria para promover a saúde do utente. No entanto, acredito que faz parte da sua profissão encontrar outras soluções, tanto promotoras da relação de confiança farmacêutico/utente, como da sustentabilidade financeira da farmácia.

3.4.2. Locais de venda de MNSRM

O Decreto-Lei 134/2005 de 16 de Agosto estabelece o regime de venda de MNSRM ao público fora das farmácias, em locais que cumpram determinados requisitos legais e regulamentares ¹³. De facto, a maior parte dos MNSRM não são de venda exclusiva em farmácia, e por isso, considere este ponto uma grande ameaça para as farmácias comunitárias portuguesas, incluindo a Farmácia São Sebastião. Esta medida governamental facilitou o acesso, por parte da população, aos MNSRM, incentivando indiretamente a automedicação e permitindo a descida dos preços destes medicamentos, já que se estabeleceu um maior nível de competitividade entre os estabelecimentos de venda (as farmácias e as parafarmácias).

Neste sentido, e tendo por base o facto de o farmacêutico ser considerado o especialista do medicamento e agente da saúde pública, considero que se torna imperativo sensibilizar a população para o risco que pode advir de uma automedicação descontrolada, sem aconselhamento nem acompanhamento.

Do mesmo modo, como os locais de venda de MNSRM geralmente pertencem a grandes superfícies comerciais, realizam compras em elevado número e praticam preços mais baixos que nas farmácias. De facto, tornaram-se numa ameaça económica para as farmácias comunitárias, e durante o meu estágio na Farmácia São Sebastião, pude presenciar que existia uma constante preocupação em acompanhar os preços praticados nesses locais. No entanto,

acredito que esta ameaça pode ser transformada numa oportunidade, pois como também pude presenciar na Farmácia São Sebastião, as farmácias devem apostar no que as diferencia, como a prestação de serviços farmacêuticos e o acompanhamento dos utentes.

4. Casos Clínicos

4.1. Caso Clínico 1

Mulher, cerca de 40 anos, dirige-se à farmácia para comprar algo para os enjoos e vómitos. Refere que vai fazer uma viagem longa, de autocarro, e tem tendência para enjoar. Na conversa que estabeleci com a utente, cheguei à conclusão que não sofria de nenhuma doença associada, e que não estava nem grávida nem em período de amamentação. Neste sentido, após ter analisado a situação, aconselhei o Vomidrine® (dimenidrinato, 50 mg) visto que é um antiemético anti-histamínico H₁ cedido apenas em casos de prevenção e tratamento do enjoo de movimento. Aconselhei a tomar um comprimido meia-hora antes de começar a viagem, no máximo três vezes por dia. Do mesmo modo, alertei para os seus efeitos adversos, dos quais se destaca a sonolência, à qual a utente disse que não era problema, pois aproveitava e dormia durante a viagem (a utente não seria a condutora). De seguida, propus à utente algumas medidas não farmacológicas, tais como evitar alimentos gordos e líquidos em excesso antes de viajar. Indiquei-lhe também que se a situação não ficasse resolvida, deveria contactar o médico.

Assim, penso que a decisão que tomei foi a mais correta, tendo agido de acordo com as minhas capacidades para resolver a situação da utente da melhor forma.

4.2. Caso Clínico 2

Homem, cerca de 30 anos, dirige-se à farmácia com o objetivo de adquirir algo que o ajude a melhorar o seu estado de saúde, referindo que tem “gripe”. O utente queixava-se de dor de garganta, espirros e rinorreia, e após ter sido questionado para saber se tinha febre, dores musculares ou cansaço extremo, as respostas foram negativas. Constatei então, que os sintomas apresentados eram relativos a uma constipação, e não a uma gripe. De seguida, perguntei-lhe se sofria de alguma doença crónica, à qual a resposta foi igualmente negativa. Neste sentido, para a dor de garganta, aconselhei pastilhas Strepfen Laranja sem açúcar (flurbiprofeno, 8,75 mg), por opção do utente, até quatro pastilhas por dia. Do mesmo modo, para a rinorreia, aconselhei Heperpoll Maçã (cetirizina, 10 mg), um comprimido por dia, advertindo para a possibilidade de ocorrência de sonolência (principal efeito secundário). Não obstante, referi também algumas medidas não farmacológicas que iriam ajudar a aliviar a sintomatologia sentida, nomeadamente o aumento da ingestão de líquidos e a importância do

repouso. Referi também que se a situação não ficasse resolvida em cerca de cinco dias, deveria contactar o médico.

Deste modo, penso que as minhas decisões ajudaram a resolver a situação do utente, tendo agido de acordo com as minhas capacidades.

5. Conclusão

O estágio em Farmácia Comunitária é uma oportunidade única para o estudante contactar com a realidade profissional de uma farmácia. Permite não só a aquisição de novos conhecimentos e a aplicação de conhecimentos previamente adquiridos durante o MICF, como também que o estudante desenvolva características sociais de comunicação e empatia com os utentes, em virtude do grande contacto que tem com eles ao balcão de atendimento.

De facto, tal aconteceu precisamente comigo durante o meu estágio na Farmácia São Sebastião. Considero que ter tido a oportunidade de contactar diariamente com casos clínicos, e ter tido a oportunidade de aplicar os conhecimentos adquiridos durante estes cinco anos do MICF nestes casos, foi uma grande mais-valia para o meu futuro profissional. Do mesmo modo, apercebi-me da extrema importância do farmacêutico enquanto agente de saúde pública, na medida em que ele deve ser capaz de ouvir e responder, mas acima de tudo, resolver os casos clínicos com que é confrontado, sempre da melhor maneira possível. Por isso, acredito que estes quatro meses de estágio contribuíram bastante para o meu desenvolvimento tanto profissional como pessoal.

Assim, fica concluída mais uma etapa do meu percurso académico, e agradeço à Farmácia São Sebastião a oportunidade oferecida para a realização do estágio que me permitiu estar mais preparado para enfrentar os desafios do mercado de trabalho que me espera. Levo do estágio uma experiência gratificante, e da Farmácia São Sebastião um exemplo de qualidade de Farmácia Comunitária.

6. Referências Bibliográficas

1. FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA - **Normas Orientadoras do Estágio Curricular**. (2018).
2. CÂMARA MUNICIPAL DE COIMBRA - **Junta de Freguesia de Santo António dos Olivais**. [Acedido a 22 de fevereiro de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.cm-coimbra.pt/index.php/municipio/municipio/freguesias/item/5523-junta-de-freguesia-de-santo-antonio-dos-olivais-01>
3. DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE - **Programa Troca de Seringas “Diz Não a Uma Seringa em Segunda Mão”**. [Acedido a 23 de fevereiro de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.pnvihsida.dgs.pt/programatrocasingas/informacao.aspx>
4. VALORMED - **Quem somos**. (2018). [Acedido a 22 de fevereiro de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.valormed.pt/paginas/2/quem-somos/>
5. MINISTÉRIO DA SAÚDE - **Portaria n.º 594/2004, de 2 de Junho**. Diário da República (2004).
6. MINISTÉRIO DA SAÚDE - **Deliberação n.º 1500/2004, 7 de Dezembro**. Diário da República (2004) I–2.
7. ACOFARMA DISTRIBUCIÓN, S. A - **Ácido Salicílico – Ficha de Informação Técnica**. I–4.
8. NETFARMA - **Intervenção das farmácias permite poupança de 880 milhões de euros e aumento da qualidade de vida dos portugueses**. (2015). [Acedido a 2 de março de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.netfarma.pt/noticia/estudo-poupanca-farmacias-congresso-nacional-dos-farmaceuticos>
9. MINISTÉRIO DA SAÚDE - **Despacho n.º 17690/2007, de 23 de Julho**. Diário da República. (2007).
10. FARMÁCIAS PORTUGUESAS - **Como funciona o cartão Saúda?** (2018). [Acedido a 5 de março de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.farmaciasportuguesas.pt/sauda/como-funciona>
11. FARMÁCIAS PORTUGUESAS - **Cartão Saúda: Vantagens e benefícios**. (2018). [Acedido a 5 de março de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.farmaciasportuguesas.pt/sauda/vantagens-e-beneficios>
12. INFARMED, I.P. - **Projeto Via Verde do Medicamento**. Circular Informativa N.º 019/CD/100.20.200. (2015).
13. MINISTÉRIO DA SAÚDE - **Decreto-Lei n.º 134/2005 de 16 de Agosto**. Diário da República I Série-A, (2005), 4763–4765.

Parte B
Relatório de Estágio no INFARMED, I.P.

Lista de Abreviaturas

- AIM** – Autorização de Introdução no Mercado
- EMA** – Agência Europeia de Medicamentos
- DAM** – Direção de Avaliação de Medicamentos
- DATS** – Direção de Avaliação das Tecnologias de Saúde
- DCP** – Procedimento Descentralizado
- DCQ** – Direção de Comprovação da Qualidade
- DGIC** – Direção de Gestão de Informação e Comunicação
- DGR** – Direção de Gestão de Risco de Medicamentos
- DIL** – Direção de Inspeção e Licenciamento
- DIPE** – Direção de Informação e Planeamento Estratégico
- DPS** – Direção de Produtos de Saúde
- DRHFP** – Direção de Recursos Humanos, Financeiros e Patrimoniais
- DSTI** – Direções de Sistemas e Tecnologias de Informação
- EDQM** – *European Directorate for Quality of Medicines and Healthcare*
- EMR** – Estado Membro de Referência
- FFUC** – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
- FI** – Folheto Informativo
- GPQ** – Gabinetes de Planeamento e Qualidade
- GJC** – Gabinetes Jurídico e de Contencioso
- INFARMED, I.P.** – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.
- MICF** – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
- MRP** – Procedimento de Reconhecimento Mútuo
- OMCL** – *Official Medicines Control Laboratories*
- RCM** – Resumo das Características do Medicamento
- SWOT** – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*
- UIM** – Unidade de Introdução no Mercado

1. Introdução

O presente relatório surge no âmbito da disciplina de Estágio Curricular, inserida no plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC). Este estágio decorreu em Lisboa, na Unidade de Introdução no Mercado (UIM) da Direção de Avaliação de Medicamentos (DAM) da Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. – INFARMED, I.P., sob a orientação da Dra. Dina Lopes e da restante equipa de trabalho, que me proporcionaram um estágio bastante enriquecedor entre 2 de maio e 31 de julho de 2018.

Tal como vem referido nas “Normas Orientadoras de Estágio do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas”¹, o presente relatório vai apresentar uma análise SWOT (acrónimo de Pontos Fortes (*Strengths*), Pontos Fracos (*Weaknesses*), Oportunidades (*Opportunities*) e Ameaças (*Threats*)), cujo objetivo é sintetizar uma análise crítica relativa à frequência e integração da aprendizagem no estágio, bem como à adequação do curso às perspetivas profissionais futuras.

Assim, através deste relatório, pretendo destacar a importância do papel do INFARMED, I.P. e da DAM-UIM no serviço público, realizando uma reflexão crítica e pessoal relativamente aos conhecimentos adquiridos durante estes três meses de estágio, e de que forma se refletirão no meu futuro percurso profissional.

2. Enquadramento do INFARMED, I.P.

O INFARMED, I.P. é um instituto público com atribuições de regulação, supervisão e fiscalização nos setores do medicamento, dispositivos médicos e cosméticos, segundo os mais elevados padrões de proteção da saúde pública, de forma a garantir o acesso dos profissionais da saúde e dos cidadãos a medicamentos, dispositivos médicos, e produtos cosméticos e de higiene corporal de qualidade, eficazes e seguros. Com jurisdição sobre todo o território nacional, o INFARMED, I.P. é dotado de autonomia administrativa, financeira e património próprio².

Atualmente sediado no Parque de Saúde de Lisboa, a organização interna do INFARMED, I.P. integra um conjunto de unidades orgânicas que prosseguem as atribuições desta Autoridade Nacional. De facto, esta entidade encontra-se organizada em cinco órgãos, nomeadamente o Conselho Diretivo, o Fiscal Único, o Conselho Consultivo, as Comissões Técnicas Especializadas e o Conselho Nacional de Publicidade de Medicamentos e Produtos de Saúde. Também fazem parte doze unidades orgânicas, das quais oito têm funções de negócio: a Direção de Avaliação de Medicamentos (DAM), a Direção de Gestão de Risco de Medicamentos (DGRM), a Direção de Produtos de Saúde (DPS), a Direção de Inspeção e

Licenciamento (DIL), a Direção de Comprovação da Qualidade (DCQ), a Direção de Avaliação das Tecnologias de Saúde (DATS), a Direção de Gestão de Informação e Comunicação (DGIC), e a Direção de Informação e Planeamento Estratégico (DIPE); e quatro têm funções de suporte: as Direções de Sistemas e Tecnologias de Informação (DSTI) e de Recursos Humanos, Financeiros e Patrimoniais (DRHFP), e os Gabinetes de Planeamento e Qualidade (GPQ) e Jurídico e de Contencioso (GJC) ³.

No Anexo IV (Figuras 11 e 12) são apresentadas fotografias do exterior do edifício da DAM, bem como uma representação da sua localização em Lisboa. No Anexo V (Figura 13) é apresentado o organograma do INFARMED, I.P.

2.1. Direção de Avaliação de Medicamentos - Unidade de Introdução no Mercado (DAM-UIM)

O meu estágio teve lugar na Unidade de Introdução no Mercado (UIM) da Direção de Avaliação de Medicamentos (DAM). A receção foi realizada pela Dra. Dina Lopes, que começou por fazer uma breve introdução sobre a DAM, elucidando as tarefas que eram realizadas nesta unidade. Foi também nesta receção inicial aos estagiários que foram delegadas as suas tarefas para os seus estágios.

A DAM-UIM é atualmente dirigida pela Dra. Marta Marcelino, e compete a esta direção, sumariamente, assegurar as atividades necessárias aos procedimentos de registo, avaliação da sua eficácia, segurança e qualidade, e de autorização de introdução no mercado de medicamentos de uso humano e à sua manutenção no mercado, bem como a gestão desses procedimentos; gerir as atividades relativas à intervenção do INFARMED, I. P., no Procedimento de Reconhecimento Mútuo (MRP) e Descentralizado (DCP), nomeadamente como Estado Membro de Referência (EMR) e nos Procedimentos Centralizado e de arbitragem comunitária; emitir pareceres de âmbito técnico-científico sobre a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos de uso humano, bem como sobre os produtos que incorporam substâncias ativas ou produtos biológicos; e assegurar as atividades inerentes à adequada integração e participação no âmbito do sistema da União Europeia relativo à avaliação e supervisão de medicamentos de uso humano, incluindo a articulação com a Agência Europeia de Medicamentos (EMA), a Comissão Europeia e as demais instituições europeias ⁴.

Para que um medicamento seja colocado no mercado, é necessária uma Autorização de Introdução no Mercado (AIM) concedida pelo INFARMED, I.P. ou pela Comissão Europeia. O Procedimento Nacional permite a disponibilização de medicamentos apenas no território nacional. Os Procedimentos por Reconhecimento Mútuo (MRP) ou Descentralizado (DCP)

constituem dois Procedimentos Europeus que permitem a autorização de medicamentos num Estado Membro da União Europeia ⁵.

Nos MRP, um dos Estados Membros da União Europeia assume durante determinados períodos o papel de Estado Membro de Referência (EMR), competindo-lhe a tarefa principal de avaliação, a qual é acompanhada e comentada pelos restantes Estados Membros que reconhecem e aceitam a AIM concedida, por Procedimento Nacional, por um EMR ⁵.

O DCP pressupõe a apresentação simultânea em vários Estados Membros de um pedido de AIM, assumindo um dos Estados Membros a tarefa de EMR ⁵.

As minhas principais funções durante o meu estágio passaram por finalizar os processos de conceção de AIM por Procedimento Nacional, por MRP ou por DCP em que Portugal atuava como Estado Membro Envolvido.

3. Análise SWOT

A Análise SWOT é uma ferramenta de gestão de auxílio à tomada de decisões, passível de divisão em duas componentes: a interna e a externa. A componente interna procura descrever os aspetos que valorizaram o meu estágio (Pontos Fortes) e aqueles que, a meu ver, dificultaram a sua realização (Pontos Fracos). Por outro lado, a componente externa engloba as Oportunidades e as Ameaças, e pretende realçar os aspetos que não estão sob a influencia direta da entidade.

Tabela II: Análise SWOT do Estágio Curricular no INFARMED, I.P.

Strengths (Pontos Fortes)	Weaknesses (Pontos Fracos)
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ambiente profissional e integração na equipa de trabalho da DAM-UIM ➤ Aplicação de conhecimentos adquiridos ao longo do MICF ➤ Consolidação e desenvolvimento de competências informáticas ➤ Contacto com inúmeras entidades ➤ Visita ao Laboratório Europeu de Referência 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Duração curta do estágio ➤ Sobrecarga dos colaboradores
Opportunities (Oportunidades)	Threats (Ameaças)
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Realização de um segundo Estágio Curricular ➤ Papel do Farmacêutico no INFARMED, I.P. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Escassez de recursos humanos ➤ A deslocalização do INFARMED, I.P.

3.1. Pontos Fortes (Strengths)

3.1.1. Ambiente profissional e integração na equipa de trabalho da DAM-UIM

A DAM-UIM apresenta um ambiente muito profissional constituído por uma equipa competente e dinâmica. Durante o meu estágio, pude observar que existia um clima alegre e descontraído, que a meu ver, era em parte responsável pelo sucesso e produtividade desta Direção. Como o número de estagiários na DAM-UIM era escasso, cada um teve um acompanhamento por uma única orientadora ao longo de todo o estágio. Para mim, este foi o ponto mais forte do estágio, pois usufruí sempre de uma formação prévia e adequada antes de executar qualquer tarefa pela primeira vez, e senti-me acompanhado e orientado durante todo o estágio. Não obstante, todos os colaboradores mostraram-se sempre disponíveis para esclarecer qualquer dúvida ou prestar algum tipo de apoio ou orientação.

O plano de estágio estava bem definido e foi-me sempre conferido um alto grau de autonomia para desempenhar as minhas funções. Após a concretização das minhas tarefas, a orientadora verificava se estava tudo conforme, e caso não estivesse, procedíamos às devidas correções em conjunto. Este equilíbrio entre acompanhamento e autonomia foi essencial para o bom desenvolvimento do estágio, e permitiu-me uma integração rápida na equipa de trabalho.

3.1.2. Aplicação de conhecimentos adquiridos ao longo do MICF

Uma mais valia do meu estágio no INFARMED, I.P. foi a possibilidade de aplicar conhecimentos adquiridos durante o meu percurso académico na prática profissional. De facto, permitiu-me aplicar conhecimentos que adquiri na área de Assuntos Regulamentares do Medicamento, complementando assim a formação adquirida durante o MICF. Desta forma, tive a oportunidade de contactar com o mercado de trabalho desta área, no âmbito da Autoridade Regulamentar, e por isso pude consolidar conhecimentos e adquirir outros.

Considero este um ponto importante do meu estágio porque a área dos Assuntos Regulamentares é uma área de que gosto bastante, e que me vejo a exercer no futuro.

3.1.3. Consolidação e desenvolvimento de competências informáticas

Para a realização do meu trabalho diário, necessitei de recorrer ao computador, em especial ao *software Microsoft Office*[®], nomeadamente ao *Word*[®] e ao *Excel*[®]. Embora eu já tenha experiência com este *software*, pude desenvolver novas competências informáticas e descobrir novas funcionalidades que foram essenciais à execução das minhas tarefas.

Do mesmo modo, pude familiarizar-me com o *GestProc* e com o *Gimed*, duas bases de dados internas com informação sobre os medicamentos e os seus processos, indispensáveis à realização das minhas tarefas.

3.1.4. Contacto com inúmeras entidades

Considero que ter tido a oportunidade de contactar com diversas entidades, através do pedido de elementos enquanto realizava as minhas tarefas, foi um ponto bastante forte do meu estágio. A diversidade de situações experienciadas em todos os processos que finalizei, permitiu-me estabelecer contacto, tanto por e-mail como por contacto telefónico, com muitas Indústrias Farmacêuticas. Esta nova experiência permitiu-me ter uma noção alargada do contacto que o INFARMED, I.P. realiza diariamente com outras entidades, em prol da saúde da população.

3.1.5. Visita ao Laboratório Europeu de Referência

Na última semana do meu estágio tive a oportunidade de visitar o Laboratório Europeu de Referência do INFARMED, I.P. Este laboratório é membro da rede *Official Medicines Control Laboratories* (OMCL), coordenada pela *European Directorate for Quality of Medicines and Healthcare* (EDQM). Os membros da rede OMCL têm sistemas de gestão de qualidade implementados de acordo com a norma ISO 17025 e complementados com as *guidelines* OMCL, sendo sujeitos a auditorias periódicas. Desta forma, é atestado o reconhecimento da competência técnica do laboratório do INFARMED, I.P.⁵.

A visita ao laboratório foi bastante enriquecedora, pois deu-me a conhecer as atividades que são desenvolvidas diariamente, tais como o combate aos medicamentos falsificados, ilegais, ou suspeitos de falsificação.

3.2. Pontos Fracos (*Weaknesses*)

3.2.1. Duração curta do estágio

O estágio teve duração de apenas três meses, e embora tenha tentado tirar o máximo desta experiência, considero que se tivesse tido uma maior duração, teria sido mais enriquecedor para a minha formação e aprendizagem.

A curta duração do estágio impossibilitou que os estagiários conhecessem com mais detalhe as outras Direções do INFARMED, I.P. Ainda assim, considero que um estágio de apenas três meses não é benéfico para os estagiários andarem a passar por todas as Direções, mas também não foi suficiente para permitir uma integração completa do estagiário numa

única Direção. Entendo que devido ao número elevado de estagiários acolhidos, e ao facto de uma entidade com tantas responsabilidades e prazos para cumprir, como o INFARMED, I.P., a disponibilidade e condições para formar estagiários esteja diminuída, bem como a distribuição dos diversos estagiários pelas diferentes Direções seja uma medida necessária.

Por isso, acredito que seria mais benéfico para o estagiário se este aspeto fosse colmatado, na medida em que permitia uma maior integração de conhecimentos, e adquiria uma visão mais alargada sobre o impacto do INFARMED, I.P. sobre as outras entidades relacionadas com a saúde pública, e sobre os produtos de saúde e medicamentos.

3.2.2. Sobrecarga dos colaboradores

O número elevado de processos em curso de Procedimentos Nacionais provocava um aumento do tempo de atravessamento e o não cumprimento dos prazos em alguns casos. De facto, embora os colaboradores tenham demonstrado sempre a máxima disponibilidade para orientar e apoiar o meu trabalho, devo referir que por vezes a sobrecarga de trabalho exigida a cada colaborador impossibilitava que obtivesse as minhas dúvidas respondidas atempadamente.

3.3. Oportunidades (*Opportunities*)

3.3.1. Realização de um segundo Estágio Curricular

A meu ver, a oportunidade dos alunos finalistas do MICF da FFUC em realizar um segundo estágio curricular é uma mais valia para a sua formação académica, e uma enorme oportunidade para o seu futuro no mercado de trabalho. De facto, levo do meu estágio no INFARMED, I.P. uma experiência desafiante e enriquecedora na medida em que o contacto com a área dos Assuntos Regulamentares permitiu-me encarar esta realidade de trabalho como uma grande possibilidade no meu futuro.

Sinto por isso, uma enorme satisfação por ter tido a oportunidade de ter realizado este estágio no decorrer do meu último ano de MICF.

3.3.2. Papel do Farmacêutico no INFARMED, I.P.

Fiquei surpreendido pela quantidade de farmacêuticos que trabalham no INFARMED, I.P. De facto, constatei que o farmacêutico apresenta as competências certas para exercer funções em todas as Direções, e em especial na DAM-UIM, tais como a verificação de discordâncias entre os textos dos medicamentos (RCMs, Fls e Rotulagens). Neste sentido, considero que o farmacêutico tem na área dos Assuntos Regulamentares uma grande

oportunidade de futuro de trabalho, destacando-se de outras profissões pelos conhecimentos específicos que tem relativamente aos medicamentos e produtos de saúde.

3.4. Ameaças (*Threats*)

3.4.1. Escassez de recursos humanos

A crise económica em que vivemos reflete-se na escassez de recursos humanos que são alocados para trabalhar no INFARMED, I.P. De facto, como já referi, senti que os colaboradores da DAM-UIM estavam frequentemente com uma carga de trabalho muito elevada. Desta forma, acredito que se este problema fosse colmatado, o meu estágio teria sido mais produtivo por haver um acompanhamento mais próximo. Ainda assim, tenho consciência de que recebi o melhor acompanhamento possível, e valorizo todas as orientações e apoio que os colaboradores me dispensaram e toda a disponibilidade que demonstraram ao longo de todo o estágio.

Neste sentido, penso que a abertura de concursos públicos para contratar recursos humanos poderia ser benéfica para contornar esta situação. No entanto, a crise económica vivida apresenta-se novamente como uma barreira a esta medida.

3.4.2. A deslocalização do INFARMED, I.P.

Durante os meus três meses de estágio no INFARMED, I.P., esteve sempre presente a problemática da sua deslocalização para o Porto, e os possíveis impactos decorrentes dessa deslocalização.

Nos próximos anos, prevê-se um aumento do número de novas moléculas no mercado, pelo que as Autoridades Regulamentares devem estar à altura do desafio e necessitam, para tal, de aumentar a capacidade de resposta pela contratação de mais recursos humanos e pela aposta na experiência dos colaboradores já existentes. De facto, a meu ver, o principal problema decorrente da deslocalização do INFARMED, I.P. seria a perda de recursos humanos, que se traduzia tanto em custos financeiros elevados (despesas de pessoal e aquisição de bens e serviços), como na diminuição da operacionalidade do INFARMED, I.P.

Neste sentido, a disrupção da atividade diária do INFARMED, I.P. teria impactos profundos no acesso da população portuguesa a medicamentos, dispositivos médicos e cosméticos com qualidade, segurança e eficácia. Do mesmo modo, o prestígio desta Autoridade Regulamentar no contexto Nacional e Europeu seria obviamente afetado, cuja sua reparação, se possível, só pode ser conseguida com recurso a grandes investimentos.

Durante o meu estágio pude presenciar que a instabilidade criada pela incerteza relativa à deslocalização do INFARMED, I.P. para o Porto foi enorme, tendo mesmo um profundo impacto no trabalho diário dos colaboradores.

4. Conclusão

O meu Estágio Curricular na Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. – INFARMED, I.P. tornou-se numa das experiências mais entusiasmantes do meu percurso académico. Ter tido a oportunidade de fazer este estágio foi, para mim, muito prestigiante e enriquecedor. De facto, contactar diariamente com a área dos Assuntos Regulamentares, e em especial com a Unidade de Introdução no Mercado da Direção de Avaliação de Medicamentos (DAM-UIM), constituiu uma enorme oportunidade de aprendizagem de novos conhecimentos, que considero essenciais para o meu futuro pessoal e profissional no mercado de trabalho.

Atualmente, a FFUC é a única Faculdade de Farmácia do país que proporciona uma unidade curricular obrigatória de Assuntos Regulamentares do Medicamento no seu plano de estudos. De facto, os conhecimentos adquiridos nesta unidade curricular mostraram-se essenciais para o meu estágio no INFARMED, I.P., e penso que se não tivesse tido esta formação inicial, teria tido muitas dificuldades de adaptação ao estágio.

Com o decorrer do estágio, consegui ter uma noção mais alargada sobre os aspetos subjacentes à Autorização de Introdução no Mercado (AIM) de novos medicamentos em Portugal, em virtude das variadas funções que desempenhei. Também tive a oportunidade de assistir a uma Comissão de Avaliação de Medicamentos (CAM), na última semana do meu estágio, que me permitiu ter uma ideia sobre a emissão de pareceres relativos à avaliação da qualidade, eficácia e segurança dos medicamentos ⁶.

Concluo assim mais uma etapa do meu percurso académico, e agradeço à excelente equipa de trabalho da DAM-UIM do INFARMED, I.P. por toda a amizade, disponibilidade oferecida e transmissão de conhecimentos ao longo destes três meses. Agradeço também à FFUC por me ter proporcionado este estágio de excelência que superou as minhas expectativas.

5. Referências Bibliográficas

1. FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA - **Normas Orientadoras do Estágio Curricular**. (2018).
2. INFARMED, I.P. - **Apresentação**. [Acedido a 17 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/apresentacao>
3. INFARMED, I.P. - **Estrutura e Organização**. [Acedido a 18 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/estrutura-e-organizacao>
4. INFARMED, I.P. - **Direção de Avaliação de Medicamentos (DAM)**. [Acedido a 20 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/estrutura-e-organizacao/dam>
5. INFARMED, I.P. - **O Futuro Preparado**. ISBN: 978-972-0-06359-5.
6. INFARMED, I.P. - **Comissão de Avaliação de Medicamentos**. [Acedido a 23 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/estrutura-e-organizacao/comissoes-tecnicas-especializadas/comissao-de-avaliacao-de-medicamentos>

Parte C

Monografia

**“Terapia Molecular em Doenças Neurodegenerativas: rAAVs e
Doença de Alzheimer”**

Lista de Abreviaturas

- AAV** – Vírus Adeno-Associado
- A β** – Peptídeo β -amiloide
- Ad** – Adenovírus
- ADA** – Adenosina desaminase
- APP** – Proteína precursora de amiloide
- BHE** – Barreira hematoencefálica
- CAT** – Comité das Terapias Avançadas
- DA** – Doença de Alzheimer
- EMA** – Agência Europeia do Medicamento
- FDA** – *Food and Drug Administration*
- FFUC** – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
- HSC** – Célula estaminal hematopoiética
- HSV** – Vírus Herpes simplex
- ICM** – Intra-cisterna magna
- ICV** – Intracerebroventricular
- IT** – Intratecal
- LCF** – Líquido cefalorraquidiano
- LV** – Lentivírus
- MICF** – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
- MoMLV** – Vírus da Leucemia Murina de Moloney
- NFTs** – Emaranhados neurofibrilares
- NIH** – *National Institutes of Health*
- OTC** – Ornitina transcarbamilase
- PCR** – *Polymerase Chain Reaction*
- PEG-ADA** – Polietilenoglicol - Adenosina desaminase
- rAAVs** – *Recombinant Adeno-Associated Viruses*
- RNAi** – RNA de interferência
- SCID** – Imunodeficiência combinada severa
- siRNA** – *small interfering RNA*
- SNC** – Sistema Nervoso Central

Resumo

A presente monografia aborda o tema da Terapia Molecular no tratamento das Doenças Neurodegenerativas, e em especial na Doença de Alzheimer. Trata-se de uma doença neurodegenerativa progressiva crónica, que se manifesta principalmente na idade avançada, cujo tratamento atual disponível é farmacológico e apenas sintomático. Por isso, torna-se necessário investir em terapêuticas alternativas que evitem a progressão ou possibilitem a cura da doença. A terapia molecular emergiu assim como uma candidata, sendo que já foram realizados ensaios clínicos recorrendo aos vetores rAAVs, tendo-se obtido resultados promissores. De facto, nos últimos anos, tem-se assistido a um aumento no investimento na terapia molecular por parte da indústria farmacêutica, sugerindo que esta forma de terapia irá integrar a rotina clínica num futuro próximo. Cabe ao farmacêutico e aos outros profissionais de saúde adquirirem o conhecimento mais atual sobre o tema em questão, e esclarecer quaisquer dúvidas que os doentes possam ter relativas a esta nova realidade terapêutica.

Palavras-chave: Genes, rAAVs, Terapia Molecular, Doenças Neurodegenerativas, Doença de Alzheimer, Ensaios clínicos, Medicamentos de Terapia Avançada, Biotecnologia.

Abstract

This monograph deals with the theme of Molecular Therapy in the treatment of Neurodegenerative Diseases, and especially in Alzheimer's Disease. It is a chronic progressive neurodegenerative disease, manifested mainly in old age, whose current treatment available is pharmacological and only symptomatic. Therefore, it is necessary to invest in alternative therapies that prevent the progression or make it possible to cure the disease. Molecular therapy has emerged as a candidate, and several clinical trials have already been performed using the rAAVs vectors, and promising results have been obtained. In fact, in recent years, there has been an increase in investment in molecular therapy by the pharmaceutical industry, suggesting that this form of therapy will integrate the clinical routine soon. It is up to the pharmacist and other healthcare professionals to acquire the most up-to-date knowledge on the subject matter and to clarify any doubts patients may have regarding this new therapeutic reality.

Keywords: Genes, rAAVs, Molecular Therapy, Neurodegenerative Diseases, Alzheimer's Disease, Clinical Trials, Advanced Therapy Medications, Biotechnology.

I. Introdução

No âmbito do plano de estudos incluído no quinto ano curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), em orientação com o Professor Doutor Sérgio Simões, desenvolveu-se a seguinte monografia com o tema: *Terapia Molecular em Doenças Neurodegenerativas: rAAVs e Doença de Alzheimer*.

O tema proposto é relevante, na medida em que a população mundial está progressivamente a envelhecer, prevendo-se que o número de idosos (indivíduos com idade superior ou igual a 65 anos) no mundo aumente para cerca de 2 mil milhões em 2050 ¹. Uma vez que a idade é um fator de risco importante em muitas doenças neurodegenerativas, o número de pessoas afetadas por estas doenças será maior nas próximas décadas, e como consequência, os custos sociais e económicos associados também aumentarão. Estes aspetos, aliados ao facto dos tratamentos farmacológicos atuais para estas doenças serem geralmente inadequados, levou a que vários grupos de investigação médico-farmacêutica se focassem recentemente nas doenças neurodegenerativas ².

As doenças neurodegenerativas, de um modo geral, englobam uma série de doenças que envolvem os neurónios do cérebro humano ³. Caracterizam-se por uma deterioração progressiva e irreversível de uma população específica de neurónios, durante um certo período, e normalmente manifestam proteínas anormais. Apesar de possuírem fenótipos clínicos distintos, permanecem difíceis de diagnosticar. São doenças crónicas e afetam profundamente a qualidade de vida dos doentes durante vários anos. A Doença de Alzheimer (DA), cuja etiologia ainda permanece relativamente desconhecida, é a doença neurodegenerativa que apresenta maior incidência, e afeta cerca de 5% da população com idade superior a 65 anos. Atualmente, não existem terapias clínicas totalmente eficazes para as doenças neurodegenerativas, e a maioria dos tratamentos são sintomáticos, não tentando fornecer benefícios terapêuticos de longo prazo ².

Desta forma, as doenças neurodegenerativas são alvos atraentes para as novas estratégias terapêuticas, e a terapia molecular emergiu assim como um método alternativo de tratamento ².

Pretende-se, com esta monografia, fornecer uma visão geral sobre a Terapia Molecular no tratamento de doenças, desde uma contextualização história até à sua atualidade, e de seguida aprofundar no tema do tratamento de doenças do Sistema Nervoso Central (SNC), em especial na DA. Finalmente, é discutida algumas questões subjacentes a esta inovadora terapia, nomeadamente, as questões éticas e de segurança.

2. Terapia Molecular

2.1. Definição e aplicação

A terapia molecular é o tratamento de doenças a partir do conhecimento da estrutura e da função do alvo molecular. Pode ser aplicada a uma variedade de doenças, de onde se destacam as que têm por base uma patologia genética, tais como a maioria das doenças neurodegenerativas. A primeira ciência “ômica” a surgir no ramo da biologia molecular e da bioinformática foi a “genômica”, que significa o “estudo do genoma”, e as ferramentas de biologia molecular e biotecnologia apareceram sob a denominação geral de “terapia génica”, “edição génica”, ou “*gene targeting*”, entre outros ⁴, tornaram-se parte integrante da pesquisa e desenvolvimento de novas ciências biomédicas e de terapias avançadas ⁵.

A Agência Europeia do Medicamento (EMA) define medicamentos de terapia avançada como “medicamentos de uso humano baseados em genes (terapia génica), células (terapia celular), ou tecidos (engenharia de tecidos)” ⁶. Estes medicamentos englobam estratégias terapêuticas inovadoras e o seu desenvolvimento contribuirá para proporcionar oportunidades de tratamento para algumas doenças que até agora não apresentam tratamentos efetivos ⁷. Neste sentido, a EMA define um “medicamento de terapia génica” como um medicamento biológico que cumpre as seguintes características:

a. Contém uma substância ativa que contém ou consiste num ácido nucleico recombinante utilizado ou administrado a seres humanos com vista a regular, reparar, substituir, adicionar ou eliminar uma sequência genética;

b. O seu efeito terapêutico, profilático ou de diagnóstico depende diretamente da sequência do ácido nucleico recombinante que contém, ou do produto de expressão genética dessa sequência. Os medicamentos de terapia génica não incluem as vacinas contra doenças infecciosas ^{6,8,9}.

Os medicamentos de terapia avançada beneficiam de um único procedimento de avaliação e autorização, por Procedimento Centralizado, dirigido pela EMA ^{6,7}. Do mesmo modo, a Agência também realiza a monitorização da segurança e eficácia destes medicamentos depois de terem sido aprovados e comercializados ⁶.

A terapia molecular, mais propriamente a terapia génica, foi concebida durante o início e meados do século XX. Considerada como um procedimento revolucionário com potencial de curar qualquer doença cujas bases moleculares fossem conhecidas ¹⁰, e em especial aquelas em que a farmacoterapia se mostrava ineficaz ⁴, foi inicialmente postulada para tratar doenças monogénicas pela substituição do gene defeituoso por uma cópia que funcionava corretamente². As imunodeficiências primárias estão entre as primeiras doenças que foram alvo de terapia génica, uma vez que as células da medula óssea são facilmente retiradas do

doente e manipuladas *in vitro*, tornando possível a realização de uma transferência genética *ex vivo* destas células e sua reintrodução no hospedeiro com segurança e eficácia ¹⁰.

Ainda assim, a substituição completa de genes foi uma modalidade que ficou aquém do sucesso esperado, mas à medida que o campo da terapia génica evoluiu, emergiu também um novo uso: a sua aplicação nas doenças complexas multifatoriais. Estas doenças envolvem alterações na expressão de múltiplos genes, combinadas com fatores ambientais ¹¹. Englobam a maioria das doenças humanas, para as quais ainda só existem tratamentos paliativos, e cujas causas primárias ainda permanecem desconhecidas ¹¹. De facto, percebeu-se que o material genético poderia ser utilizado para tratar estas doenças, nomeadamente pela geração e expressão de proteínas terapêuticas. E foi neste sentido que a terapia génica se tornou numa candidata ideal para fornecer benefícios terapêuticos às doenças neurodegenerativas ². Também se estendeu a outras doenças, tais como as doenças oculares, doenças coronárias, doenças metabólicas, e vários tipos de cancro ¹². A terapia génica evoluiu assim, em poucas décadas, de uma perspetiva quase teórica para uma aplicação na vida real ^{10,13}.

2.2. Contextualização histórica: o que correu bem e menos bem

Em 1961, Howard Temin descobriu que se podem adquirir mutações genéticas resultantes de infeções virais ¹⁴. Esta descoberta foi de grande importância porque ficou aparente que os vírus possuíam propriedades que podiam ser muito vantajosas em transportar genes de interesse para as células alvo. Cinco anos depois, Edward Tatum publicou um artigo em que discutia a eficiência dos vírus para serem usados numa possível terapia génica de células somáticas ¹⁵. Nessa altura, já se sabia que os vírus teriam de ser desprovidos dos seus genes patológicos, e teriam de transportar os genes terapêuticos. Infelizmente, as técnicas de DNA recombinante ainda não estavam suficientemente desenvolvidas ¹⁶. Só a partir dos anos 70, com a descoberta dessas tecnologias, é que se iniciou uma revolução no conceito da terapia génica. A introdução do Southern, Northern e Dot Blotting, bem como do sequenciamento de DNA, mais tarde, na década de 1970, melhorou consideravelmente a capacidade de diagnóstico. No entanto, foi com o desenvolvimento do *Polymerase Chain Reaction* (PCR), em 1985, que se conseguiu um crescimento exponencial no ramo da biologia molecular e da biotecnologia ⁵.

A terapia génica é um novo paradigma na medicina, apresentando um potencial terapêutico enorme. No entanto, uma série de eventos adversos diretamente relacionados com a terapia ofuscaram os resultados clínicos positivos obtidos e o progresso terapêutico conseguido, e fez com que se começasse a dar mais atenção aos riscos associados do que propriamente aos efeitos terapêuticos benéficos ¹⁷.

A 14 de setembro de 1990, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o primeiro ensaio clínico de terapia génica. O objetivo desse ensaio clínico foi tratar uma doente de quatro anos de idade que sofria de uma doença genética causada pela deficiência da enzima adenosina desaminase (ADA), essencial ao desenvolvimento do sistema imunitário. Esta doença resulta na degeneração dos linfócitos T do sistema imunitário, e é uma das principais causas de imunodeficiência combinada severa (SCID). Neste caso, a doença é conhecida pelo acrónimo ADA-SCID. As crianças afetadas têm pouca resistência a infeções, e se não forem tratadas, geralmente morrem precocemente. Os tratamentos consistiam na terapia de substituição enzimática por injeções semanais com polietilenoglicol-adenosina desaminase (PEG-ADA) ¹⁸.

No caso desta doente, no segundo ano de tratamento com estas injeções semanais, começou a sofrer novamente de infeções recorrentes, e desenvolveu uma alergia ao preparado enzimático utilizado nas injeções, indicando que a terapia de reposição enzimática estava a falhar. Investigadores da Universidade de Califórnia, foram então autorizados pelos comités de ética a iniciar um ensaio clínico de terapia génica nesta doente. A cada um ou dois meses, colhiam linfócitos T do sangue da doente, e inseriram o gene responsável pela codificação da enzima ADA recorrendo a um vetor γ -retroviral. Após indução da proliferação destas células *in vitro*, infundiram-nas novamente, agora corrigidas, na corrente sanguínea da doente. Por motivos de segurança, continuou a receber injeções semanais de PEG-ADA. A terapia génica nesta doente, assim como a iniciada noutra doente, de nove anos de idade, um ano depois na Europa, produziu resultados positivos. Em ambos os casos, houve uma melhoria clínica com redução da quantidade de enzima que precisou de ser inserida. Observou-se que o nível da enzima no sangue das doentes aumentou progressivamente como resultado da terapia génica ¹⁸. Após doze anos do término das infusões, quando os dois casos foram reavaliados, um grande número de linfócitos T continuou a expressar o gene terapêutico no sangue de ambas as doentes. Ainda assim, surgiram questões técnicas relacionadas a estes dois ensaios clínicos, que nos impedem de considerá-los um sucesso clínico completo. Embora tenha sido um sucesso do ponto de vista da segurança, já que não ocorreram efeitos adversos consideráveis, não ficou claro se trouxe benefícios terapêuticos, uma vez que as doentes tratadas continuaram a receber injeções de PEG-ADA, embora em doses menores, para controlar a doença ¹⁷.

A terapia génica para ADA-SCID evoluiu e hoje é considerada um sucesso clínico. De facto, mais de trinta doentes com ADA-SCID já foram tratados, por todo o mundo, recorrendo à terapia génica, em que na maioria dos casos, a função imunológica foi alcançada sem a necessidade de apoio com a terapia de reposição enzimática ¹⁷.

Apesar dos resultados dos primeiros ensaios clínicos ainda estarem aquém das expectativas, a verdade é que a terapia génica experienciou um “boom”, pelo menos, até à trágica morte de Jesse Gelsinger. Em 1999, o pior cenário possível para a terapia génica tornou-se realidade quando Jesse Gelsinger, de dezoito anos, participou num ensaio clínico de terapia génica na Universidade da Pensilvânia na Filadélfia. Sofria de deficiência parcial da ornitina transcarbamilase (OTC), uma enzima hepática necessária para a remoção do excesso de nitrogénio resultante do metabolismo de aminoácidos e proteínas. O sistema imunitário de Gelsinger respondeu abruptamente após a administração de uma dose muito elevada de vetores adenovirais, e acabou por falecer quatro dias depois por falência de vários órgãos. Gelsinger tornou-se no primeiro doente cuja morte esteve relacionada diretamente com o vetor viral usado no tratamento ¹⁶.

Alguns anos mais tarde, observou-se um novo avanço na terapia génica. A imunodeficiência combinada severa relacionada com o cromossoma X (X-SCID) foi corrigida com sucesso em vinte crianças, tornando-se no primeiro tratamento bem-sucedido de uma doença genética com recurso à terapia génica ¹⁷. A X-SCID é uma doença genética comumente diagnosticada na infância que se caracteriza-se por infeções recorrentes, como resultado da ausência de imunidade humoral e mediada por células ¹⁷. No ensaio, recorreu-se à transdução *ex vivo* de células estaminais CD34⁺ da medula óssea dos doentes, tendo-se obtido resultados clínicos positivos ¹⁹. Ainda assim, trinta meses após o tratamento, os resultados obtidos foram ofuscados pelo desenvolvimento de leucemia de linfócitos T em cinco destas crianças. Os vetores usados foram vetores γ -retrovirais, e este efeito adverso grave foi resultado direto da sua utilização, uma vez que o vetor integrou o seu genoma próximo do oncogene LMO2 ²⁰, levando a uma transcrição descontrolada do mesmo. No entanto, a maioria das crianças afetadas foi tratada com sucesso com quimioterapia, tendo-se observado remissão total da leucemia ¹⁷. Curiosamente, já tinha sido mencionado em 1980 a possibilidade de efeitos secundários deste género ocorrerem decorrentes do uso destes vetores em terapia génica. Esta propriedade destes vetores, um fenómeno conhecido por “mutagénese por inserção”, tem sido usada *in vitro* para a identificação de genes potenciadores de crescimento ¹⁸.

Ensaio clínicos usando vetores γ -retrovirais foram realizados em 2006, tendo-se corrigido com sucesso uma granulomatose crónica relacionada com o cromossoma X em adultos jovens ¹⁰, e neste sentido, a eficácia clínica correlacionou-se com a amplificação clonal de células corrigidas, como um resultado direto da ativação de certos oncogenes com capacidades de promoção de crescimento. De um modo geral, estes ensaios clínicos realçaram a necessidade das células corrigidas, para que tenham vantagem relativamente às defeituosas, em aumentarem as suas capacidades proliferativas e de sobrevivência ¹⁰.

Os ensaios clínicos iniciados nas últimas décadas, aliados aos resultados clínicos positivos observados, são um marco na história da terapia génica que inspirou o crescimento desta área no tratamento de várias outras doenças ^{16,18}. Em 1995, na Finlândia, realizou-se o primeiro ensaio clínico de transferência genética que apresentou resultados promissores de que uma transferência *in vivo* de genes para o cérebro pode ser alcançada, abrindo assim caminho para a aplicação da terapia génica em muitas doenças neurodegenerativas ¹⁶.

De facto, a aprovação regulamentar de *Glybera*[®] (AAV1 para a deficiência de lipoproteína lípase), na União Europeia, e a aprovação regulamentar pela FDA para o T-VEC oncolítico baseado em HSV para terapia de melanoma avançado, bem como os recentes resultados encorajadores de ensaios clínicos de fase III do vetor SPK-RPE65 baseado em AAV2 para distrofias hereditárias da retina, levantou esperanças de que um sucesso similar pode ser conseguido para a terapia génica de doenças neurodegenerativas no futuro ^{21,22}.

Tem-se assistido à aprovação de novas estratégias de terapia génica nos EUA e na Europa. No dia 1 de maio de 2018, a empresa Novartis recebeu a aprovação da FDA para uma segunda indicação terapêutica do medicamento *Kymriah*[®], tornando-se no primeiro medicamento de terapia de células T-CAR com duas indicações distintas: leucemia linfoblástica aguda das células B em doentes pediátricos ou adultos jovens até 25 anos de idade; e linfoma difuso das células B, a principal forma de linfoma não-Hodgkin, em doentes adultos após duas ou mais linhas de terapia sistémica (nova indicação terapêutica). A 28 de junho de 2018, a mesma aprovação foi concedida pela Agência Europeia do Medicamento (EMA) ^{23,24}.

Mais recentemente, a 10 de agosto de 2018, a FDA aprovou o medicamento *Onpattro*[®], da empresa Alnylam Netherlands B.V, contendo um oligonucleótido sintético de siRNA de cadeia dupla indicado no tratamento da amiloidose associada à transtirretina em adultos, tratando-se no primeiro medicamento silenciador génico aprovado pela FDA ²⁵.

Os exemplos atrás descritos demonstram que a aplicação segura da terapia génica depende fundamentalmente do conhecimento da engenharia vetorial ¹⁰. Atualmente, a área da terapia génica está a fazer um bom progresso, particularmente nas doenças do sistema hematopoiético. A mutagénese por inserção, no entanto, é reconhecida como um risco clinicamente estabelecido associado ao uso de vetores integrantes. Como resultado, desenvolveram-se sistemas vetoriais alternativos, com perfis de integração mais seguros, cujo objetivo é diminuir a probabilidade de tais eventos adversos ¹⁷.

No Anexo VI (Figura 14) está representado um esquema cronológico dos principais avanços científicos que levaram ao desenvolvimento da terapia génica.

2.3. Aspetos atuais da Terapia Molecular

Até à data, quase 2600 ensaios clínicos de terapia génica foram concluídos, estão em curso ou foram aprovados em todo o mundo. O número de ensaios iniciados por ano tende a diminuir em anos imediatamente a seguir àqueles onde se registaram efeitos adversos graves decorrentes da terapia génica, tal como em 2003 e 2007. No entanto, tem havido um aumento constante do número de ensaios clínicos por ano desde 2012. Os anos mais recentes tendem a estar sub-representados nos bancos de dados porque leva algum tempo para que os artigos sejam publicados, causando um atraso na obtenção de informação sobre os ensaios mais recentes. Relativamente às fases em que os ensaios clínicos se encontram, mais de três quartos dos ensaios clínicos de terapia génica realizados até ao momento são de fase I ou I/II. As duas categorias combinadas representam 77,7% de todos os ensaios clínicos de terapia génica. Os ensaios de fase II perfazem 17,1% do total e os estudos de fase II/III e III representam apenas 4,8% de todos os ensaios. A proporção dos ensaios na fase II, II/III e III continua a crescer ao longo do tempo, indicando o progresso na aproximação da terapia génica à aplicação clínica de rotina ²⁶. Todos os ensaios clínicos de terapia génica têm de ser previamente aprovados por entidades reguladoras específicas. A *Food and Drug Administration* (FDA) e o *National Institutes of Health* (NIH) são as entidades reguladoras Norte-Americanas. Na Europa, a entidade reguladora é o Comité das Terapias Avançadas (CAT), pertencente à Agência Europeia do Medicamento (EMA) (Anexo VII, Figuras 15 e 16).

A grande maioria dos ensaios clínicos de terapia génica são direcionados para o cancro, doenças hereditárias monogénicas e doenças infecciosas, e todos os cinco continentes estão envolvidos na realização destes ensaios. De facto, a distribuição continental dos ensaios não mudou muito nos últimos anos, refletindo as despesas na investigação e desenvolvimento, com 64,9% dos ensaios realizados nas Américas, 23,2% na Europa e 6,5% na Ásia. Os EUA continuam a realizar o maior número de ensaios clínicos em todo o mundo (63,3%). Não obstante, tem havido um aumento acentuado no número de ensaios clínicos *multi-country*, o que reflete tanto o aumento da interação colaborativa entre os diversos centros de pesquisa, como a necessidade de aceder às populações de doentes em mais que um país, o que é particularmente importante no caso das doenças raras ²⁶. No entanto, a percentagem relativa de ensaios clínicos com vista à aplicação da terapia génica às doenças neurodegenerativas, corresponde apenas a 1,8%. (Anexo VII, Figuras 17, 18 e 19).

Vários genes foram utilizados em ensaios clínicos de terapia génica em humanos. Como seria expectável, os genes transferidos com maior frequência (antígenos, citocinas, supressores de tumores e genes suicidas) são aqueles utilizados principalmente contra o cancro. Do mesmo modo, vários vetores também foram utilizados. Embora a utilização dos

vetores não virais se esteja a tornar cada vez mais comum, os vetores virais continuam a ser, de longe, os mais utilizados, tendo sido utilizados em aproximadamente dois terços dos ensaios clínicos realizados até hoje. Assistiu-se a uma diminuição da utilização dos vetores retrovirais nos últimos anos, e uma tendência para aumentar a utilização dos vetores AAV. Ainda assim, os vetores adenovirais são os mais utilizados (20,5% de todos os ensaios), devido principalmente à sua capacidade em transportar maior quantidade de material genético que os vetores retrovirais, de atingir uma alta eficácia de transdução com nível elevados de expressão génica (embora transitória), e de transduzir células que não estejam em divisão ²⁶ (Anexo VII, Figuras 20 e 21).

3. Terapia Génica do SNC

A terapia génica de células do Sistema Nervoso Central (SNC) é um dos temas com maior crescimento no ramo das neurociências. De um modo geral, a manipulação genética pode ser conseguida com recurso a diferentes estratégias, tais como: i) introdução de uma cópia funcional de um gene defeituoso; ii) silenciamento de um alelo mutante usando sistemas de interferência de RNA (RNAi); iii) introdução de um gene modificador da doença (tais como genes codificadores de fatores neurotróficos); ou iv) usando métodos de edição genética ²⁷. Estas estratégias são promissoras para várias doenças do SNC, tanto monogénicas como multifatoriais (ex: doenças neurodegenerativas), e em ambos os casos, a terapia génica apresenta-se como uma alternativa às abordagens farmacológicas tradicionais, que não proporcionam recuperação completa e apresentam efeitos adversos consideráveis. Além disso, é capaz de corrigir direta e permanentemente os defeitos genéticos, evitando tratamentos repetidos em algumas vertentes de aplicação. ^{27,28}.

Neste sentido, para a realização de uma terapia génica bem-sucedida, entram em jogo vários fatores, nomeadamente a escolha do gene terapêutico, a seleção do melhor vetor e a otimização da via de administração. As interações entre o sistema imunitário do hospedeiro e o vetor e/ou transgene também devem ser consideradas. Para além do mais, a natureza do tecido alvo adiciona outra camada de complexidade ²⁹. Todos estes fatores serão descritos a seguir, com maior detalhe.

3.1. Fatores críticos para uma terapia génica de sucesso

3.1.1. Escolha do gene terapêutico

O transgene pode ter, essencialmente, dois alvos: i) o gene específico causador da doença, se este se conhecer; ou ii) uma via ou processo que estejam relacionados com a doença ²¹. De um modo geral, é desejada uma grande capacidade dos transgenes em

incorporarem os genes de interesse e os reguladores ou promotores induzíveis apropriados, bem como uma boa eficiência de transdução. A estabilidade dos transgenes também é necessária em várias aplicações, mas a inativação do promotor, perda física de vetores, efeitos citotóxicos e resposta imune a proteínas externas, incluindo produtos do transgene, têm sido causas de perda de estabilidade ³⁰.

A implementação da terapia génica para doença adquiridas e hereditárias do SNC requerem uma integração contínua de diferentes áreas do conhecimento, incluindo a virologia, neurociência, imunologia e genética molecular ³⁰, e à medida que o conhecimento sobre as doenças aumenta, novos potenciais alvos terapêuticos podem ser identificados ²⁹.

3.1.2. Seleção do vetor

Após algumas décadas de investigação sem benefícios terapêuticos notáveis, as altas expectativas da terapia génica foram progressivamente desaparecendo. No entanto, esta situação mudou radicalmente após o primeiro ensaio clínico bem-sucedido de terapia génica em humanos. Ainda assim, o risco de efeitos secundários genotóxicos, como resultado da própria terapia génica, demonstrou que é necessário um maior conhecimento de engenharia vetorial ¹⁰.

De facto, um fator crítico para uma terapia génica bem-sucedida no SNC é a entrega segura e eficiente da informação genética nas células-alvo. A maneira mais simples de a fazer seria injetar o DNA terapêutico, mas devido à baixa eficiência do procedimento, torna-se necessário utilizar outras estratégias. Neste sentido, são utilizados agentes conhecidos como “vetores”, que idealmente devem apresentar as seguintes características: i) capacidade em transportar transgenes de peso molecular variado; ii) apresentarem baixa imunogenicidade e citotoxicidade, não causando efeitos adversos nem repostas imunitárias; iii) permitirem uma expressão estável e de duração adequada do transgene, de modo a induzir um efeito terapêutico na ausência de toxicidade celular; iv) garantirem uma transdução eficaz e sem efeitos *off-target*, através do direcionamento para os alvos celulares; v) produção simples, eficiente e em larga escala, bem como fácil purificação e manipulação; vi) capacidade de transduzir células em divisão ou não, como os neurónios ^{27,30,31}. O transgene transportado pelo vetor necessita de ser integrado especificamente num locus definido do cromossoma do hospedeiro, ou mantido no núcleo como um epissoma extracromossómico, que se divide com a célula ³². Ainda não existe um vetor que reúna todas estas condições desejáveis, por isso devem ser consideradas as vantagens e limitações de cada vetor no sentido de escolher aquele que melhor se adapte a cada aplicação clínica ³⁰.

Os vetores usados em terapia génica podem ser virais ou não-virais. Dos dois, os virais são os atualmente mais utilizados devido principalmente à alta eficiência de transdução³⁰. Usufruem da capacidade intrínseca dos vírus em infetar células, nos quais são eliminados genes essenciais responsáveis pela replicação viral, por exemplo, de modo a prevenir uma proliferação incontrolada do transgene e a formação de agentes patogénicos, e introduzidos os genes terapêuticos de interesse^{30,33}, juntamente com os promotores e reguladores que auxiliam na expressão do transgene². Foram várias as famílias de vírus já utilizadas como vetores de transferência génica, mas o maior ênfase vem sendo dado, principalmente, a quatro famílias: os Vírus Herpes-simplex (HSV), Adenovírus (Ad), Lentivírus (LV), e os Vírus Adeno-Associados (AAV)^{27,30}.

Os vetores virais de Herpes simplex (HSV) são vírus envelopados de cadeia dupla de DNA, com boa capacidade em transportar transgenes de elevado peso molecular. São neurotrópicos e conseguem infetar eficazmente neurónios e células da glia. O seu DNA viral é depositado na forma episomal, e por isso o risco de mutagénese por inserção é diminuído, já que não é integrado no genoma. No entanto, problemas relacionados com a expressão latente e imunogenicidade limitam a sua utilização^{2,21,30}.

Os vetores virais de Adenovírus (Ad) são vírus nus, de cadeia dupla de DNA, também com grande capacidade em transportar transgenes e de infetar muitos tipos celulares. As suas principais limitações são as respostas imunológicas, decorrentes da antigenicidade das proteínas virais, tendo-se mesmo verificado a morte de um doente por esta razão, tal como descrito atrás. Por isso, as suas principais aplicações no SNC tiram partido da sua alta antigenicidade e debruçam-se no tratamento de tumores cerebrais^{2,21,30}.

Os vetores virais de retrovírus, primariamente derivados do Vírus da Leucemia Murina de Moloney (MoMLV), estão entre os primeiros vírus a serem utilizados em terapia génica humana. São vírus envelopados de cadeia simples de RNA, o qual sofre transcrição reversa em DNA de cadeia dupla, e é integrado aleatoriamente no genoma da célula hospedeira. De facto, os retrovírus apresentam duas grandes desvantagens: i) estão limitados pela sua capacidade de transferência de genes apenas para células em divisão; ii) genotoxicidade e risco de mutagénese por inserção, derivado da integração no genoma da célula hospedeira, aumentando a expressão de proto-oncogenes ou a inativação de anti-oncogenes, tal como aconteceu nas crianças que sofreram leucemia após o término do tratamento de X-SCID, devido à ativação do oncogene LMO2.

Embora os vetores retrovirais tenham sido particularmente bem-sucedidos em ensaios clínicos de terapia génica humana, pelo menos do ponto de vista terapêutico, são inadequados para a modificação genética de células altamente diferenciadas e indivisíveis, como os

neurónios^{2,10,21,30}. Já os vetores Lentivirais (LV) são capazes de fazer a integração do seu material genético no genoma de células que não se dividem. Derivados do HIV-1, apresentam uma expressão de longo prazo em vários tipos celulares, sem serem tóxicos ou imunogénicos^{2,10}, e ainda possuem a vantagem de terem uma capacidade de empacotamento maior. Estes vetores desempenham um papel cada vez mais significativo na terapia génica dirigida ao SNC, mas continua a existir o risco de mutagénese por inserção associada à integração natural no genoma da célula hospedeira, de tal forma que os vetores modernos têm sido modificados no sentido de eliminar esta característica³². Os vetores baseados em retrovírus têm sido úteis em muitas áreas de investigação biomédica, mas as limitações apresentadas anteriormente diminuíram a sua utilização na prática clínica¹⁰.

Os vetores de Vírus Adeno-Associados (AAVs) são relativamente recentes e rapidamente emergiram como um dos mais importantes para a terapia génica de doenças neurológicas. Devido à sua segurança, natureza não-patogénica, e capacidade em transduzir eficazmente neurónios *in vivo*, são atualmente os vetores virais mais utilizados em ensaios clínicos do SNC. De facto, como será descrito mais à frente, aproximam-se de um vetor ideal para terapia génica no SNC. São vírus nus de cadeia simples de DNA, e apresentam tropismo serotipo-dependente, dependendo da interação com recetores específicos em células alvo. Como será detalhado mais à frente, os serotipos 1, 2, 5, 8, 9 e rhesus (rh).10 são os mais estudados para aplicações no SNC^{12,21}. O vetor AAV9 tem inclusive a capacidade de atravessar a BHE, tornando-os vetores atrativos para a terapia de doenças neurodegenerativas^{34,12,35}. Os AAVs podem desencadear respostas imunes inatas ou adaptativas contra o vetor ou contra o transgene, mas tem sido observada pouca toxicidade com o uso de vetores AAV no cérebro ou outros tecidos²¹. Em humanos, a imunidade preexistente é mais prevalente contra os serotipos 2 e 5 do AAV, mas a prevalência significativamente menor de serotipos como o AAVrh.10, apoia o seu uso em ensaios clínicos. A intensidade da resposta imune depende do tecido alvo e da dose de vetor que é administrada¹².

Os vexossomas (vetor + exossoma), vetores virais híbridos compreendendo AAV associados a microvesículas extracelulares, mostraram ser ainda mais eficazes na evasão aos anticorpos anti-AAV *in vivo*, e eficiência de transdução equiparável aos vetores convencionais AAV9, em ensaios não-clínicos³⁶.

Embora nenhum dos vetores atuais seja perfeito, os AAV surgiram como os vetores de escolha para a terapia génica do SNC^{2,27,29}, e em especial das doenças neurodegenerativas¹² uma vez que apresentam vantagens significativas relativamente aos demais, como uma expressão estável e de longa duração no SNC e ausência de toxicidade, embora apresentem

uma capacidade de empacotamento limitada quando comparados com os Ad ou os HSV ³⁰. Esta família de vírus será alvo de maior detalhe mais à frente.

Os métodos de transferência génica não virais são divididos em dois grupos: métodos físicos e métodos químicos. Nos métodos físicos, o transgene, que normalmente consiste num plasmídeo simples de DNA, é introduzido de forma mecânica na célula, geralmente por microinjeção direta ou por electroporação. A microinjeção direta, consiste na introdução direta do material genético, enquanto que a electroporação consiste na aplicação de pulsos elétricos alternados às células em solução com o material genético. A corrente gerada abre temporariamente poros na superfície celular permitindo a entrada do material genético. Nos métodos químicos, são utilizados compostos químicos que garantem a entrada do material genético nas células e protegem-no da degradação intracelular. Normalmente, o transgene está complexado com lípidos catiónicos ou polímeros que têm a capacidade de interagir com as cargas negativas dos grupos fosfato do DNA, formando complexos que entram nas células por endocitose. Alguns compostos químicos utilizados para este efeito são a polietilenimina, a polilisinina, entre outros.

Os métodos de transferência génica não virais são considerados uma opção promissora devido aos seus métodos de produção simples e custo-efetivos, bem como ao seu perfil de segurança ^{27,37}. No entanto, têm um efeito localizado e requerem uma dose terapêutica maior que os vetores virais, conferindo apenas uma expressão génica transitória. Desta forma, exigem administrações repetidas que aumenta o risco de desencadear uma resposta imunitária. Por estas razões, a utilização dos vetores não virais normalmente não é suficiente para o tratamento de doenças neurodegenerativas crónicas ^{27,29,38}.

3.1.3. Otimização da via de administração

O cérebro é um órgão bastante complexo, onde existem, principalmente, quatro tipos celulares que devem ser considerados. Os primeiros são os neurónios, células pós-mitóticas que podem ser distinguidos pela morfologia individual e pelo neurotransmissor. Têm funções distintas baseadas não apenas no fenótipo, mas também no local e conectividade. De seguida, podem ser distinguidos três tipos celulares de células da glia: os astrócitos, que têm um papel fundamental na manutenção do ambiente extracelular, e estão distribuídos por todas as regiões do SNC; os oligodendrócitos, que formam a bainha de mielina em torno dos axónios, essencial para a condução rápida de impulsos nervosos; e as células microgliais, que representam os macrófagos do tecido cerebral. Embora as células gliais sejam relativamente quiescentes no cérebro adulto, são capazes de entrar na divisão celular em resposta a estímulos específicos. Os vasos sanguíneos que percorrem o parênquima do SNC são

revestidos por *tight junctions* entre células endoteliais adjacentes, criando uma barreira hematoencefálica (BHE), designada para prevenir a entrada de vírus e outros compostos no cérebro ^{2,39}.

Aliada à complexidade do SNC, estão outras características que fazem com que as doenças neurológicas estejam entre as patologias mais difíceis de tratar ³³. De facto, a natureza compartimental do cérebro; o acesso limitado pelo crânio; a sensibilidade a alterações volumétricas (minimizando o tamanho das inoculações); o facto das células e dos tecidos alvo serem responsáveis por funções vitais; e a presença de uma BHE especializada, representam desafios únicos à realização de terapia génica no SNC ^{2,30}.

Neste sentido, torna-se essencial escolher a melhor via de administração. Para isso, existem duas abordagens diferentes de terapia génica do SNC que podem ser utilizadas (Anexo VIII, Figura 22). Embora os vetores lentivirais (LV) sejam preferencialmente usados em abordagens *ex vivo*, os vetores rAAVs surgem como os principais vetores virais para transferência de genes *in vivo* ²¹.

3.1.3.1. Administração *in vivo* de vetores virais recombinantes

Na injeção intraparenquimatosa direta no parênquima cerebral afetado pela doença, através de injeções estereotáticas neurocirúrgicas ¹², o vetor, ou outra forma de DNA, é capturado pelas células apenas no local de injeção, contornando a barreira hematoencefálica (BHE) mas apresentando uma distribuição limitada (1-3 mm), com consequente expressão do transgene limitada ao local de injeção. Ainda assim, a distribuição dos vetores para outras regiões do cérebro pode ser mediada pelo transporte anterógrado ou retrógrado dos neurónios ³⁰. Esta estratégia permite uma transferência direta e simples do transgene para a célula alvo ³², por isso, é ideal para doenças envolvendo uma região cerebral restrita, como a doença de Parkinson, mas não é aplicável para muitas doenças neurodegenerativas que afetam grandes regiões do SNC, como a doença de Alzheimer ^{27,36}. Além disso, cada injeção requer craniotomia e anestesia geral, estando associado o risco de hemorragia e contaminação por patogéneos ^{21,27}. Não obstante, a genotoxicidade relacionada com o vetor ³², e a possibilidade de que vírus que integram no genoma, de causarem mutações malignas no genoma do hospedeiro, devem ser consideradas. A inflamação e a resposta imune também são particularmente preocupantes, mesmo num órgão "imunoprivilegiado" como o cérebro ².

Desta forma, a via de administração ideal seria não invasiva e que possibilitasse uma grande distribuição vetorial no SNC. Neste sentido, uma solução seria a infusão dos vetores no líquido cefalorraquidiano (LCR). Isso pode ser feito através de administração intracerebroventricular (ICV), ou intra-cisterna magna (ICM) ou ainda injeções intratecais

lombares (IT), sendo este último o menos invasivo e, conseqüentemente, o mais atrativo para aplicações clínicas ²⁷. Apesar de serem estratégias mais seguras que a injeção intraparenquimatosa, requerem maiores quantidades de vetor, podendo estar associadas ao aumento de efeitos *off-target* e conseqüente transdução e expressão tecidual em órgãos periféricos, como no fígado ³⁶.

A injeção intramuscular é considerada uma abordagem adequada para o tratamento de doenças dos neurónios motores. De facto, alguns vetores rAAV podem ser absorvidos por terminais nervosos e sofrer um transporte retrógrado para os neurónios motores da espinhal-medula ^{27,29,30}.

Por fim, a via intravascular (IV) também é uma alternativa promissora, sendo geralmente dividida em vias intra-arteriais (por exemplo, intracarótidas ou intrafemorais) e endovenosas. Embora a administração intravascular seja a via menos invasiva, é inteiramente dependente da capacidade do vetor em atravessar a BHE ²⁷. Esta restringe o movimento de macromoléculas, onde se incluem os vetores, do sangue para o SNC, e por isso, desenvolveram-se métodos de contornar essa barreira de forma a aumentar a expressão dos transgenes no cérebro, após uma administração intravascular. A permeabilização temporária da BHE através de rutura osmótica com manitol hiperosmótico parece ser uma abordagem com potencial, já que tem sido usada para reduzir o inchaço cerebral após lesão traumática. No entanto, gera um influxo acrescido de moléculas para o cérebro, e apresenta alguns efeitos adversos como alteração da pressão arterial e desequilíbrio eletrolítico. Embora a administração IV seja considerada como uma técnica bastante versátil, com aplicações importantes em várias doenças do SNC, também engloba algumas desvantagens: i) exposição a anticorpos circulantes; ii) risco de efeitos adversos *off-target* e toxicidade celular; iii) necessidade de administrar uma maior dose para alcançar a dose terapêutica no tecido alvo, já que poucos vetores atingem o SNC ^{27,29} (Anexo IX, Figura 23).

Estudos indicam que a administração intraparenquimatosa é mais bem tolerada que a injeção intratecal ou intravenosa, uma vez que o tecido cerebral, como já referi, é relativamente imunoprivilegiado e a via intraparenquimatosa não requer a administração de doses altas. No entanto, surgiram novos protocolos *in vivo* usando administrações intratecais que demonstraram grande eficiência em estudos pré-clínicos. Um exemplo desta aplicação é um estudo para a doença de Batten que está em curso, e tem por base a entrega de AAV9-CLN6 (ensaio clínico NTC02725580)⁴⁰. A injeção sistémica, teoricamente a mais fácil e segura, anteriormente limitada pela incapacidade dos vetores em atravessarem a BHE, começa agora também a ser uma boa alternativa, já que foram descobertos alguns serotipos de AAV capazes de ultrapassarem a barreira. Embora a administração intravenosa de vetores seja associada a

questões relacionadas com a resposta imunitária, expressão *off-target* e limitações técnicas (necessidade de quantidade elevada de vetores a serem administrados), não deixa de ser um passo importante no campo das aplicações de terapia génica do SNC ¹².

A técnica *in vivo*, apesar de ter a vantagem de ser mais simples, apresenta algumas desvantagens, como o menor grau de controlo de transferência genética, a menor eficiência global e a dificuldade de atingir um grau alto de especificidade tecidual ⁷.

3.1.3.2. Terapia génica *ex vivo* para doenças do SNC

Esta abordagem baseia-se na manipulação genética de células estaminais hematopoiéticas (HSCs) previamente purificadas, colhidas do sangue ou da medula óssea. Recorrem-se principalmente aos vetores Lentivirais (LV) para a realização da transdução *in vitro*, e de seguida, realiza-se o transplante autólogo das células transduzidas. O objetivo desta abordagem é utilizar as células da microglia como uma fábrica celular capaz de expressar e distribuir proteínas terapêuticas, fatores tróficos ou quimiocinas, pelo cérebro ¹². A principal vantagem da terapia génica *ex vivo* é que a expressão do gene e a viabilidade das células transduzidas pode ser verificada antes de se introduzirem no doente. Para além do mais, este método pode ser útil para terapias em que os compostos devem ser expressos por tipos celulares específicos que podem ser selecionados na cultura antes do transplante. Os principais inconvenientes incluem a escassa disponibilidade de células aptas para transplante, baixas taxas de sobrevivência de células transduzidas, possível necessidade de imunossupressão, tempo consumindo e complexidade do processo de preparação das células ². Trata-se de uma estratégia que foi inicialmente projetada para tratar doenças neurológicas cujas causas primárias fossem defeitos da microglia, como a adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X (X-ALD). No entanto, pode ser também utilizada noutras situações, em que a microglia esteja a funcionar normalmente, e se pretende que secrete proteínas terapêuticas para células vizinhas, com vista a proceder às suas correções ¹².

3.2. Vírus Adeno-Associados (AAVs)

3.2.1. Características gerais dos AAVs

Descobertos em 1965 como contaminantes das preparações de adenovírus, são vírus nus de cadeia simples de DNA. O seu genoma de 4700 pares de bases, compreende dois ORF's (*open reading frames*), *rep* (de *replication*) e *cap* (de *cápside*), compreendidos entre duas ITR's (*inverted terminal repeats*), nas extremidades 5' e 3'. Não codifica polimerases, e por isso utiliza as polimerases celulares para a replicação. O ORF *rep* codifica quatro proteínas,

nomeadas com base no seu peso molecular: Rep 40, 52, 68 e 78. As proteínas, geradas a partir de transcritos processados e não processados, são controladas pelo promotor P5 (Rep68 e Rep78) e pelo promotor P19 (Rep 40 e Rep 52). Estas proteínas Rep são necessárias para a replicação, transcrição, e encapsidação do AAV. Por outro lado, o ORF cap é responsável pela produção das três proteínas estruturais (VP1, VP2 e VP3) e da proteína de ativação AAP. As primeiras agrupam-se numa proporção de 1:1:10 para produzirem a cápside icosaédrica, de aproximadamente 25 nm de diâmetro, e a proteína AAP coopera com elas, contribuindo para a montagem da cápside. O promotor P40 é responsável pela iniciação da transcrição do gene cap^{27,34} (Anexo X, Figura 24).

Os AAV2 foram os AAV de primeira geração, utilizados em estudos pré-clínicos iniciais. Com os anos, passaram do estado conceitual para ensaios clínicos em diversas doenças hereditárias e adquiridas, como a doença de Alzheimer³⁶. Desde então, foram isolados doze serotipos naturais de AAV de humanos e de outros primatas. Os diferentes serotipos de AAV são definidos pelas proteínas da cápside e pelos anticorpos neutralizantes distintos identificados. Para além da antigenicidade, os serotipos de AAV apresentam propriedades características relativamente às interações entre as regiões expostas da cápside e o recetor celular, contribuindo para o seu tropismo preferencial⁴¹. Por exemplo, os AAV 8 e 9 são considerados os serotipos ideais para atingir o fígado, enquanto os AAV 5 e 9 são os mais adequados para a transdução pulmonar. No caso do SNC, os serotipos preferenciais são os AAV 1, 2, 5, 8, 9 e rh10^{27,36}. A grande maioria dos serotipos apresenta tropismo para os neurónios, quase exclusivamente, mas o AAV1 e o AAV5 conseguem transduzir eficientemente os neurónios e as células da glia. O AAV9, particularmente, apresenta uma grande distribuição vetorial pelo SNC, uma vez que consegue incorporar no transporte axonal, pelas vias retrógrada e anterógrada, transduzindo subpopulações neuronais em locais distantes. O AAV9 foi o primeiro serotipo de AAV que demonstrou capacidade em atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) sem intervenção farmacológica²¹. É também o serotipo que apresenta maior eficiência de transdução no SNC²⁷.

3.2.2. Utilização de rAAVs na terapia génica do SNC

A simplicidade do genoma do tipo selvagem de AAV facilita o *design* de vírus adeno-associados recombinantes (rAAVs) como vetores de terapia génica. O processo de produção de rAAV geralmente envolve uma tripla transfeção de células HEK0293 com: 1) o vetor de transferência, contendo uma cassette de expressão entre duas sequências ITR, e compreende um promotor, o transgene e uma poliadenilação (PolyA), que termina a transcrição. A replicação e o empacotamento do genoma do vetor durante a produção dos rAAV são

regulados apenas pelos elementos ITR, por isso nenhuma região codificadora do AAV está presente nesses vetores recombinantes; 2) o plasmídeo *helper*, contendo as regiões adenovirais E1, E2, E3 e VA, que contribuem para a replicação do genoma; 3) o pAAV-RC, um plasmídeo contendo os genes *rep* e *cap* que medeiam a replicação do genoma e a montagem da cápside, respetivamente. Nesse processo, o genoma é empacotado numa cápside de AAV, levando a um vetor de rAAV com uma capacidade total de empacotamento de aproximadamente 5 kb, que é subsequentemente purificado e usado em terapia génica ²⁷ (Anexo X, Figura 25).

Uma vez que os rAAVs não possuem qualquer sequência codificadora viral, as células alvo não produzirão nenhum produto viral ²⁷, e por isso, os rAAVs não apresentam patogenicidade ²⁷.

3.2.3. Vantagens e limitações dos rAAVs

Muitas das propriedades dos rAAVs encaixam-se nos requisitos de um “vetor ideal”, demonstrando o porquê destes vetores serem, atualmente, os mais utilizados em estudos pré-clínicos e clínicos do SNC. De facto, os AAVs transduzem tanto células mitóticas como pós-mitóticas, e a maioria dos serotipos de AAV apresenta tropismo neuronal, sendo que alguns também são capazes de transduzir outros tipos de células do SNC, como os astrócitos. Outra vantagem é a expressão estável do transgene no SNC (cerca de 10 anos no cérebro humano). Esta expressão génica persistente em células que não se dividem explica o porquê dos rAAVs serem adequados para a terapia génica de doenças do SNC, uma vez que são doenças geralmente crónicas, e a maioria das células não se encontra em divisão. Além disso, como os AAV não são patogénicos, não são observados efeitos adversos significativos. Para além do mais, a infeção por rAAV resulta principalmente na expressão episomal do transgene, diminuindo o risco de mutagénese por inserção. Finalmente, os rAAVs são fabricados e purificados por métodos eficientes e escaláveis, fornecendo boas perspetivas para investigações e aplicações clínicas futuras ^{21,27}.

Os rAAVs também apresentam algumas limitações. Uma delas diz respeito ao atraso na expressão do transgene (cerca de 2 semanas para a expressão máxima) quando comparada com outros vetores, uma vez que necessita da síntese de uma segunda cadeia. Os vetores AAV auto-complementares (scAAV), um subgrupo dos rAAVs, superam esta limitação, pois transportam genomas de cadeia dupla de DNA, e tornam-se imediatamente ativos para transcrição após a descapsidação no núcleo. A natureza de cadeia dupla dos vetores scAAV significa, no entanto, que a capacidade em transportar o transgene é reduzida para cerca de 2,2 kb, aproximadamente metade dos vetores AAV de cadeia simples. Isto impõe novas

limitações aos tamanhos do promotor e aos produtos que podem ser expressos a partir desses vetores. Ainda assim, é possível conseguir efeitos terapêuticos notáveis dentro da restrição de 2,2 kb, selecionando para isso pequenos transgenes, pequenos promotores potentes e moléculas de interferência de RNA (iRNA), por exemplo. Curiosamente, a investigação em AAVs foi responsável por diversos avanços no ramo da terapia génica, particularmente no silenciamento génico com recurso ao iRNA, uma das principais estratégias terapêuticas ^{21,27}.

3.2.4. Transferência não-invasiva de genes para o SNC

Apesar das vantagens da administração sistémica de rAAVs, este método tem sido dificultado pelo facto da maioria dos serotipos não conseguir ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE). De facto, a administração IV não induz uma transdução eficiente no SNC para a maioria dos serotipos conhecidos, e consequentemente esta via de administração requer frequentemente estratégias farmacológicas (por exemplo, infusão de manitol) ou físicas para romper a barreira ²⁷. Como já referi acima, estas estratégias podem induzir efeitos adversos.

No entanto, com a descoberta de um serotipo particular, o AAV9, que tem a capacidade natural de ultrapassar o BHE, expandiram-se as aplicações da administração IV de rAAVs em terapia genética do SNC. O mecanismo pelo qual o AAV9 atravessa a BHE ainda é desconhecido, mas estudos demonstram que a coadministração com manitol não aumenta significativamente a transdução do AAV9 no SNC, o que sugere que o vetor não atravessa passivamente através das *tight-junctions* entre as células endoteliais, mas sim por transporte ativo ²⁷. No entanto, os custos de fabrico para fornecer rAAV9 em quantidade suficiente para uma administração intravenosa em humanos são significativos, o que restringe ainda a sua aplicação ²⁹ (Anexo X, Figura 26).

De acordo com estudos recentes em animais, a propriedade de atravessar a BHE não é restrita ao AAV9, pelo que outros serotipos também mostraram transdução no SNC após injeção sistémica. De facto, os serotipos rAAVrh.10, rAAVrh.8, rAAVrh.39, rAAVrh.43, rAAV7 e rAAV8 são também considerados como vetores candidatos para uma transferência não-invasiva de genes para o SNC ^{27,36}. O rAAV9 continua a ser o vetor mais estudado para a administração IV, uma vez que este serotipo apresentou o melhor desempenho em vários estudos realizados em animais, mostrando uma expressão transgénica elevada e uma transdução disseminada em todo o SNC ²⁷. O primeiro ensaio clínico a utilizar um vetor rAAV9 administrado por via intratecal, cujo objetivo é a transferência do gene *gigaxonina*

(GAN) no tratamento da Neuropatia Axonal Gigante (GAN), iniciou em fevereiro de 2015 nos EUA. A 29 de março de 2018 começou a recrutar doentes ⁴².

3.3. Terapia génica na Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva relacionada com a idade avançada, caracterizada por problemas de memória, pensamento e comportamento. A grande maioria dos doentes sofre da forma esporádica da doença, mas numerosos genes (polimorfismos genéticos específicos no gene da APP, ou num dos dois genes da presenilina (PS1 ou PS2) responsáveis pela clivagem da APP ⁴¹), e fatores de risco (lesão cerebral traumática, diabetes, acidente vascular cerebral (AVC) e hipertensão), foram também identificados ao longo dos anos como predisponentes ²¹. As marcas neuropatológicas da DA incluem a acumulação do peptídeo β -amiloide ($A\beta$) sob a forma de placas extracelulares, produzidas a partir do metabolismo da proteína precursora amiloide (APP), e a acumulação intracelular da proteína tau, uma proteína de montagem dos microtúbulos que se apresenta anormalmente fosforilada, formando emaranhados neurofibrilares (NFTs). A presença de placas $A\beta$ e de NFTs de tau são necessárias para o diagnóstico da DA, e geralmente estão associadas a um nível elevado de citocinas inflamatórias como o $TNF\alpha$, desregulação da homeostase do cálcio, diminuição de sinapses, disfunção neuronal e morte de neurónios (especialmente os neurónios colinérgicos) ²¹.

A doença inicia-se no córtex entorrinal e espalha-se para sub-regiões do hipocampo e áreas corticais, levando à degeneração sináptica e comprometimento cognitivo progressivo ^{32,34}. Apesar de ser a doença neurodegenerativa mais prevalente em todo o mundo, ainda não existem tratamentos eficazes que a retardem ou previnam. Embora os mecanismos precisos da degeneração sejam desconhecidos, acredita-se que a perda de neurónios colinérgicos e a excitotoxicidade contribuam para o desenvolvimento da DA. Consequentemente, para a doença leve a moderada, o tratamento atual inclui inibidores de colinesterase (donepezilo, rivastigmina e galantamina), e para os casos mais graves da doença utiliza-se um antagonista não-competitivo do recetor de NMDA (memantina). No entanto, nenhum destes fármacos diminuiu ou previne a progressão da doença, e apenas proporcionam uma melhoria sintomática temporária ^{29,41}. Neste sentido, o tratamento por terapia génica surge como uma alternativa potencial ^{29,32,34}.

As múltiplas etiologias desta doença dificultam a identificação de um alvo terapêutico, mas as abordagens mais comuns passam por diminuir os níveis dos peptídeos $A\beta$ e / ou a prevenção da fosforilação e agregação anormal da tau ²¹.

3.3.1. Terapia génica baseada na “hipótese amiloide”

Estratégias para reduzir a acumulação de placas amiloides pelo aumento de proteases degradadoras, como a neprilisina (NEP)⁴³⁻⁴⁵, ou pela utilização de anticorpos anti-A β ⁴⁶, com vista a obtenção de uma imunização passiva, nas regiões corticohipocampais de modelos animais, utilizando vetores rAAV, mostraram diminuir as placas amiloides no córtex e no hipocampo destes animais, sem sinais de neurotoxicidade^{21,34}.

A clivagem da proteína APP também foi alvo de investigação. De facto, recorreu-se à transferência genética de siRNA específico para a β -secretase, e de shRNA capaz de realizar *knock-down* ao recetor acoplado à proteína G que regula a γ -secretase, a primeira e segunda enzima, respetivamente, que controlam a proteólise da APP⁴⁷. A utilização de uma proteína chaperona que se liga à APP, e previne a acumulação de placas amiloides no hipocampo, foi também tentado, tendo demonstrado um melhoramento nos deficits cognitivos em modelos animais^{21,48}. Devido à complexidade dos mecanismos moleculares subjacentes às alterações neuropatológicas da DA, surgiram outras abordagens alternativas^{21,49,50}.

3.3.2. Terapia génica com APOE

Tendo por base estudos de risco genético, verificou-se que indivíduos que herdaram o raro alelo $\epsilon 2$ da apolipoproteína E (APOE) têm um risco acentuadamente reduzido de desenvolver DA em cerca de 50%. A expressão desta isoforma específica da APOE em cérebros de modelos animais, após a infusão ICV de um vetor rAAV4, reduziu a formação de placas amiloides e a perda de sinapses^{21,51}.

3.3.3. Terapia génica com ACAT

Estudos recentes indicam que o silenciamento da expressão da acil-CoA:colesterol aciltransferase (ACAT), uma enzima importante que regula não só o metabolismo lipídico, como também o processamento da APP, recorrendo a um vetor carregado com um miRNA, permitiu aliviar a patologia amiloide e da tau, em modelos animais^{21,52}.

3.3.4. Terapia génica com CYP46A1

O metabolismo alterado do colesterol desempenha também um papel crucial na formação das placas amiloides. De facto, a forma de colesterol cerebral capaz de passar a BHE é o 24-hidroxicolesterol, gerado pela enzima neuronal colesterol 24-hidroxilase (CYP46A1). A expressão aumentada desta enzima através da administração no cérebro utilizando um vetor

rAAV carregado com o CYP46A1, em modelos animais, reduziu o número de placas amiloides e melhorou a memória, sugerindo que o CYP46A1 é um alvo relevante para a DA ^{34,53,54}.

3.3.5. Terapia génica com citocinas anti-inflamatórias

Estudos indicam que a administração mediada por rAAVs de genes codificantes de citocinas pode neutralizar os processos inflamatórios envolvidos na progressão da doença. As citocinas anti-inflamatórias têm um papel fundamental como neurotransmissores, neuromoduladores e neurohormonas no cérebro. A entrega mediada por rAAV2 de genes codificantes das citocinas interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10) no hipocampo, em ensaios não clínicos, resultou nas suas expressões sustentadas, redução da astro-/microgliose, oligomerização e deposição de A β , e melhoramento da neurogénese ^{32,34,50,55,56}.

3.3.6. Terapia génica com recurso à via não amiloidogénica do metabolismo da APP

A via não amiloidogénica do metabolismo da APP impede a produção de formas amiloides tóxicas, e possibilita a formação de APPs α solúveis, as quais são responsáveis pelas funções fisiológicas importantes da APP. A diminuição das APPs α neuroprotetoras contribui para o desenvolvimento da DA. De facto, os níveis de APPs α estão diminuídos no LCR de pacientes com DA, estando correlacionado com a falta de memória. As APPs α inibem inclusive a fosforilação da proteína tau. O aumento da via fisiológica da APP é, portanto, uma estratégia interessante para tratar a DA, e a expressão aumentada das APPs α poderia aliviar os sintomas característicos da doença ^{34,50,57,58}.

3.3.7. Terapia génica com FKBP1b

A idade avançada e os processos normais de envelhecimento do cérebro (entre eles a desregulação de Ca²⁺) são fatores de risco para o desenvolvimento de neurodegeneração e DA. De facto, estudos indicam que uma concentração intracelular elevada de Ca²⁺ induz a deterioração eletrofisiológica dos neurónios. Com recurso a *microarrays*, verificou-se que doentes com DA apresentam uma expressão génica menor de FKBP1b, que codifica a *FK506 binding protein 1b* implicada na estabilização da libertação de Ca²⁺ do retículo endoplasmático dos neurónios ⁵⁹.

Neste sentido, se apoiados por estudos adicionais, uma abordagem terapêutica para a terapia génica da DA inclui a utilização de um vetor rAAV carregado com o gene FKBP1b,

para que a elevação da sua expressão possa ser uma abordagem viável, capaz de modificar o curso do envelhecimento cerebral prejudicial, e possivelmente, o estágio inicial da DA ^{21,59}.

3.3.8. Terapia génica com fatores neurotróficos de crescimento

Até à data, os únicos ensaios clínicos para a DA utilizando terapia génica, foram baseados na administração intracerebral de vetores rAAV2 carregados com NGF (fator neurotrófico neuronal) ¹². De facto, os fatores neurotróficos de crescimento, como o NGF ou o fator neurotrófico de crescimento derivado do cérebro (BDNF), são moléculas capazes de reparar e restaurar a função dos neurónios colinérgicos ⁶⁰, essenciais para o seu crescimento e sobrevivência ¹¹. Os resultados destes ensaios indicam que os fatores neurotróficos de crescimento são boas estratégias neuroprotetoras, mas necessitam de elevada especificidade de transdução de modo a atingir as áreas cerebrais afetadas, já que podem causar efeitos adversos *off-target* ^{34,61,62}. Atualmente, encontra-se a decorrer um ensaio clínico de fase II deste género, envolvendo a administração de AAV2-NGF (CERE-110) a 49 doentes com DA leve a moderada, tendo demonstrado na fase I que o AAV2-NGF é seguro e bem tolerado até 2 anos após a injeção, mantendo a bioatividade nas células transduzidas ⁶⁰. Poucos efeitos adversos foram reportados até ao momento, e nenhum esteve relacionado com o vetor utilizado ^{32,34,50,63}.

Tabela III: Estado atual do ensaio clínico de terapia genética para a Doença de Alzheimer

Tipo de Vetor	Doença	Vírus (serotipo)	Gene Alvo	Fase	Número do Ensaio Clínico
Vetor viral	Doença de Alzheimer	AAV2	NGF/CERE-110	Fase II	NCT00876863 (Fase II) NCT00087789 (Fase I)

Todas as abordagens atrás descritas melhoraram as expectativas para futuras aplicações clínicas em doentes humanos ³⁴. À medida que o nosso conhecimento sobre os mecanismos da doença continua a crescer e novas terapias são desenvolvidas, a terapia génica deve continuar a ser considerada como uma abordagem viável para intervenções terapêuticas na DA ⁴¹. No entanto, o principal obstáculo da terapia génica para DA é a difusão do material terapêutico pelas lesões cerebrais. Como referi, a doença afeta várias sub-regiões anatómicas do cérebro, envolvidas na aprendizagem e na memória, pelo que as estratégias de terapia génica baseadas em rAAVs devem, portanto, contar com protocolos neurocirúrgicos seguros capazes de assegurar a especificidade dos serotipos de AAV em atingir as regiões afetadas. Do

mesmo modo, o desenvolvimento de vetores rAAVs modificados capazes de atravessar eficientemente o BHE deve melhorar estas estratégias no futuro ³⁴. Ainda assim, importa destacar o papel dos vetores rAAVs como uma ferramenta útil para o fornecimento de genes para o SNC ³².

4. Questões éticas e de segurança subjacentes à Terapia Molecular

A terapia molecular é uma modalidade terapêutica inovadora e intrigante, e acredito que, brevemente, irá fazer parte da prática clínica de rotina para uma variedade de doenças diferentes. Indiscutivelmente levanta muitas questões, tanto éticas como de segurança, devido à incerteza e ao receio em relação à própria terapia, e às suas possíveis consequências. Neste sentido, os aspetos técnicos envolvidos (estabilidade e qualidade da expressão transgénica), os riscos que o doente enfrenta, e o receio sobre a engenharia genética, são algumas das principais razões pelas quais os ensaios clínicos de terapia génica humana têm sido difíceis de realizar ¹⁶.

Em termos de segurança, um dos principais argumentos contra a terapia génica humana é o risco de alterações genéticas descontroladas produzidas num indivíduo, que seriam transmitidas à descendência. De facto, um ponto importante sobre a terapia génica é o tipo celular alvo. Na terapia génica de linhagem germinativa, as células germinativas são modificadas pela introdução de genes terapêuticos, que são integrados no genoma. As alterações são hereditárias e passam para as gerações subsequentes. Em teoria, esta técnica é altamente eficaz na luta contra doenças genéticas hereditárias. Já a terapia génica de células somáticas ocorre quando os genes terapêuticos são transferidos para células somáticas de um doente. Qualquer modificação e quaisquer efeitos são restritos somente ao doente e não são herdados pelas gerações futuras ^{16,64}. A Legislação Portuguesa apenas permite este segundo tipo de terapia génica ⁶⁵.

Do mesmo modo, existem preocupações éticas e sociais em relação à utilização de produtos de terapia génica no tratamento de doenças humanas. Vivemos num mundo global, e é importante que reconheçamos e valorizemos as diferenças entre os seres humanos relativamente às suas crenças e preocupações, quando nos referimos à terapia génica. Acredito que a transparência é fundamental para a aceitação desta forma de terapia, e toda a informação e conhecimento deve ser sempre facilmente acessível e fornecida ¹⁶.

5. Conclusão

O conhecimento adquirido nas últimas décadas confere boas expectativas para uma aplicação mais recorrente da terapia molecular no futuro ⁶⁶, especialmente no âmbito do tratamento das doenças neurodegenerativas. Ainda que os principais avanços, até ao

momento, tenham sido noutras áreas, como certos tipos de cancro e síndromes de imunodeficiência combinada severa ¹⁸, os resultados obtidos nos ensaios clínicos de fase I/II para as doenças do SNC, e em especial para a Doença de Alzheimer, apoiam a praticabilidade e a eficácia da terapia génica baseada nos vetores rAAVs.

Uma área significativa que também se encontra em desenvolvimento é a identificação de novos genes terapêuticos, sendo necessário, para isso, ter uma melhor compreensão da etiologia das doenças neurodegenerativas. Neste sentido, um objetivo último da terapia génica seria identificar um transgene que pudesse modificar o “relógio biológico” e retardar o processo de envelhecimento, que como se sabe, está implicado no aumento da vulnerabilidade a muitas patologias, entre elas as doenças neurodegenerativas ¹¹. Do mesmo modo, a identificação e validação de biomarcadores destas doenças, permitirá um diagnóstico mais precoce antes que as células-alvo sejam perdidas, e ainda uma monitorização da progressão da doença. Aliás, estudos indicam que a iniciação da terapia mesmo antes do início do aparecimento significativo dos sintomas, provavelmente terá um enorme impacto na eficácia dessas terapias ²⁹.

A combinação desses avanços ajudará a trazer novas terapias moleculares para a prática clínica, capazes de melhorar o tratamento destas doenças devastadoras. No entanto, existem alguns obstáculos que precisam ainda de ser superados de modo a demonstrar efetivamente benefícios significativos da aplicação desta terapia em doentes humanos. Tais obstáculos incluem a capacidade de direcionar/restringir a expressão em certos tipos celulares específicos do SNC, melhorar a eficácia da distribuição vetorial de modo a obter uma expressão adequada do transgene a fim de alcançar o efeito terapêutico, e diminuir o risco de resposta imune que pode dificultar a eficácia do vetor. Se tal for superado, demonstra-se que a terapia génica pode proporcionar, num único tratamento, uma eficácia de longo prazo em doentes humanos que sofram de doenças severas, como é o caso da Doença de Alzheimer ¹². De facto, um sinal que demonstra a viabilidade da terapia génica como uma alternativa terapêutica num futuro próximo, é o crescente investimento das empresas de biotecnologia na investigação e desenvolvimento de medicamentos de terapia avançada.

A farmácia e a medicina moderna estão em constante evolução, e a comunidade científica observa diariamente novas descobertas que visam alterar paradigmas para o tratamento de doenças ainda incuráveis. A possibilidade de uma “one-time-cure” proporcionada pela terapia génica torna imperativo garantir que o procedimento funciona com a máxima eficácia, especialmente no caso das doenças neurodegenerativas, já que se trata de uma forma de terapia que envolve a modificação da impressão digital da vida ⁴.

6. Referências Bibliográficas

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Ageing and health**. (2018). [Acedido a 11 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>
2. MICHAEL KAPLITT, MATTHEW DURING - **Gene Therapy of the Central Nervous System: From Bench to Bedside**. Academic Press. (2006).
3. EU JOINT PROGRAMME – NEURODEGENERATIVE DISEASE RESEARCH - **O que é uma doença neurodegenerativa?** (2017). [Acedido a 11 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <http://www.neurodegenerationresearch.eu/pt-pt/sobre-a-jpnd/o-que-e-uma-doenca-neurodegenerativa/>
4. ODIBA, A. S., OTTAH, V. E., ANUNOBI, O. O., UKEGBU, C. Y., UROKO, R., OTTAH, C. U., EDEKE, A. A., OMEJE, K. - **Current strides in AAV-derived vectors and SIN channels further relieves the limitations of gene therapy**. Egyptian Journal of Medical Human Genetics 19, (2018) 69–75.
5. WIWANITKIT, V. - **Cell, Gene and Molecular Therapy: New Concepts**. (2009).
6. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. - **Advanced therapy medicinal products**. (2018). [Acedido a 27 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000294.jsp&mid=WCOB01ac05800241e0
7. AYALA, A., MUÑOZ, M., ARGÜELLES, S., ZURITA, F., CANO, M. - **Advanced therapy medicinal products: Gene therapy**. Pharmaceuticals Policy and Law. 17, (2015) 253–264.
8. **Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 (Annex I, Part IV)**.
9. **Directive (EC) No 1394/2007 of the European Parliament and of the Council of 13 November 2007 (Chapter I, Article 2)**.
10. ESCORS, D., BRECKPOT, K., ARCE, F., KOCHAN, G., STEPHENSON, H. - **Lentiviral Vectors and Gene Therapy**. (2012).
11. KRESINA, T. F. - **An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy. Molecular Biology**. (2001).
12. PIGUET, F., ALVES, S., CARTIER, N. - **Clinical Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases: Past, Present, and Future**. Human Gene Therapy. 28, (2017) 988–1003.
13. BRUNSTEIN, J. - **Gene therapy I: AAV as viral vector**. The Primer. (2018) 20–21.
14. TEMIN, H. M. - **Mixed infection with Two Types of Rous Sarcoma Virus**. Virology

- 13, (1961) 158–163.
15. TATUM, E. L. - **Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine.** Cellular Therapy and Transplantation. 1, (2009) 74–79.
 16. WIRTH, T., PARKER, N., YLÄ-HERTTUALA, S. - **History of gene therapy.** Gene 525, (2013) 162–169.
 17. GINN, S. L., ALEXANDER, I. E., EDELSTEIN, M. L., ABEDI, M. R., WIXON, J. - **Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update.** The Journal of Gene Medicine. 15, (2013) 65–77.
 18. LINDEN, R. - **Gene therapy: what it is, what it is not and what it will be.** Estudos Avançados 24, (2010) 31–69.
 19. CAVAZZANA-CALVO, M., HACEIN-BEY, S., DE SAINT BASILE, G., GROSS, F., YVON, E., NUSBAUM, P., SELZ, F., HUE, C., CERTAIN, S., CASANOVA, J. L., BOUSSO, P., LE DEIST, F., FISCHER, A. - **Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-XI Disease.** Science. 288, (2000) 669–672.
 20. EL OMARI, K., HOOSDALLY, S. J., TULADHAR, K., KARIA, D., VYAS, P., PATIENT, R., PORCHER, C., MANCINI, E. J. - **Structure of the leukemia oncogene LMO2: implications for the assembly of a hematopoietic transcription factor complex.** Blood. 117, (2011) 2146–2156.
 21. CHOUDHURY, S. R., HUDRY, E., MAGUIRE, C. A., SENA-ESTEVEZ, M., BREAKEFIELD, X. O., GRANDI, P. - **Viral vectors for therapy of neurologic diseases.** Neuropharmacology (2016).
 22. TOUCHOT, N., FLUME, M. - **Early Insights from Commercialization of Gene Therapies in Europe.** Genes. 8, (2017) 1–4.
 23. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. - **Human medicines - Kymriah.** (2018). [Acedido a 27 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/004090/smops/Positive/human_smop_001319.jsp&mid=Wc0b01ac058001d127
 24. NOVARTIS. - **Kymriah® (tisagenlecleucel), first-in-class CAR-T therapy from Novartis, receives second FDA approval to treat appropriate r/r patients with large B-cell lymphoma.** (2018). [Acedido a 27 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.novartis.com/news/media-releases/kymriahr-tisagenlecleucel-first-class-car-t-therapy-from-novartis-receives-second-fda-approval-treat-appropriate-rr-patients-large-b-cell-lymphoma>
 25. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. - **FDA approves first-of-its kind targeted RNA-based therapy to treat a rare disease.** (2018). [Acedido a 27 de agosto de

- 2018] Disponível na Internet: <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm616518.htm>
26. GINN, S. L., AMAYA, A. K., ALEXANDER, I. E., EDELSTEIN, M., ABEDI, M. R. - **Gene Therapy clinical trials worldwide to 2017 - An update**. The Journal of Gene Medicine. 20, (2018) 1–16.
 27. SARAIVA, J., NOBRE, R. J., PEREIRA DE ALMEIDA, L. - **Gene therapy for the CNS using AAVs: The impact of systemic delivery by AAV9**. Journal of Controlled Release (2016) 1–44.
 28. KARPATI, G., LOCHMULLER, H., NALBANTOGLU, J., DURHAM, H. - **The principles of gene therapy for the nervous system**. Trends in Neurosciences. 19, (1996) 49–54.
 29. O’CONNOR, D. M., BOULIS, N. M. - **Gene therapy for neurodegenerative diseases**. Trends in Molecular Medicine 21, (2015) 1–9.
 30. COSTANTINI, L. C., BAKOWSKA, J. C., BREAKEFIELD, X. O., ISACSON, O. - **Gene therapy in the CNS**. Gene Therapy. 7, (2000) 93–109.
 31. NARDI, N. B., TEIXEIRA, L. A. K., ÁVILA DA SILVA, E. F. - **Gene Therapy**. Ciência & Saúde Coletiva. 7, (2002) 109–116.
 32. XUENONG BO, JOOST VERHAAGEN. - **Gene Delivery and Therapy for Neurological Disorders**. Neuromethods. (2015).
 33. GARDLÍK, R., PÁLFFY, R., HODOSY, J., LUKÁCS, J., TURŇA, J., CELEC, P. - **Vectors and delivery systems in gene therapy**. Med Sci Monit 11, (2005) 110–121.
 34. HOCQUEMILLER, M., GIERSCH, L., AUDRAIN, M., PARKER, S., CARTIER, N. - **AAV based gene therapy for CNS diseases**. Human Gene Therapy. 27, (2016) 478–496.
 35. ASOKAN, A. - **Reengineered AAV vectors: Old dog, New tricks**. Discovery Medicine. 9, (2010) 399–403.
 36. MAGUIRE, C. A., BALAJ, L., SIVARAMAN, S., CROMMENTUIJN, M. H. W., ERICSSON, M., MINCHEVA-NILSSON, L., BARANOV, V., GIANNI, D., TANNOUS, B. A., SENA-ESTEVEZ, M., BREAKEFIELD, X. O., SKOG, J. - **Microvesicle-associated AAV Vector as a Novel Gene Delivery System**. Molecular Therapy. 20, (2012) 960–971.
 37. JAYANT, R. D., SOSA, D., KAUSHIK, A., ATLURI, V., VASHIST, A., TOMITAKA, A., NAIR, M. - **Current status of non-viral gene therapy for CNS disorders**. Expert Opinion on Drug Delivery. (2016).
 38. IBRAHEEM, D., ELAISSARI, A., FESSI, H. - **Gene therapy and DNA delivery systems**. International Journal of Pharmaceutics. 459, (2014) 70–83.
 39. CHIOCCA, E. A., BREAKEFIELD, X. - **Gene Therapy for Neurological Disorders and Brain Tumors**. (1998).

40. JERRY R. MENDELL, PRINCIPAL INVESTIGATOR, CENTER FOR GENE THERAPY, N. C. H. - **Phase I/IIa Gene Transfer Clinical Trial for Variant Late Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis, Delivering the CLN6 Gene by Self-Complementary AAV9.** (2018). [Acedido a 10 de julho de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02725580?term=02725580&rank=1>
41. MANFREDSSON, F. P. - **Gene Therapy for Neurological Disorders: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology** 1382, (2016).
42. NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE. - **A Phase I Study of Intrathecal Administration of scAAV9/JeT-GAN for the Treatment of Giant Axonal Neuropathy.** (2018). [Acedido a 28 de junho de 2018]. Disponível na Internet: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02362438>
43. IWATA, N., SEKIGUCHI, M., HATTORI, Y., TAKAHASHI, A., ASAI, M., JI, B., HIGUCHI, M., STAUFENBIEL, M., MURAMATSU, S. I., SAIDO, T. C. - **Global brain delivery of neprilysin gene by intravascular administration of AAV vector in mice.** *Scientific Reports.* 3, (2013) 1–8.
44. MINERS, J. S., BARUA, N., KEHOE, P. G., GILL, S., LOVE, S. - **A β -Degrading Enzymes: Potential for Treatment of Alzheimer Disease.** *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.* 70, (2011) 944–959.
45. CARTY, N., NASH, K. R., BROWNLOW, M., CRUITE, D., WILCOCK, D., SELENICA, M. L. B., LEE, D. C., GORDON, M. N., MORGAN, D. - **Intracranial Injection of AAV Expressing NEP but Not IDE Reduces Amyloid Pathology in APP+PS1 Transgenic Mice.** *PLoS One* 8, (2013) e59626.
46. FUKUCHI, K. ICHIRO, TAHARA, K., KIM, H. D., MAXWELL, J. A., LEWIS, T. L., ACCAVITTILOPER, M. A., KIM, H., PONNAZHAGAN, S., LALONDE, R. - **Anti-A β single-chain antibody delivery via adeno-associated virus for treatment of Alzheimer's disease.** *Neurobiology of Disease.* 23, (2006) 502–511.
47. HUANG, Y., SKWAREK-MARUSZEWSKA, A., HORRE, K., VANDEWYER, E., WOLFS, L., SNELLINX, A., SAITO, T., RADAELLI, E., CORTHOUT, N., COLOMBELLI, J., LO, A. C., VAN AERSCHOT, L., CALLAERTS-VEGH, Z., TRABZUNI, D., BOSSERS, K., VERHAAGEN, J., RYTEN, M., MUNCK, S., D'HOOGHE, R., SWAAB, D. F., HARDY, J., SAIDO, T. C., DE STROOPER, B., THATHIAH, A.. - **Loss of GPR3 reduces the amyloid plaque burden and improves memory in Alzheimer's disease mouse models.** *Science Translational Medicine.* 7, (2015) 1–10.
48. KIYOTA, T., ZHANG, G., MORRISON, C. M., BOSCH, M. E., WEIR, R. A., LU, Y., DONG, W., GENDELMAN, H. E. - **AAV2/I CD74 Gene Transfer Reduces β -amyloidosis and**

- Improves Learning and Memory in a Mouse Model of Alzheimer's Disease.** *Molecular Therapy*. 23, (2015) 1712–1721.
49. NIELSEN, T. T., NIELSEN, J. E. - **Antisense Gene Silencing: Therapy for Neurodegenerative Disorders?** *Genes*. 4, (2013) 457–484.
 50. ALVES, S., FOL, R., CARTIER, N. - **Gene Therapy Strategies for Alzheimer's Disease: An Overview.** *Human Gene Therapy*. 27, (2016) 100–107.
 51. HUDRY, E., DASHKOFF, J., ROE, A. D., TAKEDA, S., KOFFIE, R. M., HASHIMOTO, T., SCHEEL, M., SPIRES-JONES, T., ARBEL-ORNATH, M., BETENSKY, R., DAVIDSON, B. L., HYMAN, B. T. - **Gene Transfer of Human Apoe Isoforms Results in Differential Modulation of Amyloid Deposition and Neurotoxicity in Mouse Brain.** *Science Translational Medicine*. 5, (2013) 1–12.
 52. MURPHY, S. R., CHANG, C. C. Y., DOGBEVIA, G., BRYLEVA, E. Y., BOWEN, Z., HASAN, M. T., CHANG, T. Y. - **Acat1 Knockdown Gene Therapy Decreases Amyloid- β in a Mouse Model of Alzheimer's Disease.** *Molecular Therapy*. 21, (2013) 1497–1506.
 53. HUDRY, E., VAN DAM, D., KULIK, W., DE DEYN, P. P., STET, F. S., AHOUANSON, O., BENRAISS, A., DELACOURTE, A., BOUGNÈRES, P., AUBOURG, P., CARTIER, N. - **Adeno-associated Virus Gene Therapy With Cholesterol 24-Hydroxylase Reduces the Amyloid Pathology Before or After the Onset of Amyloid Plaques in Mouse Models of Alzheimer's Disease.** *Molecular Therapy*. 18, (2010) 44–53.
 54. BURLLOT, M. A., BRAUDEAU, J., MICHAELSEN-PREUSSE, K., POTIER, B., AYCIRIEX, S., VARIN, J., GAUTIER, B., DJELTI, F., AUDRAIN, M., DAUPHINOT, L., FERNANDEZ-GOMEZ, F., CAILLIEREZ, R., LAPRÉVOTE, O., BIÈCHE, I., AUZEIL, N., POTIER, M., DUTAR, P., KORTE, M., BUÉE, L., BLUM, D., CARTIER, N. - **Cholesterol 24-hydroxylase defect is implicated in memory impairments associated with alzheimer-like Tau pathology.** *Human Molecular Genetics*. 24, (2015) 1–12.
 55. KIYOTA, T., INGRAHAM, K. L., SWAN, R. J., JACOBSEN, M. T., ANDREWS, S. J., IKEZU, T. - **AAV serotype 2/1-mediated gene delivery of anti-inflammatory interleukin-10 enhances neurogenesis and cognitive function in APP+PS1 mice.** *Gene Therapy* 19, (2012) 724–733.
 56. KIYOTA, T., OKUYAMA, S., SWAN, R. J., JACOBSEN, M. T., GENDELMAN, H. E. e IKEZU, T. - **CNS expression of anti-inflammatory cytokine interleukin-4 attenuates Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP+PS1 bigenic mice.** *The FASEB Journal*. 24, (2010) 3093–3102.
 57. FOL, R., BRAUDEAU, J., LUDEWIG, S., ABEL, T., WEYER, S. W., ROEDERER, J. P., BROD, F., AUDRAIN, M., BEMELMANS, A. P., BUCHHOLZ, C. J., KORTE, M., CARTIER, N., MÜLLER, U. C.

- **Viral gene transfer of APP α rescues synaptic failure in an Alzheimer's disease mouse model.** *Acta Neuropathologica*. 131, (2016) 247–266.
58. DENG, J., HABIB, A., OBREGON, D. F., BARGER, S. W., GIUNTA, B., WANG, Y. J., HOU, H., SAWMILLER, D., TAN, J. - **Soluble amyloid precursor protein alpha inhibits tau phosphorylation through modulation of GSK3 β signaling pathway.** *Journal of Neurochemistry*. 135, (2015) 630–637.
59. GANT, J. C., CHEN, K.-C., KADISH, I., BLALOCK, E. M., THIBAUT, O., PORTER, N. M., LANDFIELD, P. W. - **Reversal of Aging-Related Neuronal Ca $^{2+}$ Dysregulation and Cognitive Impairment by Delivery of a Transgene Encoding FK506-Binding Protein 12.6/1b to the Hippocampus.** *Journal of Neuroscience*. 35, (2015) 10878–10887.
60. RAFII, M. S., BAUMANN, T. L., BAKAY, R. A. E., OSTROVE, J. M., SIFFERT, J., FLEISHER, A. S., HERZOG, C. D., BARBA, D., PAY, M., SALMON, D. P., CHU, Y., KORDOWER, J. H., BISHOP, K., KEATOR, D., POTKIN, S., BARTUS, R. T. - **A phase I study of stereotactic gene delivery of AAV2-NGF for Alzheimer's disease.** *Alzheimer's & Dementia*. 10, (2014) 571–581.
61. TUSZYNSKI, M. H., YANG, J. H., BARBA, D., U, H.-S., BAKAY, R. A. E., PAY, M. M., MASLIAH, E., CONNER, J. M., KOBALKA, P., ROY, S., NAGAHARA, A. H. - **Nerve Growth Factor Gene Therapy.** *JAMA Neurology*. 72, (2015) 1139–1147.
62. NAGAHARA, A. H., MATELING, M., KOVACS, I., WANG, L., EGGERT, S., ROCKENSTEIN, E., KOO, E. H., MASLIAH, E., TUSZYNSKI, M. H. - **Early BDNF Treatment Ameliorates Cell Loss in the Entorhinal Cortex of APP Transgenic Mice.** *Journal of Neuroscience*. 33, (2013) 15596–15602.
63. RAFII, M. S., TUSZYNSKI, M. H., THOMAS, R. G., BARBA, D., BREWER, J. B., RISSMAN, R. A., SIFFERT, J., AISEN, P. S. **Adeno-Associated Viral Vector (Serotype 2)–Nerve Growth Factor for Patients With Alzheimer Disease.** *JAMA Neurology*. 75, (2018) 834.
64. GONÇALVES, G. A. R., PAIVA, R. DE M. A. - **Gene therapy: advances, challenges and perspectives.** *Einstein* 15, (2017) 369–375.
65. LEI N.º 12/2005 DE 26 DE JANEIRO. **Informação genética pessoal e informação de saúde.** *Diário da República - I Série-A, N.º 18 (26-01-2005) 12/2005, (2005).* 606–611.
66. KEELER, A. M., ELMALLAH, M. K., FLOTTE, T. R. **Gene Therapy 2017: Progress and Future Directions.** *Clinical and Translational Science*. 10, (2017) 242–248.

Anexos

Parte A - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Anexo I



Figura 1: Fotografia do exterior da farmácia.



Figura 2: Fotografia do interior da farmácia.

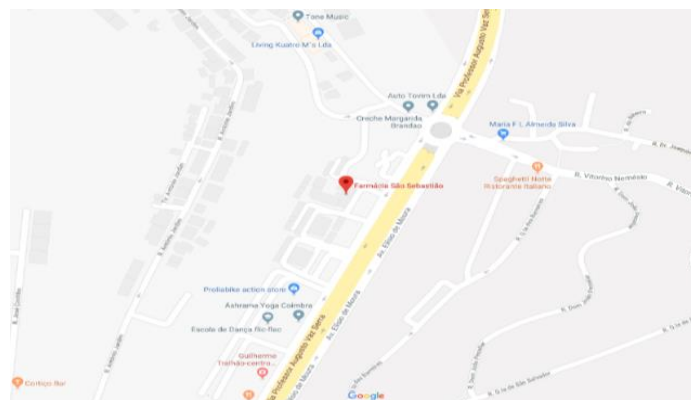


Figura 3: Representação da localização da farmácia em Coimbra.

Anexo II

FARMÁCIA SÃO SEBASTIÃO
 Av. Elísio de Moura, 443
 COIMBRA - 239 712 802
 D. TÈC.: ANA GONÇALVES M. PIMENTEL
 ILDA LOPES GONÇALVES E PIMENTEL, LDA
 N.º de Licença 175460

FICHA DE PREPARAÇÃO

Medicamento: Vaselina Salicilada

Teor em Substância(s) Activa(s): 100g (ml ou unidades) contém 2 g (ml) de Ácido Salicílico
 Forma Farmacéutica: Pomada Data de Preparação: 18/04/18
 Lote nº: 180418a Quantidade a preparar: 100 g

Matérias-primas	Lote nº	Origem	Farmacopeia	Quantidade para 100g (ml ou unidades)	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Rubrica do operador e data	Rubrica do supervisor data
Ácido Salicílico	Y163002	José M.G.Santos		2 g	2 g	2,1 g		
Vaselina Sólida	00414	Fagron		68 g	68 g	71,4 g		
Vaselina Líquida	01-073417	LabChem		30 g	30 g	31,5 g		

Preparação

Rubrica do Operador

1.	Limpar todo o material com álcool a 70°	
2.	Pesar as matérias-primas	
3.	Pulverizar o enxofre	
4.	Incorporar o enxofre na vaselina líquida	
5.	Incorporar a vaselina sólida na mistura anterior	
6.	Homogeneizar por espatulação	
7.	Acondicionar em caixa plástica	

Rubrica do Director Técnico	Data
[assinatura]	18/04/18

8.	Rotular o manipulado	[Redacted]
9.	Lavar e secar todo o material	[Redacted]
10.		
11.		
12.		
13.		
14.		
15.		
16.		

Aparelhagem usada:
 Balança
 Espátula
 Papel de pesagem
 Pedra de espatulação

Embalagem

Tipo de embalagem: Boiao plástico

Capacidade do recipiente: 175 mL

Material de embalagem	Nº de lote	Origem
[Redacted]		

Operador: [Redacted]

Rubrica do Director Técnico	Data
[Redacted]	18/09/18

Prazo de utilização e Condições de conservação

Prazo de utilização	4 meses	Operador: _____
Condições de conservação	Conservar em local fresco e seco, ao abrigo da luz	Operador: _____

Ronlagem

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

Modelo de rótulo

Identificação d	<p>VASELINA SALICILADA 2% Ác. Salicílico 2g Vaselina qbp. 100g Manter fora do alcance das crianças Utente: _____ Médico: _____ Conservar em local fresco e seco, em recipiente bem fechado</p> <p>Lote: 180418a Data Prep: 18/04/18 Validade: 18/08/18</p>
Identificação d	
Endereço e tel	
Teor em substã	
Quantidade dis	
Referência a m	
eventualmente necessário para a utilização conveniente	Nº do lote
do medicamento	Manter fora do alcance das crianças
Posologia	Advertências (precauções de manuseamento, etc.)
Via de administração	Uso externo (caso se aplique) (em fundo vermelho)

Operador: _____

Rubrica do Director Técnico	Data
_____	18/04/18

Verificação

ENSAIO	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO	RUBRICA DO OPERADOR
Cor	Amarelo	Conforme	[Redacted]
Aspecto	Uniforme	Conforme	[Redacted]

Aprovado Rejeitado

Supervisor: [Redacted] 18/09/18

Nome e morada do doente

[Redacted]

Nome do prescriptor

[Redacted]

Anotações

[Redacted]

Rubrica do Director Técnico [Redacted] Data 18/09/18



Figura 9: Acondicionamento primário da pomada de vaselina salicilada a 2% com respetivo rótulo.

Anexo III

Diário de Coimbra TERÇA-FEIRA | 27 FEV 2018 | III

ESPECIAL AV. ELÍSIO DE MOURA

Da queda de um avião à famosa derrocada

Derrocada há quase 18 anos focou na memória de muitos

HISTÓRIA A "malincha" de terras que, em Dezembro de 2000, deu origem à Avenida António Jacinto sobre a encosta e atingiu um período da Avenida Elísio de Moura, colocando em risco o edificado, posteriormente 40 famílias, serviu o episódio da habitação daquela aréola da cidade que está mais fresca na memória das pessoas. Ainda, ainda recentemente, em companhia de um irmão que atingiu um dos andares desse prédio, as primeiras referências dos moradores foram em relação a este episódio que, nessa altura, foi assunto de notícia na Comunicação Social, objecto de estudo por vários especialistas e chegou a levar a Câmara de Coimbra ao tribunal (os leilões pediram indenizações de um total de 70 0 mil euros).

Emília Fernandes, com 80 anos, moradora na Rua Quinta dos Banhos, há mais de meio século e "velha" da Avenida Elísio de Moura - o pai em propriedade de uma das quintas sobre aquela aréola foi construída - lembra-se bem da construção que foi a derrocada, há 18 anos atrás, mas comenta que não começaram aqui as "degradações" naquela zona.

«Cheia, por uns 17 anos quando caiu aqui um avião, lembrei a memória, que estava, no altura, por perto a aprender costura e, ao ouvir o estrondo, foi «a correr ao local» do acidente, num terreno mais ou menos no local onde começa a Avenida Elísio de Moura.

Emília Fernandes conta que se tinha de um jovem, estudante nos Olhos, que estava a fazer voos de treino. Durante um desses voos, tentou pousar por debaixo das tribas de alta tensão e acabou por despenhar-se. A moradora, como conta, «a primeira a chegar ao local, mas ali não havia nada a fazer, o "rapazinho" tinha morrido, recorri, «hoje já tenho de dois anos, houve uns 10 aviões a cair aqui perto. Não foi um deles, morreu. A.M. »

para termos. Nem todos os negócios correm bem, mas o que certo é que iniciaram trabalhos para a construção de uma avenida que, inicialmente, era «na» empreitada, só com uma fase, que terminava no Tróvão e que só mais tarde passou a ter duas fases.

Durante mais de 30 anos a Avenida Elísio de Moura foi recebendo moradores - assim como comércio e serviços - à medida que foram nascendo os empreendimentos, mas também cumprindo a função para a qual foi criada - ligar o Tróvão à cidade.

Até de Junho de 2004, a Câmara de Coimbra inaugurou a Quinta Estrema, após trabalhos que, só na "ilha de Moura", demoraram mais de sete meses. A rua inicia a outra fide da sua vida. É certo que por ali, há não passa só quem quer ir do Tróvão - ou dos Olhos - para a zona da Solim. Diz quem por lá mora que aquela zona via - um projecto de Mendes de Silva, ex-presidente da Câmara de Coimbra que demora 30 anos a construir-se - «era muito bonito, até de quem vem de fora, do interior da cidade».

Mas, parte da Elísio de Moura a longo aviação junto à qual muitos imóveis "rescendem", passou a ser equacionado um assento de moradores para os prédios, confirmou uma moradora, há quase 25 anos, que perdeu não se identificar: «Nós não perdemos pelo contrário, só ganhámos, mas muito do comércio que tinhamos por aqui deixou de existir, de, dando como exemplo alguns cafés e até o supermercado, que, entretanto, também fechou portas».

Mantém-se o talho e a farmácia, ao qual se junta a loja de bicicletas, a clínica de estética, o centro de análises clínicas ou de radiologia, algumas empresas ou a agência de viagens. Mantém-se também os moradores, que gostam de viver por ali, muitos há várias décadas, dando à Avenida Elísio de Moura tanta vida, como a de muitas cidades do país. ©

Venda especializada de UPS
Serviços de Manutenção
Assistência Técnica
Substituição de Baterias

OX2 POWER SERVICE, Lda
Rua António Jardim, Lote 24 - Loja B - 3000-038 Coimbra
Tel.: 239 794 210 • Fax: 239 794 219 • E-mail: geral@ox2.pt

Consulte-nos! www.ox2.pt

Farmácia São Sebastião
Av. Elísio de Moura, 443 3030-183 Coimbra
Tel: 239712802

Entregas ao domicílio

Veterinária

Nutrição

Manipulados

Venda online

Figura 10: Publicitação da Farmácia São Sebastião no Diário de Coimbra, edição de 27 de fevereiro de 2018.

Parte B - Relatório de Estágio no INFARMED, I.P.

Anexo IV



Figura 11: Fotografia do exterior do edifício da DAM.



Figura 12: Representação da localização do INFARMED, I.P. em Lisboa.

Anexo V

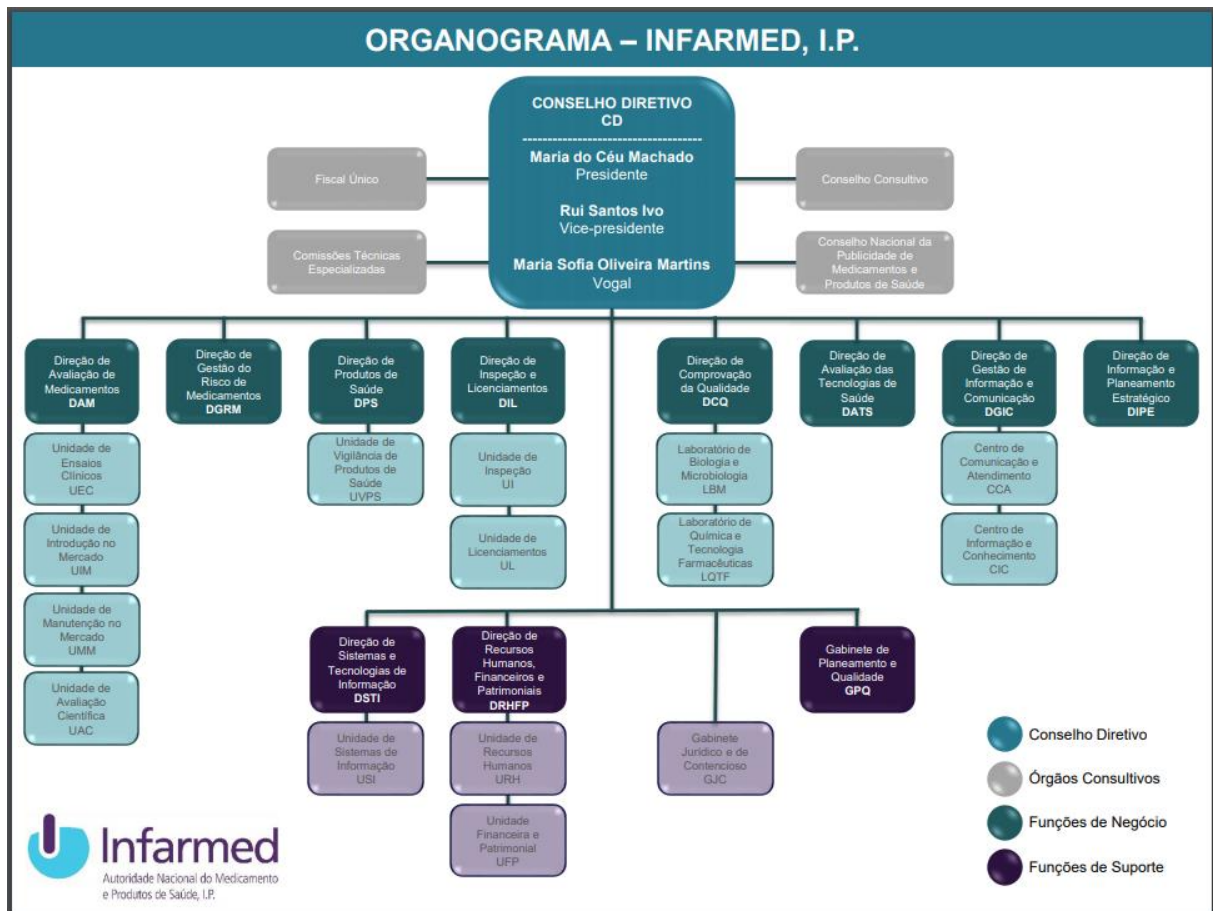


Figura I3: Organograma do INFARMED, I.P.

Parte C – Monografia “Terapia Molecular em Doenças Neurodegenerativas: rAAVs e Doença de Alzheimer”

Anexo VI

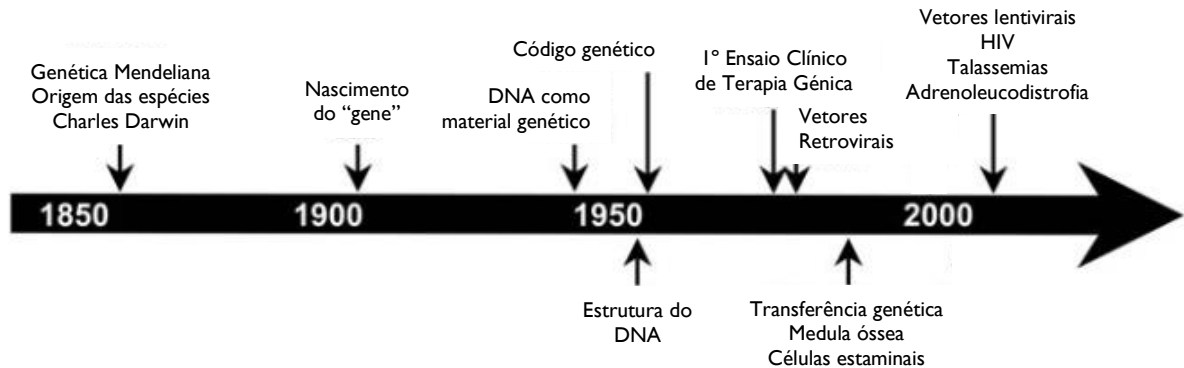
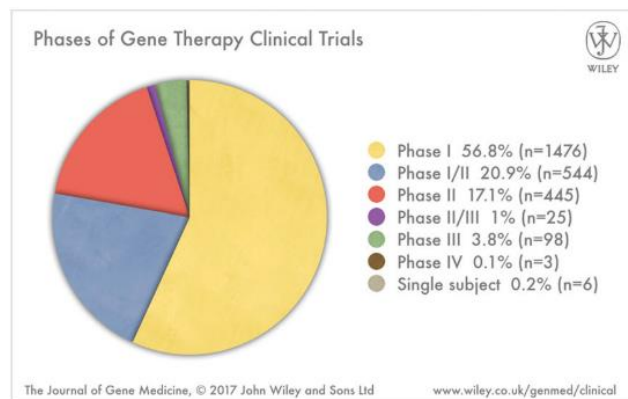
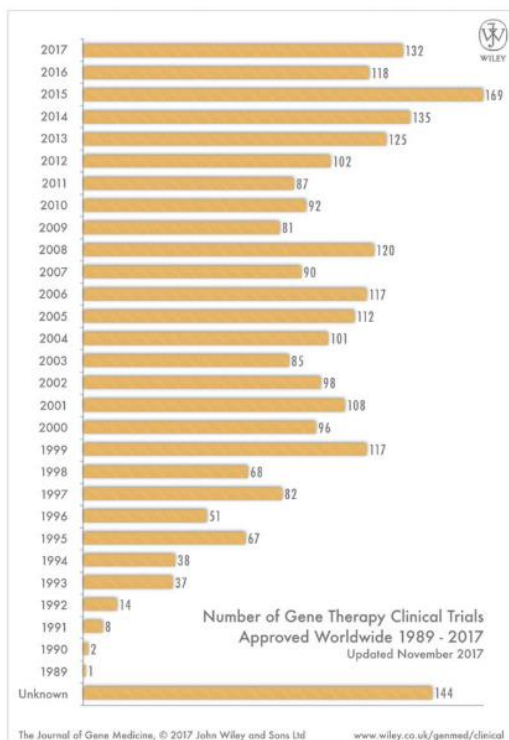
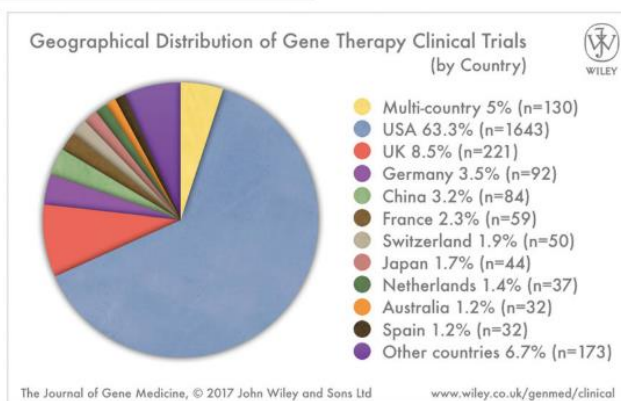
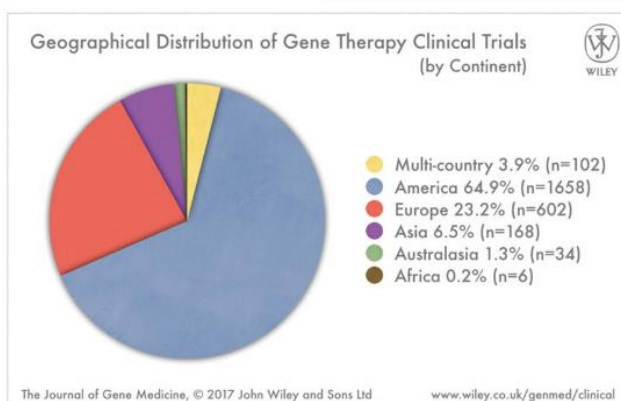
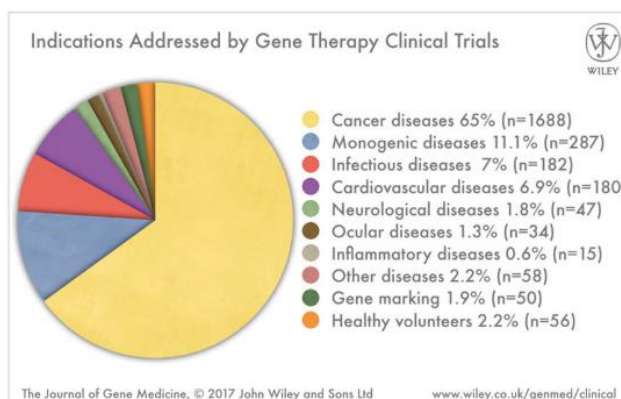


Figura 14: Cronologia dos principais avanços científicos que levaram ao desenvolvimento da terapia gênica. Cada descoberta significativa é indicada com setas, abrangendo os últimos 150 anos. Fonte: adaptado de ESCORS, D. *et. al.* ¹⁰.

Anexo VII



Figuras 15 e 16: Gráficos do número de ensaios clínicos de terapia gênica aprovados por todos o mundo entre 1989 e 2017, e das respectivas fases em que se encontram os ensaios no ano 2017. Fonte: GINN, S. L. *et. al.* ²⁶.



Figuras 17,18 e 19: Gráficos das aplicações da terapia génica em ensaios clínicos, e da distribuição geográfica dos ensaios clínicos de terapia génica (por continente e por país). Fonte: GINN, S. L. et. al. ²⁶.

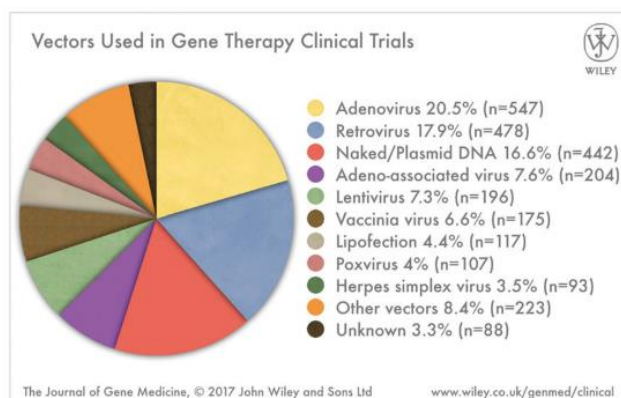
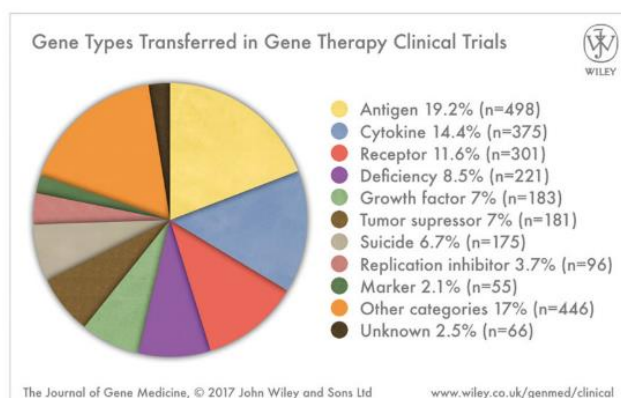


Figura 20 e 21: Tipos de genes e de vetores utilizados nos ensaios clínicos de terapia génica. Fonte: GINN, S. L. et. al. ²⁶.

Anexo VIII

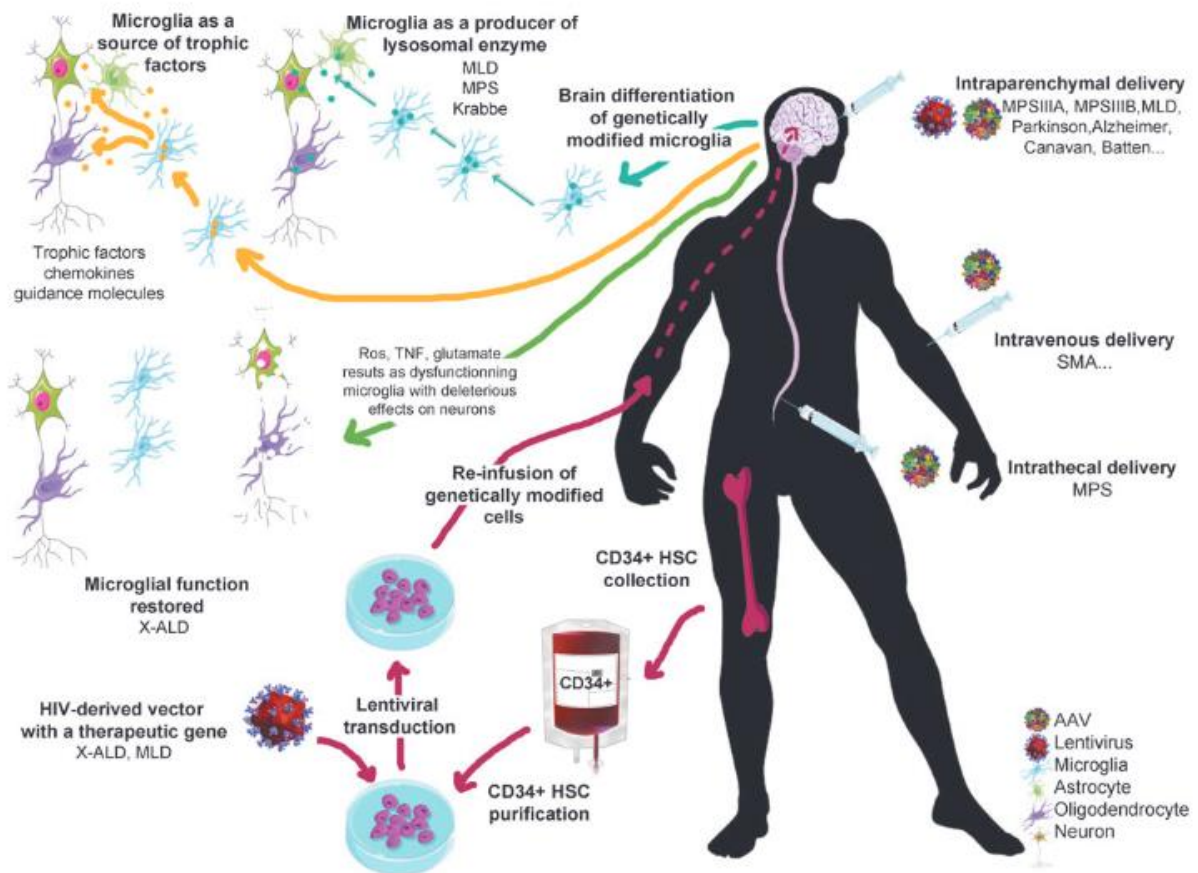


Figura 22: Estratégias de Terapia Génica *in vivo* e *ex vivo* para o tratamento de doenças do sistema nervoso central (SNC). A terapia génica *in vivo* (direita) envolve a infusão direta de vetores (geralmente rAAVs) que codificam o gene terapêutico. São apresentadas três vias de administração, nomeadamente a via intraparenquimatosa direta, a via intravenosa e a via intratecal. No lado esquerdo, a terapia génica *ex vivo* é baseada no transplante de células estaminais hematopoiéticas (HSCs) geneticamente modificadas. Após a colheita e purificação das células CD34⁺ da medula óssea do doente, estas são transduzidas com um vetor lentiviral (LV) portador do gene terapêutico. As células geneticamente modificadas são reinfundidas no doente. Uma fração é capaz de migrar para o SNC, atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e diferenciar-se localmente em células semelhantes a microglia geneticamente modificadas. As células da microglia podem ser geneticamente corrigidas para restaurar a função normal, levando a consequências benéficas para os neurónios. No caso das doenças lisossomais, a microglia tem sido usada como produtora de enzimas que são secretadas para corrigir células deficientes vizinhas. As células da microglia também podem ser usadas para produzir e secretar fatores terapêuticos, como fatores tróficos ou quimiocinas. Fonte: adaptado de PIGUET, F. *et. al.* ¹².

Anexo IX

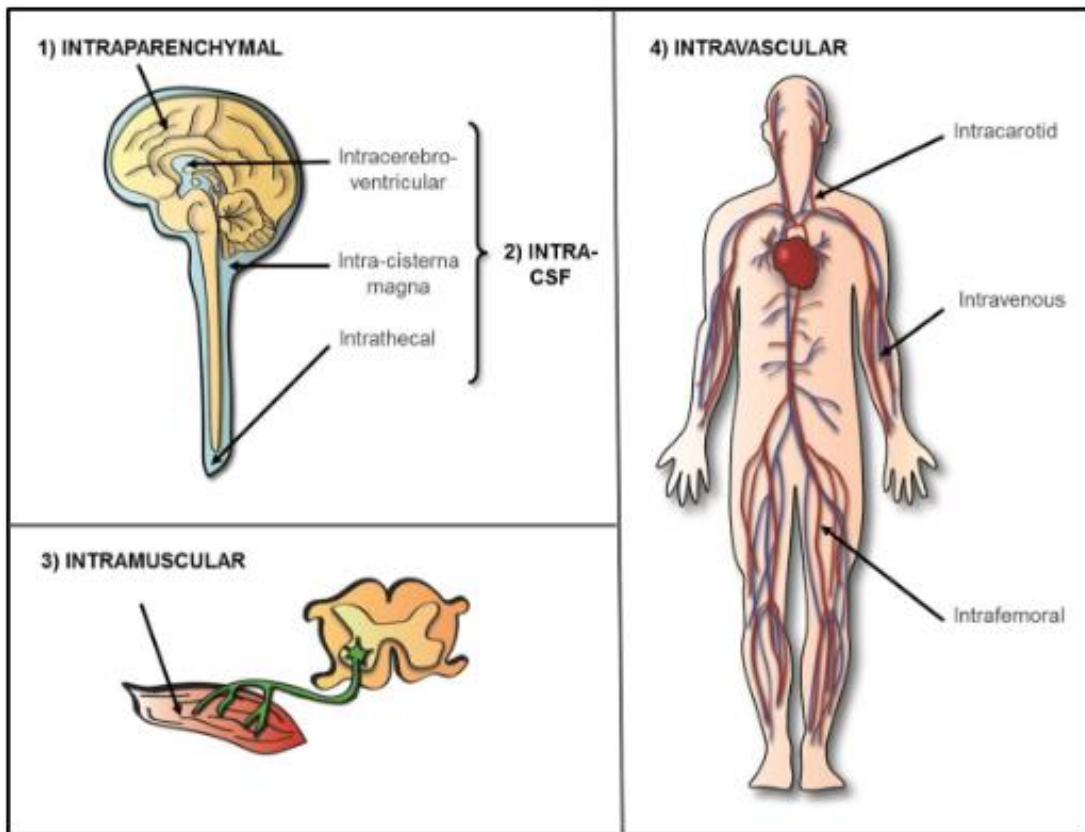


Figura 23: Possíveis vias de administração de rAAVs no SNC. Fonte: SARAIVA, J. et. al. ²⁷.

Anexo X

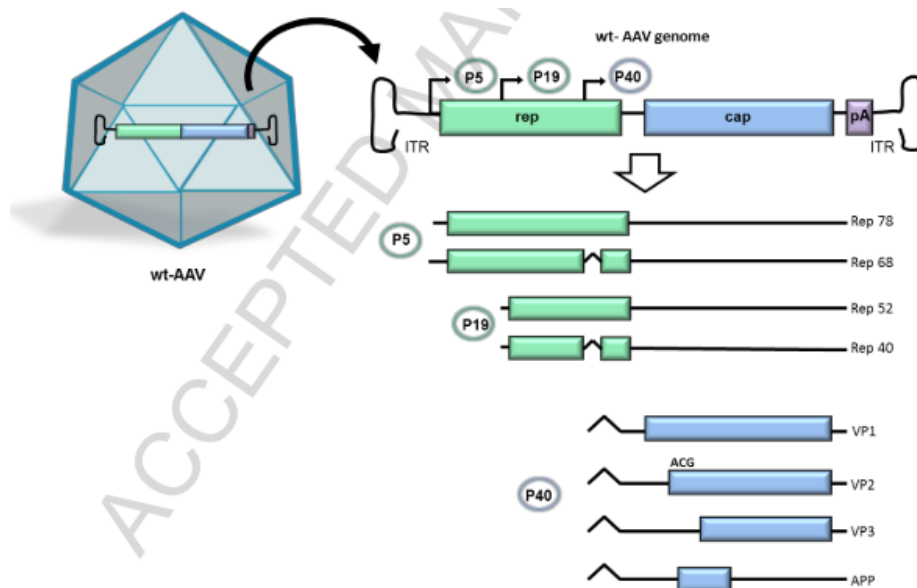


Figura 24: Representação do genoma de wt-AAV (wild type). Fonte: SARAIVA, J. et. al. ²⁷.

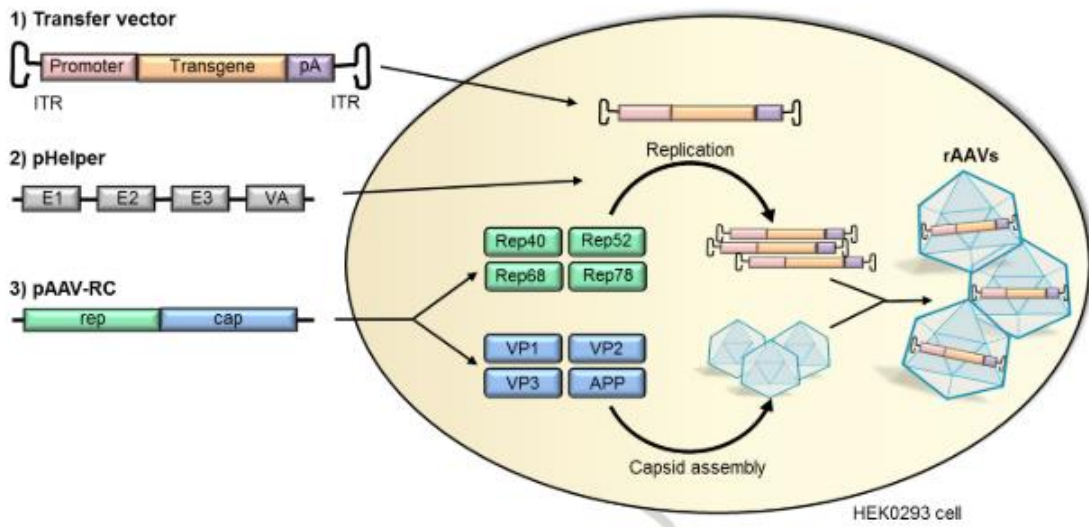


Figura 25: Processo de produção de rAAVs. Fonte: SARAIVA, J. et. al. ²⁷.

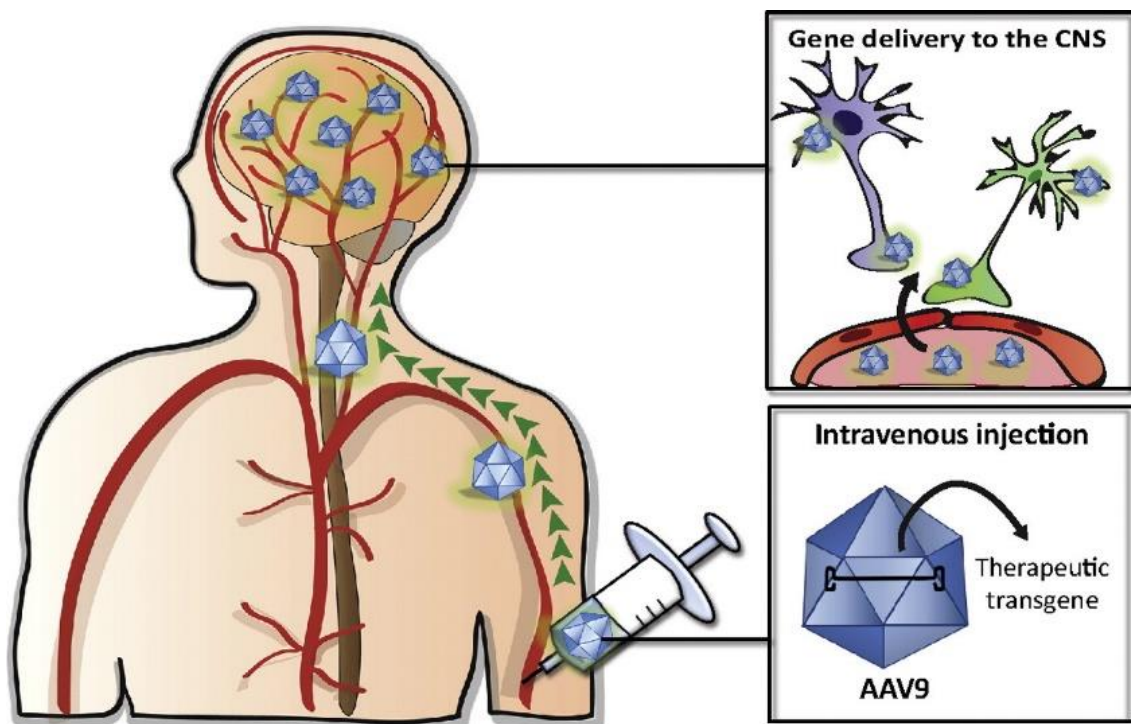


Figura 26: Injeção intravenosa para transferência de genes para o SNC, utilizando o vetor AAV9. Fonte: SARAIVA, J. et. al. ²⁷.