



1 2 9 0

UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Marisa Daniela Pereira Ferreira

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Advances in the Immunotherapies for Alzheimer’s Disease” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, da Dra. Marília Rocha, da Dra. Maria João Pedroso e da Professora Doutora Armanda Emanuela Santos apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Marisa Daniela Pereira Ferreira

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Advances in the Immunotherapies for Alzheimer’s Disease” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, da Dra. Marília Rocha, da Dra. Maria João Pedroso e da Professora Doutora Armanda Emanuela Santos apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro de 2020

Eu, Marisa Daniela Pereira Ferreira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2015234630, declaro assumir a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágios e Monografia intitulada “Advances in the Immunotherapies for Alzheimer’s Disease” apresentadas à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 20 de outubro de 2020.

Marisa Daniela Pereira Ferreira

(Marisa Daniela Pereira Ferreira)

Agradecimentos

Aos meus pais, tios, prima e avós, por todo o incentivo e apoio prestado durante o meu percurso académico.

Ao meu irmão, por todo o carinho, apoio e paciência em todos os momentos. Finalmente vais deixar de te queixar de me ver sempre a estudar!

À Inês, à Maria João, à Melissa, à Maria Inês e à Cláudia por fazerem parte da minha vida e pelo apoio incondicional nestes últimos cinco anos. Um sincero agradecimento por toda a paciência demonstrada nos momentos em que eram a minha última prioridade! Sem vocês, Coimbra não tinha o mesmo encanto!

À Professora Doutora Armanda Emanuela Santos, por toda a disponibilidade, compreensão, sugestões valiosas e conhecimentos partilhados durante a realização da monografia. Um sincero agradecimento!

À Doutora Marília Rocha, pela atenção prestada em todos os momentos e pela oportunidade de estagiar no CHUC.

À Dra. Rosângela Garcia, pela dedicação e amabilidade em esclarecer todas as minhas dúvidas durante a minha passagem pelo setor da Distribuição.

À Dra. Maria João Pedroso, pela paciência, apoio e sábios conselhos. A toda a restante equipa técnica da Farmácia Torres Padilha, pela receção calorosa e orientação em todos os momentos do estágio.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por ser a minha segunda casa e por todos os conhecimentos e valores transmitidos.

Obrigada!

Índice

Parte I: Relatório de Estágio em Farmácia Hospitalar

Lista de Abreviaturas	8
1. Nota Introdutória.....	9
2. Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra	10
3. Serviços Farmacêuticos do CHUC.....	10
4. Análise SWOT	12
4.1. Pontos Fortes (<i>Strengths</i>)	12
4.1.1. Possibilidade de passar pelo setor da Farmacotecnia	12
4.1.2. Possibilidade de passar pelo setor da Distribuição.....	14
4.1.3. Tarefas propostas durante o estágio em farmácia hospitalar.....	15
4.1.4. Caderno de estagiário	16
4.1.5. Apresentações dos setores dos SF	16
4.1.6. Sistema de Garantia da Qualidade e Gestão do Risco	16
4.2. Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>)	17
4.2.1. Impossibilidade de integrar todos os setores dos SF.....	17
4.2.2. Estágio observacional.....	17
4.2.3. Impossibilidade de contactar com determinadas atividades realizadas no setor da Distribuição e na Radiofarmácia.....	17
4.3. Oportunidades (<i>Opportunities</i>)	17
4.3.1. Perceção da atividade farmacêutica em ambiente hospitalar e estágio num hospital de referência e com múltiplas valências	17
4.3.2. Participação em formações e visitas aos serviços clínicos de Ginecologia e Neurocirurgia.....	18
4.4. Ameaças (<i>Threats</i>).....	18
4.4.1. Escassa interação com o doente internado e com o médico.....	18
4.4.2. Aptidões do FH subaproveitadas.....	18
4.4.3. Implementação do novo Sistema Informático SGICM-LF da Glintt.....	19
4.4.4. Escassas oportunidades de emprego em farmácia hospitalar	19
5. Considerações Finais	19
6. Referências Bibliográficas.....	20
ANEXOS	21
ANEXO 1 - Impresso de requisição de estupefacientes	21
ANEXO 2 - Impresso de Requisição/Distribuição/Administração de Medicamentos Hemoderivados.....	22
ANEXO 3 - Boletim de justificação clínica.....	23
ANEXO 4 - Elaboração do caso clínico	25

Parte II: Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas	31
1. Nota Introdutória.....	32
2. Farmácia Torres Padilha.....	32
2.1. Localização	32
2.2. Equipa	32
2.3. Espaço físico e funcional.....	33

2.3.1. <i>Back-Office</i>	33
2.3.2. <i>Front-Office</i>	34
3. Análise SWOT	35
3.1. Pontos Fortes (<i>Strengths</i>).....	35
3.1.1. Localização próxima da farmácia à minha área de residência	35
3.1.2. Dedicção e disponibilidade da equipa técnica.....	35
3.1.3. Incentivo à autonomia	36
3.1.4. Aprendizagem por fases.....	36
3.1.5. Preparação de medicamentos manipulados	37
3.1.6. Abrangência do período do estágio	37
3.2. Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>).....	38
3.2.1. Impossibilidade de contactar com serviços farmacêuticos inovadores.....	38
3.3. Oportunidades (<i>Opportunities</i>)	38
3.3.1. <i>Cashguard</i>	38
3.3.2. Participação em formações internas	39
3.3.3. Aprendizagem contínua no que respeita a nomes comerciais de medicamentos, produtos de uso veterinário e a dermocosméticos	39
3.4. Ameaças (<i>Threats</i>)	40
3.4.1. Atualização constante de participações e preços	40
3.4.2. Medicamentos esgotados	40
3.4.3. Estabelecimentos de venda de MNSRM.....	40
3.4.4. Pandemia COVID-19.....	41
4. Considerações Finais	41
5. Referências Bibliográficas.....	42
ANEXOS – Casos Práticos	43

Parte III: Monografia – “Advances in the Immunotherapies for Alzheimer’s Disease”

List of Abbreviations	45
Abstract	47
Resumo	48
1. Introduction.....	49
2. Alzheimer's Disease: Pathophysiology and Hypotheses	49
2.1. Amyloid Cascade Hypothesis.....	50
2.1.1. Amyloid Pathology	50
2.1.2. Tau Pathology.....	52
2.2. Presenilin mutations linked to perturbation of Ca ²⁺ homeostasis and mitochondrial dysfunction.....	53
2.3. Inflammatory processes.....	54
2.4. Vascular abnormalities	55
2.5. Metal accumulation in the brain	55
2.6. Impaired insulin/IGF-I signalization	55
2.7. Infectious disease	56
2.8. Loss of cholinergic neurotransmission.....	57
2.9. The “dual hit” hypothesis.....	57
3. Alzheimer's Disease Diagnosis	58

4.	Risk Factors for Alzheimer’s Disease	59
4.1.	Age	59
4.2.	Type 2 Diabetes Mellitus.....	60
4.3.	Genetic Risk Factors	60
4.3.1.	ApoE gene	60
4.3.1.1.	Effect of apoE lipidation	62
4.3.2.	TREM2 gene	62
5.	Protective Factors for Alzheimer’s Disease	62
6.	Available therapy	63
6.1.	Cholinesterase inhibitors (ChEIs)	63
6.2.	Anti-NMDA antagonist.....	64
7.	Immunotherapy as disease-modifying therapy	64
7.1.	Active Immunization versus Passive Immunization	64
7.2.	A β -directed Immunotherapy.....	65
7.2.1.	Active Immunization	65
7.2.2.	Passive Immunization	66
7.2.3.	A new paradigm: Prevention trials	69
7.2.	Tau-directed Immunotherapy	70
7.2.1.	Active Immunization	71
7.2.2.	Passive Immunization	72
7.3.	ApoE-direct Immunotherapy.....	73
8.	Challenges and Future Perspectives.....	73
9.	Conclusion	74
10.	References	75
	ANNEXES	85
	ANNEX 1- The Clinical Dementia Rating Scale	85
	ANNEX 2 - Sum of boxes staging category	86
	ANNEX 3 - Type and frequency of consumption of foods in AD preventive diets	87
	ANNEX 4 - Characteristics of three large clinical trials for prevention of cognitive impairment, dementia and AD	88
	ANNEX 5 - Mini-Mental State Examination	89
	ANNEX 6 - The 11-item version of the Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale (ADAS-Cog).....	90

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia Hospitalar

Serviços Farmacêuticos do CHUC

Lista de Abreviaturas

¹⁸F - radioisótopo flúor-18

¹⁸F-DFG - radiofármaco ¹⁸F- fluorodesoxiglucose

^{99m}Tc - Radioisótopo tecnécio-99 meta-estável

AIM - Autorização de Introdução no Mercado

CFALH - Câmara de fluxo de ar laminar horizontal

CFALV - Câmara de fluxo de ar laminar vertical

CFT - Comissão de Farmácia e Terapêutica

CHUC - Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

FDS - do inglês, *Fast Dispensing System* (reembala formas sólidas orais e dispensa-as)

FH - Farmacêutico Hospitalar

FHNM - Formulário Hospitalar Nacional de Medicamentos

HUC - Hospitais da Universidade de Coimbra

INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

MBB - Maternidade Bissaya Barreto

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

SF - Serviços Farmacêuticos

SGICM - LF - Sistema de Gestão Integrada do Circuito do Medicamento

SWOT - do inglês, *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats* (Forças, Oportunidades, Fraquezas, Ameaças)

UMIV - Unidade de Misturas Intravenosas

UPC - Unidade de Preparação de Citotóxicos

I. Nota Introdutória

O farmacêutico como especialista do medicamento pode exercer as suas funções e competências em variadas áreas da saúde, de entre elas a Farmácia Hospitalar que, segundo o Decreto-Lei n.º 44204 de 22 de fevereiro de 1962, define-se como “o conjunto de atividades farmacêuticas exercidas em organismos hospitalares ou serviços a eles ligados para colaborar nas funções de assistência que pertencem a esses organismos e serviços e promover a ação de investigação científica e de ensino”, sendo que é através de serviços farmacêuticos (SF) que se exercem as ditas atividades da farmácia hospitalar¹.

Neste âmbito, os farmacêuticos hospitalares prestam serviços aos doentes e aos profissionais de saúde nos hospitais, apresentando como responsabilidades e funções principais²:

- Intervir no processo de seleção, aquisição e gestão de medicamentos e produtos de saúde (por exemplo, dispositivos médicos);
- Produzir manipulados;
- Garantir a distribuição de medicamentos e intervir na gestão do circuito do medicamento experimental;
- Fornecer informação sobre medicamentos e produtos de saúde;
- Desenvolver atividades no domínio da farmácia clínica, incluindo farmacocinética clínica, reconciliação terapêutica e farmacovigilância;
- Participar nas comissões técnicas e em atividades de investigação e ensino.

O presente relatório assume a forma de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), referente à frequência do Estágio Curricular em Farmácia Hospitalar, o qual se realizou nos SF do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), E.P.E. e decorreu nos meses de janeiro e fevereiro de 2020. O primeiro mês de estágio realizou-se nos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC), no qual tive a oportunidade de contactar com as secções de Radiofarmácia, Unidade de Misturas Intravenosas (UMIV), Unidade de Produção de Não Estéreis (preparações magistrais/oficinais) e Unidade de Preparação Citotóxicos (UPC) que integram o setor da Farmacotecnia e com a unidade de Ambulatório de Oncologia situada no Edifício S. Jerónimo. Já o segundo mês de estágio alternou entre os HUC e a Maternidade Bissaya Barreto (MBB) e contemplou o setor da Distribuição.

2. Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

O Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, EPE (CHUC) é fruto da fusão dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE, do Centro Hospitalar de Coimbra, EPE e do Centro Hospitalar Psiquiátrico de Coimbra. Por conseguinte, o CHUC compreende os seguintes pólos: Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC), Hospital Geral dos Covões (HG), Maternidade Bissaya Barreto (MBB), Maternidade Daniel de Matos (MDM), Hospital Pediátrico (HP) e Hospital Sobral Cid (HSC)³.

Esta reestruturação visou tornar mais eficiente a gestão das unidades de saúde envolvidas e potenciar o ensino e a investigação científica, promovendo a colaboração e a articulação com instituições de ensino, nomeadamente com as Faculdades de Medicina e de Farmácia da Universidade de Coimbra³.

3. Serviços Farmacêuticos do CHUC

O funcionamento dos SF depende da existência de uma equipa multidisciplinar, de entre os quais, se destacam farmacêuticos, técnicos superiores de diagnóstico e terapêutica (TDT), assistentes operacionais (AO) e assistentes técnicos (AT) que colaboram entre si na disponibilização dos medicamentos aos respetivos serviços clínicos e, posto isto, no cumprimento do plano terapêutico de todos os doentes do hospital.

Os SF do CHUC são dirigidos pelo Dr. José Feio e estão centralizados no pólo dos HUC.

Em concordância com as responsabilidades e funções do farmacêutico hospitalar (FH), os SF são constituídos pelos seguintes setores^{2,4}:

- **Gestão e Aprovisionamento**, ao qual compete a seleção e aquisição de medicamentos e produtos de saúde, tendo por base o Formulário Hospitalar Nacional de Medicamentos (FHNM) assim como as necessidades terapêuticas extra-formulário dos doentes do hospital e os recursos disponíveis.
- **Receção e Armazenamento**, responsável pela receção e armazenamento dos medicamentos e produtos de saúde. O armazenamento deve ser feito a fim de garantir as condições requeridas de luz, espaço, humidade, temperatura e segurança.
- **Comissões técnicas** (por exemplo, salientam-se a Comissão de Farmácia e Terapêutica (CFT), Comissão de Controlo de Infecção e a Comissão de Ética).

- **Distribuição**, que garante a distribuição dos medicamentos aos doentes em regime de internamento e de ambulatório.

No regime de internamento, a distribuição pode ser por dose unitária diária, isto é, a medicação de um doente específico de um determinado serviço é fornecida em dose unitária para 24 horas, ou por reposição de *stocks* pré-definidos (distribuição tradicional), havendo, neste caso, pequenos *stocks* nas enfermarias, que são repostos com a frequência definida (aplica-se a soluções de grande volume, desinfetantes, antissépticos, material de penso, medicação em SOS, por exemplo). A preparação dos medicamentos é feita pelos TDT manualmente ou recorrendo a equipamentos semiautomáticos (tais como o *Kardex* ou *FDS*). Adicionalmente, existe a distribuição de medicamentos especiais, como os hemoderivados e os psicotrópicos ou estupefacientes cujo processo de dispensa, nos termos da legislação em vigor, é efetuado unicamente por farmacêuticos. Os estupefacientes são armazenados num cofre e a sua requisição faz-se através do modelo de requisição n.º 1509 – Anexo X aprovado pelo INFARMED (Anexo I).

- **Farmacotecnia**, que assegura a produção de preparações farmacêuticas não comercializadas no mercado farmacêutico nas formas farmacêuticas ou doses necessárias para determinado doente. Subdivide-se nas unidades subsequentes:
 - **Radiofarmácia** (unidade responsável pela produção de radiofármacos: ^{99m}Tc - Mertioscan[®], ^{99m}Tc – Pulmocis[®], ^{99m}Tc - Nanotop[®], entre outros).
 - **Unidade de Misturas Intravenosas (UMIV) e Unidade de Produção de Não Estéreis** (a primeira unidade é responsável pela preparação de preparações estéreis enquanto que a segunda é responsável por preparar manipulados não-estéreis).
 - **Unidade de Produção de Citotóxicos (UPC).**
- **Ensaio Clínicos.**
- **Informação de Medicamentos**, que compila e trata a informação científica sobre medicamentos e a difunde aos profissionais de saúde internos.
- **Cuidados Farmacêuticos**, incluindo a monitorização farmacocinética cuja finalidade primordial é administrar a dose certa de um determinado fármaco sem haver sobredosagem ou subdosagem, o que implica uma monitorização individualizada das concentrações séricas. Aplica-se a medicamentos com índice terapêutico estreito ou com variabilidade do comportamento cinético.

- **Auditoria interna**, que se destina a avaliar periodicamente as atividades desenvolvidas nos SF, com vista a promover uma melhoria contínua dos cuidados prestados.

4. Análise SWOT

A análise SWOT que se segue pretende identificar, internamente, os pontos fortes e os pontos fracos e, externamente, as oportunidades concedidas e as ameaças sentidas ao longo do Estágio Curricular em Farmácia Hospitalar.

Tabela I. Resumo da Análise SWOT.

Pontos Fortes	Pontos Fracos
<ul style="list-style-type: none"> • Possibilidade de passar pelo setor da Farmacotecnia. • Possibilidade de passar pelo setor da Distribuição. • Tarefas propostas durante o estágio em farmácia hospitalar. • Caderno de estagiário. • Apresentações dos setores dos SF. • Sistema de Garantia da Qualidade e Gestão do Risco. 	<ul style="list-style-type: none"> • Impossibilidade de integrar todos os setores dos SF. • Estágio observacional. • Impossibilidade de contactar com determinadas atividades realizadas no setor da Distribuição e na Radiofarmácia.
Oportunidades	Ameaças
<ul style="list-style-type: none"> • Perceção da atividade farmacêutica em ambiente hospitalar e estágio num hospital de referência e com múltiplas valências. • Participação em formações e visitas aos serviços clínicos de Ginecologia e Neurocirurgia. 	<ul style="list-style-type: none"> • Escassa interação com o doente internado e com o médico. • Aptidões do FH subaproveitadas. • Implementação do novo Sistema Informático SGICM-LF da Glintt. • Escassas oportunidades de emprego em farmácia hospitalar.

4.1. Pontos Fortes (*Strengths*)

4.1.1. Possibilidade de passar pelo setor da Farmacotecnia

Neste setor estive uma semana em cada uma das unidades: Radiofarmácia, UMIV e UPC.

Na Radiofarmácia, assisti à preparação de radiofármacos que são utilizados em Medicina Nuclear no diagnóstico e terapêutica de várias doenças, embora em 90% dos casos sejam utilizados no diagnóstico de doenças. Os radiofármacos têm na sua composição um

radioisótopo ligado a uma substância química que é responsável pelas propriedades farmacocinéticas, incluindo a distribuição a um órgão ou tecido específico.

Os farmacêuticos são responsáveis pela preparação de radiofármacos contendo ^{99m}Tc (emissor de radiação γ), utilizados na obtenção de imagens cintigráficas. Por sua vez, os físicos têm a seu cargo a preparação de ^{18}F -FDG (^{18}F é um emissor de positrões), radiofármaco utilizado aquando da realização de tomografias de emissão de positrões.

Destaco a importância de ter contactado com esta unidade, dado que permitiu alargar o meu leque de conhecimentos em radiofármacos e dominar os nomes comerciais dos *kits* frios (contém a substância química e excipientes) aos quais se procede à radiomarcagem com ^{99m}Tc .

Na UMIV, observei o processo de validação das prescrições e de manipulação segundo a guia de produção. Nesta unidade existem dois tipos de câmaras, uma câmara de fluxo de ar laminar horizontal (CFALH) e uma câmara de fluxo de ar laminar vertical (CFALV). A CFALH protege o manipulado de contaminações pelo meio exterior e, por conseguinte, nesta câmara são preparadas injeções intravítreas, enzimas (alglucosidase, laronidase, elosulfase e galsulfase), bolsas nutritivas, colírios, antivíricos, antifúngicos e anticorpos monoclonais (infiximab, bevacizumab, entre outros) que não exijam proteção do manipulador. Por outro lado, a CFALV protege tanto o manipulado como o manipulador e aqui são preparadas as monodoses de soro autólogo a 20% e alguns citotóxicos (a título de exemplo, solução oral de ciclosfosfamida). Também tive oportunidade de validar preparações (passo da verificação) que consiste em identificar o manipulador e o operador de apoio assim como libertar lotes no sistema informático, proceder ao registo diário e rotular e selar os sacos das preparações.

Já na Unidade de Produção de Medicamentos Não Estéreis, colaborei na preparação de manipulados para uso interno (por exemplo, na preparação de suspensão oral de vancomicina 25 mg/ml indicada na infeção por *Clostridium difficile*) e para uso externo (pomada de serolímus 1 mg/g indicada na esclerose tuberosa), podendo deste modo colocar em prática conhecimentos assimilados em Farmácia Galénica.

Por fim, a passagem pela UPC permitiu-me ficar a conhecer alguns protocolos de quimioterapia com os quais não estava familiarizada, assistir à reconstituição de fármacos citotóxicos (como a azacitidina) como também à diluição de outros e à preparação de infusores. Adicionalmente, constatei a necessidade de algumas preparações terem de ser administradas com filtro de 0,2 μm , tendo como exemplo as preparações contendo paclitaxel diluído em solução de cloreto de sódio a 0,9%.

4.1.2. Possibilidade de passar pelo setor da Distribuição

Quanto ao setor da Distribuição, realço como pontos fortes o Ambulatório e a “Urgência”.

A distribuição de medicamentos a doentes em regime de ambulatório prende-se com a necessidade de existir um controlo e vigilância mais apertados em determinadas terapêuticas, devido aos seus efeitos secundários graves, e de assegurar a adesão à terapêutica por parte dos doentes e também com o facto de que certos medicamentos só são comparticipados a 100% se forem dispensados pelos SF⁴. São exemplos de patologias para as quais se efetua dispensa de medicamentos para ambulatório: oncologia, VIH/SIDA, hepatite B e C, esclerose múltipla, fibrose quística, profilaxia da rejeição aguda de transplante renal, hepático e cardíaco alogénico, insuficiência renal crónica e artrite reumatoide; encontrando-se os medicamentos de “uso exclusivo hospitalar” sujeitos a despachos e/ou portarias. Adicionalmente, também se faz a cedência de medicamentos biológicos a doentes externos ao hospital.

Durante a minha passagem pelo Ambulatório do Edifício Central e do S. Jerónimo, colaborei na preparação da medicação, tendo obtido contacto com o *Consis* (no Ambulatório do Edifício Central) - *robot* de armazenamento e dispensa de medicamentos - e assisti ao atendimento dos doentes, salientando-se a explicação verbal e escrita fornecida pelo FH aos doentes a iniciar pela primeira vez a terapêutica, com a finalidade de promover a correta utilização da terapêutica.

De notar, que pude observar que o FH confirma com o doente se este administra o “medicamento biológico de referência” ou o biossimilar (desde que tenha administrado durante pelo menos um ano o medicamento de referência, o doente pode começar a administrar o biossimilar e vice-versa) e a data da próxima consulta médica, a fim de inferir a quantidade de medicação que o doente necessita, com a ressalva de que a medicação só pode ser fornecida para um período máximo de 2 meses.

Na área de “Urgência Farmacêutica”, é dever do FH receber todas as chamadas telefónicas dos serviços clínicos com pedidos urgentes de informação e de medicação (os pedidos referem-se a medicamentos que sofreram algum tipo de estrago ou inutilização; a novas prescrições ou alterações ou a falta ou troca de medicamentos na cedência anterior) e efetuar o registo dos medicamentos cedidos excecionalmente. Nesta unidade assim como na farmácia da MBB, tive oportunidade de contactar com os hemoderivados (albumina humana, fibrinogénio humano, imunoglobulina humana anti-D, etc.) e preencher o campo do impresso próprio de requisição/distribuição/administração (Anexo 2) que compete ao FH, em que se

identifica o hemoderivado dispensado, a dose, a quantidade de unidades dispensadas, o lote de fabrico, o laboratório de origem/fornecedor e o número do certificado de autorização de utilização do lote (CAUL) emitido pelo INFARMED. É necessário também indicar o número de registo de distribuição atribuído no *dossier* de registo existente nos SF. Posteriormente ao preenchimento, deve ser gerado um registo de consumo para que se possa arquivar o impresso.

Por último, neste setor foi-me ainda elucidado que os medicamentos não incluídos no FHNM (nem na adenda hospitalar do FHNM do CHUC) bem como aqueles contemplados com indicação *off-label* ou custos elevados necessitam de justificação clínica para se proceder à sua cedência pelos SF. Por conseguinte, o médico deve preencher o boletim de justificação clínica (Anexo 3). Este é, depois, encaminhado para os SF, onde o FH terá de oferecer o seu parecer (tendo o diretor dos SF que assinar). Após este procedimento, o boletim é encaminhado para o diretor do serviço e, posteriormente, ao diretor clínico com o mesmo intuito e, se necessário, depois, à CFT. Por fim, caso os medicamentos não tenham AIM ou avaliação económica, o boletim terá que ser enviado ao INFARMED.

4.1.3. Tarefas propostas durante o estágio em farmácia hospitalar

Foi proposto aos estagiários estudarem um caso clínico (Anexo 4) e resumirem uns artigos referentes à depressão para apresentarem nos últimos dias do estágio. Assim sendo, formaram-se grupos em que cada um explorava uma das três vertentes da doença: fisiopatologia, tratamento ou biomarcadores.

A realização do caso clínico permitiu-me ter um maior contacto com o sistema informático, o SGICM-LF, e colocar em prática conhecimentos adquiridos durante o MICEF. Por outro lado, a exposição dos artigos, possibilitou abordar a depressão de uma forma mais aprofundada comparativamente à lecionada durante o curso e ficar a par dos recentes avanços realizados nesta área.

Para além do referido anteriormente, enquanto estive no setor da Distribuição e no Ambulatório do S. Jerónimo, pesquisei incompatibilidades de medicamentos utilizados no serviço de obstetrícia da MBB e elaborei a ficha de informação ao doente respeitante ao medicamento Cabometryx® (cabozantinib) e o procedimento operativo normalizado (PON) relativo à preparação da solução injetável, pronta a administrar, de Citarabina, respetivamente. Acredito que a realização destas tarefas resultou em experiências de grande valor e que facilitaram a minha integração nas unidades em causa.

4.1.4. Caderno de estagiário

O caderno de estagiário inclui-se nos aspetos positivos do estágio, pois, a meu ver, não só permitiu orientar o meu percurso de estágio, através do registo das atividades, como também assimilar os processos envolvidos no circuito do medicamento.

4.1.5. Apresentações dos setores dos SF

Nas primeiras semanas do estágio curricular, os estagiários assistiram a quatro apresentações relativas aos temas “Distribuição”, “Farmacotecnia”, “Gestão e Aprovisionamento” e “Ensaio Clínicos”. Consistiram em apresentações expostas por farmacêuticos e que, segundo o meu ponto de vista, enriqueceram o estágio, uma vez que dada a inviabilidade de integrar todos os setores, permitiu conhecê-los um pouco mais no que respeita ao funcionamento de cada um.

4.1.6. Sistema de Garantia da Qualidade e Gestão do Risco

Um Sistema de Garantia da Qualidade baseia-se na existência de procedimentos padronizados⁴. Nos SF, estes são escritos, documentados e regularmente revistos e atualizados para todas as atividades farmacêuticas, tendo como foco o aperfeiçoamento da qualidade do serviço prestado.

A “Gestão do Risco”, isto é, o “processo através do qual as organizações lidam com o risco associado à sua atividade” também é de extrema importância, na medida em que, tem como objetivo diminuir a probabilidade de ocorrência de efeitos, erros e falhas². Nos SF, o incorreto manuseamento dos medicamentos pode conduzir a muitos custos, mortalidade e morbidade e pode ser evitado implementando rotinas de gestão do risco (planos de segurança).

A título de exemplo, pude constatar que na UPC não se manipulam na mesma câmara as ampolas dos agentes alquilantes, cisplatina (dosagem 1 mg/mL) e carboplatina (dosagem 10 mg/mL), assim como nem o biossimilar e o respetivo medicamento biológico de referência ou até medicamentos que apresentem colorações idênticas, por questões de segurança.

Importa ainda mencionar que na manipulação de radiofármacos tem-se em consideração três regras básicas para reduzir a exposição à radiação: manipular durante o menor tempo possível, aumentar a distância ao manipulador (recorrendo a pinças) e utilizar proteções de chumbo entre a fonte e o operador (proteções de chumbo para as ampolas e seringas e CFALV revestida com chumbo).

4.2. Pontos Fracos (*Weaknesses*)

4.2.1. Impossibilidade de integrar todos os setores dos SF

Visto que o estágio em farmácia hospitalar apresentou duração de dois meses, não foi possível passar por todos os setores dos SF e, por alguns que passei, creio que a duração do estágio se revelou insuficiente para assimilar todos os aspetos relativos ao funcionamento do mesmo, destacando-se o setor da Farmacotecnia em que apenas estive uma semana em cada unidade.

4.2.2. Estágio observacional

Durante o meu estágio curricular percecionei que devido à elevada quantidade de trabalho que os farmacêuticos possuem e à necessidade de ter que haver sempre validação de cada ação efetuada pelo estagiário tem-se pouca autonomia e o estágio acaba por ser maioritariamente observacional. Não obstante, todos os farmacêuticos com os quais contactei deram-me oportunidade de realizar algumas atividades de cada setor, sob a sua supervisão.

4.2.3. Impossibilidade de contactar com determinadas atividades realizadas no setor da Distribuição e na Radiofarmácia

Os farmacêuticos estão sujeitos à rotatividade entre as diferentes unidades que compõem o setor da Distribuição. A Dra. Rosângela Garcia que me acompanhou durante o mês que estive neste setor não passou pela secção de distribuição de psicotrópicos ou estupefacientes nem participou em reuniões clínicas.

Além do mais, enquanto estive na Radiofarmácia, não tive oportunidade de assistir ao procedimento de marcação de leucócitos com ^{99m}Tc cujo intuito é localizar o foco da infeção, quando este é desconhecido (cintilografia com leucócitos marcados).

4.3. Oportunidades (*Opportunities*)

4.3.1. Perceção da atividade farmacêutica em ambiente hospitalar e estágio num hospital de referência e com múltiplas valências

O Estágio Curricular em Farmácia Hospitalar assumiu-se como a minha primeira convivência com a realidade hospitalar, contribuindo para a perceção da atividade farmacêutica no meio hospitalar. O facto de ter realizado estágio no CHUC, hospital considerado de referência e com múltiplas valências, permitiu-me contactar com diversas áreas do domínio da Farmácia Hospitalar e ganhar alguma experiência e preparação para o meu futuro profissional.

4.3.2. Participação em formações e visitas aos serviços clínicos de Ginecologia e Neurocirurgia

Foi-me dada a oportunidade de participar numa formação referente ao beta-glucano e em idas aos serviços clínicos, como por exemplo, aos serviços de Ginecologia e Neurocirurgia cujo objetivo foi averiguar como é que os enfermeiros procediam à impressão do mapa das alteradas e a que horas o faziam e se o mesmo se encontrava em concordância com as alterações da prescrição.

Na formação mencionada anteriormente, apresentou-se o Woulgan® Gel cujo princípio ativo é o beta-glucano solúvel e que é indicado para o uso em feridas de cicatrização lenta (especialmente em úlceras de pressão e diabéticas) duas a três vezes por semana.

4.4. Ameaças (Threats)

4.4.1. Escassa interação com o doente internado e com o médico

A farmácia clínica é um conceito que remete para uma intervenção farmacêutica baseada no doente, tendo-se em conta a melhor forma de lhe dispensar os cuidados farmacêuticos com os menores riscos possíveis⁴. Para tal, o FH deve fazer parte da equipa clínica, seguindo continuamente o doente nos serviços.

Durante o período de estágio, pude observar que o contacto do farmacêutico com o doente internado é frequentemente inexistente. Na minha opinião, a interação com o doente internado trata-se de um aspeto fulcral, na medida que, possibilita uma validação da prescrição mais conscienciosa e adaptada ao contexto clínico de cada doente.

Considero também que um maior contacto entre o médico e o FH seria favorável, pois contribuiria para uma maior otimização das tabelas terapêuticas prescritas (antibioterapia mais dirigida, menor número de interações e de erros nas doses e na via de administração, etc.).

4.4.2. Aptidões do FH subaproveitadas

Julgo que as competências do FH são subaproveitadas: por exemplo, nos cuidados farmacêuticos poderiam ser desenvolvidas mais atividades, destacando-se a monitorização farmacocinética de um maior número de fármacos (digoxina, varfarina, etc.) para além de antibióticos e a reconciliação da medicação trazida do domicílio para o hospital e aquando a alta do doente.

4.4.3. Implementação do novo Sistema Informático SGICM-LF da Glintt

O FH deve assegurar o respeito pelos “7 Certos”: doente certo, medicamento certo, dose certa, via de administração certa, tempo de administração certo, com a informação certa e a documentação certa. Por isso, um dos passos que se deve ter em consideração durante a validação de uma prescrição é o de analisar se a tabela terapêutica prescrita se adequa ao diagnóstico referido. Durante o tempo de estágio, pude observar que o sistema SGICM-LF apresenta algumas falhas, sendo uma delas a não inclusão do campo “diagnóstico”, ficando assim comprometido o processo de dupla - verificação efetuado pelo FH.

Adicionalmente, saliento que no SGIMCM - LF os “alertas de interações” surgem tanto para o médico como para o farmacêutico e, por isso, considero que a decisão cabe ao médico, a partir do momento em que este é alertado e, mesmo assim, prossegue com a prescrição. Consequentemente, a capacidade de intervenção do FH, no sentido de maximizar a segurança e eficácia da terapêutica, torna-se limitada.

4.4.4. Escassas oportunidades de emprego em farmácia hospitalar

O acesso à carreira de farmacêutico hospitalar depende da abertura de concursos para farmacêuticos. Para além de se privilegiar os candidatos com experiência profissional na área hospitalar, a frequência com que se procede à abertura destes concursos é baixa. Deste modo, as oportunidades de emprego em farmácia hospitalar são escassas para os estagiários, pelo que considero uma ameaça.

5. Considerações Finais

O Estágio Curricular em Farmácia Hospitalar contribuiu para reconhecer o papel relevante do farmacêutico no circuito do medicamento desde a sua aquisição até à administração, sendo um elemento essencial no funcionamento do hospital.

Julgo que para um conhecimento mais aprofundado dos setores integrados, o período de estágio foi curto. Porém, ressalvo que todo o percurso de estágio no CHUC foi uma mais-valia como primeiro contacto com o ambiente hospitalar. De entre os setores pelos quais passei, gostei sobretudo do Ambulatório, um setor que possibilita um maior contacto com o doente e que me despertou interesse pela importância que o farmacêutico desempenha no esclarecimento de dúvidas dos doentes.

Em suma, depreendo que é fundamental que exista uma maior interação entre farmacêuticos e serviços clínicos de modo a garantir uma terapêutica eficaz e segura ao doente.

6. Referências Bibliográficas

1. Decreto-Lei n.º 44204, de 2 de fevereiro de 1962 - **Regulamento geral da Farmácia Hospitalar**. Diário do Governo n.º 40/1962 – Série I.
2. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Manual de Boas Práticas de Farmácia Hospitalar**, Capítulo I: Processos de Suporte. (2018) 6-7.
3. Decreto-Lei n.º 30/2011, de 2 de março de 2011. Diário da República n.º 43/2011 – Série I.
4. BROU, M. H. L. *et al.* - **Manual da Farmácia Hospitalar**. (2005) 1-69. ISBN 972-8425-63-5.

ANEXOS

ANEXO I - Impresso de requisição de estupefacientes

REQUISIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS SUAS PREPARAÇÕES COMPREENDIDAS NAS TABELAS I, II, III E IV, COM EXCEÇÃO DA II-A,
ANEXAS AO DECRETO-LEI N.º 15/93, DE 22 DE JANEIRO, COM RECTIFICAÇÃO DE 20 DE FEVEREIRO

N.º

Serviços Farmacêuticos
do

Código

SERVIÇO
SALA

Medicamento (D.C.I.)	Forma Farmacêutica	Dosagem	Código
----------------------	--------------------	---------	--------

Nome do Doente	Cama/ Processo	Quantidade Pedida Ou Prescrita	Enfermeiro que administra o Medicamento		Quantidade Fornecida	Observações
			Rubrica	Data		
		Total			Total	

Assinatura legível do director de serviço ou legal substituo Data ___/___/___ N.º Mec. _____	Assinatura legível do director do serviço farmacêutico ou legal substituto. Data ___/___/___ N.º Mec. _____	Entregue por (ass. Legível) _____ N.º Mec. _____ Data ___/___/___ Recebido por (ass. Legível) _____ N.º Mec. _____ Data ___/___/___
--	---	--

ANEXO 3 - Boletim de justificação clínica

Justificação Clínica de Medicamentos do C.H.U.C., E.P.E.

Autorização (D.C./ C.A.)

Data: ___/___/___

- A justificação clínica é da responsabilidade do médico com categoria de assistente, assistente graduado ou chefe de serviço. O médico prescriptor deverá preencher integralmente todos os campos da página 1 deste formulário, devidamente datada.
- A justificação clínica preenchida é enviada aos Serviços Farmacêuticos, que elaboram informação técnica e enviam ao Diretor do Serviço, devidamente datada.
- O Diretor de Serviço emite parecer e informa sobre cabimentação de custos no Orçamento Sectorial do Serviço e envia para o Diretor Clínico, devidamente datada.
- O Diretor Clínico emite parecer.
- O médico prescriptor é informado pelos Serviços Farmacêuticos do parecer.

Doente:

Nome: _____
P.U. _____ Serviço _____
Idade _____ Residência: _____
Diagnóstico (s) _____

Medicamento:

D.C.I. _____ F. Farm. _____ V. Adm. _____
Dose _____ Freq. _____ Grupo Farmacoterapêutico _____
_____ Duração previsível do tratamento _____

Justificação clínica da opção terapêutica (Anexar resumo da história clínica - obrigatório em situações a definir pela CFT; outros elementos de referência científica poderão ser anexados para melhor fundamentação. Caso existam medicamentos similares no Formulário C.H.U.C., porque razão não são considerados como adequados?)

Monitorização da eficácia terapêutica a realizar em (dia /mês / ano): _____

Médico:

Nome legível: _____ Nº mec. _____ Telef/ Email _____
Serviço: _____ Assistente Assistente Graduado Chefe de Serviço
Assinatura: _____ Data de prescrição ___/___/___

ANEXO 4 - Elaboração do caso clínico

Caso Clínico

XXXXXXXX XXXXXXXX XXXXXX | PU YYYYY

1. **Data Nascimento:** 21/08/1950 (69 anos), nacionalidade holandesa

2. **Serviço Internamento:** HUC-Ginecologia (Unidade A)

Entrada: 17-02-2020

Saída: 20-02-2020

3. **Diagnóstico:** Discreta a moderada incontinência urinária de esforço (IUE) associada a cistocele (2º grau) e reto-elitrocele (3º grau).

4. **Sinais Vitais:** FC 62 bpm

5. Exames Complementares:

Antecedentes MCDTs:


- Ecografia ginecológica endovaginal (janeiro 2020): útero retrovertido, endométrio linear, miométrio homogêneo, OD 13x8mm; OE 16x9mm.
- Citologia do colo do útero (outubro 2018): Negativa para lesão intraepitelial ou neoplasia maligna.
- Observação ginecológica (julho 2019): Reto-elitrocele "medonho"; Cistocele 2-3º grau; Discreto histerocele; Teste da tosse: positivo (fuga com tosse); Mobilidade uretral: aumentada; Resíduo urinário pós-miccional: 50cc.

Rotinas pré-operatórias (17-02-2020)


- Observação ginecológica no dia 17-02-2020: cistocele 2º grau; sem histerocele; reto-elitrocele 3º grau. É frequente o reto-elitrocele não a deixar iniciar rapidamente a micção.
- ECG: RS (com ritmo sinusal)
- Raios x tórax: normal
- Hemograma com leucograma

	Resultado	Valores de referência
Leucócitos	5,4 x10 ⁹ /L	4,0 – 10,0
Neutrófilos	2,70 x10 ⁹ /L	2,0 – 7,0
Linfócitos	1,95 x10 ⁹ /L	1,0 – 3,0
Monócitos	0,42 x10 ⁹ /L	0,2 – 1,0
Eosinófilos	0,25 x10 ⁹ /L	0,0 – 0,5
Basófilos	0,04 x10 ⁹ /L	0,0 – 0,1
Eritrócitos	4,42 x10 ¹² /L	3,80 – 4,80
Hemoglobina	13,7 g/dL	12,0 – 16,0
Hematócrito	39,8 %	36,0 – 46,0
Volume Corpuscular Médio	90,0 fL	83,0 – 101,0
Hemoglobina Corpuscular Média	31,0 pg	27,0 – 32,0
C. Hemoglobina Corpuscular Media	34,4 g/dL	32 - 35
Coefficiente Variação Eritrócitos	13,4	11.6 - 14

Plaquetas	223 x10 ⁹ /L	150-400
Volume Plaquetar Médio	10,0 fL	
Plaquetócrito	0,22%	
Coefficiente Variação Plaquetas	10,8	

 Provas da coagulação

	Resultado	Valores de referência
Tempo de Protrombina (TP)	10,3 seg.	9,4 – 12,5
Controlo	11,8 seg.	
Protrombinémia	119%	70 - 120
Relação Normalizada (INR)	0,87	0,2 – 1,0
Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado	28,1 seg.	23,4 – 35,4
Controlo	29,4 seg.	
Rácio	0,96	0,81 – 1,19

 Dados bioquímicos

	Resultado	Valores de referência
Glicose	121 mg/dL	60-109
Azoto ureico	19,0 mg/dL	7,9-20,9
Creatinina	0,83 mg/dL	0,55-1,02
Sódio	140 mmol/L	136-146
Potássio	4,7 mmol/L	3,5-5,1
Osmolalidade	283 mOSM/kg	260-302

 Virologia

	Resultado	Valores de referência
Hepatite B - HBcAc (total)	0,39	S/CO
Interpretação	Não Reativo	Não Reativo: <0,9 Equivoco: 0,9 – 1,00 Reativo: ≥ 1,00
Hepatite C - anti HCV (IgG/IgM)	0,07	S/CO
Interpretação	Não Reativo Ausência de Anticorpos específicos	Não Reativo: <0,9 Reativo: ≥ 1,00
HIV 1 e 2 (Antigénio/Anticorpos)	0,08	S/CO
Interpretação	Não Reativo Ausência de Antigénio e Anticorpos específicos	Não Reativo: <0,9 Equivoco: 0,9 – 1,00 Reativo: ≥ 1,00

✚ Bacteriologia

Urina (Jato médio)

Exame Cultural (Quantitativo):

Negativo

6. Tratamento médico

- ✚ Antecedentes médicos: Patologia degenerativa (osteoarticular); Depressão-ansiedade (associada à alteração do local de residência e à presença de dificuldades de comunicação).
- ✚ Antecedentes cirúrgicos: Ablação do endométrio por método histeroscópico em 2002 (devido a menometrorragias); cirurgia a hérnia discal em outubro de 2019.
- ✚ Medicação habitual: Tramadol + Paracetamol (zilpen®) 3id, oxazepam (serenal®) à noite, pregabalina 1id, glucosamina 1id.
- ✚ Alergias: Penicilina.
- ✚ Sem história de transfusões.
- ✚ Hábitos: ex-fumadora desde julho de 2019; 5 copos vinho tinto por dia.
- ✚ Antecedentes familiares: Pai com antecedentes de cancro da próstata. Mãe com Alzheimer.
- ✚ Menarca: 14 anos; Fluxo: escasso e irregular (anorexia mental); Início da vida sexual ativa: 14 anos; N° parceiros: 2; Gestações/Partos: 4/3; Idade do 1º parto: 23; Último Parto: 37; Tipos de Partos: normais e 1 pélvica; Menopausa: 56 anos.

Trata-se de uma doente de nacionalidade holandesa com 69 anos internada para ser submetida a colpoplastia anterior e colpoperineoplastia posterior no dia 18 fevereiro (correção da parede vaginal anterior e posterior e reconstrução do períneo). Precedeu-se ainda há correção da IUE com colocação de prótese/rede (sling) TVT Abbrevio® na porção média da uretra. Seguimento na consulta de Ginecologia urológica (MBB).

Medicamento	17-02	18-02	19-02	20-02	Observações
Ciprofloxacina 400 mg (toma única)					Administrado não às 7h como previsto, mas antes às 12h. Justificação: de acordo com o protocolo do serviço.
Cetorolac 30 mg 8/8h					
Escitalopram 20 mg 1 id					Não administrado no dia 18-02. Justificação: pausa alimentar.
Enoxaparina sódica 40 mg 1 id					
Metamizol magnésico 575 mg 3 id					
Oxazepam 15 mg à noite					
Paracetamol 500 mg SOS até 3 id					Não foi necessário administrar.
Paracetamol 1000 mg 8/8h					Dia 19-02: passou a SOS até 2 id.
Polielectrol + Glucose 1000 ml					Dia 18-02: a dosagem alterou de 1000 ml para 2000 ml 1 id.
Pregabalina 150 mg 1 id					Não administrado no dia 18-02. Justificação: pausa alimentar.
Tramadol 100 mg SOS até 3 id					Não foi necessário administrar.

Legenda: Amarelo – prescrito; Azul – administrado.

7. Tabela Terapêutica – INTERNAMENTO

Medicamento	FF	Dose	Via adm.	Freq.	Horário	Qt.	Observações
Ciprofloxacina 200 mg/100 ml Sol inj Fr 100 ml IV	Solução injetável	400 mg	IV	Toma única	7h	2	Profilaxia pré-operatório
Pregabalina 150 mg Cáps.	Cápsulas	150 mg	Oral	1 id	9h	1	Medicação habitual - tratamento da ansiedade
Escitalopram 10 mg Comp.	Comprimido revestido	20 mg	Oral	1 id	9h	2	Controlo da ansiedade/preocupação

							excessiva associados ao ambiente hospitalar
Oxazepam 15 mg Comp.	Comprimido	15 mg	Oral	Noite	Noite	1	Medicação habitual - tratamento da insónia
Enoxaparina sódica 40 mg/0.4 ml Sol inj Ser 0.4 ml SC	Solução injetável	40 mg	SC	1 id	19h	1	Profilaxia da doença tromboembólica venosa
Polielectrol + Glucose 50 mg/ml Sol inj Fr/Sac 1000 ml IV	Solução injetável	1000 mL	IV	1 id	9h	1	Corretivo das alterações hidroeletrólíticas
Polielectrol + Glucose 50 mg/ml Sol inj Fr/Sac 1000 ml IV	Solução injetável	2000 mL	IV	1 id	9h	2	Corretivo das alterações hidroeletrólíticas
Paracetamol 10 mg/ml Sol inj Fr 100 ml IV	Solução injetável	1000 mg	IV	8/8h	7h - 15h - 23h	3	Controlo da dor pós-operatório
Paracetamol 10 mg/ml Sol inj Fr 100 ml IV	Solução injetável	1000 mg	IV	SOS2	SOS até 2 id	2	Controlo da dor pós-operatório
Cetorolac 30 mg/1 ml Sol inj Fr 1 ml IM IV	Solução injetável	30 mg	IV	8/8h	7h - 15h - 23h	3	Controlo da dor pós-operatório
Tramadol 100 mg/2 ml Sol inj Fr 2 ml IM IV SC	Solução injetável	100 mg	IV	SOS3	SOS até 3 id	3	Controlo da dor pós-operatório
Metamizol magnésico 575 mg Cáps	Cápsulas	575 mg	Oral	3id	7 h - 15 h - 23 h	3	Controlo da dor pós-operatório
Paracetamol 500 mg Comp	Comprimido	1000 mg	Oral	SOS3	SOS até 3 id	6	Controlo da dor pós-operatório

8. Interações

Tipo de interação	Associação	Observações
Moderada	Enoxaparina sódica + Escitalopram	O escitalopram (SSRI) pode potenciar o risco de hemorragia (incluindo hemorragia GI) em doentes a fazer terapêutica com enoxaparina, uma vez que possui propriedades antiagregantes plaquetares.
Moderada	Oxazepam + Pregabalina/ Oxazepam + Escitalopram/ Pregabalina + Escitalopram	Os efeitos depressores do SNC podem ser aumentados, especialmente em doentes idosos - pode ocorrer sedação e comprometimento da atenção, julgamento, pensamento e habilidades psicomotoras.
Major	Escitalopram + Ciprofloxacina	O uso do fármaco escitalopram tem sido associado ao prolongamento do intervalo QT (dependente da dose). A administração concomitante com a ciprofloxacina que também pode causar prolongamento do intervalo QT aumenta o risco de ocorrerem arritmias ventriculares (<i>torsade de pointes</i> e morte súbita).
Major	Cetorolac + Enoxaparina sódica/ Metamizol magnésico + Enoxaparina sódica	O cetorolac e o metamizol (AINEs) potenciam o efeito anticoagulante da enoxaparina sódica ao inibir indiretamente a produção de tromboxano A2 nas plaquetas (aumento do risco de hemorragia).
Moderada	Cetorolac + Escitalopram/ Metamizol magnésico + Escitalopram	Os fármacos apresentam como efeito secundário a possibilidade de provocarem hemorragias (efeito aditivo).
Major	Cetorolac + Metamizol magnésico	Duplicação da terapêutica AINE - aumento da toxicidade: perturbações digestivas (náuseas, vômitos, dispepsia, diarreia, úlceras e hemorragias GI, toxicidade hepática), inibição da agregação plaquetar, disfunção renal e reações de hipersensibilidade.

Consultado em: www.drugs.com.

9. Orientação Terapêutica a prosseguir

- No dia seguinte à cirurgia (19-02) realizou-se treino vesical.

- Treino vesical: 150cc.
- Resíduo pós – miccional: 100cc (valor alto).

- Quando o resíduo pós – miccional foi inferior a 50cc, no dia 20-02, a doente teve alta. Retirou-se a sonda vesical, 48h após a cirurgia.

- Os pontos são absorvíveis, não sendo necessário retirá-los.

- Após a alta, a doente deve retomar a medicação habitual e deve evitar fazer esforços (durante o ato de defecar, exercício físico, levantar pesos superiores a 5kg, etc.) e ter relações sexuais pelo menos durante cinco a seis semanas (tempo necessário para a cicatrização é cerca de 3 meses). Além do mencionado anteriormente, deve adotar a seguintes medidas não farmacológicas:

- Não deixar a bexiga cheia;
- Ir à casa de banho de 2 em 2 horas;
- Beber muita água e ingerir fibras;
- Não ingerir muitos líquidos a partir do final da tarde.

- Cerca de 15 dias/1 mês após a cirurgia, a doente tem uma consulta pós-operatório cujo objetivo é avaliar os sinais de alerta: queixas de febre, dor, corrimento com odor fétido, etc.

10. Tabela Terapêutica – AMBULATÓRIO EXTERNO

Não aplicável.

11. Reconciliação terapêutica

Não aplicável.

12. Discussão

Doente com 69 anos, de nacionalidade holandesa, foi internada no dia 17 de fevereiro para ser submetida a colpoplastia anterior (correção do prolapso da bexiga que chegava até à abertura da vagina – cistoceleto 2º grau), colpoperineoplastia posterior (correção do prolapso do reto e do intestino delgado que já saíam através da vagina – reto-elitocelo 3º grau) e correção da IUE com recurso ao *slings* TVT Abbrevio®.

A incontinência urinária de esforço (IUE) consiste na perda involuntária de urina desencadeada pelo esforço (tosse, cargas, desporto, etc.). A presença de hiper mobilidade uretral associa-se a situações de IUE não complicada, sendo fator preditivo de sucesso do tratamento cirúrgico.

A presença de protusões dos órgãos pélvicos para o canal vaginal acontece quando há enfraquecimento e rutura dos tecidos (musculatura do períneo e fásia) que suportam os mesmos. O prolapso tem como causas mais comuns a gravidez, os partos e a menopausa (quando a mulher chega à menopausa, o défice hormonal provoca perda da elasticidade da musculatura). Os procedimentos cirúrgicos mencionados anteriormente envolvem reparar a rotura e, nos casos mais graves, colocar uma rede/prótese para reforçar a musculatura.

A doente apresenta patologia degenerativa osteoarticular e depressão/ansiedade associada à alteração do local de residência e à presença de dificuldades de comunicação (diagnóstico sem distinção das patologias). E, por conseguinte, toma a seguinte medicação habitual: Tramadol + Paracetamol (zilpen®) 3id e glucosamina I id cuja indicação terapêutica é aliviar a dor provocada pela degeneração osteoarticular; oxazepam (serenal®) à noite para o tratamento de perturbações do sono (insónia) e pregabalina I id para o tratamento da ansiedade.

Fez-se as rotinas pré-operatórias (análises + Raios x tórax + ECG), pedida classificação e reserva de 2 UCE. A doente assinou folha de consentimento informado. Das análises efetuadas, concluiu-se que todos os parâmetros avaliados estavam dentro dos valores de referência, à exceção da glicose em jejum cujo valor (121 mg/dL) encontrava-se acima do valor de referência (isto pode ser explicável pela toma de glucosamina que está associada a elevações da glicémia).

A terapêutica de internamento incluiu antibioterapia pré-operatória, em toma única, terapêutica profilática da doença tromboembólica venosa, medicação habitual (oxazepam e pregabalina), escitalopram, terapêutica da dor (pós-operatória) e polielectrol + glucose (correção das alterações hidroelectrolíticas pós-cirurgia). Como a doente é alérgica às penicilinas, optou-se por uma fluoroquinolona (ciprofloxacina) em vez da cefalosporina cefazolina que é, normalmente a 1ª escolha, na profilaxia da cirurgia urogenocológica.

Em ambiente hospitalar, a ansiedade tem tendência a agravar-se e é comum estados de preocupação excessiva e desorientação, especialmente em idosos e, portanto, introduziu-se mais um fármaco com esta indicação na tabela terapêutica, o escitalopram 20 mg I id. Suspendeu-se a toma do tramadol + paracetamol e da glucosamina, pois a dor na doença osteoarticular tende a piorar com os movimentos e o esforço durante o dia, porém melhora em repouso e, além disso, a doente iria ser sujeita a uma cirurgia o que implicava analgesia pós-operatória.

Das interações farmacológicas verificadas durante o internamento, salienta-se que a mais relevante e que pode causar preocupação é a interação verificada entre a ciprofloxacina e o escitalopram. Relativamente às restantes, podem não se considerar significativamente relevantes dado que se tratou de um internamento curto (4 dias) e se procedeu a uma monitorização regular da doente.

Com a utilização da prótese TVT Abbrevio® há um aumento do risco de ocorrência de algumas complicações como a infeção. Deste modo, considero que no período pós-operatório se poderiam ter instituído lavagens com antisséptico ou, alternativamente, antibioterapia profilática. Ressalvo também que se deve aconselhar a doente a realizar análises regularmente para monitorizar a glicémia e a evitar consumir álcool, pois este provoca potenciação dos efeitos dos depressores do SNC.

13. Bibliografia

- Simón, Aurora. (2017) “Hiperglicemia e medicamentos”, publicação (cim), 27 de Dezembro.
- Base de dados Lexicomp - Clinical Drug Information.
- Sociedade Portuguesa de Ginecologia (2018) Consenso Nacional sobre Urogenecologia. Ad Médic, Lda.

Parte II

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Torres Padilha

Lista de Abreviaturas

AMI - Assistência Médica Internacional

FTP - Farmácia Torres Padilha

INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P.

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM - Medicamentos não sujeitos a receita médica

MSRM - Medicamentos sujeitos a receita médica

PIM - Preparação Individualizada da Medicação

PVP - Preço de Venda ao Público

QR - do inglês, *Quick Response*

SNS - Serviço Nacional de Saúde

SWOT - do inglês, *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats* (Forças, Oportunidades, Fraquezas, Ameaças)

TAF - Técnico Auxiliar de Farmácia

I. Nota Introdutória

A Farmácia Comunitária é a “face mais visível da profissão”, como afirma a Ordem dos Farmacêuticos¹, sendo o serviço de saúde mais acessível à população, essencial para o funcionamento completo do Serviço Nacional de Saúde (SNS), onde se realizam atividades orientadas para o medicamento e para o cidadão².

Mais do que meramente dispensar medicamentos, o farmacêutico comunitário é um agente ativo na sociedade, dotado de elevada responsabilidade social e noção deontológica, que promove a saúde e o bem-estar do cidadão, assegurando o direito a uma terapêutica com qualidade, eficácia e segurança².

O presente relatório de estágio assume a forma de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), referente à frequência do Estágio Curricular em Farmácia Comunitária, o qual se realizou na Farmácia Torres Padilha (FTP) e teve início a 2 de março e posterior término a 19 de agosto de 2020, sob a orientação da Dra. Maria João Pedroso. Saliento que o estágio este suspenso desde o dia 18 de março até 11 de maio, em virtude da pandemia COVID-19 que assolou a comunidade mundial.

2. Farmácia Torres Padilha

2.1. Localização

Sob a Direção Técnica da Dra. Maria Alcina Cravo, a FTP encontra-se em funcionamento desde 2009 e localiza-se na Av. Dr. José Maria Cardoso, Loja I, no concelho da Lousã. A rentabilidade da farmácia é maioritariamente oriunda de utentes habituais e fidelizados provenientes quer da zona, quer de aldeias vizinhas.

2.2. Equipa

A equipa técnica da FTP é constituída por oito colaboradores que asseguram o seu funcionamento de segunda a sexta-feira das 9h às 13h e das 14:30 às 19h e sábados das 9h às 13h, excetuando os dias em que a farmácia efetua o turno de serviço, encontrando-se, neste caso, ininterruptamente aberta das 9h às 21h.

Tabela I. Equipa técnica da Farmácia Torres Padilha.

Equipa	Cargo/Função
Dra. Maria Alcina Cravo	Proprietária/Diretora técnica
Dra. Maria João Pedroso	Farmacêutica
Dra. Joana Constante	Farmacêutica
Dra. Carolina Lopes	Farmacêutica
Dra. Ana Rita Serra	Gestora/ Técnico auxiliar de Farmácia (TAF)
Sr. Paulo Graça	Técnico de Farmácia
Marina Lourenço	Técnica de Farmácia
Manuel Cravo	TAF

2.3. Espaço físico e funcional

Em concordância com o disposto no Decreto-Lei n.º 75/2016 de 8 de novembro, e de forma a assegurar um ambiente adequado à prestação de cuidados de saúde, as farmácias devem dispor das seguintes divisões: sala de atendimento ao público, armazém, laboratório e instalações sanitárias³.

2.3.1. Back-Office

O *back-office* da FTP é constituído por um armazém, área de receção de encomendas, um laboratório para preparação de manipulados e reconstituição de preparações extemporâneas, um gabinete da Direção Técnica, uma zona reservada aos colaboradores e instalações sanitárias destinadas aos colaboradores da farmácia.

Na área de receção de encomendas figuram dois postos munidos de computador, leitor ótico, impressora, impressora de códigos de barras e rótulos, onde se procede igualmente à criação de encomendas, ao controlo de stocks e prazos de validade, à gestão de psicotrópicos e estupefacientes, à gestão de devoluções e à conferência e organização por lotes do receituário (exceto as receitas eletrónicas) para efeitos de faturação. Esta zona reúne também uma tabela de exposição de divisão de tarefas e objetivos e um conjunto de gavetas deslizantes, nas quais se armazenam medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) não genéricos organizados pelas secções “material de penso”, “ostomia”, “xaropes”, “saquetas”, “soluções”, “formas sólidas”, “pomadas/cremes/emulsões cutâneas”, “colírios”, “pomadas oftálmicas”, “gotas e bombas”, “vaginal”, “pílulas”, “antibióticos” e “veterinário”. Dentro destas secções encontram-se distribuídos alfabeticamente segundo a designação comercial.

Todos os excedentes e os MSRM genéricos encontram-se em prateleiras no armazém, estando estes últimos organizados por ordem alfabética da sua denominação comum internacional (DCI). No corredor para o armazém e para a área reservada aos colaboradores encontra-se alocado um frigorífico para conservar os medicamentos que requeiram condições de temperatura entre 2 e 8°C. Por sua vez, os medicamentos psicotrópicos e estupefacientes são armazenados no laboratório em local próprio de acesso restrito, segregados dos restantes fármacos.

2.3.2. Front-Office

A *front-office* da FTP alberga o gabinete de atendimento personalizado onde se realizam medições de parâmetros bioquímicos e fisiológicos (pressão arterial, glicémia e colesterol total), rastreios e a administração de vacinas; a sala de atendimento ao público; um gabinete para aconselhamento e acompanhamento nutricional e instalações sanitárias destinadas aos utentes. A sala de atendimento é constituída por cinco balcões de atendimento, cada um dotado de um computador com o sistema informático Sifarma 2000[®], uma unidade de leitura ótica de código de barras e código bidimensional QR e uma impressora de emissão de faturas e impressão do verso das receitas manuais. Aqui existem ainda bancos para uma espera confortável, um sistema de atribuição de senhas, uma máquina de *check-up* de saúde (pressão arterial, altura, peso, índice de massa corporal e gordura corporal), lineares e gôndolas que dispõem variados produtos de dermocosmética separados por marca (destacam-se as marcas MartiDerm[®], Lierac[®], La Roche-Posay[®] e ISDIN[®]) bem como produtos de puericultura e produtos de uso veterinário de venda livre e, por último, uma área “*over the counter*”, inacessível ao utente, destinada à exposição de medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM), produtos da linha de emagrecimento EasySlim[®], produtos de higiene oral, fitoterápicos, homeopáticos e suplementos alimentares. A parte inferior da área posterior aos balcões inclui também gavetas com outros suplementos alimentares e MNSRM organizados por ordem alfabética e por patologia, respetivamente.

Em prol da defesa da saúde pública, a FTP dispõe de vários serviços que demonstram concretamente a sua responsabilidade social para com o cidadão em geral, destacando-se a recolha de radiografias com mais de 5 anos ou sem valor de diagnóstico para posterior reciclagem nos armazéns da Assistência Médica Internacional (AMI) (a prata obtida constitui uma das fontes de receitas para o trabalho da AMI em território português)⁴; a recolha de embalagens e medicamentos fora do prazo de validade, para posterior tratamento na ValorMed (uma entidade sem fins lucrativos tutelada pela Agência Portuguesa do Ambiente)⁵ e o programa de troca de seringas que envolve a entrega gratuita de *kits* de prevenção da

transmissão do vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), vírus da Hepatite B e vírus da Hepatite C por via sexual, endovenosa e parentérica em utilizadores de drogas injetáveis, mediante recolha de seringas usadas⁶.

3. Análise SWOT

A análise SWOT que se segue pretende identificar, internamente, os pontos fortes e os pontos fracos e, externamente, as oportunidades concedidas e as ameaças sentidas ao longo do estágio na FTP.

Tabela 2. Resumo da Análise SWOT.

Pontos Fortes	Pontos Fracos
<ul style="list-style-type: none"> • Localização próxima da farmácia à minha área de residência. • Dedicção e disponibilidade da equipa técnica. • Incentivo à autonomia. • Aprendizagem por fases. • Preparação de medicamentos manipulados. • Abrangência do período de estágio. 	<ul style="list-style-type: none"> • Impossibilidade de contactar com serviços farmacêuticos inovadores.
Oportunidades	Ameaças
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Cashguard</i>. • Participação de formações internas. • Aprendizagem contínua no que respeita a nomes comerciais de medicamentos, produtos de uso veterinário e dermocosméticos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Atualização constante de participações e preços. • Medicamentos esgotados. • Estabelecimentos de venda de MNSRM. • Pandemia COVID-19.

3.1. Pontos Fortes (*Strengths*)

3.1.1. Localização próxima da farmácia à minha área de residência

A localização próxima da FTP à minha área de residência constituiu uma mais-valia no que respeita à gestão do tempo e à produtividade no estágio.

3.1.2. Dedicção e disponibilidade da equipa técnica

Posso dizer que todos os colaboradores da FTP se mostraram sempre disponíveis e dedicados em promover o meu desenvolvimento contínuo, contextualizando e demonstrando previamente cada tarefa executada e incentivando à exposição de dúvidas, o que me deixou confortável na colocação de questões e facilitou a minha integração na dinâmica da equipa.

3.1.3. Incentivo à autonomia

Com o decorrer do tempo, fui encorajada a cada vez ser mais autónoma nas tarefas, o que considero um aspeto positivo, na medida em que, a consolidação de conhecimentos no que respeita ao funcionamento do Sifarma 2000®, o reconhecimento de erros e fraquezas e a confiança decorre de “fazer” e não apenas de “observar”.

3.1.4. Aprendizagem por fases

O plano de estágio iniciou-se com a receção de encomendas e posterior arrumação dos produtos recém-rececionados com o intuito de me familiarizar com a disposição dos produtos na farmácia. Na arrumação dos produtos é incutido o cuidado com os prazos de validade, de modo a se obedecer à regra “*first expired first out*”. À medida que era oportuno para a equipa, novas tarefas eram-me identificadas, com vista a poder assistir e/ou colaborar na realização das mesmas, destacando-se a medição de parâmetros bioquímicos e fisiológicos, a preparação de manipulados, a criação diária de encomendas, a realização de devoluções e a conferência e organização de receituário por lotes no final do mês para posterior faturação. No decurso do estágio, efetuei também a contagem física de produtos, por forma a avaliar a sua conformidade com o *stock* registado no Sifarma 2000®.

Durante o primeiro mês de estágio, foi-me dada a oportunidade de observar já certos atendimentos ao público, como posteriormente efetuar alguns acompanhada. Seguiu-se depois a realização simultânea de atendimentos de forma independente e de outras funções consoante as necessidades, fazendo-me sentir parte da equipa.

Presenciei a importância de confirmar com o utente se a medicação aviada é habitual ou não, por forma a prestar toda a informação oral e escrita necessária (modo de administração, posologia, duração do tratamento, possíveis efeitos secundários). A potencialidade de intervenção do farmacêutico é claramente maior no caso da indicação farmacêutica do que na dispensa de MSRM. No exercício da indicação farmacêutica, o farmacêutico deve estabelecer uma comunicação pertinente com o utente, de modo a conhecer os sintomas ou a razão da procura do farmacêutico, se é para ele a medicação, a duração do problema de saúde, medicação que o utente toma, entre outros.

Neste sentido, o atendimento ao público assumiu-se como a função mais desafiante e enriquecedora, permitindo a interação com diferentes realidades de utentes e perfis clínicos, o que contribuiu para o desenvolvimento de competências interpessoais, para a capacidade de adaptação e resposta rápida às variadas situações e para a aplicação de conhecimentos teóricos

de Bacteriologia, Parasitologia, Farmacologia, Farmácia Clínica e Indicação Farmacêutica a casos práticos (Anexo I).

Por último, realço que de acordo com o estabelecido pela Portaria n.º 284-A/2016 de 4 de novembro e somente em vigor desde agosto deste ano, as farmácias apenas podem dispensar ao utente, por mês, um máximo de 2 embalagens, por linha de prescrição, ou um máximo de 4 embalagens em dose unitária⁷. No entanto, em caso de necessidade de um número de embalagens superior para cumprir a posologia mensal, perda, extravio ou roubo de medicamentos, dificuldade do utente em deslocar-se à farmácia e ausência do país por tempo prolongado, é possível às farmácias dispensarem uma quantidade mensal superior⁷. Sendo frequente o desperdício de medicamentos devido a prazos de validade expirados e suspensão e/ou troca da terapêutica, congratulo a implementação desta medida a nível informático.

3.1.5. Preparação de medicamentos manipulados

Em virtude do progresso da Indústria Farmacêutica, a preparação de medicamentos manipulados, quaisquer formas magistrais ou preparados officinais, sob a responsabilidade de um farmacêutico, tem tido cada vez menor representatividade nas farmácias, justificando-se apenas em situações específicas de personalização da terapêutica e quando a terapêutica ou a forma farmacêutica pretendida não é comercializada. Durante o estágio, surgiu a oportunidade de colaborar na preparação de uma solução de álcool a 60° boricada à saturação indicada para uso externo no tratamento de otites externas. Além do mais, procedi algumas vezes à reconstituição de antibióticos comercializados sob a forma de pó liofilizado (preparações extemporâneas).

O cálculo do preço de venda ao público (PVP) dos medicamentos manipulados rege-se pelos critérios estabelecidos na Portaria n.º 769/2004 de 1 de julho, refletindo o valor dos honorários da preparação, preço das matérias-primas e o preço dos materiais de embalagem⁸. Os medicamentos manipulados passíveis de comparticipação pelo SNS (30% do respetivo PVP) encontram-se discriminados na listagem publicada em anexo ao Despacho n.º 18694/2010 de 16 de dezembro, e devem ser prescritos indicando, na receita médica, as substâncias ativas, dosagens, excipientes e forma farmacêutica⁹.

3.1.6. Abrangência do período do estágio

O estágio curricular em Farmácia Comunitária reuniu diversas estações, nomeadamente a primavera, o verão e o inverno. Por conseguinte, permitiu o contacto preciso tanto com os produtos mais procurados nas épocas mais frias do ano (antigripais,

sprays e colutórios anti-inflamatórios, pastilhas anti-inflamatórias, xaropes para a tosse seca e produtiva, etc.) como os mais vendidos nas épocas do ano marcadas pela ocorrência de picadas de insetos, alergias e queimaduras solares, incluindo protetores solares, cuidados pós-solares, cicatrizantes e regeneradores cutâneos, repelentes de mosquitos, anti-histamínicos, corticosteróides e descongestionantes nasais.

3.2. Pontos Fracos (*Weaknesses*)

3.2.1. Impossibilidade de contactar com serviços farmacêuticos inovadores

A população assistida pela farmácia é sobretudo idosa e polimedicada, sendo assim relevante a implementação de serviços farmacêuticos como a revisão da medicação, o acompanhamento farmacoterapêutico e a preparação individualizada da medicação. A revisão da medicação compreende uma análise estruturada e crítica da medicação do utente com o objetivo de reduzir o número de problemas relacionados com os medicamentos (tais como, a duplicação da terapêutica, interação medicamentosa, reação adversa, dosagem sub-terapêutica, problema de saúde não tratado, entre outros), otimizando assim o impacto dos medicamentos³. Na FTP, a revisão da medicação realiza-se no ato de dispensa, consistindo numa revisão da medicação simples a intermédia, baseada no histórico de medicamentos cedidos e/ou em dados fornecidos pelo utente. Já o serviço de acompanhamento farmacoterapêutico que inclui uma revisão da medicação inicial, a execução de um plano de intervenção e posterior acompanhamento do utente através de consultas entre este e o farmacêutico para garantir que os medicamentos que toma se mantêm os mais efetivos e seguros possível³, não se realiza na FTP, o que me impossibilitou de observar como se processam as consultas em contexto real e, subsequentemente, consolidar conhecimentos adquiridos na unidade curricular Farmácia Clínica. Por último, sublinho a não preparação individualizada da medicação (PIM) na FTP. A PIM envolve a organização da medicação do utente (formas farmacêuticas sólidas) em caixas dispensadoras próprias, conforme a respetiva posologia¹⁰. Este serviço é de enorme relevância, particularmente em regimes terapêuticos complexos, pois promove o uso racional do medicamento, minimizando assim o risco de não adesão não intencional à terapêutica.

3.3. Oportunidades (*Opportunities*)

3.3.1 Cashguard

A farmácia possui o “Cashguard” que consiste numa tecnologia que automatiza o pagamento, facilita a gestão dos totais de caixa diários e regista todos os movimentos de caixa

de cada operador¹¹. Isto agilizou o processo de devoluções de trocos eliminando o potencial risco de erros e permitiu o foco total no atendimento ao invés da contagem meticulosa de dinheiro.

3.3.2. Participação em formações internas

Embora não tenham surgido oportunidades para frequentar formações externas, tive a oportunidade de assistir a diversas formações internas de curta duração, durante o horário de funcionamento da farmácia, concedidas por delegados de informação médica provenientes de diferentes laboratórios, que possibilitaram assimilar novos conhecimentos e consolidar outros. Estas consistiam na apresentação das indicações terapêuticas, posologia, vantagens e estratégias de *merchandising* para produtos, particularmente da área da dermocosmética e dos suplementos alimentares, quer já comercializados quer prestes a serem lançados no mercado. Esta partilha de informação fez-se acompanhar por um cunho pessoal e crítico oriundo da equipa técnica que engrandeceu igualmente o meu estágio.

3.3.3. Aprendizagem contínua no que respeita a nomes comerciais de medicamentos, produtos de uso veterinário e a dermocosméticos

A maioria dos utentes reconhecia os medicamentos pelo nome comercial, o que no princípio se tornou um obstáculo no atendimento, tornando-o mais moroso, uma vez que a formação académica é orientada maioritariamente para os princípios ativos. Não entanto, solucionei sempre a situação recorrendo aos meios informáticos, ao diálogo com o utente a fim de perceber qual era a indicação terapêutica e à colaboração da equipa da farmácia. Como o domínio das designações comerciais é um processo de aprendizagem progressivo, enriquecido com a experiência profissional, no decurso do estágio, esta dificuldade foi sendo ultrapassada.

Outros desafios também se sobressaíram no início do estágio, destacando-se a falta de conhecimentos relativa à área dos produtos veterinários e a existência de extensas marcas e gamas de dermocosméticos. Em momentos de menor afluência à farmácia, foi-me transmitido os principais produtos de uso veterinário e cosméticos que a farmácia dispunha e as suas funcionalidades e vantagens, o que propiciou um à vontade cada vez maior no aconselhamento no âmbito destas duas vertentes. No entanto, ressalvo que a falta inicial de conhecimentos relacionados com os produtos veterinários poderia ser desde logo colmatada na unidade curricular Preparações de Uso Veterinário cuja abordagem que nela é feita não é a mais adequada em função do que é exigido no aconselhamento deste tipo de produtos.

3.4. Ameaças (Threats)

3.4.1. Atualização constante de participações e preços

Ao longo do estágio na FTP, pude presenciar que as alterações constantes feitas na participação dos medicamentos, as quais constituem situações externas à farmácia, e, por isso, nada dependiam dos colaboradores da farmácia, afetavam tanto as potenciais vendas que, por vezes, não se finalizavam como a relação com os utentes que desconfiavam do farmacêutico. Os utentes, principalmente os idosos, julgam que a autoria da atualização dos preços dos medicamentos é da própria farmácia, sob o pretexto de obter maior lucro.

3.4.2. Medicamentos esgotados

Dada a impossibilidade de ceder aos utentes determinados medicamentos prescritos e de utilização crónica, por se encontrarem esgotados a nível nacional e sem previsão de reposição no mercado, frequentemente me deparei com a incompreensão, preocupação e frustração dos utentes. Cito, como exemplo, a falta no *stock* das farmácias portuguesas do medicamento Victan® 2 mg (embalagens de 20 e 60 comprimidos) cuja substância ativa é o loflazepato de etilo, uma benzodiazepina indicada para a ansiedade e sintomas ansiosos. Todavia, o INFARMED, I. P. emitiu uma circular informativa (n.º 134/CD/100.20.200) na qual divulgou como data provável para chegada do medicamento às farmácias o 4.º trimestre de 2020 e a consideração da substância ativa alprazolam 1 mg em formulação de libertação prolongada como alternativa terapêutica, especialmente nos casos de ansiedade crónica e de risco de aparecimento de sintomas físicos de abstinência¹².

3.4.3. Estabelecimentos de venda de MNSRM

Uma notória ameaça para a viabilidade económica de todas as farmácias comunitárias é a existência de estabelecimentos de venda de MNSRM que, predominantemente nas grandes superfícies, têm vindo a crescer. Estes locais caracterizam-se por efetuar um grande volume de compras, o que lhes possibilita a aquisição de produtos a um preço inferior e, conseqüentemente, a prática de preços mais acessíveis face às farmácias. Durante o meu estágio na FTP também foi evidente esta ameaça, traduzindo-se na minha dificuldade em concretizar certos atendimentos, devido à problemática dos preços. Neste contexto de maior competitividade, impera a necessidade de diferenciação no atendimento realizado na farmácia em termos de um aconselhamento mais personalizado, conciso e rigoroso que acrescente valor ao utente, destacando o inigualável papel do farmacêutico na sociedade.

3.4.4. Pandemia COVID-19

A COVID-19 impôs o atendimento ao postigo, por um determinado período de tempo, que dificultou a comunicação com o utente, contribuindo para atendimentos mais demorados e subsequente desagrado e impaciência dos utentes. Saliento ainda que terminado o atendimento ao postigo, as medições da glicémia e do colesterol total continuaram suspensas, sendo apenas permitido a utilização da máquina *check-up* de saúde em detrimento do contacto direto com o utente.

4. Considerações Finais

O Estágio Curricular em Farmácia Comunitária representou o culminar de 5 anos de intensa formação teórica e prática, fornecendo as bases necessárias para o futuro exercício da profissão farmacêutica. Contribuiu para a compreensão da estrutura, organização e funcionamento da farmácia comunitária e para a consciencialização do papel do farmacêutico na sociedade e das oportunidades e dificuldades com que contacta diariamente, reforçando a necessidade constante de atualização do conhecimento técnico-científico. Neste sentido, encaro convictamente o Estágio Curricular em Farmácia Comunitária como uma mais-valia para os alunos do MICEF, uma experiência que assumo como desafiante e enriquecedora, que possibilitou uma aprendizagem contínua tanto a nível profissional como a nível pessoal.

5. Referências Bibliográficas

1. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS. - **Farmácia Comunitária** [Consultado a 15 de agosto de 2020]. Disponível em: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas_profissionais/farmacia-comunitaria/
2. MARQUES, C. *et al.* - **Boas Práticas Farmacêuticas para a farmácia comunitária (BPF)**. 3ª edição. (2009).
3. Decreto-Lei n.º 75/2016 de 8 de novembro. Diário da República n.º 214/2016 - I Série.
4. FUNDAÇÃO DE ASSISTÊNCIA MÉDICA INTERNACIONAL. - **Reciclagem de Radiografias** [Consultado a 20 de agosto de 2020]. Disponível em: <https://ami.org.pt/blog/21a-campanha-reciclagem-radiografias/>
5. VALORMED. **Quem Somos** [Consultado a 20 de agosto de 2020]. Disponível em: <http://www.valormed.pt/paginas/2/quem-somos/>
6. SERVIÇO NACIONAL DE SAÚDE. - **Programa de Troca de Seringas** [Consultado a 20 de agosto de 2020]. Disponível em: <https://www.sns.gov.pt/noticias/2016/09/02/programa-de-troca-de-seringas/>
7. ACSS/INFARMED - **Normas relativas à dispensa de medicamentos e produtos de saúde**. Ministério da Saúde. Versão 6.0. (2019).
8. Portaria n.º 769/2004, de 1 de julho. Diário da República n.º 153/2004 – I Série B.
9. Despacho n.º 18694/2010, de 16 de dezembro. Diário da República n.º 242/2010 – II Série.
10. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Norma Geral: Preparação Individualizada da Medicação (PIM)**. (2018). [Consultado a 15 de agosto de 2020]. Disponível em: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/norma_pim_vfinal_30_nge_0_0_010_02_1834827175bf58d479434f.pdf
11. CASHGUARD PORTUGAL. - **Vantagens** [Consultado a 20 de agosto de 2020]. Disponível na internet: <http://www.cashguard.pt>
12. INFARMED- AUTORIDADE NACIONAL DO MEDICAMENTO E PRODUTOS DE SAÚDE, I. P. - Circular Informativa N.º 134/CD/100.20.200, de 21 de julho de 2020.

ANEXO - Casos Práticos

Caso Prático 1

Uma senhora grávida dirigiu-se à farmácia, pedindo algo para a sinusite. Referiu ainda que habitualmente toma Sinutab[®] (paracetamol 500 mg + pseudoefedrina 30 mg), mas que está informada que o não pode tomar neste momento. Após se confirmar a veracidade da afirmação e que a utente não apresentava problemas hepáticos, indicou-se o repouso e o aumento de ingestão de líquidos como medidas não farmacológicas e a toma de paracetamol 500 mg para aliviar a dor de cabeça (1 comprimido de 8/8h em SOS) e a utilização de uma água de mar hipertónica com ação descongestionante nasal como medidas farmacológicas. Relativamente à água do mar hipertónica, recomendou-se realizar 1 a 2 pulverizações em cada narina com a cabeça direita, 1 a 3 vezes por dia, durante um máximo de 4-5 dias, uma vez que a utilização por um período superior provoca secura nasal e ao fim de 10 dias de uso induz efeito *rebound*. Caso os sintomas não melhorassem em 4-5 dias, aconselhou-se dirigir-se ao médico (pode ser necessário corticosteróide nasal).

Caso Prático 2

Uma senhora de 60 anos deslocou-se à farmácia no sentido de obter aconselhamento relativo às queixas reportadas pela sua neta de 6 anos. A criança apresentava prurido intenso na região anal, predominantemente à noite. Quando questionada se estes eram os únicos sintomas que a criança manifestava, a avó respondeu afirmativamente. Posto isto, suspeitou-se de infeção por *Enterobius vermicularis* (oxiuríase). Considerando tratar-se de uma epidemia familiar, aconselhou-se empiricamente terapêutica antiparasitária para todo o agregado familiar: a toma do Pantelmin[®] 20 mg/ml suspensão oral (mebendazol) para a criança e a mesma terapêutica na forma farmacêutica comprimido (dosagem 100 mg) para a restante família. Posteriormente, informou-se que a posologia recomendada é a toma única de 1 comprimido ou 1 copo de medida (5 ml) da suspensão, sendo necessário repetir o tratamento após 2 a 4 semanas. Alertou-se para agitar bem a suspensão antes de utilizar e esclareceu-se que o fármaco irá eliminar os vermes adultos, mas não os ovos que a fêmea depositou na região perianal à noite e que estes poderão causar re-infestações, daí a necessidade de repetir o tratamento. Com vista a prevenir a contaminação mão-boca, simultaneamente aconselharam-se medidas não farmacológicas tais como: o cuidado alargado a toda a família de lavar as mãos regularmente, a criança evitar coçar a região anal e a limpeza de todo o meio envolvente familiar (roupas de cama, toalhas, do quarto, da casa de banho). Por fim, demarcou-se a necessidade de a criança dirigir-se ao médico, caso os sintomas não melhorassem.

Parte III

Monografia

**“Advances in the Immunotherapies for Alzheimer’s
Disease”**

List of Abbreviations

AD - Alzheimer's disease

ADAD - Autosomal-Dominant AD

ADAS-Cog - Alzheimer's Disease Assessment Scale–Cognitive subscale

ApoE - Apolipoprotein E

ApoE - TR - ApoE-targeted replacement

APP - Amyloid precursor protein

ARIA-E - brain vasogenic edema

ARIA-H - cerebral microhemorrhages

ARIAs - Amyloid-related imaging abnormalities

ATP - Adenosine triphosphate

A β - Amyloid- β

BACE1 - β -secretase I

BBB - Blood brain barrier

CDR - Clinical Dementia Rating Scale

CDR-SB - Clinical Dementia Rating Scale-Sum of Boxes

ChEIs - Cholinesterase inhibitors

CNS - Central Nervous System

CSF - Cerebrospinal fluid

CTF - C-terminal fragment

DNA - Deoxyribonucleic acid

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EOAD - Early-onset AD

Fc - Fragment crystallizable domain

HDL - High-density lipoprotein

HHV - Human herpesvirus

HSV - Herpes simplex virus

KO - Knockout

LOAD - Late-onset AD

MCI - Mild cognitive impairment

MMSE - Mini-Mental State Examination

mRNA - Messenger ribonucleic acid

NFTs - Neurofibrillary tangles

NMDA - N-methyl-D-aspartate receptors

PET - Positron Emission Tomography

PSENI/2 - Presenilin 1/2

ROS - Reactive oxygen species

SPECT - Single-photon emission computerized tomography

SPs - Senile plaques

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia. This neurodegenerative disease that mainly affects the elderly population is neuropathologically characterized by the presence of extracellular senile plaques composed of deposits of amyloid- β peptides and intraneuronal neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated tau proteins.

Late-onset sporadic AD is the most prevalent form of AD, while early-onset AD is a rare form, constituting less than 5% of all cases. About 1%–2% of early-onset AD is inherited in an autosomal dominant fashion. Familial AD is closely linked to the occurrence of mutations in the amyloid precursor protein and presenilin 1/2 genes. On the other hand, sporadic AD is a heterogeneous disease with a complex pathogenesis, involving several risk factors that increase the predisposition to develop the disease, such as demographic, genetic, environmental and vascular factors.

Despite great progress in the understanding of AD pathobiology, there is still no disease-modifying therapy approved for AD treatment. Amyloid-based immunotherapies appear to be ineffective in altering the disease course in clinical trials for symptomatic AD. Thus, recent clinical trials efforts have focused on applying these amyloid-based immunotherapies to the preclinical disease (asymptomatic). Regarding non-amyloid immunotherapies, tau-directed therapies are at an early stage of clinical development, showing great potential to further development, whereas immunotherapies targeting apoE have not yet reached the clinical studies.

Keywords: Alzheimer's Disease; amyloid- β peptide; tau protein; apoE; active immunization; passive immunization.

Resumo

A doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência. Esta doença neurodegenerativa que afeta maioritariamente a população idosa é neuropatologicamente caracterizada pela presença de placas senis extracelulares compostas por depósitos de peptídeos β -amilóides e emaranhados neurofibrilares intraneuronais contendo proteínas tau hiperfosforiladas.

A DA esporádica de início tardio é a forma mais prevalente de DA, enquanto que a DA de início precoce é uma forma rara, constituindo menos de 5% de todos os casos. Cerca de 1% a 2% da DA de início precoce é herdada de forma autossómica dominante. A DA familiar está intimamente ligada à ocorrência de mutações nos genes da proteína precursora amilóide e da presenilina 1/2. Por outro lado, a DA esporádica é uma doença heterogénea com patogénese complexa, envolvendo diversos fatores de risco que aumentam a predisposição para o desenvolvimento da doença, como fatores demográficos, genéticos, ambientais e vasculares.

Apesar do grande progresso na compreensão da patogénese da DA, ainda não existe uma terapia capaz de modificar o decurso da doença disponível. Nos ensaios clínicos que abrangem a DA sintomática, as estratégias imunoterapêuticas dirigidas ao peptídeo β -amilóide parecem ser ineficazes na alteração do curso da doença. Assim, os esforços recentes têm-se concentrado na aplicação desta abordagem à doença pré-clínica (assintomática). As imunoterapias dirigidas à tau encontram-se em estadios iniciais de desenvolvimento clínico, apresentando grande potencial para prosseguir nos ensaios clínicos, ao passo que, as imunoterapias dirigidas à apoE ainda não atingiram a fase clínica.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; peptídeo β -amilóide; proteína tau; apoE; imunização ativa; imunização passiva.

I. Introduction

According to the World Health Organization, about 50 million people worldwide suffer from dementia, with almost 60% living in low- and middle-income countries. This number is projected to reach 82 million in 2030 and 152 in 2050.

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia (60 to 80% of all cases of dementia). This neurodegenerative disease that mainly affects the cortex and hippocampus of elderly population has an insidious and progressive course, with death as an inevitable outcome that usually occurs within 5-12 years after the onset of symptoms¹. AD is neuropathologically characterized by the presence of extracellular senile plaques (SPs) composed of deposits of amyloid- β (A β) peptides and intraneuronal neurofibrillary tangles (NFTs) of hyperphosphorylated tau proteins¹.

Late-onset AD (LOAD) or sporadic AD, which appears after age 65, is the most prevalent form of AD, while early-onset AD (EOAD), which occurs earlier than age 65, is a rare form, constituting less than 5% of all cases¹. Sporadic AD is characterized by early impairment in learning and memory, followed by later deficits in complex attention, executive function, language, visuospatial function, praxis, gnosis, and social behavior. About 1%–2% of EOAD is inherited in an autosomal dominant fashion. EOAD may present a more rapid rate of progression and atypical neurologic symptoms found less frequently in sporadic AD, with early impairment in nonmemory domains (visuospatial function, praxis, and gnosis). Autosomal-Dominant AD (ADAD) or familial AD is closely linked to the occurrence of mutations in the amyloid precursor protein (APP), presenilin 1 (PSEN1) and presenilin 2 (PSEN2) genes localized in chromosomes 21, 14, and 1, respectively¹.

Due to the global increase in life expectancy and enormous burden on the public health sector and caregivers, there is an urgent need for disease-modifying therapies that may prevent, delay the onset or slow the progression of AD. However, none of them are currently available¹. Taking this into consideration the present monograph aims to review the approaches that allow an understanding of AD pathophysiology as well as AD risk and protective factors and to discuss advances in the immunotherapies against A β , tau and apoE.

2. Alzheimer's Disease: Pathophysiology and Hypotheses

In 1906, Alois Alzheimer identified an “unusual disease of the cerebral cortex” that caused memory loss, disorientation, hallucinations in a woman in her fifties, Auguste D., which led to her death at the age of 55². The *postmortem* studies showed several abnormalities on her brain: a brain cortex thinner than normal and the presence of SPs, previously found only

in elderly people, along with NFTs which had never previously been described. The term AD was initially only applied to cases of early onset, whereas cases of late onset were referred to as “senile dementia”. Subsequently, the understanding that “pre-senile and senile dementia” were substantially subtypes of the same disease emerged with the discovery of the molecular markers of AD, A β and tau. In 1992, Hardy and Higgins proposed the “Amyloid Cascade Hypothesis” considered the most widely accepted model of the molecular pathology of AD. Some portions have been revised or supplemented^{1,3}.

2.1. Amyloid Cascade Hypothesis

The “Amyloid Cascade Hypothesis” postulates that the initial pathological event of the disease is the deposition of A β peptides as a result of an imbalance between the production and clearance of A β and this leads to synaptic function deficits, neuroinflammation, formation of NFTs, reduced glucose metabolism, neuronal loss and, finally, dementia. This hypothesis is supported by the discovery that exclusively genetic forms of AD, such as Autosomal-Dominant AD and Down syndrome (trisomy 21), cause an increase in A β production, inducing AD pathology. Moreover, the rare APP mutation A673T leads to reduced A β production, decreasing the risk of developing AD⁴.

An extension of the A β hypothesis is the “cell phase” of AD, which briefly proposes that the A β and tau accumulation in the brain is a gradual process that is tolerated by central nervous system (CNS) cells at the beginning of disease, but when cellular homeostatic mechanisms fail, leading to deficits of the pathological aggregated protein clearance and to increased cellular stress, the disease starts to manifest clinically⁵.

2.1.1. Amyloid Pathology

A β , a peptide that may have 38 to 43 amino acids, is formed predominantly in the endosomes by sequential proteolytic processing of APP by β -secretase (BACE1) and γ -secretase. This integral membrane protein can also be processed by α - and γ -secretases via non-amyloidogenic pathways. In healthy state, APP is mainly cleaved by α -secretase, with minimal processing by β -secretase. The cleavage site for α -secretase is within the A β sequence and thus blocks A β formation. The α - and β -secretase activities generate the long-secreted N-terminal APP fragments, sAPP α and sAPP β , respectively. In turn, the membrane-bound C-terminal fragments originated by the APP processing mediated by α - and β -secretases are termed CTF83 and CTF99, respectively. The γ -secretase cleavage of CTF83 and CTF99 produces p3 and A β s, respectively, as well as the APP intracellular domain (AICD)¹. The most

likely candidates with α -secretase activity are members of the family of disintegrin and metalloproteinase domain proteins (ADAM). The γ -secretase is a multi-protein complex, including four proteins (presenilin 1 or 2, nicastrin, presenilin enhancer 2 and anterior pharynx-defective 1)⁶.

The major $A\beta$ species are $A\beta_{42}$ and $A\beta_{40}$. The $A\beta$ peptide with 42 amino acids is more hydrophobic, amyloidogenic and toxic than the one with 40 amino acids, although the latter is the most abundant form. $A\beta_{43}$ exhibits the greatest propensity for aggregation (this property is more pronounced in $A\beta$ peptides with a greater number of amino acids)⁶. The release of $A\beta$ from neurons is mediated by synaptic activity and, in the extracellular space, $A\beta$ tends to aggregate into β sheet conformations in the form of oligomers, protofibrils and, ultimately, in fibrils. Amyloid plaques containing $A\beta$ deposited in insoluble fibrillar aggregates trigger a reactive inflammatory process, impair the synaptic activity, induce a reduction of cerebral capillary blood flow, and promote tau pathology that irreversibly damages neurons (Figure 1)¹.

In addition to the full-length $A\beta$ peptides, the AD brain also contains an abundance of N-terminally truncated/modified $A\beta$ species. Among all N-truncated/modified $A\beta$ species, pyroglutamate-modified $A\beta_{pE3-x}$ represents the main constituent. Studies *in vitro* show that N-truncated/modified $A\beta$ species are more resistant to degradation and aggregate faster than full-length peptides, indicating the significant role of these species in the formation of SPs⁷.

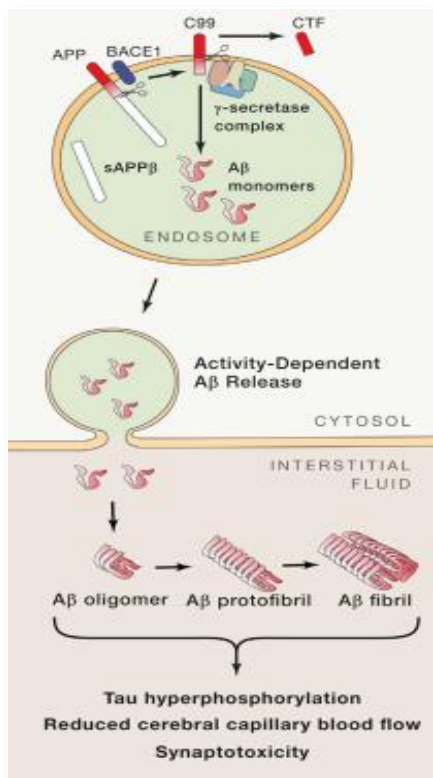


Figure 1. Role of $A\beta$ in AD pathophysiology¹. BACE1 and APP are co-localized to endosomes. The amyloidogenic pathway involves cleavages by β - and γ -secretases leading to generation of sAPP β , CTF 99 and $A\beta$ s. $A\beta$ is secreted into the interstitial fluid and aggregates into oligomers, protofibrils and, ultimately, fibrils, leading to synapse loss, reduced cerebral capillary blood flow, and promotion of tau pathology.

2.1.2. Tau Pathology

Tau protein is highly expressed by neurons in the brain and is a microtubule-associated protein (MAP), promoting the polymerization and assembly of microtubules^{8,9}. Consequently, tau has functions in axonal transport/cell trafficking and cell signaling. This protein, encoded by MAPT gene located on chromosome 17, is alternatively spliced at the N-terminal region (N) and the microtubule-binding repeat domain (R) to originate six different isoforms (0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R, 2N3R, and 2N4R), ranging from 352 to 441 residues, which are differentially expressed throughout brain development (Figure 2). In AD, NFTs include both 3R and 4R isoforms^{8,9}.

Tau is generally a highly soluble protein that is natively unfolded (primary structure), and does not have significant intrinsic hydrophobicity, but under the specific conditions (e.g. post-translational modifications) it will aggregate into oligomers and fibrils^{1,10}. Examples of tau post-translational modifications include phosphorylation, acetylation, glycation, nitration, O-GlcNAcylation, SUMOylation, ubiquitination, and truncation¹¹. This protein may be phosphorylated at 85 different residues and, in many cases, hyperphosphorylation induces a reduced binding affinity for microtubules and promotes the aggregation of tau. Pathological tau-tau interaction is linked to the microtubule-binding repeat domain. This property is attributed to two hexapeptides motifs 275VQIINK280 on the R2 and 306VQIVYK311 on the R3 which were shown to change from a random coil into a β sheet structure, leading tau aggregation^{12,13}. Hyperphosphorylated tau also moves from the axonal compartment to the somatodendritic compartment, impairing synaptic function¹⁴. Over the past decade, several studies have demonstrated the prion-like ability of aggregated tau to spread to remote, anatomically connected brain regions, inducing more seeding and aggregation of tau and neurodegeneration¹⁵.

Tau binds to nucleic acids. The binding of tau to DNA may allow protection against reactive oxygen species (ROS) and may be involved in chromatin remodeling^{16,17}. Consequently, formation of tau oligomers causes changes in nuclear organization and protein expression.

The tau pathology starts in the transentorhinal and hippocampal region of the brain and progress to the cortex, in contrast to the A β deposition, where the appearance of neocortical SPs occurs earlier than the presence of hippocampal SPs^{8,9}. The correlation between the stages of A β deposition and the degree of cognitive decline is minimal, evidencing that A β is necessary, but not sufficient, existing other downstream factors, such as

neuroinflammation and tau accumulation, that may be the main drivers of neurodegeneration. Indeed, synaptic dysfunction and loss of synapses progress with the pathological spread of tau aggregates. Longitudinal PET studies in humans have suggested that the deposition of A β may be necessary for the progression of the pathology of tau in AD, revealing that progression of the pathology of tau from the entorhinal cortex into the neocortex normally does not occur in the absence of co-existing A β pathology^{18,19}.

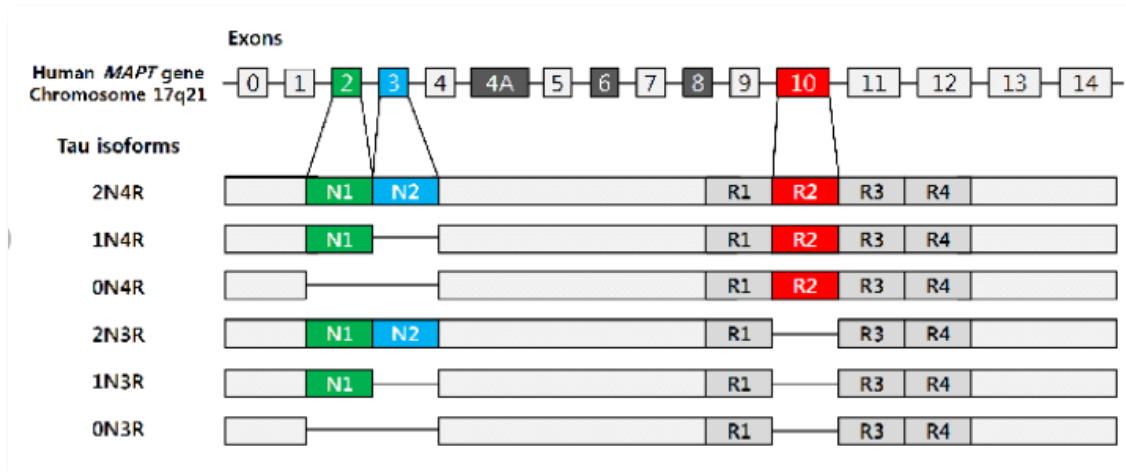


Figure 2. Different combinations of splicing of exons 2, 3 and/or 10 resulting in six human tau isoforms²⁰.

2.2. Presenilin mutations linked to perturbation of Ca²⁺ homeostasis and mitochondrial dysfunction

In addition to the production of adenosine triphosphate (ATP), mitochondria also play a vital role in Ca²⁺ homeostasis. The release of Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum (ER) and golgi complex (GC) results in elevated levels of mitochondrial Ca²⁺ which stimulates the metabolic activity of mitochondria, allowing to generate more energy for the cell²¹.

It is accepted that imbalances in Ca²⁺ homeostasis and mitochondrial metabolic dysregulation represent an early event in the pathogenesis of AD²¹.

Presenilin is the catalytic subunit of γ -secretase and presenilin mutations are responsible for more than 90% of cases of familial AD. The structure of presenilin is composed of nine transmembrane domains located in the membrane of ER. After undergoing endoproteolytic cleavage, presenilins integrate the multiprotein complex γ -secretase which is subsequently transported to the cell surface¹. In addition to their catalytic function in the γ -secretase complex, presenilins are believed to intervene in calcium homeostasis²².

In *Caenorhabditis elegans*, Sarasija *et al.* concluded that mutations in the sel-12 gene (from these nematodes), encoding a homologous protein of human presenilin I, lead to

mitochondrial metabolic alterations, promoting neurodegeneration as a consequence of oxidative stress. The release of high amounts of Ca^{2+} from the ER culminates in increased levels of mitochondrial Ca^{2+} , which stimulates mitochondrial metabolic activity (cellular respiration) and subsequent production of ROS such as hydrogen peroxide, hydroxide radicals and superoxide radicals. Low levels of ROS are part of cellular activity; however, their increase becomes harmful to cell, causing oxidative damage to biomolecules essential for the structural and functional integrity of neuronal cells. By decreasing Ca^{2+} release from ER and mitochondrial Ca^{2+} uptake, the authors demonstrated the reversal of mitochondrial metabolic dysfunction, preventing neurodegeneration, which suggests that presenilin is important to mitochondrial regulation and ER Ca^{2+} signaling²².

In turn, Zatti *et al.*, using HeLa and SH-SY5Y cells and human skin fibroblasts from individuals with familial AD, found that four mutations in the PSEN2 gene (M239I, T122R, N141I, D366A) cause a reduction in the Ca^{2+} content of intracellular stores which may support “ Ca^{2+} overload” hypothesis in AD. The authors concluded that mutant PSEN2 inhibit the activity of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) and the secretory pathway Ca^{2+} -ATPase (SPCA), responsible for promoting the influx of calcium ions from the cytosol to the ER and GC, respectively. On the other hand, four mutations in PSEN1 (P117L, M146L, L286V, A246E) had modest or no effect on either SERCA or SPCA²³.

2.3. Inflammatory processes

Chronic neuroinflammation is a pathological feature in AD. The observation that polymorphic variations in genes encoding inflammatory cytokines are associated with AD together with connection between the use of anti-inflammatory drugs and reduced risk for AD indicates that neuroinflammation may be a possible cause or driving force of AD²⁴.

$\text{A}\beta$ deposits increases the production of ROS and proinflammatory cytokines such as interleukin 1 beta (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6), and tumor necrosis factor α (TNF α). Also, activated microglia migrate to the plaques and promote $\text{A}\beta$ phagocytosis. However, a number of evidences have demonstrated that persistent activation of the immune response results in a reduced microglia ability for phagocytosing $\text{A}\beta$ which, in turn, leads to $\text{A}\beta$ accumulation and sustained pro-inflammatory cytokine production. This exacerbates the neuroinflammation and triggers events, such as oxidative stress, demyelination and apoptosis, ultimately leading to neurodegeneration. Whether the neuroinflammation is a cause or a result of AD processes remains under discussion²⁵.

Neurons express various molecules that inhibits microglial proinflammatory cytokine production (e.g. CD200). Once CD200 binds to its receptor (CD200R) expressed on immune cells, it promotes an increased expression of multiple anti-inflammatory cytokines owing to the inhibition of NF- κ B transcription factor mechanism. The expression of CD200 and CD200R is decreased in the AD brain, indicating that AD neurons are more vulnerable to inflammatory attack²⁴.

2.4. Vascular abnormalities

Vascular abnormalities were found in the AD brain which include regional increase of capillary density, formation of glomeruloids and formation of vascular loops^{25,26}. Furthermore, the expression of angiogenic factors (e.g. vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor β (TGF β)) was observed. Neovascularization develops after altered cerebral perfusion and damage to the vessels (inflammation), and therefore, abnormal angiogenesis is believed to play a role in the pathogenesis of AD. Angiogenic activation may lead to accumulation of A β ²⁶.

The vascular abnormalities mentioned before may contribute to alter the permeability of the blood–brain barrier (BBB), facilitating the infiltration of toxic products into the brain and subsequent synaptic and neuronal dysfunction²⁶.

2.5. Metal accumulation in the brain

Endogenous metal cations such as copper, zinc and iron are concentrated in the brain SPs of patients with AD. Zinc ions are released together with glutamate by most glutamatergic synapses. Zn²⁺ induces rapid A β precipitation which forms protease-resistant aggregates *in vitro*. Copper also released from synapses promotes aggregation of A β peptide under conditions of mild acidosis²⁷. Despite the accumulation of exogenous aluminum causes specific neurological injuries, the association between this metal and the pathological changes observed in AD has not yet been proven and thus its role in AD remains uncertain²⁸.

2.6. Impaired insulin/IGF-I signalization

The passage of insulin through the BBB is transporter-mediated²⁹. The detection of C-peptide immunoreactivity and proinsulin mRNA in the neurons of human and animal CNS, suggests that insulin may be synthesized locally in the brain. Insulin regulates glucose metabolism in peripheral tissues and it also appears to exert regional effects on cerebral glucose metabolism owing to the presence of insulin-responsive glucose transporters GLUT4 and GLUT8 in specific brain regions, including hippocampus, cerebellum, cortex, amygdala and

hypothalamus³⁰. The localization of insulin receptors (IRs) in the hippocampus suggests that insulin may influence memory. In fact, memory improvement was observed following administration of intranasal insulin in patients with mild cognitive impairment (MCI) or early AD³¹. Moreover, insulin enhances N-methyl-D-aspartate (NMDA) and γ -aminobutyric acid (GABA) receptors cell surface levels. These observations indicate that insulin is not only involved in glucose metabolism but also modulates synaptic transmission^{32,33}.

Insulin-like growth factor-I (IGF-I) can bind IRs, which are tyrosine kinases with α and β subunits; however, IGF-I has less binding affinity than insulin²⁹. When insulin or IGF-I are bound, the α subunit promotes autophosphorylation of tyrosine residues on the β subunits leading to the recruitment of scaffolding proteins, IR substrates proteins (IRS-1 and IRS-2). Tyrosine phosphorylated IRS ultimately triggers the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway, widely responsible for production of GLUT4 and protein synthesis, and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway which modulates growth-related gene transcription and mitogenesis²⁹. In addition, insulin/IGF-I-induced PI3K/Akt signaling inhibits glycogen synthase kinase (Gsk)-3 β , which is associated with reduced tau hyperphosphorylation^{29,34}. *In vitro* experiments also indicate that insulin, via the PI3K/Akt pathway, increases the expression of anti-amyloidogenic proteins such as the insulin-degrading enzyme (IDE), involved in A β degradation, and α -secretase³⁵. By contrast, cell exposure to insulin diminish the expression of pro-amyloidogenic proteins (e.g. β -secretase and glycogen synthase kinase (Gsk)-3 β). Correspondingly, a disturbed insulin/IGF-I signaling may lead to neuronal loss, tangle formation and brain amyloidosis typical of AD pathology. In turn, A β reduces insulin/IGF-I signaling by competitively binding to the insulin/IGF-I receptors *in vitro*³⁶.

Early in the course of AD, cerebral glucose utilization is reduced by as much as 45%, indicating that energy failure is an early event in AD pathogenesis. In the later stages, abnormalities in energy metabolism worsen. Taken together, these observations suggest that AD is related to insulin/IGF-I deficiency and/or insulin/IGF-I resistance. Importantly, *postmortem* studies have demonstrated that levels of insulin/IGF-I, its receptors and IRS proteins are significantly decreased in the AD brain. Hence, AD could represent a form of brain diabetes²⁹.

2.7. Infectious disease

Several recent studies reveal that there may be an underlying infectious basis in the development of AD. In human AD brains was found periodontal bacterial proteins (gingipains) and DNA. Oral infection of wild-type mice with *Porphyromonas gingivalis* led to an increase in

A β production and the inhibition of the activity of gingipains decreased brain bacterial burden, A β levels and neuroinflammation³⁷. Based on these findings, a phase 2/3 double-blind, randomized, placebo-controlled trial of gingipain inhibitor COR388 is ongoing in mild-to-moderate AD (ClinicalTrials.gov, NCT03823404). Moreover, human herpesvirus (HHV)-6 and herpes simplex virus (HSV)-1 DNA was detected in brain of AD patients³⁸.

It has been reported that A β peptide exhibits characteristics of an antimicrobial peptide (AMP), an important molecule of innate immune defense. According to Soscia *et al.*, both synthetic and from AD patients A β peptides inhibit the growth of bacterial and fungal cells, with a potency similar to, or in some cases higher than LL-37, a human AMP³⁹. Additionally, A β impede HSV-1 entry into the cell⁴⁰. Spitzer *et al.* demonstrated that A β 1-42, A β 2-42, and A β 3p-42, but not A β 1-40 and A β 2-40, bind to the surface of several bacterial strains and *Candida albicans*, leading to microbial agglutination *in vitro*⁴¹. Collectively, these results suggest that intracerebral infection may promote A β seeding and deposition as an antimicrobial defense mechanism⁴².

2.8. Loss of cholinergic neurotransmission

According to the “cholinergic hypothesis”, the selective loss of cholinergic synapses, mostly in the nucleus basalis of Meynert which is the major source of cholinergic innervation to widespread cortical regions, is the leading cause of cognitive impairment⁴³. In reality, extent of cholinergic impairment closely correlates with AD severity. It is also known that taking anticholinergic drugs (e.g. atropine and scopolamine) impairs intellectual abilities in both healthy individuals and those with AD, which corroborates this hypothesis⁴³.

2.9. The “dual hit” hypothesis

Lahiri and Maloney⁴⁴ proposed a “dual hit” hypothesis (Latent early-life associated regulation model) to explain AD, which suggests that environment (e.g., heavy metals) perturb gene regulation at sites of promoter genes in a long-term manner, beginning at the developmental stages of life. The first “hit” early in life operates through epigenetic changes (e.g. DNA methylation), which do not alter the sequence of nucleotides, but modulate gene expression. The second ‘hit’ acting later in life involves further environmental stress (e.g. poor diet, head injury) in association with modifications in gene expression.

In AD neurons, Li *et al.*⁴⁵ identified a large cluster of hypomethylated enhancers in the DS Cell Adhesion Molecule Like 1 (DSCAML1) gene. They also found that enhancers in DSCAML1 gene interacted with the promoter region of BACE1 gene and subsequently

hypomethylation of these enhancers in the DSCAML1 gene may upregulate BACE1 transcripts in AD.

3. Alzheimer's Disease Diagnosis

Currently, *antemortem* AD neuropathologic diagnosis is based largely on neuropsychological tests (e.g. The Clinical Dementia Rating (CDR) Scale), PET brain imaging and ELISA measurement of A β 42, total tau and phospho-tau in cerebrospinal fluid (CSF)¹. The use of plasma to study AD biomarkers is still limited. A β deposition is estimated to start about 15 and 20 years before the clinical symptoms of AD (Figure 3)⁴⁶. Preclinical AD is detected by a decrease in CSF levels of A β 42 (indicating A β deposition in the brain) or increased signal on amyloid PET imaging. Simultaneously, there are early neuroinflammatory responses (such as microglial activation). Increased signal on tau PET imaging and increased CSF total tau and phospho-tau levels correlates with progression to mild cognitive impairment (MCI) in cognitively healthy people and progression to AD in patients with MCI. CSF total tau and phospho-tau levels increase in the course of the disease^{1,46}.

CDR scale grades clinical dementia severity based on composite level of disfunction in categories of memory, orientation, judgement and problem solving, involvement in community activities, hobbies and home, and self-care (Annex 1)⁴⁷. The CDR can be scored to obtain a Global (CDR-GS) or a Sum of Boxes (CDR-SB) score. Global CDR scores of 0, 0.5, 1, 2, and 3 indicate no dementia, questionable or very mild (MCI), mild, moderate, and severe dementia, respectively. CDR-SB score is obtained by summing each of the domain box scores, with scores ranging from 0 to 18 (Annex 2)⁴⁸. CDR-SB is more accurate than global CDR to identify people with MCI.

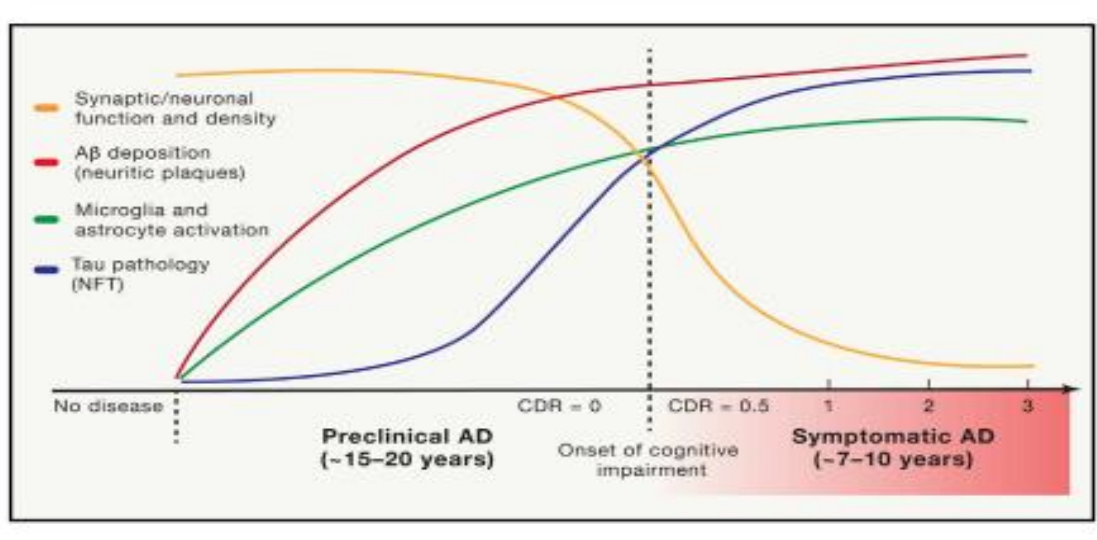


Figure 3. Timing of the main AD pathophysiological events¹. Aβ deposition is estimated to start about 15 and 20 years before the clinical symptoms of AD. Simultaneously, there are early neuroinflammatory responses. Increased tau pathology correlates with severity of disease. Synaptic dysfunction and loss of synapses progress with the pathological spread of tau aggregates.

4. Risk Factors for Alzheimer's Disease

Several risk factors participate in the pathogenesis of AD, particularly in LOAD. Epidemiological studies showed that age, female gender, lower level of education, physical inactivity, previous traumatic brain injury and psychiatric factors (e.g. depression and stress in early life) increase the AD risk⁴⁹. The risk of AD is 3 times higher in females in comparison with males. Midlife hypertension and obesity, type 2 diabetes mellitus, smoking, stroke and cardiovascular disease are also associated with an increased risk of AD⁴⁹.

4.1. Age

Age is considered the most important risk factor for AD. As age advances, it is estimated that prevalence of AD increases to 19% in individuals aged 75 to 84 years and to 30-35% in people older than 85 years⁴⁹. AD is believed to be an accelerated form of normal aging, based on observation that many of pathological processes of AD are present in normal aging, although with less severity. Events such as reduction in brain volume and weight, dilation of the ventricles, loss of synapses and the presence of SPs and NFTs are observed in normal aging⁴⁹. Arriagada *et al.* found the presence of SPs in a large number of normal individuals over the age of 55 years⁵⁰. In turn, a cross-sectional study involving 199 cognitively normal individuals reported an abrupt increase in the number of SPs and NFTs from the age of 71⁵¹.

Two age-related pathological alterations may be implicated in the development of AD: first, the demyelination of the white matter that may lead to the formation of protein deposits

(A β and tau) considered by-products of the homeostatic myelin repair processes (however, some studies indicate that demyelination occurs late in the disease as a result of neuronal death) and, second, the degeneration of brain stem nuclei, such as the locus coeruleus (LC) which is the main noradrenergic nucleus of the brain that stimulates microglia to migrate and to phagocytize A β deposits^{52,53}.

4.2. Type 2 Diabetes Mellitus

Under normal conditions, an acute rise in peripheral levels of insulin leads to an increase in CNS levels of insulin. On the other hand, persistent peripheral hyperinsulinemia which is strongly associated with type 2 diabetes mellitus leads to the downregulation of insulin transporters at the BBB, reducing the amount of insulin that may cross the BBB. CNS insulin deficiency may therefore induce impairments in memory, synaptic transmission, as well as likely promoting to the development of AD⁵⁴.

4.3. Genetic Risk Factors

4.3.1. ApoE gene

Apolipoprotein E (apoE) is a lipid-binding protein present in lipoprotein particles that is produced at higher levels in the liver and brain. The major function of apoE is the transport of cholesterol and other lipids from astrocytes and microglia to neurons¹. The cells that produce apoE in the brain are mostly astrocytes and, to some extent, microglia. ApoE acts as a ligand in receptor-mediated endocytosis of “high-density lipoprotein (HDL)-like” particles by low-density lipoprotein (LDL) receptor family members. Cholesterol released from apoE-containing HDL is used in the repair, growth and maintenance of myelin and to support synaptogenesis and maintenance of synapses¹.

Human APOE gene localizes on chromosome 19 and is polymorphic with three main alleles, with different allele frequencies: apoE ϵ 2 (5–10%), apoE ϵ 3 (65–70%) and apoE ϵ 4 (15–20%) (1). The three common isoforms distinguish by a single amino acid substitution at position 112 or 158 (E2 Cys112/Cys158, E3 Cys112/Arg158, and E4 Arg112/ Arg158)¹.

The APOE ϵ 4 allele is the strongest genetic risk factor for the development of LOAD, while ϵ 2 appears to decrease the risk and ϵ 3 is considered risk-neutral because as it is by far the most common isoform, it is considered the standard for the general population. Having a single copy of APOE ϵ 4 increases the risk of developing AD by approximately 3-fold, while inheriting two copies increases the risk by approximately 12-fold^{55,56}. AD individuals who carry at least one APOE ϵ 4 allele manifest earlier disease onset, increased brain A β deposition and

more rapid disease progression compared to individuals with AD who are not carriers of APOE ϵ 4^{57,58}. However, it should be noted that the majority of LOAD cases involve homozygous APOE ϵ 3 patients, indicating that other genetic or environmental factors are relevant to developing LOAD¹.

Several lines of evidence have linked apoE to various neurobiological processes of AD, which are differentially regulated by apoE isoforms. ApoE binds to A β present in SPs⁵⁹. APP transgenic animal models with deletion of the apoE gene demonstrate substantial decreased A β deposition, indicating apoE may inhibit clearance and/or increase A β aggregation. APP transgenic-ApoE4 targeted replacement (ApoE4-TR) mice, where human apoE4 are expressed under the influence of murine ApoE regulatory sequences, have enhanced A β deposition and higher A β 42 brain levels compared to ApoE3-TR and ApoE2-TR mice⁶⁰. Experiments involving the temporary control of apoE expression, using inducible expression or intrathecal antisense oligonucleotides, demonstrate that apoE4, but not apoE3, promotes the initial seeding of fibrillar A β deposition⁶¹. This effect is lost when apoE4 was expressed only in later stages of amyloid deposition, suggesting that apoE4 promotes amyloid deposition in the early seeding stages, whereas subsequent plaque growth seems to depend on other factors. Using *in vivo* microdialysis technique in mice expressing a mutant APP in conjunction with human apoE isoform, Castellano *et al.* found that ApoE4-TR mice show higher concentration and reduced clearance rate of soluble A β in the brain interstitial fluid in relation to other TR mice, and thereby, concluded that apoE mediates cerebral A β clearance in an isoform-dependent manner. In addition, they also demonstrated that A β synthesis was not influenced by apoE isoform, as evaluated by *in vivo* stable isotope labelling kinetic experiment⁶². ApoE mediates clearance of A β by competitively binding to A β receptors (e.g. LDLR-related protein I (LRPI) on the surface of astrocytes and pericytes), precluding A β uptake⁶³. ApoE4 may also contribute to the AD processes through direct effects on neurons and neuronal network activity. Nathan *et al.* revealed that exogenous apoE4 inhibits neurite growth, while apoE3 stimulates neurite growth in cultures of dorsal root ganglion neurons⁶⁴. According to Nuriel *et al.*, apoE4 is associated with neuronal hyperactivity, as displayed by increased seizures and reduced GABAergic inhibitory inputs in ApoE4-TR mice⁶⁵. Finally, apoE4 promotes tau pathogenicity. Using a P301S tauopathy mouse model expressing human apoE4, Shi *et al.* showed that apoE4 worsens tau-mediated neurodegeneration, while the deletion of apoE gene is protective⁶⁶.

4.3.1.1. Effect of apoE lipidation

ApoE lipidation is mediated by ATP-binding cassette transporters AI/GI (ABCAI/GI). Using ATP hydrolysis, ABCAI/GI transports cell cholesterol and phospholipids to hypolipidated lipoproteins (nascent HDL). Studies in humans and animal models suggest that cerebral apoE4 is less lipidated compared to apoE3¹. This finding is corroborated by *in vitro* cell culture experiments, which showed that apoE3 promotes the efflux of cholesterol and phospholipids more efficiently than apoE4. ABCAI recycling and degradation is regulated by small GTPase ADP-ribosylation factor 6 (ARF6). Mukhamedova *et al.*, using a mouse macrophage cell line, reported that apoE4 promotes greater expression of ARF6 relative to apoE3 which leads to increased lysosomal degradation of ABCAI, impairing ABCAI membrane recycling and subsequent apoE4 lipidation⁶⁷.

In ApoE4-TR mice, Boehm-Cagan *et al.* found that ABCAI-agonist peptide CS-6253 and bexarotene, a retinoid X receptor agonist that upregulates ABCAI, increased the lipidation of brain apoE4 resulting in the reversal of the pathological effects of apoE4 as well as cognitive deficits⁶⁸.

4.3.2. TREM2 gene

Rare R47H and R62H variants in the triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) are linked to increased risk for AD. TREM2 is expressed on microglia and plays an important role in modulating inflammatory signaling and in promoting microglial phagocytosis and microglial survival. TREM2 binds to several forms of A β , observing interactions of greater affinity with soluble A β oligomers, and promotes A β phagocytosis. Thus, TREM2-deficient microglia fail to contain the plaques, leading to an increase in plaque size and in surrounding dystrophic area as well as enhanced tau seeding and spreading⁶⁹.

Kober *et al.* demonstrated that TREM AD variants affect the binding of the TREM2 ligand. Many of the AD-related mutations occur near or within a large basic region of TREM2 that is not present in other members of the TREM family, indicating the relevance of this domain in the function of TREM2. Both R47H and R62H reduce the size of the basic region, resulting in reduced binding properties and loss of function⁷⁰.

5. Protective Factors for Alzheimer's Disease

Many AD risk factors are modifiable (e.g. hypertension, diabetes mellitus, obesity, stroke and cardiovascular disease) through pharmacological treatment and/or lifestyle

changes⁷². Epidemiological studies demonstrate that the Mediterranean, DASH and MIND diets (Annex 3) are associated with a reduction in the risk of AD⁷¹. The DASH diet stands for “Dietary Approaches to Stop Hypertension” while the MIND diet stands for “Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay”.

Several intervention trials focused on the management of modifiable risk factors in order to prevent or delay dementia/AD onset, including studies testing unimodal interventions (e.g. diet, exercise or medications) in older adults at increased risk of dementia/AD⁷². Most of these studies had short intervention durations/follow-up periods, tested the preventive interventions in small groups and yielded negative or modest results. Given the complex and multifactorial nature of LOAD, multidomain interventions (e.g. physical training, cognitive training, nutritional counseling, social activities and cardiovascular monitoring) may be necessary for an optimal preventive effect⁷². Therefore, some research groups took the limitations of previous trials into account and started to conduct large multidomain lifestyle trials in elderly individuals at risk of dementia/AD. Three European, randomized, placebo-controlled trials of multidomain lifestyle interventions were completed in the last few years: the Finnish Geriatric Intervention Study to Prevent Cognitive Impairment and Disability (FINGER; ClinicalTrials.gov, NCT01041989), the Multidomain Alzheimer Prevention Trial (MAPT; ClinicalTrials.gov, NCT00672685), and the Prevention of Dementia by Intensive Vascular Care (PreDIVA; ISRCTN29711771) study⁷². The characteristics of these trials are listed in the Annex 4 and the results suggest that targeting multidomain interventions to older adults at risk of dementia/AD is an effective approach.

6. Available therapy

Nowadays, despite the enormous efforts of the pharmaceutical industry in recent years, there is neither a cure nor a disease-modifying therapy approved for AD treatment. The available symptomatic therapy includes four drugs: three cholinesterase inhibitors (donepezil, rivastigmine and galantamine) and memantine, an uncompetitive NMDA receptor antagonist¹.

6.1. Cholinesterase inhibitors (ChEIs)

ChEIs are approved for use in mild-to-moderate AD and leads to reduction of the degradation of acetylcholine in choline and acetic acid and thus promoting an increase in its concentration in the synaptic cleft. They differ in their pharmacokinetic profiles (donepezil has the longest half-life and therefore is administered once daily) and formulation (donepezil is

available as a tablet or orodispersible tablet, rivastigmine as a continuous-release transdermal patch or capsule, and galantamine as a capsule or tablet), but not in their efficacy. ChEIs have no effect on long-term disease progression and their symptomatic benefit on cognition performance confirmed by several meta-analyses is modest (after 6 months of treatment, the mean difference in the Mini-Mental State Examination (MMSE; Annex 5) is 1.37). The use of ChEIs in very mild AD (MCI) is not recommended, because the available evidence shows that they may even worsen cognitive performance at this early clinical stage⁷³.

6.2. Anti-NMDA antagonist

Memantine, an uncompetitive NMDA receptor antagonist, is indicated in moderate-to-severe AD and might alleviate the toxic effects of glutamate released from degenerating neurons. Like ChEIs, memantine has no effect on long-term disease progression. Given that effects in mild-to-moderate stage disease were minimal, memantine is not recommended for symptomatic treatment of mild AD⁷⁴.

7. Immunotherapy as disease-modifying therapy

7.1. Active Immunization versus Passive Immunization

Active immunization consists of exposing the individual to an antigen to induce antigen-reactive B and T cells proliferation and subsequent formation of memory cells (immunological memory). On the other hand, passive immunization refers to the process of administering preformed antibodies to an individual. While active immunity is long-lasting (it persists for years or all life), passive immunity is short-lived, usually lasting a small number of weeks or months⁷⁵. Monoclonal antibodies have several advantages over polyclonal antibodies, including high antigen-specific activity, lot consistency and unlimited availability. There are several methods for the production of monoclonal antibodies, including hybridoma technology and Epstein-Barr virus immortalization method. Immunoglobulin G (IgG) is the most preferred immunoglobulin class for immunotherapy. Typically, IgG is a high-affinity antibody, is permeable to extravascular space and has the longest half-life (approximately 21 days), except IgG3, which has a half-life of 7 days⁷⁵. Also, IgG molecules have several effector functions (e.g. neutralization, opsonization and phagocytosis). Regarding to human IgG isotypes, IgG1 and IgG3 are more efficient at generating downstream mechanisms⁷⁶.

7.2. A β -directed Immunotherapy

Over the last 20 years, immunotherapy against A β has been explored as a disease-modifying therapy in AD (Figure 7 and 8). The major safety findings are amyloid-related imaging abnormalities (ARIAs), such as brain vasogenic edema (ARIA-E) and microhemorrhages (ARIA-H), which are more common in APOE ϵ 4 carriers than non-APOE ϵ 4 carriers. ARIAs may be a result of inflammatory processes or coincident cerebral amyloid angiopathy (deposition of A β in the blood vessel walls)⁷⁷.

7.2.1. Active Immunization

In 2002, Elan Pharmaceuticals developed the first human A β immunotherapy phase I trial using AN-1792, a mixture composed of synthetic full-length human A β 42 with the QS-21 adjuvant (saponins from *Q. Saponaria*)⁷⁷. However, in a phase 2a trial (ClinicalTrials.gov, NCT00021723), 4 of 375 patients with mild-to-moderate AD developed aseptic meningoencephalitis caused by Th1 lymphocyte activation, leading to premature termination of the trial. T cell-mediated immunological response was attributed to A β residues 15-42. Approximately five years after the termination of phase 2a study, one-year follow-up was conducted in 129 patients to assess the long-term response to treatment and safety outcomes. Patients considered antibody responders in the phase 2a study (25/129) had improvements in cognitive function⁷⁸. A 15-year *postmortem* neuropathological follow-up included 19 patients treated with AN1792 and 3 treated with placebo. Two of 19 patients had nearly-complete plaque removal. However, most of the patients treated with AN1792 had abundant tau pathology and severe dementia at time of death⁷⁹.

Examples of the second-generation active A β immunotherapies that avoid activation of A β -reactive T-cells includes Vanutide (ACC-001), CAD106 and ABVac40. Vanutide (ACC-001) was co-developed by Pfizer and Janssen AI and comprises multiple short A β fragments (aa1–7) coupled to a carrier of inactivated diphtheria toxin. Two placebo-controlled phase 2 studies (ClinicalTrials.gov, NCT01284387 and NCT00479557) assessed ascending doses of Vanutide, with or without QS-21, in individuals with mild-to-moderate AD. There were no differences in CSF biomarkers or cognitive measures between the Vanutide and placebo groups⁸⁰. In turn, CAD106 vaccine (Novartis) contains multiple copies of the A β 1–6 fragment, coupled to a carrier containing 180 copies of bacteriophage Q β coat protein (virus-like particle). In cell cultures, antibodies induced by CAD106 reacted with A β monomers and oligomers⁷⁷. No significant changes on cognitive scales were found in a 1-year, double-blind, placebo-controlled phase I study (ClinicalTrials.gov, NCT00411580) of CAD106 in patients

with mild-to-moderate AD⁸¹. In a 90-week, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial, the safety, tolerability and immunogenicity of two intramuscular doses of CAD106 (150 µg or 450 µg), with or without alum adjuvant, was tested in subjects with mild AD (ClinicalTrials.gov, NCT01097096). ARIA-E were observed in a single patient who received CAD106, while ARIA-H in 5 patients. Also, as expected no case of meningoencephalitis was detected. CAD106 vaccine elicited strong serological responses in 55% and 81% of patients on 150 µg and 450 µg doses, respectively. Despite the decrease in amyloid PET correlated with serum Aβ-IgG antibody titers, the cognitive decline measured over 78 weeks on the MMSE scale was higher in patients treated with CAD106 who had a strong antibody response compared to controls. However, the difference did not reach statistical significance⁸². Ultimately, active immunization with ABVac40, which contains several repeats of a short C-terminal fragment of Aβ40 (www.alzforum.org), moved to a phase 2 trials (ClinicalTrials.gov, NCT03461276) and Araclon Biotech is currently recruiting participants with very mild AD (MCI).

7.2.2. Passive Immunization

Anti-Aβ monoclonal antibodies may act through at least three mechanisms: i) bind to Aβ-containing plaques, triggering Fcγ receptors-mediated phagocytosis of the Aβ-anti-Aβ antibody complexes by microglia; ii) act as chaperones blocking aggregation and promoting disaggregation of Aβ; or iii) sequester soluble Aβ in the peripheral blood and causes a concentration gradient that leads to efflux of Aβ from the brain, reducing Aβ brain levels (“peripheral sink hypothesis”). The first two mechanisms require that the antibody enter the brain, while the last does not. Some researchers adhered to the use of IgG4 isotypes in order to limit microglial activation, thus minimizing inflammation⁸³.

- Bapineuzumab

Bapineuzumab is a humanized IgG1 monoclonal antibody that recognizes the Aβ N-terminus (aa1-5) and was the first monoclonal antibody to achieve phase 3 clinical trials in 2012. Bapineuzumab showed no effect on cognition in two large phase 3 trials targeting mild-to-moderate AD patients; as a result, Pfizer and Janssen AI dropped the development of bapineuzumab for AD (ClinicalTrials.gov, NCT00575055; NCT00574132)⁸⁴.

- Solanezumab

Eli Lilly’s Solanezumab is a humanized IgG1 monoclonal antibody that recognizes an epitope within the middle region of Aβ (aa13-28) and preferentially binds to soluble Aβ monomers rather than aggregated forms of Aβ⁷⁷. Treatment with solanezumab leads to an

abrupt increase in total A β levels in plasma and CSF without affecting brain SPs in animal models (“peripheral sink hypothesis”)⁸⁵. This effect also occurred in clinical studies. Two 80-week, double-blind, placebo-controlled phase 3 studies investigated efficacy of solanezumab at a dose of 400 mg administered intravenously every 4 weeks in patients with mild-to-moderate AD (EXPEDITION 1, ClinicalTrials.gov number NCT00905372; EXPEDITION 2, ClinicalTrials.gov number NCT00904683). Neither trial showed significant improvement in the primary cognitive and functional outcomes. However, subsequent independent statistical analysis of subgroups in both studies indicated a possible signal of efficacy for the subgroup of mild AD⁸⁶. A third phase 3 trial (EXPEDITION 3, ClinicalTrials.gov, NCT01900665) for mild AD, failed to meet primary outcome measure of efficacy, the 14-item Alzheimer’s Disease Assessment Scale–Cognitive subscale (ADAS-Cog14; Annex 6). However, solanezumab showed a slight improvement on the secondary outcomes (MMSE and CDR-SB scores)⁸⁷.

- Gantenerumab

Gantenerumab is a fully human IgG1 monoclonal antibody investigated by Roche and recognizes to both N- terminal and mid-region of A β (discontinuous epitope)⁷⁷. Gantenerumab shows greater affinities for oligomers and A β fibrils than for A β monomers *in vitro*⁸⁸. This finding is consistent with the observation *in vivo* that gantenerumab does not modify plasma A β levels. Results from multiple ascending-dose PET phase I trial (ISRCTN17517446) for mild-to-moderate AD revealed that 2 patients who received 200 mg of gantenerumab intravenously developed ARIA-E co-localized with regions of higher amyloid reduction. Also, gantenerumab clears SPs via microglia–mediated phagocytosis in a dose-dependent fashion *ex vivo*. In comparison with placebo, doses of 60 mg and 200 mg led to 16% and 36% reductions in cerebral amyloid burden, respectively⁸⁹. A 2-year, double-blind, placebo-controlled, phase 2/3 study, SCarlet RoAD (ClinicalTrials.gov, NCT01224106), 797 patients with prodromal AD (MCI) were randomized to subcutaneous gantenerumab 105 mg or 225 mg or placebo administered every 4 weeks. Due to futility and a rise in ARIAs, the study was prematurely discontinued⁹⁰. Currently, two 2-year, double-blind, placebo-controlled phase 3 trials (GRADUATE 1, ClinicalTrials.gov number NCT03444870; GRADUATE 2, ClinicalTrials.gov number NCT03443973) are undergoing in participants with prodromal-to-mild AD (collectively termed as early AD)⁸³.

- Crenezumab

Crenezumab is a humanized IgG4 monoclonal antibody that binds to A β oligomers and fibrils with high affinity. *In vitro* studies revealed that crenezumab promotes disaggregation of A β oligomers⁷⁷. A double-blind, placebo-controlled phase 2 ABBY study in patients with mild-to-moderate AD and tested doses of crenezumab intravenously and subcutaneously (ClinicalTrials.gov, NCT01343966). Compared to placebo, crenezumab did not show significant differences on the 12-item ADAS-Cog and CDR-SB scores⁹¹. BLAZE, a smaller phase 2 brain imaging study in patients with mild-to-moderate AD, also failed to meet primary endpoint, which was change in amyloid load from baseline to week 69 evaluated by florbetapir PET (ClinicalTrials.gov, NCT01397578). No ARIAs were observed in BLAZE trial⁹². In 2019, Roche announced the discontinuation of two phase 3 trials (CREAD 1 and CREAD 2) for prodromal-to-mild AD for not demonstrating any clinical benefit (ClinicalTrials.gov, NCT02670083; NCT03114657)⁸³.

- Aducanumab

Aducanumab is a fully human IgG1 antibody that recognizes the N-terminal region of A β (aa3–7). It binds to A β aggregates with higher selectivity than monomers (>10,000-fold)⁷⁷. In a first-in-human, double-blind, placebo controlled, single-dose escalation phase Ia study of intravenous aducanumab in mild-to-moderate AD, ARIA-E was detected in 3 patients who received the highest dose of 60 mg/kg (ClinicalTrials.gov, NCT01397539). Beyond to ARIA-E, the most common adverse events are headache, and diarrhea and pyrexia. Aducanumab at 60 mg/kg increased plasma A β 40 and A β 42 levels, while lower doses (0.3 mg/kg to 30 mg/kg) did not affect plasma A β 40 and A β 42 levels. This indicates that aducanumab binds to soluble A β monomers at high doses⁹³. PRIME, a 12-month, double-blind, placebo-controlled, multiple ascending dose phase Ib study for prodromal-to-mild AD, showed that aducanumab at doses of 1, 3, 6 and 10 mg/kg decreased brain SPs in a dose- and time-dependent manner, as measured by florbetapir PET imaging (ClinicalTrials.gov, NCT01677572). The main adverse event was ARIA-E which was more prevalent in APOE ϵ 4 carriers. Importantly, aducanumab also produced a slight reduction of clinical decline in MMSE and CDR-SB scores. The dropout rate of placebo group was 25% versus 23%, 19%, 17%, and 38% of the 1, 3, 6 and 10 mg/kg aducanumab groups, respectively⁹⁴. The high rate of treatment discontinuation in the 10 mg/kg group compared to placebo may have contributed to this apparent positive effect of the antibody on cognitive status⁷⁷. Despite the initial excitement for this antibody, two large 18-month, double-blind, placebo-controlled phase 3 trials that enrolled participants with early AD

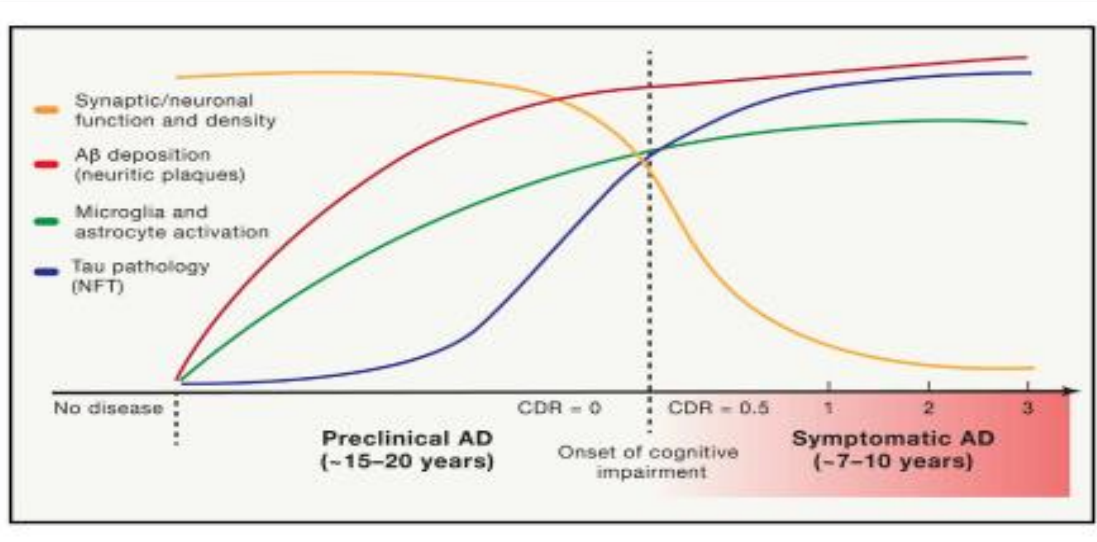


Figure 3. Timing of the main AD pathophysiological events¹. A β deposition is estimated to start about 15 and 20 years before the clinical symptoms of AD. Simultaneously, there are early neuroinflammatory responses. Increased tau pathology correlates with severity of disease. Synaptic dysfunction and loss of synapses progress with the pathological spread of tau aggregates.

4. Risk Factors for Alzheimer's Disease

Several risk factors participate in the pathogenesis of AD, particularly in LOAD. Epidemiological studies showed that age, female gender, lower level of education, physical inactivity, previous traumatic brain injury and psychiatric factors (e.g. depression and stress in early life) increase the AD risk⁴⁹. The risk of AD is 3 times higher in females in comparison with males. Midlife hypertension and obesity, type 2 diabetes mellitus, smoking, stroke and cardiovascular disease are also associated with an increased risk of AD⁴⁹.

4.1. Age

Age is considered the most important risk factor for AD. As age advances, it is estimated that prevalence of AD increases to 19% in individuals aged 75 to 84 years and to 30-35% in people older than 85 years⁴⁹. AD is believed to be an accelerated form of normal aging, based on observation that many of pathological processes of AD are present in normal aging, although with less severity. Events such as reduction in brain volume and weight, dilation of the ventricles, loss of synapses and the presence of SPs and NFTs are observed in normal aging⁴⁹. Arriagada *et al.* found the presence of SPs in a large number of normal individuals over the age of 55 years⁵⁰. In turn, a cross-sectional study involving 199 cognitively normal individuals reported an abrupt increase in the number of SPs and NFTs from the age of 71⁵¹.

Two age-related pathological alterations may be implicated in the development of AD: first, the demyelination of the white matter that may lead to the formation of protein deposits

is testing higher dose of solanezumab in asymptomatic older individuals selected for positive A β biomarkers (ClinicalTrials.gov, NCT02008357). In turn, the API-APOE4 trial was terminated in early 2020 by Novartis and assessed CD106 versus a BACE1 inhibitor (CNP520) in asymptomatic homozygous APOE ϵ 4 carriers (ClinicalTrials.gov, NCT02565511). DIAN-TU phase 2/3 trial with Roche's gantenerumab and Lilly's solanezumab in individuals at risk for or with ADAD (APP or PSEN mutation carriers) began in 2012 and includes multiple sites in the United States and Europe (ClinicalTrials.gov, NCT01760005)⁷⁹. The most recent reported data demonstrate that none of the treatments achieve the primary study endpoint: a slowdown in cognitive impairment, as measured by DIAN-TU cognitive composite, which is created to test cognitive performance in ADAD patients⁹⁵. Crenezumab is being used in the API-ADAD Colombia trial (ClinicalTrials.gov, NCT01998841). The goal of this study is to evaluate the efficacy and safety of antibody versus placebo in asymptomatic PSEN1 G280A carriers ("Paisa" mutation). The upcoming primary prevention A3 trial will test monoclonal antibody BAN2401 in cognitively normal participants with intermediate A β levels, who are at high risk for further A β accumulation⁷⁹.

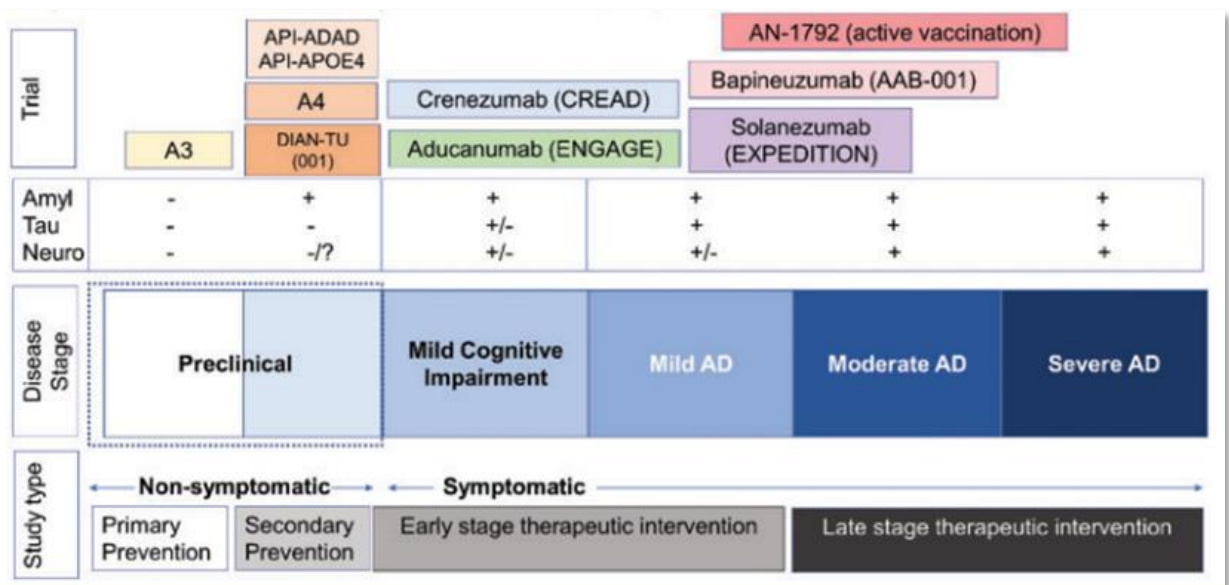


Figure 8. Schematic representation of the alignment between stages of AD and some examples of A β -directed immunotherapy clinical trials⁷⁹. Amyl, amyloid; Neuro, neurodegeneration.

7.3. Tau-directed Immunotherapy

AD is considered a tauopathy since the tau protein suffers post-translational modifications leading to tau aggregation and formation of NFTs. The aim of anti-tau antibodies is to neutralize and/or eliminate extracellular pathogenic tau forms (monomers and tau aggregates), which are thought to be responsible for seeding and spreading of tau pathology. Anti-tau antibodies can recognize C-terminus, N-terminus, mid region or the microtubule

binding region of tau. The N-terminal region of tau is appealing for development of tau antibodies⁸³. In AD, tau protein in CSF consists of proteolytically derived fragments and most of them are N-terminal fragments⁹⁶. Inversely, most of the tau in the AD brain is truncated, mainly at the N-terminal portion⁹⁷. Consequently, antibodies targeting the N-terminus do not recognize truncated tau. In the mid domain, phosphorylation of tau at the position S202 and T205 was described as feature for tau pathology in AD as well as phosphorylation of tau at the position T231^{98,99}. Finally, it has been reported the C-terminus of tau contains various phosphorylation sites such as pS413, pS396, pS404 which regulate microtubule binding of tau and its hyperphosphorylation is observed in early and late stages of AD¹⁰⁰.

Several anti-tau immunotherapies reduced tau seeding and cognitive deficits in transgenic mice expressing mutant tau proteins⁸³. Human studies started recently.

7.3.1. Active Immunization

There are only two tau active vaccines that are being tested in human clinical trials (Table 2). The active vaccine AADvac-I (Axon Neuroscience SE) consists of a synthetic unphosphorylated fragment of tau peptide (aa294-305/4R) coupled to keyhole limpet hemocyanin (KLH) and aluminum hydroxide as adjuvant. AADvacI vaccine leads predominantly to the production of an IgG1 antibody response that target conformational epitopes in the microtubule-binding region of tau, blocking tau aggregation and spreading of tau pathology in the extracellular space of the brain. In a 3-month randomized, double-blind, placebo-controlled phase I trial (ClinicalTrials.gov, NCT01850238), AADvac-I proved to be safe, with injection site reactions being the most common adverse event. Of 30 patients with mild-to-moderate AD who received AADvac-I subcutaneously, 29 developed an IgG immune response, indicating that vaccine was highly immunogenic in humans¹⁰¹. A 24-month phase 2 trial testing the use of AADvac-I in patients with mild AD was completed in 2019 (ClinicalTrials.gov, NCT02579252). At 24 months, AADvacI reduced CSF levels of total tau and phospho-tauT181 and phospho-tauT217 and brain volume loss, which correlated with a cognitive improvement in CDR-SB scores (www.alzforum.org). The other tau vaccine is ACI-35, which is a liposome-based vaccine consisting of 16 copies of synthetic phosphorylated tau fragment at residues S396/S404 anchored into a lipid bilayer⁷⁷. ACI-35 was designed to induce an immune response against pathologic phosphorylated tau with no cross-reactivity against physiological tau (www.alzforum.org). AC Immune and Janssen are currently recruiting people with early AD in order to initiate a phase Ib/2a trial to investigate safety and immunogenicity of ACI-35.030, a second generation of the ACI-35 vaccine (ClinicalTrials.gov, NCT04445831)⁷⁷.

7.3.2. Passive Immunization

Several tau-directed monoclonal antibodies have reached the clinical development stage (Table 2). ABBV-8E12 (Tilavonemab), BIIB092 (Gosuranemab) and R07105705 (Semorinemab) are humanized IgG4 monoclonal antibodies that recognize a linear, unphosphorylated epitope located in the N-terminal domain of tau, while LY3303560 (Zagotenemab) is a humanized IgG4 monoclonal antibody that recognizes a conformational epitope (aa7–9/313–322)⁸³. Treatment with ABBV-8E12 vaccine from AbbVie was found safe and well-tolerated in a phase I double-blind, placebo-controlled, single ascending dose trial (ClinicalTrials.gov, NCT02494024) for progressive supranuclear palsy (PSP). BIIB092 from Biogen decreased CSF levels of N-terminal tau in a randomised, placebo-controlled, multiple ascending dose phase Ib trial for PSP (ClinicalTrials.gov, NCT02460094). In transgenic mice expressing human mutant tau, Roche/Genentech's R07105705 increased plasma levels of tau ("peripheral sink mechanism"). ABBV-8E12, BIIB092 and R07105705 are currently undergoing phase 2 trials in patients with prodromal-to-mild AD (ClinicalTrials.gov, NCT02880956; NCT03352557; NCT02880956). Regarding to the Eli Lilly's LY3303560, results of two phase I trials have not yet been published (Clinicaltrials.gov, NCT02754830; NCT03019536). However, LY3303560 is currently being tested in a phase 2 trial in patients with early AD (Clinicaltrials.gov, NCT03518073)⁸³.

Since tau pathology correlates better with cognitive impairments than A β lesions, it is expected the results regarding tau-directed immunotherapy performance in clinical trials will be more favorable than those obtained with A β -directed immunotherapy⁸³.

Table 1. Examples of tau-directed immunotherapy in clinical development for AD.

Compound	Mechanism of Action	Most Advanced Development Phase	Status
AADVac-I	Active immunotherapy	2	Completed
ACI-35.030	Active immunotherapy	Ib/2a	Recruiting
ABBV-8E12	Passive immunotherapy	2	Ongoing
BIIB092	Passive immunotherapy	2	Ongoing
R07105705	Passive immunotherapy	2	Ongoing
LY3303560	Passive immunotherapy	2	Ongoing

7.4. ApoE-direct Immunotherapy

Using anti-apoE antibodies may be an alternative approach for lowering A β amyloid plaque deposition since apoE influence A β aggregation and clearance. Two anti-apoE antibodies were tested in preclinical studies. When delivered peripherally to APP/PSEN1 mice either before or after plaque deposition, anti-mouse apoE antibody HJ6.3 (IgG) reduced insoluble A β 40 and A β 42 levels and amyloid deposition in the cortex and hippocampus, without affecting plasma cholesterol levels. Also, treatment with HJ6.3 slightly improved spatial learning performance in the water maze^{102,103}. In turn, anti-human apoE monoclonal antibody HAE-4 (IgG) specifically recognizes non-lipidated, aggregated apoE3 and E4 preferentially located within SPs. In APP transgenic mice expressing human apoE4, the delivery of this antibody centrally or peripherally before the onset of plaque deposition reduced A β deposition, together with insoluble A β levels without reducing cerebral or plasma apoE levels. Using adeno-associated virus to express HAE-4 with and without a D265A mutation in the Fc region, Liao *et al.* demonstrated that HAE-4 mediates its effects by inducing antibody-mediated plaque opsonization. Unlike the HAE-4 antibodies without the D265A mutation in the Fc domain, the HAE-4 antibodies with the D265A mutation in the Fc domain that prevents Fc γ receptor binding were not effective in clearance of SPs¹⁰⁴.

8. Challenges and Future Perspectives

Only small percentage of antibodies penetrate the intact BBB. BBB permeability is believed to be altered in AD patients, which may enhance the passage of antibodies across the BBB. However, Bien-Ly *et al.* found that CNS levels of three molecules with different molecular weights (dextran, albumin and IgG) were similar between APP/PSEN2 mice (young or aged) and wild-type mice, suggesting that BBB of APP/PSEN2 mice is intact. The lack of BBB disruption was also observed in other mouse models of AD¹⁰⁵. Based on these findings, some preclinical studies have been investigating BBB-crossing bispecific antibodies, which simultaneously target the brain antigen and receptor-mediated transport systems on the BBB (e.g. insulin receptor or transferrin receptor). Using a mouse model of AD, Gustavsson *et al.* displayed that bispecific monoclonal antibody RmAbI58-scFv8D3 has higher brain uptake via transferrin receptor-mediated transcytosis than RmAbI58R (mouse version of BAN2401), as assessed by SPECT scan. In contrast to RmAbI58R, RmAbI58-scFv8D3 was also capable to access the entire brain volume, showing a uniform distribution¹⁰⁶. Taken together, these results

agree that BBB-penetrating approaches are necessary to increase delivery of antibodies to the brain.

Similarly to the treatment strategies for other multifactorial chronic diseases, a combinatorial treatment for AD (e.g. A β - and tau- directed immunotherapy) seems more likely to produce clinical successes than monotherapy. Indeed, combination strategies have begun to be using in clinical trial design. For instance, the Lilly TRAILBLAZER phase 2 trial (ClinicalTrials.gov, NCT03367403) tested anti-pyroglutamate A β monoclonal antibody donanemab alone and in combination with BACE1 inhibitor LY3202626 in patients with early AD. Unluckily, LY3202626 was associated with slight cognitive worsening, so Lilly decided to drop the combination treatment arm. However, combination therapy in AD clinical trial design should continue to be encouraged, especially as a preventive approach¹⁰⁷.

9. Conclusion

Several mutations in any of APP, PSEN1 and PSEN2 genes cause familial AD, following an autosomal dominant inheritance pattern. Sporadic AD is a heterogeneous disease with a complex pathogenesis, involving several risk factors that increase the predisposition to develop the disease, such as demographic, genetic, environmental and vascular factors.

Despite great progress in understanding of AD pathobiology, there is still no disease-modifying therapy approved for AD treatment. Amyloid-based immunotherapies appear to be ineffective in altering the disease course in clinical trials for symptomatic AD. Thus, recent clinical trials efforts have focused on applying these amyloid-based immunotherapies to the preclinical disease. Looking for non-amyloid therapies, tau-directed immunotherapies are at an early stage of clinical development, showing great potential to pursue forward, whereas immunotherapies targeting apoE have not yet reached the clinical studies.

10. References

1. JUSTIN, L.; DAVID, M. - **Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies**. *Cell*. 179 (2019) 312-339.
2. ALZHEIMER A. - **On a peculiar disease of the cerebral cortex**. *Allg Z Psychiatr PS*. 64 (1907) 146-148.
3. HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. - **Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis**. *Science*. 256 (1992) 184-185.
4. TCW J.; GOATE A. M. - **Genetics of β -Amyloid Precursor Protein in Alzheimer's Disease**. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 7:6 (2017) a024539.
5. DE STROOPER, B.; KARRAN, E. - **The Cellular Phase of Alzheimer's Disease**. *Cell*. 164:4 (2016) 603-15.
6. CHOW, V. W.; MATTSON, M. P. *et al.* - **An overview of APP processing enzymes and products**. *Neuromolecular Med*. 12:1 (2010) 1-12.
7. PEREZ-GARMENDIA, R.; GOAR, G. - **Pyroglutamate-Modified Amyloid Beta Peptides: Emerging Targets for Alzheimer's Disease Immunotherapy**. *Current neuropharmacology*. 11:5 (2013) 491-8.
8. CÁRDENAS, A. M. *et al.* - **Role of tau protein in neuronal damage in Alzheimer's disease and Down syndrome**. *Arch Med Res*. 43 (2012) 645-654.
9. GUO, T. *et al.* - **Roles of tau protein in health and disease**. *Acta Neuropathol*. 133 (2017) 665-704.
10. MANDELKOW, E.; VON BERGEN, M. *et al.* - **Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease**. *Brain Pathol*. 17 (2007) 83-90.
11. MARCELLI, S.; CORBO, M. *et al.* - **The Involvement of Post-Translational Modifications in Alzheimer's Disease**. *Curr. Alzheimer Res*. 15 (2018) 313-335.
12. STÖHR, J.; WU, H. *et al.* - **A 31-residue peptide induces aggregation of tau's microtubule-binding region in cells**. *Nat Chem*. 9 (2017) 874-881.
13. VON BERGEN, M.; BARGHORN, S. *et al.* - **Tau aggregation is driven by a transition from random coil to beta sheet structure**. *Biochim Biophys Acta*. 1739 (2005) 158-166.

14. HOOVER, B. R.; REED, M.N. *et al.* - **Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration.** *Neuron.* 68 (2010) 1067-1081.
15. GUO, J.L.; MCBRIDE, J. D. *et al.* - **Amyloid- β plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation.** *Nat. Med.* 24 (2018) 29-38.
16. CAMERO, S.; BENITEZ, M. J. *et al.* - **Tau protein provides DNA with thermodynamic and structural features which are similar to those found in histone-DNA complex.** *J Alzheimers Dis.* 39 (2014) 649-660.
17. SULTAN, A.; NESSLANY, F. *et al.* - **Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection.** *J Biol Chem.* 286 (2011) 4566-4575.
18. PONTECORVO M. J. *et al.* - **A multicentre longitudinal study of flortaucipir (18F) in normal ageing, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease dementia.** *Brain.* 1:142(6) (2019) 1723-1735.
19. PRICE, J. L., MORRIS, J. C. - **Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease.** *Ann Neurol.* 45:3 (1999) 358-68.
20. PARK, S. A. *et al.* - **Tau mis-splicing in the pathogenesis of neurodegenerative disorders.** *BMB reports.* 49 (2016).
21. MATTSON, M. P. - **Oxidative stress, perturbed calcium homeostasis, and immune dysfunction in Alzheimer's disease.** *J Neuroviral.* 8:6(2002) 539-550.
22. SARASIJA, S. *et al.* - **Presenilin mutations deregulate mitochondrial Ca^{2+} homeostasis and metabolic activity causing neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*.** *eLife.* 7 (2018) e33052.
23. ZATTI, G. *et al.* - **Presenilin mutations linked to familial Alzheimer's disease reduce endoplasmic reticulum and Golgi apparatus calcium levels.** *Cell calcium.* 39,6 (2006) 539-50.
24. WYSS-CORAY, T; ROGERS, J. - **Inflammation in Alzheimer disease-a brief review of the basic science and clinical literature.** *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2:1 (2012) a006346.
25. KINNEY, J.W. *et al.* - **Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease.** *Alzheimers Dement (N Y).* 4 (2018) 575-590.

26. KELLEHER, R. J.; SOIZA, R. L. - **Evidence of endothelial dysfunction in the development of Alzheimer's disease: Is Alzheimer's a vascular disorder?** *Am J Cardiovasc Dis.* 3:4 (2013) 197-226.
27. MANTYH, P. W. *et al.* - **Aluminum, Iron, and Zinc Ions Promote Aggregation of Physiological Concentrations of β -Amyloid Peptide.** *J Neurochem* (1993).
28. TOMLJENOVIC, L. - **Aluminum and Alzheimer's disease: after a century of controversy, is there a plausible link?** *J Alzheimers Dis.* 23:4 (2010) 567-598.
29. CRAIG, A. - **The role of insulin in Alzheimer's disease.** *GM.* (2019).
30. SHAH, K. *et al.* - **The role of glucose transporters in brain disease: diabetes and Alzheimer's Disease.** *T. Int J Mol Sci.* 13:10 (2012) 12629-55.
31. CLAXTON, A. *et al.* - **Long-acting intranasal insulin detemir improves cognition for adults with mild cognitive impairment or early-stage Alzheimer's disease dementia.** *J Alzheimers Dis.* 44:3 (2015) 897-906.
32. SKEBERDIS, V. A. *et al.* - **Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D-aspartate receptors to the cell surface by exocytosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:6 (2001) 3561-6.
33. WAN, Q. *et al.* - **Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin.** *Nature.* 388: 6643 (1997) 686-90.
34. HONG, M; LEE, V. M. - **Insulin and insulin-like growth factor-I regulate tau phosphorylation in cultured human neurons.** *J Biol Chem.* 272 (1997) 19547-53.
35. PANDINI, G. *et al.* - **Insulin has multiple antiamyloidogenic effects on human neuronal cells.** *Endocrinology.* 154 (2013) 375-87.
36. XIE, L. *et al.* - **Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor.** *J Neurosci.* 222 (2002) RC221.
37. DOMINY, S. S.; LYNCH, C. *et al.* - **Porphyromonas gingivalis in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors.** *Sci Adv.* 5 (2019) eaau3333.
38. READHEAD, B.; HAURE-MIRANDE, J. V. *et al.* - **Multiscale Analysis of Independent Alzheimer's Cohorts Finds Disruption of Molecular, Genetic, and Clinical Networks by Human Herpesvirus.** *Neuron.* 99 (2018) 64-82.

39. SOSCIA, S. J.; KIRBY, J. E. *et al.* - **The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide.** PLoS ONE. 5 (2010).
40. BOURGADE, K.; GARNEAU, H. *et al.* - **β - Amyloid peptides display protective activity against the human Alzheimer's disease-associated herpes simplex virus-1.** Biogerontology. 16 (2015) 85-98.
41. SPITZER, P, CONDIC, M. *et al.* - **Amyloidogenic amyloid- β -peptide variants induce microbial agglutination and exert antimicrobial activity.** Sci. Rep. 6 (2016) 32228.
42. MOIR, R. D. *et al.* - **The antimicrobial protection hypothesis of Alzheimer's disease.** Alzheimers Dement. 14 (2018) 1602-1614.
43. SIVAPRAKASAM, K. - **Towards a unifying hypothesis of Alzheimer's disease: cholinergic system linked to plaques, tangles and neuroinflammation.** Curr Med Chem. 13: 18 (2006) 2179-2188.
44. LAHIRY, D. K., MALONEY, B. - **The 'LEARn' (Latent early-life associated regulation) model integrates environmental risk factors and the developmental basis of Alzheimer's disease and proposes remedial steps.** Exp Gerontol. 45 (2010) 291-296.
45. LI, P.; MARSHALL, L. *et al.* - **Epigenetic dysregulation of enhancers in neurons is associated with Alzheimer's disease pathology and cognitive symptoms.** Nat Commun. 10 (2019) 2246.
46. GORDON, B. A.; BLAZEY, T. M.; SU, Y. *et al.* - **Spatial patterns of neuroimaging biomarker change in individuals from families with autosomal dominant Alzheimer's disease: a longitudinal study.** Lancet Neurol. 17:3 (2018) 241-250.
47. MORRIS, J. C. - **The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules.** Neurology. 43 (1993) 2412-2414.
48. O'BRYANT, S. *et al.* - **Staging dementia using Clinical Dementia Rating Scale Sum of Boxes scores: a Texas Alzheimer's research consortium study.** Archives of neurology. 65:8 (2008) 1091-5.
49. ARMSTRONG, R. - **Risk factors for Alzheimer's disease.** Folia Neuropathologica. 57: 2 (2019) 87-105.

50. ARRIAGADA, P. V. *et al.* - **Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in non-demented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease.** *Neurology*. 42 (1992)1681-1688.
51. MILLER, D. F. *et al.* - **A descriptive study of neuritic plaques and neurofibrillary tangles in an autopsy population.** *Am J Epidemiol*. 20 (1984) 331-341.
52. BARTZOKIS, G. - **Alzheimer's disease as homeostatic response to age-related myelin breakdown.** *Neurobiol Aging*. 32 (2011) 1341-1371.
53. HENEKA, M. T. *et al.* - **Locus caeruleus controls Alzheimer's disease pathology by modulating microglial function through norepinephrine.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 107 (2010) 6058-6063.
54. BANKS, W. A.; OWEN, J. B.; ERICKSON, M. A. - **Insulin in the brain: there and back again.** *Pharmacol Ther*. 136:1 (2012) 82-93.
55. CORDER, E. H.; SAUNDERS, A. M. *et al.* - **Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families.** *Science*. 261 (1993) 921-923.
56. ROSES, A. D. - **Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease.** *Annu. Rev. Med*. 47 (1996) 387-400.
57. BUSSY, A.; SNIDER, B. J. *et al.* - **Dominantly Inherited Alzheimer Network Effect of apolipoprotein E4 on clinical, neuroimaging, and biomarker measures in noncarrier participants in the Dominantly Inherited Alzheimer Network.** *Neurobiol. Aging*. 75 (2019) 42-50.
58. MISHRA, S.; BLAZEY, T. M. *et al.* - **Longitudinal brain imaging in preclinical Alzheimer disease: impact of APOE ϵ 4 genotype.** *Brain*. 141 (2018) 1828-1839.
59. NAMBA, Y.; TOMONAGA, M. *et al.* - **Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease.** *Brain Res*. 541 (1991)163-166.
60. BALES, K.R.; LIU, F. *et al.* - **Human APOE isoform-dependent effects on brain beta-amyloid levels in PDAPP transgenic mice.** *J. Neurosci*. 29 (2009) 6771-6779.
61. LIU, C. C.; ZHAO, N. *et al.* - **ApoE4 Accelerates Early Seeding of Amyloid Pathology.** *Neuron*. 96 (2017) 1024-1032.e3.

62. CASTELLANO, J. M., KIM, J. *et al.* - **Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance.** *Sci. Transl. Med.* 3: 89 (2011) ra57.
63. VERGHESE, P. B. *et al.* - **ApoE influences amyloid- β (A β) clearance despite minimal apoE/A β association in physiological conditions.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 110:19 (2013) 1807-1816.
64. NATHAN, B. P.; BELLOSTA, S. *et al.* **Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro.** *Science.* 264 (1994) 850-852.
65. NURIEL, T. *et al.* - **Neuronal hyperactivity due to loss of inhibitory tone in APOE4 mice lacking Alzheimer's disease-like pathology.** *Nat Commun.* 8:1 (2017) 1464.
66. SHI, Y.; YAMADA, K. *et al.* - **Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy.** *Nature.* 549 (2017) 523-527.
67. MUKHAMEDOVA, N. *et al.* - **Small GTPase ARF6 regulates endocytic pathway leading to degradation of ATP-binding cassette transporter AI.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 36 (2016) 2292-2303.
68. BOEHM-CAGAN, A. *et al.* - **Differential Effects of apoE4 and Activation of ABCA1 on Brain and Plasma Lipoproteins.** *PloS one.* 11:11 (2016) e0166195.
69. COLONNA, M.; WANG, Y. - **TREM2 variants: new keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis.** *Nat Rev Neurosci.* 17:4 (2016) 201-7.
70. KOBER, D. L. *et al.* - **Neurodegenerative disease mutations in TREM2 reveal a functional surface and distinct loss-of-function mechanisms.** *Elife.* 5 (2016).
71. CREMONINI, A. L. *et al.* - **Nutrients in the Prevention of Alzheimer's Disease.** *Oxid Med Cell Longev.* (2019) 9874159.
72. KIVIPELTO, M.; MANGIALASCHE, F.; NGANDU, T. - **Lifestyle interventions to prevent cognitive impairment, dementia and Alzheimer disease.** *Nat Rev Neurol.* 14 (2018) 653-666.
73. HAN, J. Y.; BESSER, L. M. *et al.* - **Cholinesterase Inhibitors May Not Benefit Mild Cognitive Impairment and Mild Alzheimer Disease Dementia.** *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 33 (2019) 87-94.

74. MCSHANE, R., AREOSA SASTRE, A. *et al.* - **Memantine for dementia.** Cochrane Database Syst. Rev. (2006) CD003154.
75. SLIFKA, M.K.; AMANNA, I.J. - **Passive Immunization.** Plotkin's Vaccines. (2018) 84-95. e10.
76. VIDARSSON, G. *et al.* - **IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions.** Frontiers in immunology. 5 (2014) 520.
77. PANZA, F. *et al.* - **A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease.** Nat Rev Neurol. 15 (2019) 73-88.
78. VELLAS, B. *et al.* - **Long-term follow-up of patients immunized with AN1792: reduced functional decline in antibody responders.** Curr Alzheimer Res. 2009 6:2 (2009)144-51.
79. OVERK, C.; MASLIAH, E. - **Could changing the course of Alzheimer's disease pathology with immunotherapy prevent dementia?** Brain. 142:7 (2019) 1853-1855.
80. PASQUIER, F. *et al.* - **Two phase 2 multiple ascending-dose studies of vanutide cridificar (ACC-001) and QS-21 adjuvant in mild-to-moderate Alzheimer's disease.** J. Alzheimers Dis. 51 (2016) 1131-1143.
81. WINBLAD, B. *et al.* - **Safety, tolerability, and antibody response of active A β immunotherapy with CAD106 in patients with Alzheimer's disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study.** Lancet Neurol. 11 (2012) 597-604.
82. VANDENBERGHE, R. *et al.* - **Active A β immunotherapy CAD106 in Alzheimer's disease: a phase 2b study.** Alzheimers Dement. 3 (2016) 10–22.
83. PLOTKINA, S.; CASHMANB, N. - **Passive immunotherapies targeting A β and tau in Alzheimer's disease.** Neurobiology of Disease. 144 (2020).
84. SALLOWAY, S.; SPERLING R. *et al.* - **Bapineuzumab 301 and 302 Clinical Trial Investigators Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease.** N. Engl. J. Med. 370 (2014) 322-333.
85. DEMATTOS, R. B. *et al.* - **Peripheral anti-A β antibody alters CNS and plasma A β clearance and decreases brain A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease.** Proc. Natl Acad. Sci. USA 98 (2001) 8850-8855.

86. DOODY, R. S. *et al.* - **Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease.** *N. Engl. J. Med.* 370 (2014) 311–321.
87. HONIG, L. S. *et al.* - **Trial of solanezumab for mild dementia due to Alzheimer's disease.** *N. Engl. J. Med.* 378 (2018) 321-330.
88. BOHRMANN, B. *et al.* - **Gantenerumab: a novel human anti-A β antibody demonstrates sustained cerebral amyloid- β binding and elicits cell-mediated removal of human amyloid- β .** *J. Alzheimers Dis.* 28 (2012) 49-69.
89. OSTROWITZKI, S. *et al.* - **Mechanism of amyloid removal in patients with Alzheimer disease treated with gantenerumab.** *Arch. Neurol.* 69 (2012) 198–207.
90. NIKOLICHEVA, T. *et al.* - **CSF and amyloid pet biomarker data from the phase 3 SCarlet SCarlet RoAD trial, a study of gantenerumab in patients with prodromal AD.** *Neurobiol. Aging* 39 (2016) S28-S29.
91. CUMMINGS, J. L. *et al.* - **ABBY: a phase 2 randomized trial of crenezumab in mild to moderate Alzheimer disease.** *Neurology* 90 (2018) e1889-e1897.
92. SALLOWAY, S. *et al.* - **Amyloid positron emission tomography and cerebrospinal fluid results from a crenezumab anti-amyloid-beta antibody double-blind, placebo-controlled, randomized phase II study in mild-to-moderate Alzheimer's disease (BLAZE).** *Alzheimers Res. Ther.* 10 (2018) 96.
93. FERRERO, J. *et al.* - **First-in-human, double-blind, placebo-controlled, single-dose escalation study of aducanumab (BIIB037) in mild-to-moderate Alzheimer's disease.** *Alzheimers Dement.* 2 (2016) 169-176.
94. BUDD HAEBERLEIN, S. *et al.* - **Clinical development of aducanumab, an anti-A β human monoclonal antibody being investigated for the treatment of early Alzheimer's disease.** *J. Prev. Alzheimers Dis.* 4 (2017) 255-263.
95. **Failure of DIAN-TU drug trial for Alzheimer's disease** [accessed on 27 jun. 2020]. Available in: <https://www.clinicaltrialsarena.com/comment/dian-tu-drug-trial/>
96. JOHNSON, G. V.; SEUBERT, P. *et al.* - **The tau protein in human cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease consists of proteolytically derived fragments.** *J Neurochem.* 68 (1997) 430-433.
97. ZILKA, N.; KOVACECH, B. *et al.* - **The self-perpetuating tau truncation circle.** *Biochem Soc Trans.* 40 (2012) 681-686.

98. LUNA-MUNOZ, J.; CHAVEZ-MACIAS, L. *et al.* - **Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific phospho-dependent tau epitopes in Alzheimer's disease.** *J Alzheimers Dis.* 12 (2007) 365-375.
99. LUNA-MUNOZ, J.; CHAVEZ-MACIAS, L. *et al.* - **Regional conformational change involving phosphorylation of tau protein at the Thr231, precedes the structural change detected by Alz-50 antibody in Alzheimer's disease.** *J Alzheimers Dis.* 8 (2005) 29-41.
100. AUGUSTINACK, J.C.; SCHNEIDER, A. *et al.* - **Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease.** *Acta Neuropathol.* 103 (2002) 26-35.
101. NOVAK P. *et al.* - **Safety and immunogenicity of the tau vaccine AADvacI in patients with Alzheimer's disease: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase I trial.** *Lancet Neurol.* 16 (2017) 123–134.
102. KIM, J.; ELTORAI, A. E. M. *et al.* - **Anti-apoE immunotherapy inhibits amyloid accumulation in a transgenic mouse model of A β amyloidosis.** *J. Exp. Med.* 209 (2012) 2149-2156.
103. LIAO, F.; HORI, Y. *et al.* - **Anti-ApoE antibody given after plaque onset decreases A β accumulation and improves brain function in a mouse model of A β amyloidosis.** *J. Neurosci.* 34 (2014) 7281-7292.
104. LIAO, F.; LI, A. *et al.* - **Targeting of nonlipidated, aggregated apoE with antibodies inhibits amyloid accumulation.** *J. Clin. Invest.* 128 (2018) 2144-2155.
105. Bien-Ly, N. *et al.* - **Lack of Widespread BBB Disruption in Alzheimer's Disease Models: Focus on Therapeutic Antibodies.** *Neuron.* 88:2 (2015) 289-97.
106. GUSTAVSSON, T. *et al.* - **SPECT imaging of distribution and retention of a brain-penetrating bispecific amyloid- β antibody in a mouse model of Alzheimer's disease.** *Transl Neurodegener* 9:37 (2020).
107. GAUTHIER, S.; ALAM J. *et al.* - **Combination Therapy for Alzheimer's Disease: Perspectives of the EU/US CTAD Task Force.** *J. Prev. Alzheimers Dis.* (2019) 6: 164-168.
108. SINDI, S.; MANGIALASCHE, F.; KIVIPELTO, M. - **Advances in the prevention of Alzheimer's Disease.** *FI000Prime Rep.* 7: 50 (2015).

109. **Oxford Medical Education** [accessed on 2 jul. 2020]. Available in: <http://www.oxfordmedicaleducation.com/geriatrics/mini-mental-state-examination-mmse/>
110. KUEPER, J. K. *et al.* - **The Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale (ADAS-Cog): Modifications and Responsiveness in Pre-Dementia Populations.** A Narrative Review. *Journal of Alzheimer's disease.* 63:2 (2018) 423-444.

ANNEXES

ANNEX I - The Clinical Dementia Rating Scale⁴⁷.

Clinical dementia rating (CDR): 0, 0.5, 1, 2, 3

Impairment	None (0)	Questionable (0.5)	Mild (1)	Moderate (2)	Severe (3)
Memory	No memory loss or slight inconstant forgetfulness	Consistent slight forgetfulness; partial recollection of events	Moderate memory loss; more marked for recent events; defect interferes with everyday activities	Severe memory loss; only highly learned material retained; new material rapidly lost	Severe memory loss; only fragments remain
Orientation	Fully oriented	Fully oriented or slight difficulty with time relationships	Moderate difficulty with time relationships; oriented for place at examination; may have geographic disorientation elsewhere	Severe difficulty with time relationships; usually disoriented in time, often to place	Oriented to person only
Judgment and problem	Solves everyday problems and handles business and financial affairs well; judgment good in relation to past performance	Slight impairment to solving problems, similarities, differences	Moderate difficulty in handling problems, similarities, differences; social judgment usually maintained	Severely impaired in handling problems, similarities, differences; social judgment usually impaired	Unable to make judgments or solve problems
Community affairs	Independent function at usual level in job, shopping, volunteer and social groups	Slight impairment in these activities	Unable to function independently at these activities though may still be engaged in some; appears normal to casual inspection	No pretense of independent function outside of home; appears well enough to be taken to functions outside of family home	No pretense of independent function outside of home; appears too ill to be taken to functions outside a family home
Home and hobbies	Life at home, hobbies, intellectual interests well maintained	Life at home, hobbies, intellectual interests slightly impaired	Mild but definite impairment of function at home; more difficult chores abandoned; more complicated hobbies and interests abandoned	Only simple chores preserved; very restricted interests, poorly maintained	No significant function in home
Personal care	Fully capable of self care	Fully capable of self care	Needs prompting	Requires assistance in dressing, hygiene keeping of personal effects	Requires much help with personal care; frequent incontinence

ANNEX 2 - Sum of boxes staging category⁴⁸.

CDR Sum of Boxes Range	Staging Category
0	Normal
0.5-4.0	Questionable cognitive impairment
0.5-2.5	Questionable impairment
3.0-4.0	Very mild dementia
4.5-9.0	Mild dementia
9.5-15.5	Moderate dementia
16.0-18.0	Severe dementia

ANNEX 3 - Type and frequency of consumption of foods in AD preventive diets⁷¹.


Characteristics		
Dietary pattern	Moderate-to-high consumption	Low consumption
Mediterranean	Whole-grain cereals (1-2 s every main meal) Vegetables (≥ 2 s/every main meal) Fruits (1-2 s/every main meal) Olive oil (every main meal) Olives/nuts/seeds (1-2 s/every day) Low-fat diaries (2 s/every day) Herbs/spices/garlic/onions (every day) Eggs (2-4 s/week) White meat (2 s/week) Fish/seafood (≥ 2 s/week) Potatoes (≤ 3 s/week) Legumes (≥ 2 s/week) (Red) wine	Added salt Red meat (< 2 s/week) Processed meat (< 1 s/week) Sweets (≤ 2 s/week)
DASH	Whole-grain products (every day) Vegetables (every day) Fruits (every day) Dairy (moderate-to-high consumption) Poultry (2 s/week) Fish/seafood (1-2 s/week) Legumes (2 s/week)	Saturated fats Total fats Salt (sodium) Sweetened beverages Red and processed meats
MIND	Green leafy vegetables (≥ 6 s/week) Other vegetables (≥ 1 s/day) Nuts (≥ 5 s/week) Berries (≥ 2 s/week) Beans (≥ 3 s/week) Whole grains (≥ 3 s/day) Fish (≥ 1 s/week) Poultry (≥ 2 s/week) Olive oil (primary oil used) (Red) wine (1 glass/day)	Red meats (< 4 s/week) Butter and stick margarines Cheese (< 1 s/week) Pastries and sweets (< 5 s/week) Fried or fast food (< 1 s/week)

ANNEX 4 - Characteristics of three large clinical trials for prevention of cognitive impairment, dementia and AD¹⁰⁸.

TRIALS	FINGER	MAPT	PreDIVA
Sample size	1260 community dwellers, from previous population-based observational cohorts.	1680 community dwellers	3533 community dwellers
Main inclusion criteria	CAIDE Dementia Risk Score >6 and cognition at mean level/slightly lower than expected for age (CERAD test battery).	Frail elderly people, subjective memory complaint, slow walking speed, limitation in IADL (MMSE≥24).	All elderly within general GP practices, non-demented (MMSE >23).
Age at enrolment	60–77 years	≥70 years	70–78 years
Study design	Multi-center, randomized, parallel-group controlled trial.	Multi-center, randomized, controlled trial.	Multi-center, cluster-randomized, parallel group-controlled trial.
Intervention	Multi-domain: nutritional guidance, physical activity, cognitive training, increased social activity and intensive monitoring and management of metabolic and vascular risk factors.	Multi-domain: vascular care, nutritional advice, exercise advice, cognitive training, and/or DHA 800 mg/day.	Multi-domain: nurse-led vascular care including medical treatment of risk factors, nutritional advice, exercise advice.
Duration	2 years + 5 years extended follow-up	3 years + 2 years extended follow-up	6 years
Outcomes	Primary: change in cognitive function (neuropsychological test battery, Trail Making, Stroop), Secondary: dementia, cardiovascular events, depression, disability, quality of life, health resources utilization, AD biomarkers change.	Primary: change in cognitive function (Grober and Buschke memory test) Secondary: cognition (MMSE, CDR), functional status, depression, health resources utilization, AD biomarkers change.	Primary: dementia, disability Secondary: cognitive decline (MMSE, VAT), depression, cardiovascular events.

CERAD, Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease; CDR, clinical dementia rating scale; DHA, docosahexaenoic acid; FINGER, Finnish Geriatric Intervention Study to Prevent Cognitive Impairment and Disability; GP, general practitioner; IADL, instrumental activities of daily living; MAPT, Multidomain Alzheimer Prevention Study; PreDIVA, Prevention of Dementia by Intensive Vascular Care; VAT, visual association test.

ANNEX 5 - Mini-Mental State Examination¹⁰⁹.

MINI MENTAL STATE EXAMINATION (MMSE)		Name:		
		DOB:		
		Hospital Number:		
One point for each answer		DATE:		
ORIENTATION				
Year	Season	Month	Date	Time
...../5/5/5/5/5
Country	Town	District	Hospital	Ward/Floor
...../5/5/5/5/5
REGISTRATION				
Examiner names three objects (e.g. apple, table, penny) and asks the patient to repeat (1 point for each correct. THEN the patient learns the 3 names repeating until correct).	/3/3/3
ATTENTION AND CALCULATION				
Subtract 7 from 100, then repeat from result. Continue five times: 100, 93, 86, 79, 65. (Alternative: spell "WORLD" backwards: DLROW).	/5/5/5
RECALL				
Ask for the names of the three objects learned earlier.	/3/3/3
LANGUAGE				
Name two objects (e.g. pen, watch).	/2/2/2
Repeat "No ifs, ands, or buts".	/1/1/1
Give a three-stage command. Score 1 for each stage. (e.g. "Place index finger of right hand on your nose and then on your left ear").	/3/3/3
Ask the patient to read and obey a written command on a piece of paper. The written instruction is: "Close your eyes".	/1/1/1
Ask the patient to write a sentence. Score 1 if it is sensible and has a subject and a verb.	/1/1/1
COPYING: Ask the patient to copy a pair of intersecting pentagons				
	/1/1/1
TOTAL:	/30/30/30
MMSE scoring				
24-30: no cognitive impairment				
18-23: mild cognitive impairment				
0-17: severe cognitive impairment				



MMSE is a screening tool and evaluate orientation, memory, attention, language and motor skills. The total MMSE score ranges from 0 (severe cognitive impairment) to 30 (no cognitive impairment).

ANNEX 6 - The 11-item version of the Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale (ADAS-Cog)¹¹⁰.

Task	Description	Scoring
Word Recall	A list of 10 words is read by the subject, and then the subject is asked to verbally recall as many of the words as possible. Three trials of reading and recalling are performed.	Mean number of words not recalled across the three trials; scoring range is 0 to 10.
Naming Objects and Fingers	The subject is asked to name the fingers of their dominant hand as well as twelve objects: flower (plastic), bed (doll house furniture), whistle, pencil, rattle, mask, scissors, comb, wallet, harmonica, stethoscope, and tongs.	The number of fingers and objects correctly named; scoping range is 0 to 4.
Commands	The subject is asked to perform commands that involve one to five steps. For example, the two-step command is to "Point to the ceiling, then to the floor."	Scored from 0 to 5 based on the largest number of steps that are correctly performed (score is 0 if five step command is correctly performed).
Constructional Praxis	The subject is shown four geometric forms (circle, two overlapping rectangles, rhombus, cube) and asked to copy them on a piece of paper.	Scored from 0 to 5 based on the number of correctly drawn forms.
Ideational Praxis	The subject is asked to pretend to send a letter to themselves: fold letter, put letter in envelope, seal envelope, address envelope, and put a stamp on the envelope.	Scored from 0 to 5 based on difficulty of performing the five components.
Orientation	The subject is asked the date, month, year, day of the week, season, time of day, place, and person.	The number of correct responses; scoring range is 0 to 8.
Word Recognition	The subject reads twelve words aloud, and then these twelve words are randomly shuffled with twelve new words, and the subject is asked whether they have previously seen each of the twenty-four words. Three trials are performed.	Mean number of correct responses across the three trials; scoring range is 0 to 12.
Language	After the administration of the Word Recall task (Q1) ten minutes of open-ended conversation occur between the test administrator and subject, before the remainder of the tasks are presented. These ten minutes of conversation are used to assess language ability.	Quality of speech is given a global rating by the administrator that ranges from 0 to 5.
Comprehension of Spoken Language	This task also relies on the ten minutes of open-ended conversation. The administrator provides an assessment of how well the subject can understand speech.	The administrator provides a score from 0 to 5.
Word Finding Difficulty	During the aforementioned open-ended conversation, the administrator assesses how much difficulty the subject has in finding desired words.	The administer provides a score from 0 to 5.
Remembering Test Instructions	The administrator provides an assessment according to the number of times that the subject needed to be reminded of instructions for the Word Recognition task.	The administrator provides a score from 1 to 5.

The ADAS-Cog-11 includes 11 tasks that assess the cognitive domains of memory, language, praxis, constructive ability and orientation. The total ADAS-Cog-11 score ranges from 0–70 with higher scores suggesting greater cognitive impairment. There are extended versions of the ADAS-cog which includes additional items to assess, for example, executive function and delayed verbal recall.