

Revisão sistemática sobre a influência dos níveis de pregnenolona e sulfato de pregnenolona na doença de Alzheimer

Experiência Profissionalizante na vertente de Farmácia Comunitária e Investigação

Vítor Rafael Miranda Silva

Estágio para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas
(Mestrado Integrado)

Orientador: Prof. Doutor Samuel Martins Silvestre

abril de 2021

“E eu só digo obrigado por viver com agrado,
Por ter uma vida assim e não assim ao quadrado.”

Samuel Mira

Agradecimentos

A toda a minha família mas, em especial, à minha mãe que sempre deu do seu sangue para que eu tivesse um curso superior.

Ao Professor Doutor Samuel Silvestre por ter orientado o meu trabalho e pela sua disponibilidade para me auxiliar durante todo o processo.

Ao Dr. Júlio Canedo por me ter recebido na sua farmácia, ao Dr. Vítor Almeida por ter supervisionado o meu estágio curricular e a toda a equipa da Farmácia Gândara, onde pude aprender o que é ser farmacêutico.

A todos os amigos que fiz na Covilhã e que tornaram o meu percurso académico em histórias que recordarei para sempre.

Resumo

O presente trabalho está dividido em dois capítulos que descrevem a minha experiência profissionalizante para a obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, apresentando uma componente de investigação, bem como uma componente de estágio realizado em Farmácia Comunitária. O primeiro capítulo é composto por uma revisão sistemática de artigos em que foram comparados os níveis de pregnenolona e sulfato de pregnenolona, em amostras biológicas de doentes com doença de Alzheimer e grupos de controlo sem apresentação de demência. A doença de Alzheimer é a causa mais comum de demência globalmente e os únicos tratamentos aprovados, atualmente, visam apenas a melhoria de sintomas, não possuindo a capacidade de alterar a deterioração progressiva da doença nem o respetivo declínio cognitivo. A pregnenolona é um esteróide derivado do colesterol com várias funções neuronais e, tal como o seu conjugado sulfatado, exibe propriedades de neuroproteção e potenciação de memória. Evidência crescente sobre a influência de uma desregulação de níveis endógenos de esteróides neuroativos na patofisiologia da doença de Alzheimer poderá constituir uma nova abordagem no tratamento e diagnóstico da doença. Desta forma, foi elaborada uma pesquisa sobre o tópico em três bases de dados eletrónicas e incluídos cinco artigos no estudo. Ainda que haja uma tendência para os níveis de pregnenolona e sulfato de pregnenolona estarem aumentados em amostras de sangue, líquido cefalorraquidiano, córtex pré-frontal e córtex temporal de doentes com Alzheimer, não é possível fazer uma associação clara entre a alteração dos níveis destes neuroesteróides e a presença da doença. Adicionalmente, foi demonstrada uma correlação positiva entre os níveis de pregnenolona no córtex temporal e a severidade do estágio neuropatológico da doença. A realização de ensaios clínicos controlados e randomizados a larga escala poderá ser valiosa para avaliar a eficácia de um tratamento com pregnenolona ou sulfato de pregnenolona face ao declínio cognitivo, assim como a realização de estudos prospetivos para avaliar as alterações de concentração a longo prazo destes neuroesteróides e a sua potencialidade como biomarcadores para diagnóstico em estágios precoces da doença de Alzheimer. O segundo capítulo é referente às competências adquiridas no decorrer do estágio em Farmácia Comunitária, na Farmácia Gândara, em Vila Nova de Gaia. Durante o período de estágio curricular, tive oportunidade de contactar com a realidade da profissão de farmacêutico comunitário e desempenhar o papel de agente de saúde pública durante a pandemia provocada pela doença Covid-19.

Palavras-chave

Pregnenolona; sulfato de pregnenolona; neuroesteróides; doença de Alzheimer; farmácia comunitária.

Abstract

The present dissertation is divided into two chapters that describe my professional experience for obtaining a Master's degree in Pharmaceutical Sciences, presenting a research component, as well as an internship component carried out in Community Pharmacy. The first chapter consists of a systematic review of articles comparing the levels of pregnenolone and pregnenolone sulfate in biological samples from patients with Alzheimer's disease and cognitively intact control groups. Alzheimer's disease is the most common cause of dementia globally and the only treatments currently approved are aimed at improving symptoms, without the ability to alter the progressive deterioration of the disease or the corresponding cognitive decline. Pregnenolone is a cholesterol-derived steroid with several neuronal functions and, like its sulfated conjugate, exhibits neuroprotective and memory enhancing properties. Increasing evidence on the influence of endogenous levels of neuroactive steroids on the pathophysiology of Alzheimer's disease may constitute a new approach in the treatment and diagnosis of the disease. In this way, research on the topic was carried out in three electronic databases and five articles were included in the study. Although there is a tendency for pregnenolone and pregnenolone sulfate levels to be increased in blood, cerebrospinal fluid, prefrontal cortex and temporal cortex samples from Alzheimer's patients, it is not possible to make a clear association between the changes in the levels of these neurosteroids and the presence of Alzheimer's. Additionally, a positive correlation has been demonstrated between pregnenolone levels in the temporal cortex and the severity of the neuropathological stage of the disease. Conducting large-scale controlled and randomized clinical trials may be valuable in assessing the effectiveness of a treatment with pregnenolone or pregnenolone sulfate against the cognitive decline, as well as conducting prospective studies to assess changes in the long-term concentration of these neurosteroids and their potential as biomarkers for diagnosis in early stages of Alzheimer's disease. The second chapter refers to the skills acquired during the internship in Community Pharmacy, at Farmácia Gândara, in Vila Nova de Gaia. During the internship period, I had the opportunity to get in touch with the reality of the community pharmacist profession and play the role of public health agent during the pandemic caused by the Covid-19 disease.

Keywords

Pregnenolone; pregnenolone sulphate; neurosteroids; Alzheimer's Disease; community pharmacy.

Índice

Capítulo 1 – Investigação.....	1
1. Introdução	1
1.1. Doença de Alzheimer – Generalidades	1
2. Bases fisiopatológicas na etiologia da DA.....	1
2.1. Beta amiloide.....	2
2.2. Proteína tau.....	2
3. Diagnóstico da DA.....	3
3.1. Critérios NINCDS-ADRDA de classificação para demência devida a DA	4
3.1.1. Demência provável devida a DA: critérios clínicos	4
3.1.2. Demência possível devida a DA: critérios clínicos.....	4
3.2. Avaliação neuropatológica da DA.....	5
3.2.1. Método de Thal	5
3.2.2. Método de Braak.....	5
3.2.3. Método de CERAD.....	5
3.2.4. Critérios NIA-Reagan para o diagnóstico <i>postmortem</i> da DA.....	6
4. Terapias na DA	6
4.1. Tratamentos atuais na DA.....	6
4.2. Perspetivas futuras no tratamento da DA	7
5. De esteróides clássicos a esteróides neuroativos: biossíntese e metabolismo da pregnenolona.....	11
5.1. Visão geral de enzimas esteroidogénicas.....	11
5.2. Esteroidogénese: visão geral das vias principais, biossíntese e metabolismo da PREG	12
5.3. Caminhos esteroidogénicos principais em tecidos específicos.....	14
5.4. Mecanismo de ação dos neuroesteróides.....	15
5.4.1. Modulação de recetores GABA-A.....	15
5.4.2. Modulação de recetores de glutamato e outros neurotransmissores	16
6. Influência da PREG-S na neurotransmissão com relevância na DA.....	16
6.1. PREG-S e a libertação de glutamato	17
6.2. PREG-S e a libertação de GABA.....	17
6.3. PREG-S e a libertação de ACh.....	17
7. Alvos moleculares da PREG e PREG-S e mecanismos de ação.....	18
8. Efeitos centrais da PREG e PREG-S com relevância na DA.....	20

8.1. Efeitos neuroprotetores.....	20
8.2. Efeitos na cognição.....	21
8.3. Alteração dos níveis de PREG e PREG-S na DA.....	22
9. Métodos.....	23
9.1. Revisão sistemática.....	23
9.1.1. Estratégia de pesquisa.....	23
9.1.2. Critérios de elegibilidade.....	23
9.1.3. Extração de dados.....	24
9.1.4. Avaliação da qualidade.....	24
10. Análise de dados.....	24
11. Discussão.....	29
12. Conclusão.....	31
13. Referências.....	32
Capítulo 2 – Estágio em Farmácia Comunitária.....	49
1. Introdução.....	49
2. Caracterização e Organização Geral da Farmácia Gândara.....	49
2.1. Localização e Horário.....	49
2.2. Instalações.....	49
2.2.1 Espaço exterior.....	49
2.2.2. Espaço interior.....	50
2.3. Recursos humanos.....	52
2.3.1 Farmacêutico DT – Deveres e responsabilidades.....	52
2.4. Recursos Informáticos.....	52
2.5. Documentação científica.....	53
3. Aprovisionamento e Armazenamento.....	53
3.1. Fornecedores.....	53
3.2. Receção de encomendas.....	53
3.3. Tipos de encomendas.....	55
3.3.1. Encomenda diária.....	55
3.3.2. Encomenda instantânea.....	55
3.3.3. Encomenda manual.....	55
3.4. Armazenamento.....	55
3.5. Prazos de validade.....	56
3.6. Devoluções.....	56
4. Interação farmacêutico-utente-medicamento.....	57
5. Dispensa de medicamentos e outros produtos de saúde.....	57

5.1. Dispensa de medicamentos sujeitos a receita médica	58
5.2. Regimes de comparticipação	59
5.2.1. Regime geral de comparticipação de medicamentos	59
5.2.2. Regime especial de comparticipação de medicamentos	59
5.2.2.1. Beneficiários	59
5.2.2.2. Patologias ou grupos especiais de utentes	60
5.3. Dispensa de medicamentos não sujeitos a receita médica	60
5.4. Medicamentos sujeitos a legislação especial	61
5.4.1. Medicamentos estupefacientes e psicotrópicos	61
5.4.2. Dispensa ao abrigo de protocolo específico	61
6. Aconselhamento e dispensa de outros produtos de saúde	62
6.1. Produtos de dermofarmácia e higiene	62
6.2. Produtos dietéticos para alimentação especial	62
6.3. Fitoterapia e Suplementos nutricionais	62
6.4. Produtos e medicamentos de uso veterinário	63
6.5. Dispositivos médicos	63
7. Medicamentos manipulados e preparações extemporâneas	64
8. Serviços Farmacêuticos	64
8.1. Controlo da pressão arterial	64
8.2. Perfil lipídico	65
8.3. Glicémia capilar	65
8.4. Vacinação e administração de injetáveis	66
9. Conferência de receituário	66
10. Covid-19 e a farmácia comunitária	67
10.1. Medidas adotadas na FG	67
10.2. Informações disponibilizadas aos utentes	67
10.3. Formas de minimização de contacto	68
11. Referências	68

Lista de Figuras

Figura 1 – Representação esquemática do transporte de colesterol para a matriz mitocondrial e subsequente biossíntese de esteróides	12
Figura 2 – Vias e enzimas principais da esteroidogénese.....	14
Figura 3 - Fluxograma dos artigos seleccionados para revisão	25

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Estudos clínicos sobre terapias modificadoras de DA.....	10
Tabela 2 – Alvos moleculares da PREG e PREG-S com relevância na DA.....	20
Tabela 3 - Lista de estudos eligíveis que compararam concentrações de PREG e/ou PREG-S em doentes com DA e grupos controlo.	26
Tabela 4 – Valores de referência de PAS e PAD	65

Lista de Acrónimos

11 β -HSD	11 β -hidroxiesteróide desidrogenase
17-OHP	17 α -hidroxiprogesterona
17 β -HSD	17 β -hidroxiesteróide desidrogenase
3 α -HSOR	3 α -hidroxiesteróide oxidorreductase
3 β -HSD	3 β -hidroxiesteróide desidrogenase
5 α -DHT	5 α -dihidrotestosterona
5-HT	Serotonina
ACh	Acetilcolina
ADRC	<i>Alzheimer's Disease Research Centers</i>
AIM	Autorização de Introdução no Mercado
AKT	Proteína cinase B
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
APP	Proteína precursora amilóide
AR	Recetor androgénico
A β	Beta amilóide
BACE-1	Beta-secretase 1
CB1R	Recetor canabinóide tipo 1
CDK5	Cinase 5 dependente de ciclina
CERAD	<i>Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease</i>
ChEI	Inibidor da acetilcolinesterase
CNP	Código Nacional de Produto
DA	Doença de Alzheimer
DCI	Denominação Comum Internacional
DGAV	Direção-Geral de Alimentação e Veterinária
DHEA	Desidroepiandrosterona
DHEA-S	Sulfato de desidroepiandrosterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOC	11-desoxicorticosterona
DT	Diretor Técnico
ER	Recetor de estrogénio
FAD	<i>Food and Drug Administration</i>
FEFO	<i>First Expired First Out</i>
FG	Farmácia Gândara
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABA _A R	Recetor GABA-A
GC-MS	Espectrometria de Massa acoplada a Cromatografia Gasosa
GSK-3 β	Glicogénio sintase cinase-3 β
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HRE	Elemento de resposta hormonal
HSD	Hidroxiesteróide desidrogenase
HT	Hipertensão arterial
IP	Intraperitoneal
IP ₃	Inositol trifosfato
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
MAP	Proteína associada a microtúbulos
MAP ₁	Proteína associada a microtúbulos 1
MAP ₂	Proteína associada a microtúbulos 2
MCI	Défice Cognitivo Ligeiro
MEP	Medicamentos estupefacientes e psicotrópicos
mEPSCs	Correntes pós-sinápticas excitatórias em miniatura
mIPSCs	Correntes pós-sinápticas inibitórias em miniatura
MMSE	<i>Mini-Mental State Examination</i>
MNSRM	Medicamento Não Sujeito a Receita Médica
MNSRM-EF	Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica de Dispensa Exclusiva em Farmácia
MoCA	<i>Montreal Cognitive Assessment</i>
mPTP	Poros de permeabilidade transitória da membrana mitocondrial
MRI	Imagem de Ressonância Magnética
mRNA	RNA mensageiro
MSRM	Medicamentos Sujeito a Receita Médica
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADP	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NBM	Núcleo basal de Meynert
NFT	Emaranhado neurofibrilar
NINCDS-ADRDA	<i>National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association</i>
NMDA	N-metil D-Aspartato
NMDAR	Recetor de NMDA
NO	Óxido nítrico
NR	Recetor nuclear
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PHF	Filamentos helicoidais emparelhados
PIP ₃	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PMI	Intervalo <i>postmortem</i>
PR	Recetor de progesterona

PREG	Pregnenolona
PREG-S	Sulfato de pregnenolona
PSEN1/2	Presenilina 1 e 2
PVF	Preço de Venda à Farmácia
PVP	Preço de Venda ao Público
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SF	Filamento único
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema Nacional de Saúde
StAR	Proteína reguladora aguda esteroideogénica
SULT	Sulfotransferase
THC	Tetrahydrocannabinol
THDOC	Tetrahydrodesoxicorticosterona
TRPM3	Canal de potencial de recetor transitório da subfamília M 3
TSPO	Proteína Translocadora 18 KDa
VDAC	Canal Aniónico Dependente de Voltagem
Via MAPK/ERK	Via da MAP cinase
$\alpha 7$ nAChR	Recetor Nicotínico $\alpha 7$
$\sigma 1$ R	Recetor sigma 1

Capítulo 1 – Investigação

1. Introdução

1.1. Doença de Alzheimer – Generalidades

A DA (doença de Alzheimer) é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda de memória, declínio cognitivo, mudanças comportamentais e perda de habilidades funcionais. A DA é a causa mais comum de demência e estima-se que mais de 50 milhões de pessoas padeçam de demência, atualmente [1]. Ainda que a patogénese e os mecanismos de progressão da DA permaneçam por esclarecer, os principais sinais cardinais neuropatológicos da DA são deposições extracelulares de péptido A β (beta amilóide) na forma de placas e NTFs (emaranhados neurofibrilares) intracelulares [2–4].

Existem tratamentos aprovados para a melhoria de sintomas da DA, no entanto estes não têm a capacidade de alterar a deterioração progressiva da doença. Surge, então, a necessidade de estudar melhor a patogénese da DA, para que sejam desenvolvidas novas moléculas capazes de modificar o curso da doença. Uma vez que as placas de péptido A β e NTFs estão presentes, muitas vezes, em cérebros de uma população mais envelhecida, mas saudável a nível cognitivo, a evidência sugere que os processos biológicos subjacentes à DA estejam presentes décadas antes da expressão de sintomas [5]. Neste contexto, a descoberta de biomarcadores de alta sensibilidade e especificidade poderá exercer uma componente importante na investigação da patofisiologia da DA e na sua deteção em estágios iniciais, bem como no acompanhamento da sua progressão [6].

2. Bases fisiopatológicas na etiologia da DA

Vários mecanismos têm sido propostos para tentar explicar a patologia subjacente à DA e, de uma forma geral, estão destacadas quatro hipóteses que se relacionam entre si: a hipótese da cascata amilóide, hipótese da proteína tau, hipótese colinérgica, bem como a hipótese da excitotoxicidade.

Segundo a hipótese da cascata amilóide, um processamento anormal de APP (proteína precursora amilóide) pode conduzir a uma produção anormal de A β , desencadeando uma cascata amiloidogénica que leva a perdas neuronais e a danos sináticos e, em última instância, aos sinais cardinais da doença: placas senis de péptido A β e emaranhados neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada [7]. Uma hiperfosforilação aberrante da proteína tau ocorre a jusante na cascata amiloidogénica e leva à acumulação de emaranhados neurofibrilares em corpos celulares de neurónios, impedindo a sua normal funcionalidade e preconizando a hipótese da proteína tau [8].

Um défice colinérgico, mediado pela depleção de enzima colina-acetiltransferase em cérebros de doentes com DA foi demonstrado, levando à proposta da hipótese colinérgica na DA e a tratamentos que visam o aumento da atividade colinérgica nestes doentes. A perda de neurónios colinérgicos ocorre numa etapa mais tardia da cascata neurodegenerativa e parece ser agravada por processos de excitotoxicidade, como uma sobreexposição ao glutamato ou sobreestimulação de NMDARs (receptores de NMDA). A excitotoxicidade desempenha um papel importante na perda neuronal progressiva da DA, resultado de um influxo excessivo de Ca²⁺ nas células [9].

2.1. Beta amilóide

A patofisiologia da DA ainda é alvo de alguma controvérsia. Em 1992, Hardy e Higgins propuseram a hipótese da cascata amilóide, com a acumulação de péptido A β no parênquima cerebral como causa central da patogénese da DA [10]. A evidência que mais apoia esta hipótese compreende a manifestação da patologia em indivíduos com mutações autossómicas dominantes em genes que codificam a APP ou em proteínas γ -secretase PSEN1/2 (presenilina 1 e 2), bem como a manifestação precoce da DA em indivíduos com a Síndrome de Down, algo que está associado à triplicação ou sobreexpressão do gene codificante da APP, localizado no cromossoma 21 [11].

Neste contexto, é de referir que a APP é uma proteína transmembranar de tipo I que, no SNC (sistema nervoso central), pode sofrer clivagens sequenciais seguindo dois percursos diferentes.

No “caminho amiloidogénico”, a APP é clivada sequencialmente por duas enzimas: a BACE-1 (beta-secretase 1) e γ -secretase. Inicialmente, a BACE-1 cliva a APP no domínio N-terminal da sequência do péptido A β , dando origem a um produto extracelular (sAPP β) e a um péptido C-terminal com 99 aminoácidos. Subsequentemente, a γ -secretase, um complexo multiprotease que inclui PSEN1/2, atua no domínio transmembranar da APP através de clivagens por endopeptidases/carboxipeptidases, resultando numa secreção extracelular de A β . A clivagem pela γ -secretase pode ocorrer em sítios distintos, o que dá origem a péptidos A β de diferentes comprimentos, sendo as formas A β ₄₀ e A β ₄₂ as mais comuns no cérebro humano [11, 12]. Ainda que o processamento de APP produza mais A β ₄₀ que A β ₄₂, a última forma é mais amiloidogénica, devido à presença de resíduos de alanina e isoleucina no C-terminal, conferindo-lhe características hidrofóbicas e, por isso, torna-se mais passível de agregar e de se depositar em placas [13].

No “caminho não amiloidogénico”, a APP é clivada, em primeiro lugar, pela α -secretase, originando um produto extracelular (sAPP α) e um péptido C-terminal de 83 aminoácidos. A clivagem deste péptido pela γ -secretase produz um outro fragmento que é secretado (p3), abandonando a região transmembranar.

Ainda que a regulação destes dois percursos não esteja completamente compreendida, pensa-se que uma sobreprodução ou *clearance* reduzida de A β , que é normalmente solúvel, leve à sua auto-agregação em oligómeros e, posteriormente, à formação de fibrilas amilóides altamente regulares que formam placas visíveis em amostras patológicas.

O comprimento do péptido A β varia de 37 a 42 aminoácidos, sendo as variantes mais longas, A β ₄₀ e, especialmente, a A β ₄₂, mais prováveis de se auto-agregar e formar fibrilas, em comparação às mais curtas. A evidência sugere que tanto as formas solúveis de A β como as placas sejam tóxicas e que os seus efeitos nas funções celulares levem a eventos secundários ou de *downstream*, como a hiperfosforilação da proteína tau (e formação de NFTs), inflamação, *stress* oxidativo e excitotoxicidade. Esta cadeia de eventos conduz à morte celular e a défices na neurotransmissão, especialmente na colinérgica [12].

2.2. Proteína tau

A proteína tau faz parte da família das proteínas associadas aos microtúbulos. Uma das suas funções é polimerizar a tubulina em microtúbulos, mantendo a complexa microarquitetura neuronal e promovendo a estabilização dos microtúbulos, particularmente nos axónios [14]. No SNC, são expressas seis isoformas de proteína tau, através de um *splicing* alternativo de mRNA (RNA mensageiro), durante a transcrição do gene MAPT, nos exões 2, 3 e 10 [15]. As isoformas

contêm dois domínios principais: um péptido ácido de 29 aminoácidos é codificado pelos exões 2 e 3, inserindo-se no domínio da projeção N-terminal e um péptido de 31 aminoácidos que constitui o domínio de ligação aos microtúbulos é codificado pelo exão 10, no domínio C-terminal [16]. As isoformas de proteína tau contêm, ainda, três (3R) ou quatro (4R) repetições do péptido de 31 aminoácidos que constitui o domínio de ligação aos microtúbulos. A proteína tau trata-se de uma fosfoproteína cuja atividade biológica é regulada pelo seu grau de fosforilação. Uma característica comum a taupatas como a DA é a acumulação de proteína tau anormalmente fosforilada em neurónios e que é polimerizada maioritariamente em emaranhados neurofibrilares de PHFs e/ou SFs de proteína tau (filamentos helicoidais emparelhados e/ou filamentos únicos) [17, 18]. A fosforilação anormal de proteína tau ocorre através da ação de cinases, sendo a GSK-3 β (glicogénio sintase cinase-3 β) e a CDK5 (cinase 5 dependente da ciclina) as mais importantes nesse processo. A GSK-3 β está bem documentada como uma cinase com ação na proteína tau, uma vez que a sua *up-regulation* modula anormalmente a hiperfosforilação da proteína tau na DA, através da via PI3K/AKT/GSK-3 β (fosfatidilinositol 3-cinase/proteína cinase B/GSK-3 β) [19]. A ativação de PI3K, por níveis elevados de PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato), leva a uma sobreexcitação de AKT que fosforila a GSK-3 β e, subsequentemente, resulta na hiperfosforilação da proteína tau [20]. Uma sobreexpressão de CDK5 leva, igualmente, à hiperfosforilação de proteína tau e formação de PHFs. Os PHFs de proteína tau são formados, maioritariamente, através de duas proteínas reguladoras, p35 e p39, que ativam a CDK5 [21].

Cerca de 40% da proteína tau hiperfosforilada está presente no citosol e não é polimerizada em NFTs, em cérebros com DA. A proteína tau citosólica hiperfosforilada não se liga à tubulina nem promove a organização dos microtúbulos, destruindo, pelo contrário, a sua dinâmica a nível neuronal. Esta propriedade tóxica envolve a sequestração de proteína tau normal pela proteína tau patológica. A proteína tau normal encontra-se na forma solúvel, pelo que a sua ligação à proteína tau hiperfosforilada promove a formação de oligómeros compostos por proteína tau normal e proteína tau hiperfosforilada. Por conseguinte, estes oligómeros irão sedimentar, levando à sua auto-agregação em PHFs/SFs que formarão NFTs. Desta forma, as funções de polimerização da tubulina e organização de microtúbulos desempenhadas pela proteína tau normal são alteradas devido à interação com a proteína tau patológica e o citoesqueleto neuronal é progressivamente destruído, sendo demonstradas inclusões de NFTs [17, 22]. O número de NFTs está diretamente correlacionado com o grau de demência em doentes com DA [18].

3. Diagnóstico da DA

De acordo com o descrito nos últimos critérios de diagnóstico da DA, o aparecimento clínico da doença pode ser dividido em três períodos gerais: fase pré-clínica, MCI (Défice Cognitivo Ligeiro) e demência devida a DA [23].

Os resultados de estudos observacionais em indivíduos com fatores de risco genético para a DA demonstram evidência convergente de que os processos patofisiológicos da DA se iniciem décadas anteriormente ao diagnóstico clínico de demência devida a DA. Avanços recentes em técnicas de neuroimagem, análises de LCR (líquido cefalorraquidiano) e de outros biomarcadores permitem o estudo dos processos patofisiológicos da DA *in vivo* [24].

Tendo isto em conta, no primeiro estágio da fase pré-clínica, o péptido A β com estrutura monomérica começa a agregar-se e acumula-se em neurónios e sinapses, porém estas alterações não são detetadas usando os métodos atuais de diagnóstico. Durante o segundo estágio da fase pré-clínica, a presença de biomarcadores no LCR como o aumento da proteína tau, o hipometabolismo no giro cingulado posterior e uma diminuição cortical passa a ser detetável

[25]. No terceiro estágio, o indivíduo poderá detetar sinais da doença e a presença de biomarcadores continua a aumentar. O doente ainda conseguirá obter resultados dentro da normalidade em testes de avaliação da função cognitiva, como MoCA (*Montreal Cognitive Assessment*) e MMSE (*Mini-Mental State Examination*), mas poderá ser detetado um declínio na *performance* habitual do indivíduo [26].

No período seguinte da evolução do aparecimento clínico da DA, é observada uma redução da função cognitiva do doente, demonstrando um declínio cognitivo ligeiro na realização de testes de avaliação da função cognitiva, porém o indivíduo continua a ser autónomo e funcional [27]. Um declínio em domínios como a memória, atenção, linguagem e execução de tarefas poderá ser observado com o decorrer do tempo. Os resultados de testes cognitivos realizados pelo doente estarão abaixo da média e biomarcadores positivos para o péptido A β indicam uma alta probabilidade de que o MCI seja devido à DA [28].

Em 1984, foram estabelecidos critérios para descrever um diagnóstico clínico da DA, conhecidos por critérios NINCDS-ADRDA (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*). Estes contemplavam o histórico clínico do doente, testes neuropsicológicos e avaliações laboratoriais, tendo sido demonstrada uma sensibilidade de 81% e uma especificidade de 70% aquando a sua aplicação [23, 29]. A evidência sobre as manifestações clínicas e patofisiologia da DA aumentou consideravelmente nos últimos anos, tendo os critérios NINCDS-ADRDA sido revistos.

Atualmente, os critérios clínicos para diagnóstico de demência contemplam o aparecimento progressivo de sintomas cognitivos e/ou comportamentais que interferem na realização de tarefas do indivíduo e que não são atribuídos a um transtorno delirante ou doença neuropsiquiátrica. O diagnóstico de demência é realizado seguindo a história clínica do doente e através da realização de testes que avaliam a função cognitiva, devendo os sintomas cognitivos e/ou comportamentais afetar, pelo menos, dois dos seguintes domínios gerais: inabilidade para relembrar nova informação, discernimento alterado, inabilidade visuoespacial, inabilidade para desempenhar funções de linguagem ou alterações de personalidade ou comportamento [23].

3.1. Critérios NINCDS-ADRDA de classificação para demência devida a DA

3.1.1. Demência provável devida a DA: critérios clínicos

O doente é diagnosticado com demência provável devida a DA quando corresponde aos critérios definidos anteriormente para demência e, simultaneamente:

1. Os sintomas surgem de forma progressiva e gradual;
2. Existe um agravamento óbvio dos sintomas no decurso do tempo;
3. Apresenta sintomas amnésicos, como dificuldade na aprendizagem e assimilação de nova informação ou, tipicamente numa fase mais avançada, sintomas não-amnésicos, como dificuldade em escolher palavras, défices na cognição espacial (agnosia e simultanagnosia) e disfunção executiva (discernimento alterado e dificuldade em resolver problemas) [23].

3.1.2. Demência possível devida a DA: critérios clínicos

Um diagnóstico de demência possível devida a DA deve ser realizado nas seguintes circunstâncias:

1. Correspondência com a natureza dos défices cognitivos característicos para demência provável devida a DA, mas com aparecimento repentino dos sintomas ou história clínica/documentação insuficiente de um declínio progressivo;
2. Correspondência com os critérios clínicos para demência provável devida a DA, mas com presença de doença cerebrovascular concomitante, características de demência com corpos de Lewy ou presença de fatores que possam afetar substancialmente a cognição do indivíduo [23].

3.2. Avaliação neuropatológica da DA

Atualmente, a alteração neuropatológica devida a DA é avaliada através de um sistema “ABC”, com três escalas diferentes de atribuição de pontos: deposição de péptido A β na forma de placas pelo método de Thal, distribuição de NFTs pelo método de Braak e avaliação de placas neuríticas pelo método de CERAD (*Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*). A combinação entre os resultados dos três métodos de avaliação neuropatológica recebe um descritor que pode ser “negativo”, “baixo”, “intermédio” ou “alto”, relativamente à alteração neuropatológica devida a DA. Uma alteração neuropatológica “intermédia” ou “alta” é considerada suficiente para explicar um estado demencial devido a DA [30].

3.2.1. Método de Thal

A deposição extracelular de péptido A β , no cérebro, segue uma sequência na qual as regiões cerebrais são hierarquicamente envolvidas. Assim, a deposição de péptido A β expande-se para regiões cerebrais que recebem projeções neuronais de outras regiões com a presença de A β . Na primeira de cinco fases de evolução da amiloidose, as deposições de péptido A β são encontradas exclusivamente no neocórtex. A segunda fase é caracterizada pelo envolvimento adicional do alocórtex. Na terceira fase de evolução, o diencéfalo e corpo estriado também são afetados. Na quarta fase, adicionalmente, estão envolvidas as regiões do tronco encefálico e, por fim, a quinta fase é caracterizada por uma deposição cerebelar [31].

3.2.2. Método de Braak

Os NFTs são lesões neuropatológicas características da DA e considerados essenciais no seu diagnóstico. Os NFTs podem ser visualizados através de técnicas de imunohistoquímica direcionada à proteína tau ou a epítomos de proteína tau fosforilada [30]. Num estágio inicial, é comum observar a presença de NFTs em regiões do sistema límbico, porém, dependendo da fase da doença, outras regiões cerebrais podem ser envolvidas [32]. Estes achados parecem demonstrar um padrão de distribuição característico, permitindo a diferenciação de seis estágios que se correlacionam com o estado clínico do doente [33].

Os primeiros NFTs desenvolvem-se na camada superficial da região transentorrinal (estágio I) e região entorrinal (estágio II). Subsequentemente, difundem-se no hipocampo (estágio III), giro temporal médio e giro temporal superior (estágio IV) e restantes áreas do neocórtex (estágio V e VI). O declínio cognitivo, geralmente, tem início a partir do estágio III e agrava progressivamente. A degeneração neurofibrilar no prosencéfalo basal leva, em parte, à perda de neurónios colinérgicos nesta região e a uma perda generalizada da inervação colinérgica pré-sináptica da zona límbica e neocortical [12].

3.2.3. Método de CERAD

As deposições de péptido A β podem ocorrer no centro de neurites distróficas que, frequentemente, demonstram imunorreatividade a proteína tau fosforilada, tratando-se de um

subgrupo de placas senis, as placas neuríticas [30]. O CERAD desenvolveu um sistema para avaliação de placas neuríticas, identificadas por métodos imunohistoquímicos, através da classificação da sua densidade com descritores de “não frequente”, “moderada” e “frequente”, nas regiões do neocórtex [34].

3.2.4. Critérios NIA-Reagan para o diagnóstico *postmortem* da DA

A) Existe uma alta probabilidade de a demência ser devida a DA, quando na análise *postmortem* do cérebro se evidencia a presença de placas neuríticas e de NFTs no neocórtex, ou seja, uma classificação CERAD “frequente” de placas neuríticas e um estágio V/VI do método de Braak.

B) Existe uma probabilidade intermédia de a demência ser devida a DA, quando a análise *postmortem* do cérebro demonstra uma densidade moderada de placas neuríticas neocorticais e a presença de NFTs em regiões do sistema límbico, ou seja, classificação CERAD “moderada” de placas neuríticas e estágio III/IV do método de Braak.

C) Existe uma baixa probabilidade de a demência ser devida a DA, quando a análise *postmortem* do cérebro demonstra uma distribuição e/ou severidade mais limitada de placas neuríticas e NFTs, ou seja, classificação CERAD de placas neuríticas “não frequente” e estágio I/II do método de Braak [35].

4. Terapias na DA

O paradigma atual do tratamento da DA está focado na redução da progressão dos sintomas. Os sintomas amnésicos são mais comuns e incluem dificuldade em processos de aprendizagem e assimilação de nova informação. Os sintomas não-amnésicos podem manifestar-se em vários domínios, nomeadamente na linguagem, visuoespacial e execução de tarefas [23]. Apesar de esforços contínuos, uma “cura” para a DA em estágios demenciais parece ser irrealista dentro de um futuro próximo. Quando a doença atinge estágios mais avançados, a degeneração progressiva já terá afetado o cérebro a vários níveis.

4.1. Tratamentos atuais na DA

Os ChEIs (inibidores da acetilcolinesterase) donepezilo, galantamina e rivastigmina e a memantina, tratando-se de um antagonista de NMDARs, são os únicos tratamentos aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) para a demência na DA, atualmente. Existe evidência de que uma abordagem de terapêutica de combinação, com a adição de memantina, em doentes com DA moderada ou DA moderada a severa, a donepezilo está associada a benefícios significativos no atraso do declínio cognitivo em 24 semanas. Estes fármacos possuem mecanismos de ação complementares, com potenciais efeitos aditivos e demonstram perfis de segurança e tolerabilidade aceitáveis [36]. Os benefícios da redução do declínio cognitivo e o retardamento do aparecimento de sintomas são observados com a utilização de ChEIs ou memantina quer seja em monoterapia ou em terapia combinada [37]. A tacrina, tratando-se de um ChEI, foi retirada do mercado devido a efeitos adversos de hepatotoxicidade.

Com base na hipótese colinérgica, a disfunção cognitiva e outros sintomas da DA são explicados pela perda progressiva de neurónios colinérgicos. Desta forma, os efeitos dos ChEIs promovem a neurotransmissão colinérgica por impedirem que a acetilcolina sofra um processo de hidrólise, aumentando os seus níveis nas sinapses. O mecanismo de ação da memantina ainda não está totalmente compreendido, mas pensa-se que reduza a neurotoxicidade excitatória do glutamato [38–40].

4.2. Perspetivas futuras no tratamento da DA

Devido à ineficácia das terapias atuais para modificar a progressão da DA, têm sido estudadas novas moléculas com potencial para mudar o curso da doença. Surgem as terapias modificadoras da doença. Estas apontam para os dois sinais cardinais neuropatológicos predominantes na DA, as placas senis de A β e os NFTs. Podemos, então, dividi-las em duas estratégias distintas: a terapia anti-amilóide e a terapia anti-tau.

A) A terapia anti-amilóide baseia-se no princípio da redução da produção de A β , prevenção da agregação ou promoção da sua *clearance*.

A1) Segundo a hipótese da cascata amilóide, as atividades da BACE-1 e da γ -secretase desempenham um papel crucial na produção de péptido A β . A BACE-1 atua em primeiro lugar, clivando a APP no domínio N-terminal e, posteriormente, a γ -secretase atua no domínio transmembranar, através da ação de endopeptidases e carboxipeptidases, dando origem a uma secreção extracelular de A β . Tendo isto em conta, a modulação destas enzimas tem sido uma estratégia para reduzir a produção de A β [11, 40].

Apenas cinco inibidores da BACE-1 chegaram à fase III dos ensaios clínicos (verubecestat, lanabecestat, atabecestat, umibecestat e elenbecestat), porém todos eles foram descontinuados devido à falta de benefícios cognitivos e funcionais (Tabela 1) [41–44].

Dois inibidores da γ -secretase (semagacestat e avagacestat) e um modulador da γ -secretase (tarenflurbil) seriam os fármacos mais promissores testados clinicamente, no entanto falharam igualmente na demonstração de benefícios cognitivos (Tabela 1). O semagacestat foi o primeiro inibidor da γ -secretase a chegar à fase III dos ensaios clínicos, no entanto estes foram interrompidos devido a um agravamento clínico e alta incidência de cancro de pele e infeções no grupo tratado com o fármaco [45]. Depois de falhar na diminuição do declínio cognitivo e de ter aumentado, de igual forma, o risco de cancro de pele, os ensaios clínicos para o fármaco avagacestat foram interrompidos na fase II [46]. O tarenflurbil não demonstrou uma diminuição do declínio cognitivo ou funcional, sendo interrompido na fase III dos ensaios clínicos [47].

A2) A agregação de A β em oligómeros, fibrilas ou a sua deposição na forma de placas amilóides poderá estar na origem das disfunções sináticas e perdas neuronais da DA. Atualmente, a evidência sugere que os oligómeros solúveis de A β sejam as formas mais neurotóxicas. Agentes anti-agregação representam, por isso, uma estratégia racional na terapia de modificação da doença, uma vez que o seu mecanismo de ação consiste em inibir a agregação de péptidos A β solúveis em oligómeros [40].

Dois inibidores da agregação de A β foram estudados, scilo-inositol e tramiprosate, porém são necessárias pesquisas futuras para estudar melhor a possibilidade de benefícios clínicos e avaliar a sua eficácia, não tendo sido descritas melhorias cognitivas em ensaios clínicos de fase II e III, respetivamente (Tabela 1) [48–51].

A3) Promover a *clearance* através de anticorpos específicos direcionados à A β tem sido a estratégia mais promissora na tentativa de abrandar a progressão da doença. Esta terapia pode dividir-se na indução do sistema imunitário a produzir anticorpos ou na injeção direta de anticorpos monoclonais exógenos, tratando-se de uma imunização ativa e passiva, respetivamente [40].

Vacinas de imunoterapia ativa estão sob investigação, tais como a Amilomotide (CAD106), ABvac40, Lu AF20513 e UB-311. De igual forma, estão a ser investigados anticorpos monoclonais com alvo à A β , como Gantenerumab (RO4909832) e BAN2401 (Tabela 1) [40].

B) As pesquisas sobre terapia anti-amilóide têm dominado nos últimos 25 anos, mas a ausência de eficácia em ensaios clínicos recentes está a redirecionar esforços para terapias anti-tau [40]. A proteína tau desempenha um papel importante na organização e estabilização de microtúbulos, no entanto uma fosforilação anormal pela cinase GSK-3 β leva à sua hiperfosforilação. Quando anormalmente fosforilada, a proteína tau patológica liga-se a proteínas tau normais para formar oligómeros. Ao contrário da proteína tau normal que é altamente solúvel, os oligómeros formados com a proteína tau patológica podem sedimentar e agregar-se em PHFs/SFs na forma de NFTs [17]. Assim, o citoesqueleto neuronal é progressivamente destruído, havendo uma acumulação de emaranhados que levarão à neurodegeneração [22].

A terapia anti-tau baseia-se, então, na prevenção da hiperfosforilação e agregação de proteína tau, estabilização de microtúbulos e promoção da *clearance* de proteína tau [40].

B1) A GSK-3 β parece desempenhar o papel mais importante na fosforilação da proteína tau, logo a sua inibição tem sido considerada uma estratégia racional de terapia modificadora da doença. Neste âmbito, têm sido realizados estudos sobre o lítio, devido ao seu potencial para inibir a GSK-3 β através de uma ligação direta e indireta à enzima, potenciando uma fosforilação do N-terminal de um resíduo de serina. Existe, também, evidência que demonstra uma modulação, pelo lítio, da expressão de GSK-3 β , uma vez que este inibe a sua transcrição de mRNA [52].

Em ensaios de fase II, foi demonstrada uma diminuição dos níveis de proteína tau fosforilada no LCR e uma melhoria da cognição, porém estudos adicionais são necessários para clarificar os benefícios clínicos dos sais de lítio (Tabela 1) [40].

B2) A extensão e acumulação de agregados de proteína tau está associada a perda neuronal e a agravamento clínico na DA. Dessa forma, uma inibição da agregação da proteína tau estabelece uma abordagem racional para a terapia modificadora de doença.

Em estudos *in vitro*, foi demonstrada uma inibição da agregação de proteína tau com cloreto de metiltionínio (azul de metileno). Em ensaios clínicos de fase II, foram demonstrados benefícios cognitivos em doentes com DA ligeira a moderada, no entanto foram reportadas limitações na absorção com a administração oral do fármaco e baixa tolerabilidade na ausência de alimentos (Tabela 1). Esta descoberta levou ao desenvolvimento de LMTM, um derivado reduzido do cloreto de metiltionínio, mais estável e com melhores propriedades de absorção e tolerabilidade, cujo tratamento em monoterapia está sob investigação (Tabela 1) [40], [53–55].

B3) Uma disfunção na estabilização dos microtúbulos e subsequente agravamento do transporte axonal tem um papel crucial na neurodegeneração devida a DA.

Davunetide é um péptido que parece estabilizar os microtúbulos em neurónios e células gliais, no entanto não mostrou uma melhoria significativa na cognição, em ensaios de fase II (Tabela 1). Epotilona D (BMS-241027) é outro estabilizador de microtúbulos que apresentou melhorias na *performance* cognitiva em animais, mas depois de ter passado a ensaios de fase I para determinar parâmetros de segurança e efeitos farmacodinâmicos, os resultados não foram publicados e a pesquisa foi descontinuada (Tabela 1) [40, 56, 57].

B4) Quanto à promoção da *clearance* da proteína tau, imunoterapia ativa tem sido usada como estratégia, onde vacinas anti-tau induzem o sistema imunitário dos doentes a desenvolver anticorpos contra as formas patogénicas de proteína tau. Neste contexto, péptidos sintéticos que mimetizam a forma patológica da proteína tau têm sido usados como antigénios. Adicionalmente e no âmbito da imunoterapia passiva, anticorpos monoclonais são administrados e direcionados contra as formas anormais de proteína tau e esta abordagem parece ser mais segura que as vacinas anti-tau [40].

A AADvac1 foi a primeira vacina anti-tau testada em ensaios clínicos. Depois de ter mostrado um perfil de segurança favorável em ensaios de fase I, passou para ensaios de fase II. Os resultados foram anunciados posteriormente, tendo demonstrado uma imunogenicidade positiva (98,2% dos doentes desenvolveram anticorpos específicos anti-tau) e confirmaram a sua segurança, sendo que isto encorajou a que transitasse a ensaios de fase III (Tabela 1) [58].

Quatro anticorpos anti-tau chegaram aos ensaios de fase II: gosuranemab, tilavonemab, semorinemab e zagotenemab (Tabela 1). Atualmente, o gosuranemab está a ser testado em doentes com DA ligeira, em ensaios de fase II, prevendo-se que o estudo continue até 2024 [59]. De uma forma semelhante, a eficácia e segurança do tilavonemab está a ser testada em ensaios de fase II, em doentes com DA ligeira, prevendo-se que os ensaios durem até 2021. Dois ensaios de fase II estão a decorrer para avaliar um tratamento com semorinemab, em doentes com DA ligeira e doentes com DA moderada, até 2022 e 2023, respetivamente [60, 61]. Em doentes com DA ligeira, um tratamento com zagotenemab está a ser avaliado em ensaios de fase II, até 2021 [62].

Alvo/Mecanismo	Fármaco	Fase	Resultados/Estado
Inibidor da BACE-1 (inibidor da β -secretase 1)	Verubecestat	III	Declínio da cognição; mais efeitos adversos
	Lanabecestat	III	Sem melhorias cognitivas; mais efeitos adversos
	Atabecestat	II/III	Declínio da cognição; mais efeitos adversos (hepatotoxicidade)
	Umibecestat	II/III	Declínio da cognição; mais efeitos adversos
	Elenbecestat	III	Sem melhorias cognitivas; mais efeitos adversos
Inibidor da γ -secretase	Semagacestat	III	Declínio da cognição; mais efeitos adversos (cancro da pele)
	Avagacestat	II	Sem melhorias cognitivas; mais efeitos adversos (cancro da pele)
Modulador da γ -secretase	Tarenflurbil	III	Sem melhorias cognitivas; mais efeitos adversos
Inibidores da agregação de A β	Scilo-inositol	II	Sem melhorias cognitivas
	Tramiprosate	III	Sem melhorias cognitivas
Imunoterapia ativa (vacina anti-A β)	Amilomotide (CAD106)	II/III	Estudos clínicos de fase II/III a decorrer
	ABvac40	II	Recrutamento para estudos clínicos
	Lu AF20513	I	Sem resultados publicados
	UB-311	II	Imunogenicidade positiva; seguro e bem tolerado
Imunoterapia passiva (anticorpos anti-A β)	Gantenerumab (RO4909832)	III	Recrutamento para estudos clínicos
	BAN2401	III	Recrutamento para estudos clínicos
Inibidor de GSK-3 β	Carbonato de lítio	II	Melhorias cognitivas; seguro e bem tolerado
Inibidor da agregação de tau	Azul de metileno	II	Melhorias cognitivas; pouco tolerado sem alimentos; limitações na absorção
	LMTM	III	Sem melhorias cognitivas mas ainda sob investigação
Estabilizador de microtúbulos	Davunetide	II	Sem melhorias cognitivas; seguro e bem tolerado
	Epotilona D (BMS-241027)	I	Sem resultados publicados
Imunoterapia ativa (vacina anti-tau)	AADvac1	II	Imunogenicidade positiva; seguro e bem tolerado
Imunoterapia passiva (anticorpos anti-tau)	Gosuranemab (BIIB092/BMS986168)	II	Fase II de ensaios clínicos a decorrer
	Tilavonemab (ABBV-8E12/C2N 8E12)	II	Fase II de ensaios clínicos a decorrer
	Semorinemab (RO7105705)	II	Fase II de ensaios clínicos a decorrer
	Zagotenemab (LY3303560)	II	Fase II de ensaios clínicos a decorrer

Tabela 1 – Estudos clínicos sobre terapias modificadoras de DA

5. De esteróides clássicos a esteróides neuroativos: biossíntese e metabolismo da pregnenolona

As hormonas esteróides são conhecidas por mediarem várias funções celulares através de uma via genómica. Nesse contexto, os esteróides clássicos interagem, tipicamente, com recetores nucleares (NRs) localizados no citoplasma e no núcleo celular. Esta ligação resulta numa alteração conformacional do NR citoplasmático e subsequente translocação do complexo NR-ligando até ao núcleo. No núcleo, ocorre uma dimerização do complexo, ligando-se, posteriormente, a sequências específicas de DNA (ácido desoxirribonucleico), conhecidas como HREs (elementos de resposta hormonal), para regular a transcrição genética [63, 64].

Alternativamente, uma sinalização não-genómica pode ser mediada por hormonas esteróides através da regulação de diversas vias de transdução de sinal, devido à localização de NRs na membrana plasmática. Assim, as ações de hormonas esteróides em ERs (recetores de estrogénio), PRs (recetores de progesterona) e ARs (recetores androgénicos), localizados na membrana plasmática, demonstraram modular a atividade das vias MAPK/ERK (via da MAP cinase) e PI3K/AKT, ativam cascatas sinalizadoras da síntese de NO (óxido nítrico), induzem a libertação de Ca^{2+} intracelular e aumentam os níveis de IP₃ (inositol trifosfato), promovendo processos celulares que incluem autofagia, proliferação, apoptose, sobrevivência celular, diferenciação e vasodilatação. Por sua vez, a ativação destas vias de transdução de sinal pode aumentar a transcrição de genes e, desta forma, regular eventos genómicos [64].

O termo “neuroesteróide” foi mencionado pela primeira vez por Etienne Baulieu, referindo-se a esteróides endógenos sintetizados no SNC a partir do colesterol, independentemente do sistema endócrino. Nos últimos 25 anos, a ação dos neuroesteróides tem sido associada a processos de memória e plasticidade sinática. Os neuroesteróides modulam a excitabilidade neuronal através de rápidas ações não-genómicas e os seus efeitos não-genómicos ocorrem pela modulação alostérica de recetores inibitórios e excitatórios localizados na membrana plasmática [65].

A PREG (pregnenolona) é o precursor de todos os neuroesteróides e, mediante estudos realizados em animais, demonstraram-se efeitos benéficos da PREG e do seu conjugado sulfatado PREG-S (sulfato de pregnenolona) em défices de memória relacionados com o envelhecimento e uma relação direta entre *performance* cognitiva e a concentração destes compostos no hipocampo de roedores em idade avançada [66].

5.1. Visão geral de enzimas esteroidogénicas

A maior parte das enzimas envolvidas na biossíntese de esteróides são enzimas do citocromo P450 ou HSDs (hidroxiesteróide desidrogenases).

Seis enzimas do citocromo P450 desempenham um papel na esteroidogénese. Na mitocôndria, a P450_{sc} cataliza a clivagem da cadeia lateral do colesterol. As duas isoenzimas da P450_{c11}, P450_{c11β} (11β-hidroxilase) e P450_{c11AS} (aldosterona sintase), catalizam atividades de 11β-hidroxilase, 18-hidroxilase e 18-metil oxidase. No retículo endoplasmático, P450_{c17} cataliza atividades de 17α-hidroxilase e 17,20-liase, a P450_{c21} cataliza uma 21-hidroxilação na síntese de glucocorticóides e mineralocorticóides e a P450_{aro} cataliza a aromatização de androgénios a estrogénios [67].

As HSDs não possuem grupos heme e requerem cofatores de NAD (dinucleótido de nicotinamida e adenina) ou NADP (fostato de dinucleótido de nicotinamida e adenina) para reduzir ou oxidar esteróides por dois eletrões [68]. A maior parte dos casos envolve a conversão

de um álcool secundário a uma cetona ou vice-versa. No caso da 3 β -HSD (3 β -hidroxiesteróide desidrogenase)/ $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ -isomerase, a desidrogenação é acompanhada de uma isomerização da dupla ligação carbono-carbono adjacente, da posição Δ^5 (entre o carbono 5 e 6) para a posição Δ^4 (entre o carbono 4 e 5). As HSDs incluem a 3 α -HSD (3 α -hidroxiesteróide desidrogenase) e 3 β -HSD, 11 β -HSDs (11 β -hidroxiesteróide desidrogenases) e 17 β -HSDs (17 β -hidroxiesteróide desidrogenases) [67].

5.2. Esteroidogénese: visão geral das vias principais, biossínese e metabolismo da PREG

O primeiro passo da esteroidogénese ocorre dentro da mitocôndria. A evidência sugere que a StAR (proteína reguladora aguda esteroidogénica) aumente o transporte de colesterol, nas gónadas e glândulas adrenais, da membrana mitocondrial externa (OMM) para a membrana mitocondrial interna (IMM), fornecendo o substrato para a biossínese de hormonas esteróides. A interação da StAR com a OMM envolve alterações conformacionais que são necessárias para que a StAR permita a entrada de moléculas de colesterol na mitocôndria [69].

Adicionalmente, foi demonstrado que a ação da StAR é mediada pela TSPO (proteína translocadora 18 KDa), na OMM. A PAP7, uma proteína associada à TSPO, liga-se ao complexo TSPO/VDAC (Canal aniónico dependente de voltagem) e ativa a PKA (proteína cinase A), formando um homodímero PKAR1 α na presença de AMPc (monofosfato cíclico de adenosina). Subsequentemente, o homodímero PKAR1 α fosforila a StAR que, por sua vez, entrega o colesterol livre ao complexo TSPO, iniciando a esteroidogénese (Figura 1) [70, 71].

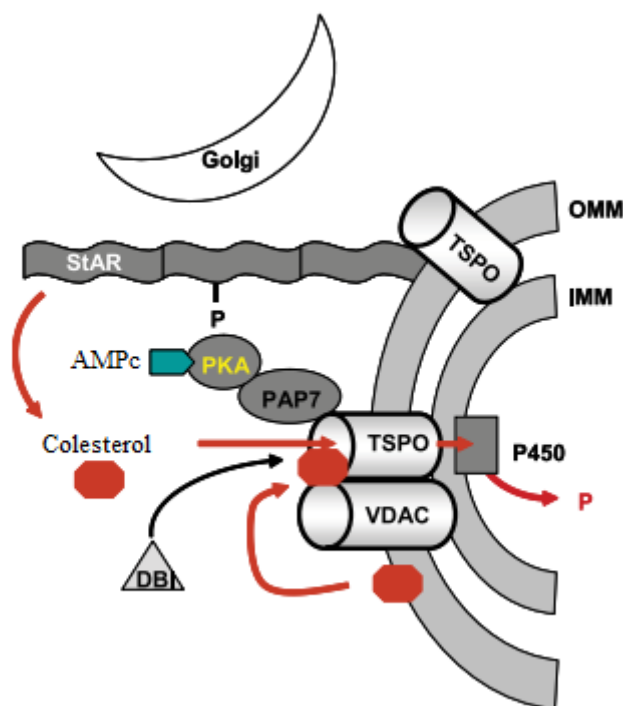


Figura 1 – Representação esquemática do transporte de colesterol para a matriz mitocondrial e subsequente biossínese de esteróides, adaptado de [71]

Uma célula é considerada esteroidogénica quando expressa a enzima P450sc que catalisa o primeiro passo da esteroidogénese. A conversão do colesterol em PREG, na mitocôndria, é o primeiro passo, limitante da velocidade da reação, da síntese de todas as hormonas esteróides. Este processo envolve três reações distintas: a 22-hidroxição de colesterol, seguida de uma 20-

hidroxilação de 22(*R*)-hidroxicolesterol e, subsequentemente, uma cisão oxidativa da ligação C₂₀–22 de 20(*R*),22(*R*)-dihidroxicolesterol, dando origem à PREG e aldeído isocapróico. Estas três reações ocorrem num único sítio ativo que está em contacto com a IMM [67]. A expressão de P450sc é induzida por AMPc na zona fasciculada e reticular adrenal, testículos e ovários, bem como pelo sistema Ca²⁺/PKC (proteína cinase C) na zona glomerulosa adrenal [72–75]. A atividade da enzima P450sc e subsequente biossíntese de PREG foi demonstrada em cérebros de rato e humano [76].

Subsequentemente, a PREG pode sofrer uma 17 α -hidroxilação pela P450c17, dando origem a 17 α -hidroxipregnenolona ou pode ser convertida a progesterona pela 3 β -HSD. Por sua vez, a progesterona pode sofrer uma 17 α -hidroxilação pela P450c17, dando origem a 17-OHP (17 α -hidroxiprogesterona). A P450c17 cataliza ainda a conversão de 17 α -hidroxipregnenolona a DHEA (desidroepiandrosterona) e a conversão de 17-OHP a androstenodiona, através de uma atividade 17,20-liase (Figura 2). A velocidade da atividade 17,20-liase aumenta na presença de citocromo *b*₅, no entanto é 50 vezes mais eficiente na conversão de 17 α -hidroxipregnenolona a DHEA, sendo que a 17-OHP não é, em circunstâncias normais, um precursor relevante na síntese de esteróides sexuais [67, 77].

A 3 β -HSD cataliza a conversão do hidroxilo a uma cetona no C3 e a isomerização da dupla ligação do anel B (presente em esteróides Δ^5) para o anel A (presente em esteróides Δ^4) [78]. Dessa forma, converte 17 α -hidroxipregnenolona a 17-OHP, DHEA a androstenodiona e androstenodiol a testosterona (Figura 2). Ainda que tenham sido descritas várias isoformas de 3 β -HSD em ratos, o genoma humano tem apenas dois genes ativos para as enzimas. A enzima de tipo 1 (3 β -HSD1) demonstrou atividade na placenta, fígado e cérebro [79, 80]. Por outro lado, a enzima de tipo 2 (3 β -HSD2) é a isoforma principal nas glândulas adrenais e gónadas [80, 81].

A P450c21 cataliza a 21-hidroxilação de esteróides Δ^4 , convertendo a progesterona em DOC (11-desoxicorticosterona) e 17-OHP em 11-desoxicortisol, na biossíntese de mineralocorticóides e glucocorticóides, respetivamente (Figura 2).

Subsequentemente, o passo final da síntese de mineralocorticóides e glucocorticóides é catalizado por duas isoenzimas da P450c11, a P450c11 β e P450c11AS. A P450c11 β cataliza a 11 β -hidroxilação que converte 11-desoxicortisol em cortisol e é expressa predominantemente na zona fasciculada adrenal e, numa menor extensão, na zona reticular adrenal, mas não na zona glomerulosa (Figura 2) [82]. A P450c11AS, encontrada apenas na zona glomerulosa adrenal, cataliza reações de 11 β -hidroxilase, 18-hidroxilase e 18-metil oxidase (aldosterona sintase), convertendo DOC em aldosterona (Figura 2) [83, 84].

Os estrogénios (estrona e estradiol) são produzidos através da aromatização de androgénios, por uma série de reações catalizadas pela P450aro (Figura 2). Uma desmetilação oxidativa de esteróides C₁₉, maioritariamente androstenodiona e testosterona, dá origem, portanto, a esteróides C₁₈ com um anel A aromático. A P450aro é expressa em tecidos esteroideogénicos (células da granulosa, placenta e cérebro), assim como em tecidos não esteroideogénicos, como o tecido adiposo [67, 85].

Uma interconversão entre androstenodiona e testosterona, DHEA e androstenodiol, estrona e estradiol, bem como entre 5 α -androstanoediona e 5 α -DHT (5 α -dihidrotestosterona) é catalizada pelas isoenzimas da 17 β -HSD (Figura 2) [67].

As hormonas esteróides sulfatadas podem ser sintetizadas diretamente a partir do sulfato de colesterol ou formadas pela sulfatação de esteróides, através de enzimas SULT (sulfotransferase) [86, 87]. A SULT2A1 é a sulfotransferase que é expressa mais predominantemente nas glândulas adrenais, onde sulfata o grupo 3 β -hidroxilo de esteróides Δ^5

(PREG, 17 α -hidroxipregnenolona, DHEA e androstenediol), dando origem aos respectivos compostos sulfatados. Adicionalmente, a SULT2B1a também possui a capacidade de sulfatar a PREG. Os esteróides sulfatados, por sua vez, podem ser hidrolisados pela esteróide sulfatase, dando origem à sua forma nativa [67].

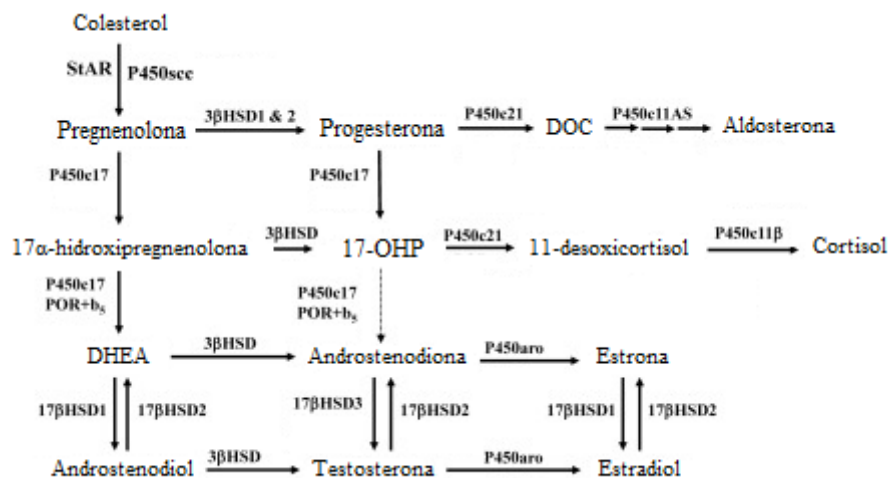


Figura 2 – Vias e enzimas principais da esteroidogênese, adaptado de [67]

5.3. Caminhos esteroidogénicos principais em tecidos específicos

A conversão de colesterol a PREG pela P450sc é um evento comum em todas as zonas do córtex adrenal.

A1) Na zona glomerulosa adrenal, a 3 β -HSD2 converte a PREG em progesterona. Nesta zona adrenal, a P450c17 está ausente, porém a P450c21 converte a progesterona em DOC que é um substrato para a P450c11AS, completando a síntese de aldosterona.

A2) Na zona fasciculada adrenal existe expressão de P450c17, sendo a PREG hidroxilada a 17 α -hidroxipregnenolona (ou progesterona a 17-OHP), no entanto a atividade 17,20-liase da P450c17 está diminuída devido à baixa presença de citocromo b_5 , havendo, por isso, uma baixa produção de DHEA. Por outro lado, através da ação de 3 β -HSD2 e P450c17, é originada 17-OHP que funciona como substrato para P450c21, formando 11-desoxicortisol. A síntese de cortisol é completada através da ação de P450c11 β , cuja presença é única nesta zona adrenal.

A3) Na zona reticular adrenal existe uma grande quantidade de P450c17 e citocromo b_5 , mas pouca de 3 β -HSD2. A PREG gera, por isso, 17 α -hidroxipregnenolona que é convertida a DHEA. Subsequentemente, a SULT2A1 sulfata a DHEA, sendo exportado para a circulação DHEA-S (sulfato de desidroepiandrosterona) [67].

B1) Nas células de Leydig, a PREG é convertida a DHEA pela ação de P450c17. A DHEA, por sua vez, pode sofrer uma conversão a androstenediol ou androstenediona, pela ação de 17 β -HSD e pela 3 β -HSD2, respetivamente. O androstenediol é convertido a testosterona pela ação da 3 β -HSD2 e a androstenediona origina testosterona pela ação da 17 β -HSD3.

B2) No ovário, a P450sc é expressa nas células da granulosa, havendo conversão de colesterol a PREG. Por outro lado, as células da teca expressam a P450sc em pouca quantidade mas altos níveis de P450c17, tendo a capacidade de produzir, por isso, os precursores dos esteróides

sexuais. Por sua vez, as células da teca não expressam P450aro, presente nas células da granulosa e, por isso, a androstenodiona é convertida a estrona nessa região. Subsequentemente, a estrona sofre a ação de 17 β -HSD1, completando a síntese de estradiol nas células da granulosa. Durante a fase lútea, a 3 β -HSD2, presente no corpo lúteo, metaboliza a PREG em progesterona, o produto final [67].

Altas concentrações de DHEA, DHEA-S, PREG e PREG-S foram encontradas em cérebros de rato, persistindo semanas após adrenalectomia e gonadectomia, sugerindo-se uma biossíntese endógena de neuroesteróides [88, 89]. Dois caminhos esteroidogênicos parecem predominar no cérebro.

C1) O primeiro caminho esteroidogênico envolve a formação de DHEA e DHEA-S. A presença de mRNA para a StAR e P450sc foi documentada em várias regiões cerebrais de rato, bem como mRNA para a StAR no cérebro humano [90, 91]. O colesterol é, então, convertido a PREG pela P450sc, sendo esta convertida a DHEA pela P450c17, encontrada no hipocampo de rato adulto [92]. Subsequentemente, a DHEA pode ser sulfatada pela SULT2A1 [67, 93].

C2) O segundo caminho esteroidogênico envolve a formação de progesterona e o seu derivado 3 α ,5 α -reduzido, alopregnanolona. O colesterol é convertido a PREG pela P450sc e esta pode ser sulfatada pela SULT2A1 e SULT2B1a [93]. Por outro lado, a PREG pode ser convertida a progesterona pela 3 β -HSD, encontrada em células gliais e neurónios glutamatérgicos de rato [94]. Por conseguinte, a progesterona pode sofrer uma redução sequencial por uma 5 α -redutase e 3 α -HSD (3 α -hidroxiesteróide oxidorreductase), encontradas no neocórtex, substância branca subcortical e hipocampo de cérebros humanos, dando origem a alopregnanolona [65, 95, 96]. No cérebro poderá, ainda, haver uma 21-hidroxilação de esteróides, originando DOC e o seu derivado 3 α ,5 α -reduzido, THDOC (tetrahidrodesoxicorticosterona), no entanto este não parece expressar grandes quantidades de P450c21 [67, 97, 98].

5.4. Mecanismo de ação dos neuroesteróides

Existe uma forte evidência de que os efeitos agudos dos neuroesteróides não estejam relacionados com a sua interação com recetores de esteróides clássicos que regulam a transcrição de genes. Por outro lado, os efeitos crónicos observados de neuroesteróides parecem ser devidos a ações genómicas, através da sua interconversão metabólica em esteróides clássicos e a rápidas ações não-genómicas, no cérebro. O mecanismo de ação dos neuroesteróides passa, principalmente, pela modulação da excitabilidade neuronal, através da sua interação com recetores de membrana em neurónios e canais iónicos [99, 100].

5.4.1. Modulação de recetores GABA-A

Os neuroesteróides podem regular positivamente ou negativamente a função dos GABA_ARs (recetores de GABA-A), dependendo da estrutura química da molécula [100, 101]. Uma inibição sinática no SNC é mediada por GABA_ARs, um subtipo de recetores para o neurotransmissor GABA. Estruturalmente, os GABA_ARs são heteropentâmeros com cinco subunidades de proteínas que formam os canais iónicos de Cl⁻. Existem sete classes de subunidades, dentro das quais existem múltiplas variantes homólogas (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , σ_{1-3} , δ , ϵ e θ), sendo que a maior parte dos GABA_ARs é composta por subunidades α , β e γ ou δ [65].

O neurotransmissor GABA liga-se ao recetor e ativa a abertura de canais iónicos de Cl⁻, permitindo a entrada de Cl⁻ e uma consequente hiperpolarização. Os GABA_ARs previnem, assim, a geração de um potencial de ação, inibindo a despolarização produzida por neurotransmissores

excitatórios. Dois tipos de neurotransmissão inibitória podem ser mediados por GABA_ARs: uma inibição sináptica (fásica) e “extrasinática” (tônica) [65].

Os neuroesteróides têm a capacidade de modular GABA_ARs sinápticos e “extrasináticos” e, assim, potenciar correntes fásicas e tónicas. A inibição fásica resulta de uma ativação de recetores contendo γ_2 , na sinapse, através de uma libertação intermitente de altas concentrações de GABA dos terminais pré-sinápticos. Em contraste, uma inibição tónica é mediada pela ativação contínua de recetores contendo δ localizados fora da fenda sináptica, através da libertação de baixas concentrações de GABA continuamente. Os GABA_ARs contendo δ estão presentes nas dendrites das células granulares da circunvolução dentada no hipocampo, sendo que a inibição tónica desempenha um papel no controlo da excitabilidade hipocámpal, “configurando” a linha de base dessa mesma excitabilidade [65].

Os efeitos moduladores dos neuroesteróides ocorrem através da sua ligação a sítios específicos do GABA_AR, localizados nos domínios transmembranares das subunidades α e β [102]. Ainda que a localização exata do sítio de ligação para os neuroesteróides seja, atualmente, desconhecida, foi demonstrado que a conservação de um resíduo de glutamina na posição 241, no domínio M1 da subunidade α , seja importante para manter as funções de modulação dos neuroesteróides [103].

5.4.2. Modulação de recetores de glutamato e outros neurotransmissores

Os NMDARs, ativados pelo glutamato, podem ser modulados por neuroesteróides [104]. A evidência sugere que haja uma combinação entre uma subunidade NR1 com, pelo menos, uma subunidade NR2, para que um NMDAR seja funcional. A subunidade NR1 pode, então, combinar-se com subunidades NR2A, NR2B, NR2C ou NR2D para formar recetores funcionais [105, 106].

Estudos de interatividade demonstraram que os NMDARs possuem, pelo menos, dois sítios de ligação distintos para a modulação realizada por neuroesteróides. Um dos sítios de ligação medeia o efeito de moduladores positivos, enquanto o outro medeia o efeito de moduladores negativos [106]. Neuroesteróides sulfatados, como a PREG-S e DHEAS-S, são potentes agonistas alostéricos de NMDARs, tendo sido demonstrado, através de estudos de estrutura-atividade, que a presença de um grupo sulfato na posição C3 é um fator importante para a atividade moduladora destes esteróides nos NMDARs, podendo, no entanto, ser substituído por grupos carregados negativamente, como hemi-ésteres de ácido dicarboxílico [106]. A modulação realizada pela PREG-S está ligada à sua capacidade para aumentar o tempo de abertura de canais ativado por NMDA (N-metil D-aspartato), quer aumentando a frequência de abertura dos canais, quer aumentando a duração da abertura dos canais. Os efeitos da PREG-S nos NMDARs dependem das subunidades que compõem os recetores, sendo que os recetores com subunidades NR1/NR2A e NR1/NR2B foram potenciados pela PREG-S e recetores contendo NR1/NR2C e NR1/NR2D foram inibidos [106, 107].

Estudos de interatividade demonstraram que neuroesteróides interagem, também, com recetores σ presentes no cérebro, comportando-se a PREG-S e DHEA-S como agonistas. Os efeitos da PREG-S e DHEA-S nos recetores σ_1 poderão estar subjacentes a uma ação pré-sináptica, induzindo a libertação de glutamato [65, 108, 109].

6. Influência da PREG-S na neurotransmissão com relevância na DA

6.1. PREG-S e a liberação de glutamato

O efeito da PREG-S na liberação de glutamato no hipocampo, CPF (córtex pré-frontal) e corpo estriado foi estudado e os resultados demonstraram que este depende da fase de desenvolvimento neuronal e região cerebral [110].

Em neurónios imaturos do hipocampo, os efeitos da PREG-S na liberação espontânea de glutamato foram avaliados usando a frequência de mEPSCs (correntes pós-sinápticas excitatórias em miniatura) como índice da liberação espontânea de glutamato. Os resultados demonstraram que uma exposição dos neurónios a PREG-S aumentou, de uma forma dependente da dose, a frequência de mEPSCs, sugerindo que esta promova uma liberação pré-sináptica espontânea de glutamato em neurónios imaturos do hipocampo [111–113].

Em neurónios maduros do hipocampo, o efeito da PREG-S no aumento da liberação espontânea de glutamato apresentou resultados contraditórios. O efeito da PREG-S na liberação espontânea de glutamato não foi detetado [112], porém foi demonstrado, noutros estudos, que uma exposição dos neurónios a PREG-S poderá promover uma liberação espontânea de glutamato em neurónios maduros [114, 115]. Adicionalmente, uma liberação facilitada de glutamato pode ser promovida pelo efeito da PREG-S [116–119].

Os resultados de uma exposição a PREG-S no CPF demonstraram um aumento, de uma forma dependente da dose, na frequência de mEPSCs, sugerindo que a PREG-S promova uma liberação espontânea de glutamato no CPF [115]. Adicionalmente, uma exposição a PREG-S, no CPF, a concentrações de 1 μ M inibiu a liberação pré-sináptica de glutamato estimulada por dopamina e 5-HT (serotonina), sugerindo que, a concentrações baixas, a PREG-S iniba seletivamente uma liberação facilitada de glutamato [120].

No corpo estriado, uma exposição a PREG-S não demonstrou efeitos na liberação espontânea de glutamato [115].

6.2. PREG-S e a liberação de GABA

O efeito da PREG-S na liberação pré-sináptica de GABA foi estudado no hipocampo, usando a frequência de mIPSCs (correntes pós-sinápticas inibitórias em miniatura) como índice da liberação espontânea de GABA. Os resultados demonstraram uma diminuição da frequência de correntes pós-sinápticas inibitórias espontâneas, sugerindo que a PREG-S iniba a liberação espontânea de GABA no hipocampo [121].

6.3. PREG-S e a liberação de ACh

Uma administração intracerebroventricular de PREG-S estimulou um aumento da liberação de ACh (acetilcolina) no hipocampo [122, 123]. Além disso, uma injeção direta de PREG-S no núcleo septal medial, onde os corpos celulares dos neurónios colinérgicos que se projetam para o hipocampo estão localizados, induziu, também, um aumento da liberação de ACh no hipocampo [124].

O efeito da PREG-S na liberação de ACh no córtex frontal também foi avaliado, através de uma administração intracerebroventricular de PREG-S. Os resultados do estudo demonstraram um aumento dos níveis de ACh, de uma forma dependente da dose [125].

7. Alvos moleculares da PREG e PREG-S e mecanismos de ação

Em relação ao efeito da PREG-S na liberação espontânea de glutamato em neurónios imaturos do hipocampo, a evidência sugere que ocorra através da ativação de σ_1 Rs (receptores sigma 1), uma vez que antagonistas de σ_1 Rs, haloperidol e BD-1063, bloqueiam o aumento da frequência de mEPSC induzida pela PREG-S e dado que um agonista de σ_1 Rs, a pentazocina, consegue replicar os efeitos da PREG-S [113]. O mecanismo *downstream* da ativação de σ_1 Rs pela PREG-S parece envolver um aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , pela ativação pré-sináptica de uma proteína $G_{i/o}$ acoplada ao σ_1 R [113]. Os efeitos da liberação espontânea de glutamato poderão ter um impacto no desenvolvimento sináptico no hipocampo e contribuir para o amadurecimento e/ou manutenção das sinapses no hipocampo (Tabela 2) [113, 126].

Adicionalmente, foi observada uma liberação espontânea de glutamato em células de Purkinje neonatais potenciada pela PREG-S, através da modulação de TRPM3 (canal de potencial de recetor transitório da subfamília M 3) e subsequente aumento do influxo de Ca^{2+} em terminais pré-sinápticos (Tabela 2) [127].

O efeito da PREG-S na liberação espontânea e facilitada de glutamato em neurónios maduros do hipocampo parece ocorrer através da ativação do mesmo recetor, σ_1 R [115, 116], no entanto, num outro estudo, foi proposto um mecanismo onde os efeitos da PREG-S na liberação facilitada de glutamato parecem ser devidos a uma modulação positiva de α_7 nAChRs (recetor nicotínico α_7) e subsequente ativação de canais de Ca^{2+} de tipo L [114]. O péptido A β liga-se com alta afinidade a α_7 nAChRs e esta interação pode ser inibida através de ligandos de α_7 nAChRs [128]. A administração, em ratos envelhecidos, de um agonista de α_7 nAChRs, GTS-21, demonstrou melhorias em processos de aprendizagem e memória, sendo que o efeito da PREG-S na liberação facilitada de glutamato no hipocampo poderá estar subjacente à sua influência na cognição [110, 114, 129].

No hipocampo, a inibição da liberação espontânea de GABA pela PREG-S parece ocorrer através da ativação de proteínas $G_{i/o}$ acopladas a σ_1 Rs, um mecanismo similar ao que ocorre na liberação espontânea de glutamato no hipocampo pela PREG-S [130]. A liberação espontânea de GABA contribui para uma inibição tónica da excitabilidade neuronal, sendo que o efeito da PREG-S poderá desempenhar um papel na modulação da excitabilidade no hipocampo (Tabela 2) [110, 131]. Adicionalmente, esta inibição da liberação espontânea de GABA mediada pela PREG-S poderá facilitar uma LTP (potenciação de longa duração) em neurónios piramidais CA1 e, consequentemente, facilitar processos de memória e aprendizagem [110, 132].

Uma inativação ou expressão modificada de σ_1 Rs aumentou défices de aprendizagem e neurotoxicidade associada a A β , em modelos de DA em ratos. Agonistas de σ_1 Rs, atuando como chaperonas moleculares em membranas do retículo endoplasmático associado à mitocôndria, parecem exercer potentes efeitos neuroprotetores nestes modelos de DA [133].

Tanto uma administração IP (intraperitoneal) como intracerebroventricular de PREG-S reduziram significativamente a hipnose induzida por barbitúricos em ratos [134], atuando a PREG-S como um modulador alostérico negativo de GABA_ARs, através de uma redução da frequência de abertura de canais de Cl^- (Tabela 2) [135–137].

Como mencionado anteriormente, a PREG-S é também um potente agonista alostérico de NMDARs [107]. Uma exposição a PREG-S demonstrou potenciar respostas mediadas por NMDA como o aumento da frequência e duração de abertura de canais ativados por NMDA e como o aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} induzidos por NMDA, no hipocampo [138,

139]. Uma despolarização induzida por glutamato e mediada por NMDARs foi potenciada pela PREG-S em neurónios de medula espinal de galinha, demonstrando o seu papel de modulador alostérico positivo de NMDARs [107].

Uma ativação transitória de NMDARs é necessária para a indução de uma LTP, aumentando a transmissão sinática, bem como de uma LTD (depressão de longa duração), diminuindo a transmissão sinática [140]. Dessa forma, a ativação de NMDARs parece aumentar a eficiência da neurotransmissão em sinapses glutamatérgicas através da indução de uma LTP, bem como parece alterar diretamente a plasticidade sinática responsável por processos de aprendizagem e memória no hipocampo e vários núcleos cerebrais [141–145]. Adicionalmente, foi observada, em neurónios piramidais CA1 do hipocampo, uma potenciação de LTP causada pela ação da PREG-S, através da modulação de NMDARs (Tabela 2) [146–148]. A PREG-S atua, ainda, como modulador alostérico negativo de recetores de glicina, AMPA e cainato [135].

Uma administração de THC (tetrahydrocannabinol), a substância ativa da canábis, aumentou, substancialmente, a síntese de PREG no cérebro de ratos Wistar, através da ativação de CB1Rs (receptor canabinóide tipo 1). A ativação pré-sináptica de CB1Rs por THC inibe a libertação de neurotransmissores como GABA e glutamato, afetando a transmissão sinática e, conseqüentemente, funções de memória. Um mecanismo de *feedback* negativo, mediado pela PREG, contra os efeitos de TCH na intoxicação por canábis é promovido através da modulação alostérica negativa de CB1Rs [149]. A inibição da libertação de neurotransmissores que ocorre através da fosforilação da proteína vesicular Munc-18-1 demonstrou sensibilidade à ação da PREG (Tabela 2) [150].

Os neurónios têm uma morfologia característica de processos neuríticos densamente preenchidos por microtúbulos que desempenham um papel fulcral no crescimento e manutenção de neurites, durante a diferenciação neuronal [151, 152]. Os microtúbulos neuronais são compostos de tubulina e de MAPs (proteínas associadas a microtúbulos), das quais é necessário purificar a tubulina ao longo de vários cursos de polimerização-despolimerização [153, 154]. As MAPs regulam a formação e dinâmica da rede de microtúbulos, determinando, assim, a formação neuronal e controlam o equilíbrio entre rigidez e plasticidade nos processos neuronais [155, 156]. A PREG atua como agonista, ligando-se especificamente e com grande afinidade à MAP2, expressa nas dendrites de neurónios (Tabela 2) [157].

A estabilidade dos microtúbulos é regulada por moduladores associados a microtúbulos, como a CLIP-170. Num estudo em culturas de células de mamífero e embriões de peixe-zebra, foi observada uma ligação e subsequente ativação da CLIP-170 pela PREG, através da alteração da conformação da CLIP-170. Dessa forma, a ação da PREG demonstrou potenciar a capacidade de organização de microtúbulos mediada pela CLIP-170 (Tabela 2) [158].

Num estudo em amostras do corpo estriado de rato, foi demonstrada uma inibição, pela PREG, da libertação de dopamina estimulada por NMDA, de uma maneira dependente da concentração. A inibição da libertação de dopamina foi completamente revertida aquando utilização de antagonistas de σ_1 Rs e σ_2 Rs (DuP734 e Lu28-179, respetivamente), sugerindo que a ação da PREG ocorra via σ Rs [159].

Esteróide	Alvo molecular	Modo de regulação	Mecanismo de ação	Ação fisiológica
PREG-S	σ 1R	Ativação	Aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , através de ativação de proteínas $G_{i/o}$	Amadurecimento e/ou manutenção de sinapses em neurónios imaturos do hipocampo Modulação da excitabilidade neuronal no hipocampo
	TRPM3	Ativação	Aumento do influxo de Ca^{2+} em terminais pré-sinápticos	Modulação da transmissão glutamatérgica em células de Purkinje neonatais
	GABA _A R	Modulador alostérico negativo	Redução da frequência de abertura de canais de Cl^-	Redução da hipnose induzida por barbitúricos
	NMDAR	Modulador alostérico positivo	Aumento do tempo de abertura de canais ativados por NMDA	Indução de LTP em neurónios piramidais CA1 no hipocampo
PREG	CB1R	Modulador alostérico negativo	Inibição da fosforilação da proteína vesicular Munc-18-1	Modulação da neurotransmissão sinática
	MAP2	Agonista	Estimulação da formação de microtúbulos	Crescimento e manutenção de neurites
	CLIP-170	Agonista	Alteração da conformação da CLIP-170	Estabilização de microtúbulos

Tabela 2 – Alvos moleculares da PREG e PREG-S com relevância na DA

8. Efeitos centrais da PREG e PREG-S com relevância na DA

8.1. Efeitos neuroprotetores

Os efeitos neuroprotetores da PREG contra a morte neuronal induzida pelo glutamato e péptido A β foram demonstrados, depois de um tratamento de uma linha celular hipocampal de rato

(HT-22) com PREG, de uma forma dependente da concentração. Um tratamento de células HT-22 com glutamato induziu mudanças significativas na integridade morfológica dos neurónios hipocámpais, sendo que um pré-tratamento das células com PREG preveniu quase completamente as mudanças morfológicas observadas depois do tratamento com glutamato. As células HT-22 pré-tratadas com PREG demonstraram características morfológicas semelhantes a células controlo que não foram expostas a glutamato [160].

Um tratamento com PREG realizado num modelo neuronal composto por uma linha celular (PC-12) de feocromocitoma de rato demonstrou, também, efeitos neuroprotetores contra o péptido A β , de uma forma dependente da concentração. Pelo contrário, uma exposição das células PC-12 a PREG-S não demonstrou o mesmo efeito neuroprotetor, tendo exacerbado a toxicidade induzida pelo péptido A β e diminuído significativamente a viabilidade celular em células tratadas com A β [161].

Um tratamento de células do neuroblastoma de rato (B104) com péptido A β demonstrou uma diminuição significativa da viabilidade celular, quando em comparação com células controlo que não foram tratadas com o péptido A β . Por outro lado, esta diminuição da viabilidade celular foi significativamente atenuada através de um pré-tratamento das células B104 com PREG-S. A toxicidade induzida por A β foi, ainda, completamente prevenida, quando o pré-tratamento com PREG-S foi realizado a concentrações de 0.25 μ M (mais baixa) e 5 μ M (mais alta). A percentagem de células necróticas e de células que se encontravam num estágio tardio de apoptose induzido pelo péptido A β foi diminuída significativamente, depois de um pré-tratamento com PREG-S [162].

Como já referido, a TSPO facilita o transporte de colesterol, do citosol até à matriz mitocondrial, onde é subsequentemente metabolizado a PREG pela P450sc. Os níveis de TSPO encontram-se aumentados em cérebros de doentes com DA [163]. A TSPO é ativada por distúrbios na homeostase do Ca²⁺ e formação de ROS (espécies reativas de oxigénio) e regula a apoptose mediada pela mitocôndria. Subsequentemente, a ativação de TSPO medeia a formação e abertura de mPTP (poro de permeabilidade transitória da membrana mitocondrial) e promove a oxidação da cardiolipina, resultando na libertação de mediadores apoptóticos como o citocromo c e, consequentemente, na morte celular [70]. Num modelo celular da DA, em células do neuroblastoma humano (SH-SY5Y) que expressam APP, foi observado um aumento da produção de PREG, aquando tratamento das células com dois ligandos de TSPO, 2a e 2b. Os neuroesteróides, como a PREG, possuem efeitos neuroprotetores, impedindo a morte celular através da inibição da libertação de citocromo c, bem como do aumento dos níveis de Ca²⁺ [70, 164].

8.2. Efeitos na cognição

Uma infusão de PREG-S no NBM (núcleo basal de Meynert) de ratos Sprague-Dawley demonstrou melhorar a *performance* cognitiva, durante um teste de reconhecimento em dois ensaios, num labirinto em Y. O grupo de ratos ao qual foi administrado PREG-S imediatamente após o primeiro ensaio (ensaio de aquisição) realizou mais visitas ao novo braço do labirinto que os restantes dois grupos, compostos por um grupo ao qual foi administrado PREG-S antes do ensaio de aquisição e um grupo controlo ao qual não foi administrado PREG-S. A potenciação da *performance* cognitiva foi observada apenas no grupo cuja administração foi realizada após o ensaio de aquisição [165].

Num estudo realizado em ratos CD-1, as propriedades de potenciação de memória da PREG e do seu conjugado foram avaliadas, através de um teste de evasão a choques, num labirinto em T. Uma administração intracerebroventricular de PREG e PREG-S foi realizada após o treino de evasão a choques e a retenção de memória foi avaliada uma semana depois. Tanto a

administração de PREG como de PREG-S demonstrou potenciar a *performance* cognitiva dos ratos [166]. De uma maneira semelhante, uma administração sistêmica e na amígdala de PREG-S demonstrou propriedades de potenciação de memória em ratos [167, 168].

A capacidade mnésica de ratos Swiss foi avaliada 7 dias após administração intracerebroventricular de péptido A β na forma agregada, através da observação do seu comportamento num labirinto em Y para estudo de memória espacial a curto prazo. A memória a longo prazo foi também avaliada, após 14 dias, através de um teste de evasão a choques. A administração de PREG e do seu conjugado demonstrou, de uma forma dependente da dose, diminuir os défices de memória induzidos pela administração de péptido A β [169].

Os resultados do estudo anterior foram, em parte, consistentes com os resultados de um estudo semelhante que pretendia avaliar a memória espacial em ratos, usando o teste do labirinto aquático de Morris. Depois de uma administração intracerebroventricular do péptido A β na forma agregada, foi observado um aumento significativo da latência de escape para alcançar a plataforma escondida no labirinto aquático, em comparação a ratos controlo aos quais não foi administrado péptido A β .

O tratamento com PREG-S em ratos aos quais foi administrado o péptido A β demonstrou um efeito positivo, diminuindo o prolongamento da latência de escape, de uma forma dependente da dose, contra os défices de cognição espacial induzidos pela administração do péptido A β . Contrariamente, o tratamento com PREG não surtiu efeito contra o enfraquecimento da memória espacial induzido pelo péptido A β [170].

Para explorar os mecanismos relacionados às propriedades anti-amnésicas da PREG-S, foram examinadas células piramidais da região CA1 do hipocampo dos ratos. Os resultados demonstraram uma redução das células piramidais, aproximadamente, para metade, em ratos aos quais foi administrado o péptido A β . O tratamento com PREG-S atenuou significativamente a perda de células piramidais e o aumento de células apoptóticas observado em ratos aos quais foi administrado péptido A β , sugerindo um efeito protetor da PREG-S contra a neurotoxicidade induzida.

Adicionalmente, os níveis de PREG no hipocampo de rato diminuíram significativamente após uma injeção intrahipocampal bilateral de péptido A β na forma agregada. Sugere-se que esta alteração dos níveis de PREG possa ser devida à diminuição da viabilidade celular induzida pelo péptido A β , contribuindo para a redução da síntese de neuroesteróides e tornando, por sua vez, as células mais vulneráveis aos défices induzidos por péptido A β [171].

8.3. Alteração dos níveis de PREG e PREG-S na DA

A administração de PREG tem demonstrado potenciar processos de memória e aprendizagem em modelos animais de roedores e as características deste neuroesteróide poderão ser relevantes relativamente à ação de algumas classes farmacológicas.

Por exemplo, um aumento nos níveis de PREG induzido pela administração de clozapina poderá ter um impacto na patofisiologia da esquizofrenia, uma vez que os efeitos da PREG promovem a formação e estabilização de microtúbulos, bem como a potenciação do crescimento de neurites e foi demonstrada uma diminuição do neurópilo em doentes com esquizofrenia [172]. Dessa forma, uma administração IP de clozapina e olanzepina em ratos Sprague-Dawley promoveu um aumento dos níveis corticais de PREG, assim como no hipocampo e LCR. De uma maneira semelhante, uma administração IP de fluoxetina e uma administração em regime de

combinação de fluoxetina e olanzepina promoveu um aumento dos níveis de PREG no hipocampo de ratos Sprague-Dawley [173].

Embora haja poucos estudos sobre os níveis de neuroesteróides em amostras biológicas de doentes com DA, foram quantificadas as concentrações de PREG e PREG-S em amostras de tecido cerebral *postmortem*, sangue e LCR, tendo sido demonstradas alterações significativas em doentes com DA, através de metodologias usando maioritariamente purificações por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e identificação por GC-MS (Espectrometria de Massa acoplada a Cromatografia Gasosa).

No corpo estriado e cerebelo de doentes com DA, as concentrações de PREG-S encontraram-se significativamente diminuídas, quando comparadas a indivíduos controlo sem demência e uma correlação negativa entre os níveis de péptido A β corticais e os níveis de PREG-S no corpo estriado e cerebelo foi observada [174]. Por outro lado, um aumento significativo dos níveis de PREG-S no sangue de mulheres com DA foi observado, quando comparado a mulheres sem a doença [175].

No córtex temporal de doentes com DA, as concentrações de PREG encontraram-se significativamente aumentadas, quando comparadas a indivíduos controlo sem demência e uma correlação positiva entre os níveis de PREG no córtex temporal e a severidade de *Braak and Braak stage* foi observada [176].

A acessibilidade a métodos analíticos altamente específicos e seletivos para a quantificação de níveis endógenos muito baixos de esteróides permite-nos avaliar a sua metabolómica, usando metodologias com alto grau de confiança. Evidência crescente sugere que uma desregulação de concentrações endógenas de esteróides tenha uma influência na DA [177]. Tendo isso em conta e dado que foi documentada uma correlação entre os níveis de PREG e a severidade do estágio neuropatológico da doença avaliado através do método de Braak, abre-se portas para uma função da PREG como possível biomarcador da doença em estágios mais precoces. Neste âmbito, realizou-se uma revisão sistemática das investigações existentes, comparando as concentrações de PREG e PREG-S, entre indivíduos com DA e indivíduos controlo sem doença, em amostras biológicas de tecido cerebral *postmortem*, sangue e LCR.

O objetivo desta revisão sistemática é consolidar a evidência existente em relação aos níveis de PREG e do seu conjugado sulfatado em amostras biológicas de doentes com DA e avaliar os resultados obtidos, considerando os efeitos neuroprotetores e potenciadores de memória da PREG e PREG-S, bem como um possível papel no diagnóstico precoce da doença.

9. Métodos

9.1. Revisão sistemática

9.1.1. Estratégia de pesquisa

Artigos e estudos relevantes em três bases de dados eletrónicas (PubMed, b-on e Scopus) foram pesquisados e reunidos. A pesquisa foi restrita a todos os artigos publicados em inglês, desde o início da base de dados até ao mês de Junho de 2020, de todas as bases de dados utilizadas. O *design* da estratégia envolveu palavras-chave relacionadas com os seguintes conceitos: (1) pregnenolona (PREG) ou sulfato de pregnenolona (PREG-S) e (2) doença de Alzheimer (DA). A estratégia de pesquisa detalhada para as três bases de dados encontra-se no Apêndice 1.

9.1.2. Critérios de elegibilidade

Os estudos são considerados elegíveis, se forem estudos de caso-controlo, comparando doentes com DA com indivíduos controlo sem demência (1), se usarem critérios de diagnóstico da DA estandardizados, como os critérios que estão de acordo com NINCDS-ADRDA (2), se medirem e compararem as concentrações de PREG e/ou PREG-S em doentes com DA e em indivíduos controlo sem demência (3), tal como demonstrado na Figura 3. Os estudos são excluídos, se forem relatórios médicos (*case reports*) ou artigos de revisão (1), se estudarem a DA juntamente com outras patologias que afetem o foro mental (2), se tiver sido usada medicação psicotrópica ou outro tipo de medicação que possa influenciar os níveis de PREG e PREG-S (3), estudos em animais ou experiências *in vitro* (4) e literatura cinzenta (5), tal como demonstrado na Figura 3.

9.1.3. Extração de dados

Depois de selecionados os estudos elegíveis, a informação foi extraída de acordo com as seguintes variáveis: nome do primeiro autor do estudo e ano de publicação (1), amostra biológica (2), distribuição de género dos indivíduos (3), idade média dos indivíduos (4), critérios de diagnóstico (5), intervalo *postmortem* (6), método de quantificação da PREG e PREG-S (7), concentrações médias de PREG e/ou PREG-S (8).

9.1.4. Avaliação da qualidade

A escala NOS (*Newcastle-Ottawa Quality Assessment Scale*) foi usada para avaliar a qualidade dos estudos elegíveis [178]. Cada um dos estudos foi avaliado com base em três perspetivas: seleção, com a representatividade da amostra e definição dos controlos (quatro pontos), comparabilidade entre indivíduos dos diferentes grupos, baseada no *design* do estudo e controlo de variáveis confundentes (dois pontos) e resultados, averiguando a exposição à doença e se foi usado o mesmo método de averiguação para casos e controlos (três pontos). De acordo com os critérios pré-específicos de pontuação deste instrumento, a pontuação total varia de zero a nove pontos e os estudos com pontuação de 7–9, 3–6 e 0–3 são classificados de alta, moderada e baixa qualidade, respetivamente. O método para atribuição de pontos e a pontuação de cada aspeto para avaliação da qualidade do estudo encontra-se descrito no Apêndice 2.

10. Análise de dados

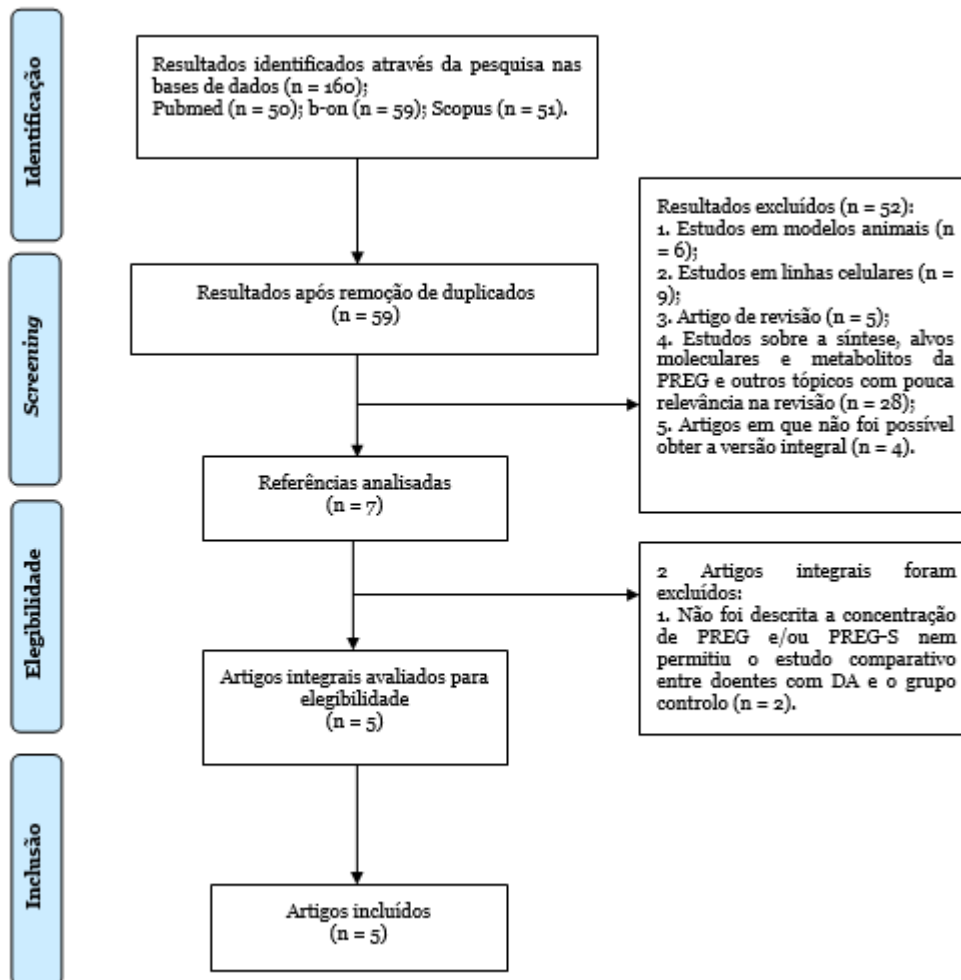


Figura 3 - Fluxograma dos artigos seleccionados para revisão

Referência	Amostra	Gén. masculino	Gén. feminino	Idade média	Critério de diagnóstico	PMI	Método de análise	Níveis de PREG (DA)	Níveis de PREG (controlo)	Níveis de PREG-S (DA)	Níveis de PREG-S (controlo)
C.E. Marx, et al., 2006 [179]	CPF	14 (100%)	0 (0%)	81	NINCDS-ADRDA; confirmado pelos critérios NIA-RI	2,3 horas	HPLC e GC-MS	20,50 ng/g	8,61 ng/g	-	-
Naylor, et al., 2008 [180]	LCR	NE	NE	83	NINCDS-ADRDA; confirmado pelos critérios NIA-RI	6,5 horas	HPLC e GC-MS	0,15 ng/mL	0,10 ng/mL	-	-
Naylor, et al., 2010 [176]	Córtex temporal	17 (42,5%)	23 (57,5%)	83	NINCDS-ADRDA; confirmado pelos critérios NIA-RI	6,5 horas	HPLC e GC-MS	22,24 ng/g	10,24 ng/g	-	-
M. Vaňková, et al., 2015 [175]	Sangue	0 (0%)	16 (100%)	74,8	NINCDS-ADRDA	-	GC-MS	NE	NE	64,6 nmol/L	40,7 nmol/L
Weill-Engerer, et al., 2002 [174]	Amígdala, cerebelo, corpo estriado, córtex frontal, hipocampo, hipotálamo	1 (20%)	4 (80%)	86	NINCDS-ADRDA; confirmado pelos critérios NIA-RI	<24 horas	HPLC e GC-MS	NE	NE	NE	NE

Tabela 3 - Lista de estudos elegíveis que compararam concentrações de PREG e/ou PREG-S em doentes com DA e grupos controlo.

CPF – córtex pré-frontal; GC-MS – Espectrometria de Massa acoplada a Cromatografia Gasosa; HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; LCR – líquido cefalorraquidiano; NE – Não especificado; PMI – Intervalo *postmortem*

Analisando os cinco estudos de caso-controle que compararam os níveis de PREG e/ou PREG-S em amostras biológicas entre doentes com DA e indivíduos controle sem demência, podemos observar resultados interessantes, no entanto controversos.

Ao todo, foram analisados os níveis médios de PREG e/ou PREG-S em amostras biológicas de 159 indivíduos. O diagnóstico clínico de DA, com base nos critérios de NINCDS-ADRDA, foi atribuído a 75 indivíduos. Subsequentemente, o diagnóstico clínico foi confirmado através da análise *postmortem* de amostras de tecido cerebral em 59 dos 75 indivíduos, segundo os critérios de NIA-RI (*National Institute on Aging/Reagan Institute*). Os restantes 84 indivíduos fizeram parte dos grupos controle ao quais não foi atribuído diagnóstico de DA. As concentrações de PREG foram comparadas entre 54 indivíduos com DA e 56 indivíduos controle sem DA, totalizando 110 indivíduos. As concentrações de PREG-S foram comparadas entre 21 indivíduos com DA e 28 indivíduos controle sem DA, totalizando 49 indivíduos.

O estágio neuropatológico da doença foi determinado através do método de Braak em todos os estudos, exceto no estudo que envolvia as amostras de sangue [174, 176, 179, 180]. As análises correlacionais entre os níveis de PREG e/ou PREG-S e o estágio neuropatológico da doença incluíram tanto doentes com DA como indivíduos controle, uma vez que indivíduos controle poderão apresentar sinais neuropatológicos que correspondam a critérios para estágios precoces no método de Braak, refletindo potencialmente os estágios mais precoces da DA ou uma predisposição para desenvolver a doença na ausência de sintomatologia clínica detectável [174, 176, 179, 180].

A presença de placas amilóides foi avaliada de acordo com os critérios do CERAD, no estudo conduzido por Engerer [174]. Através da classificação histológica dos tecidos cerebrais, podemos concluir sobre a ausência de placas amilóides ou uma presença escassa de placas amilóides difusas, bem como a presença de NFTs no córtex transentorrinal, córtex entorrinal e hipocampo, no grupo de indivíduos controle. Segundo os critérios de avaliação neuropatológica do CERAD, existe baixa probabilidade de que uma possível demência seja devida a lesões neuropatológicas da DA, uma vez a análise *postmortem* do cérebro apresenta uma classificação CERAD “não frequente” e estágio de Braak I/II/III. Por outro lado, podemos concluir, ainda, que o grupo de doentes com DA apresenta, maioritariamente, uma presença frequente de placas amilóides, bem como um envolvimento do giro temporal médio e superior e núcleos da base. Segundo os critérios de avaliação neuropatológica do CERAD, existe uma alta probabilidade de que a demência seja devida a lesões neuropatológicas da DA, uma vez que a análise *postmortem* do cérebro apresenta, maioritariamente, uma classificação CERAD “frequente” e estágio de Braak IV/V/VI [174].

Os níveis de PREG tendem a ser mais altos em amostras biológicas de indivíduos que compõem o grupo de doentes com DA.

Quando quantificados em amostras de CPF, os níveis de PREG encontram-se tendencialmente mais altos no grupo de doentes com DA, no entanto não chegam à significância estatística, atingindo níveis médios de 20,50 ng/g contra 8,61 ng/g no grupo de indivíduos controle (Tabela 3). Constatamos, ainda, que os níveis de PREG no CPF não estão significativamente correlacionados com a severidade do estágio neuropatológico da doença [179].

Quando medidos através de amostras de LCR, os níveis de PREG tendem, igualmente, a estar mais altos no grupo com DA (0,15 ng/mL *vs.* 0,10 ng/mL, respetivamente), porém não alcançam a significância estatística (Tabela 3). Uma correlação positiva entre os níveis de PREG

no LCR e a severidade do estágio neuropatológico da doença esteve perto de ser alcançada, contudo, devido a uma grande aproximação entre os valores dos níveis de PREG em doentes com DA e indivíduos controlo, terá importância realçar que as medições de PREG no LCR poderão não ser úteis para uma deteção segura de estágios de DA mais precoces. Neste estudo, conclui-se, também, que os níveis de PREG no LCR se correlacionam positivamente com os níveis de PREG no córtex temporal dos mesmos indivíduos, sugerindo que estes sirvam, potencialmente, como biomarcadores para os níveis de neuroesteróides no cérebro [180].

Os níveis de PREG foram quantificados em amostras de tecido cerebral do córtex temporal dos mesmos indivíduos do estudo citado anteriormente. Constatou-se que os níveis de PREG no córtex temporal estão significativamente aumentados em doentes com DA, atingindo níveis médios de 22,24 ng/g contra 10,24 ng/g, em indivíduos controlo (Tabela 3). Os níveis de PREG no córtex temporal demonstraram uma correlação positiva com o *Braak and Braak stage*, denotando-se que poderá haver alguma relação entre os níveis de PREG e a severidade da doença [176].

Os níveis de PREG e PREG-S foram medidos em amostras de sangue, observando-se uma diferença significativa nas medições entre doentes com DA e indivíduos controlo, com os níveis de PREG-S aumentados significativamente em doentes com DA (64,6 nmol/L vs. 40,7 nmol/L, respetivamente), como demonstrado na Tabela 3 [175].

Ainda sobre os níveis de PREG e PREG-S, estes foram quantificados em seis amostras de tecido cerebral, nomeadamente do hipocampo, amígdala, córtex frontal, corpo estriado, hipotálamo e cerebelo, em doentes com DA e indivíduos controlo sem demência. A PREG foi o neuroesteróide encontrado em maiores concentrações em todas as regiões cerebrais de ambos os grupos, no entanto foi observada uma tendência para níveis mais baixos de neuroesteróides nas regiões cerebrais de doentes com DA. Uma diferença regional significativa foi, ainda, observada entre os níveis de PREG-S no corpo estriado e cerebelo, estando diminuídos no grupo de doentes com DA. Os níveis de PREG-S no córtex frontal de doentes com DA também se encontravam diminuídos, no entanto não foi atingida uma significância estatística. Adicionalmente, os níveis de péptido A β foram quantificados no córtex frontal, encontrando-se significativamente aumentados no grupo de doentes com DA e uma correlação negativa foi observada entre os níveis de A β cortical e os níveis de PREG-S no corpo estriado e cerebelo [174].

O estudo que avaliou os níveis de PREG e PREG-S em amostras de sangue apenas compreendeu mulheres, num total de 38, já o estudo que utilizou amostras de CPF apenas recorreu a indivíduos do género masculino, num total de 29 [175, 179]. No entanto, relativamente a este último, foi realizado um estudo posterior, utilizando amostras de córtex temporal e incluindo homens e mulheres, sendo que não foram descritas diferenças significativas entre os níveis de PREG em mulheres, quando comparados com homens, em ambos os grupos [176].

Não foram demonstradas diferenças significativas na média das idades entre o grupo de doentes com DA e o grupo de indivíduos controlo, em todos os estudos analisados, contudo a idade foi ajustada no estudo conduzido por Vaňková, apesar de, ainda assim, ser comparável entre grupos [175].

Nos estudos que avaliavam a concentração de PREG no LCR e córtex temporal, não foi demonstrada uma diferença significativa entre a média do PMI (intervalo *postmortem*), tempo que decorreu desde a morte do indivíduo para a análise dos tecidos, no grupo de doentes e no grupo controlo, porém, no estudo que utilizou CPF como amostra, foi significativamente mais baixa no grupo de doentes com DA. Ainda assim, nos três estudos, não foi demonstrada uma correlação entre os níveis de neuroesteróides e o PMI, logo possíveis diferenças entre as médias de PMI nos diferentes grupos são pouco prováveis de influenciar os níveis de PREG, visto que,

até no estudo em que a diferença foi observada, as médias de PMI continuam a ser francamente baixas em relação a outras investigações com tecido cerebral *postmortem* (Tabela 3) [176, 179, 180].

Quatro estudos obtiveram uma avaliação de cinco pontos na escala NOS e um estudo obteve uma avaliação de seis pontos, correspondendo a um nível moderado de qualidade dos estudos elegidos (Apêndice 2).

Em relação à avaliação dos estudos baseada na seleção de casos e controles, todos obtiveram a mesma pontuação. A definição de caso foi considerada adequada, uma vez que todos os indivíduos do grupo de doentes cumpriram os critérios NINCDS-ADRDA para atribuição de diagnóstico clínico de DA e este foi confirmado posteriormente, porém a amostra não foi considerada representativa. A definição de controle também foi adequada, uma vez que indivíduos do grupo controle não apresentaram demência devida a DA nem outras patologias neurológicas e/ou psiquiátricas, no entanto a seleção de controles não foi realizada a partir da comunidade, tratando-se de indivíduos hospitalizados, indivíduos inscritos em programas de doação de cérebro do ADRC (*Alzheimer's Disease Research Center*) ou não foi descrita.

Em relação à avaliação dos estudos baseada na comparabilidade entre casos e controles, quatro dos estudos obtiveram um ponto, uma vez que apenas foi controlado o fator mais importante, comparação dos níveis de neuroesteróides em amostras biológicas entre doentes com DA e indivíduos controle sem a doença. Por outro lado, dois pontos foram atribuídos à investigação conduzida por Vaňková, uma vez que, para além cumprir o critério mencionado anteriormente, um fator adicional foi controlado, tendo a idade sido ajustada entre o grupo de doentes com DA e o grupo controle (Apêndice 2) [175].

Em relação à avaliação dos estudos baseada nos resultados, todos obtiveram a mesma pontuação, uma vez que a quantificação e análise de neuroesteróides foi realizada através de métodos analíticos validados e o mesmo método foi utilizado em amostras biológicas de doentes com DA e indivíduos controle (Apêndice 2).

De uma maneira interessante, a qualidade dos estudos elegidos demonstrou ser bastante próxima, algo que poderá fazer sentido, dado que a maior parte das investigações foram realizadas seguindo uma linha temporal contínua e coerente, com metodologias muito semelhantes. Um dos objetivos da investigação conduzida por Naylor foi determinar se os resultados obtidos sobre os níveis de neuroesteróides no CPF, de doentes com DA e indivíduos controle do género masculino, poderiam ser replicados no córtex temporal, utilizando um maior número de amostras e incluindo tanto homens como mulheres. Adicionalmente, as amostras biológicas de CPF, córtex temporal e LCR provieram de indivíduos inscritos em programas de doação de cérebro do ADRC, podendo concluir-se sobre uma homogeneidade na seleção de casos e controles, comparabilidade e avaliação de resultados.

O método analítico utilizado para quantificar os níveis de neuroesteróides foi GC-MS. Em todas as investigações, foi realizado um passo de purificação por HPLC antes da análise por GC-MS, exceto no estudo que utilizou amostras de sangue [175].

11. Discussão

De um modo geral, podemos observar uma tendência para o aumento dos níveis de PREG em doentes com DA. Não obstante, os níveis de PREG em amostras de seis regiões cerebrais de doentes com DA encontravam-se diminuídos face ao grupo controle, ainda que a diferença não tenha sido estatisticamente significativa [174]. Em comparação, os estudos nos quais foi

observado um aumento de PREG em doentes com DA e onde também foram utilizadas amostras de tecido cerebral demonstraram algumas divergências na metodologia de quantificação de neuroesteróides [176, 179].

Ainda que os neuroesteróides tenham sido quantificados através de GC-MS em todos os estudos, a escolha do padrão interno diferiu, tendo sido utilizada PREG deuterada, em vez da utilização de $3\beta,5\beta$ -tetrahydroandrostenediona no estudo de Engerer [174]. Quando é utilizado um padrão interno na quantificação por GC-MS, este deve ser adicionado o mais cedo possível durante a preparação e extração da amostra. Tanto o padrão interno como o analito são analisados simultaneamente, tendo em consideração possíveis variações que ocorram durante o processo analítico, quer na eficiência de extração, derivatização do analito, volume de injeção ou efeitos de matriz, sendo que o padrão interno deve estar ausente na amostra [181]. Uma vez os níveis de neuroesteróides são calculados em relação à intensidade do sinal do padrão interno, uma escolha apropriada pode ser crítica neste processo. Tendo isso em conta, a PREG deuterada exibe características químicas e físicas muito semelhantes às da PREG não deuterada, trata-se de um composto estável e difere apenas em quatro unidades de massa atômica, algo facilmente discernível através de espectrometria de massa, considerando-se um padrão interno ótimo [182]. Adicionalmente, uma distribuição desigual de géneros entre grupos e um número limitado de amostras por região cerebral (n= 5-6/grupo) poderão, também, ter influenciado os resultados no estudo de Engerer [174].

Relativamente aos níveis de PREG-S, estes encontravam-se aumentados em amostras de sangue de doentes com DA, mas diminuídos em amostras de corpo estriado e cerebelo [174, 175].

Esta discrepância pode ser potencialmente explicada por diversos fatores. O estudo que envolveu amostras de sangue apenas incluiu mulheres e, em contrapartida, no estudo de Engerer, foram incluídas amostras de homens e mulheres, no entanto foram provenientes de um grupo mais limitado de indivíduos (38 vs. 11, respetivamente) [174, 175]. Adicionalmente, as investigações parecem ter avaliado indivíduos em diferentes estágios da doença. No estudo de Vaňková foi descrito que o grupo de mulheres com DA se encontrava em estágios iniciais da doença e, por outro lado, o envolvimento de núcleos da base como o corpo estriado e cerebelo ocorre em estágios mais avançados da DA [183, 184].

Como mencionado anteriormente, foi descrita uma correlação entre níveis corticais de péptido A β e níveis baixos de PREG-S no corpo estriado e cerebelo. A morte de células neuronais característica durante o curso da doença poderá, em parte, explicar os níveis diminuídos de neuroesteróides no cérebro de doentes com DA, porém um tratamento de células SH-SY5Y com doses tóxicas de péptido A β , na forma agregada, demonstrou promover um aumento dos níveis de PREG-S. Esta produção aumentada de PREG-S foi interpretada como um mecanismo de defesa para combater a toxicidade induzida pelo péptido A β [185].

Os níveis aumentados de PREG-S em amostras de sangue podem ser explicados através da diminuição da atividade 17,20-liase e de 17 α -hidroxilação, catalizada pela P450c17, na zona reticular adrenal do grupo de mulheres com DA, tendo sido demonstrado um rácio diminuído de produto/precursor em relação a DHEA-S/PREG-S [175].

Um estudo que pretendia avaliar o papel da SULT2A1 na patofisiologia da DA foi realizado. Para estimar a atividade desta enzima, compararam-se os rácios de esteróides conjugados com os seus análogos não conjugados (C/U), em amostras de sangue de indivíduos controlo e doentes com DA. Considerando que um rácio mais baixo de esteróides conjugados poderá indicar uma atividade geral reduzida da SULT2A1, constatou-se que o C/U da PREG estava significativamente mais alto no género masculino, o que poderá ser explicado através da influência da esteroidogénese testicular no balanço entre as duas formas do esteróide. No

entanto, não se verificaram diferenças entre os grupos no rácio de PREG/PREG-S, o que poderá ser atribuído à baixa estabilidade da PREG e do seu análogo, visto que estes são precursores dos restantes esteróides e sofrem um rápido metabolismo, com grandes variações inter-individuais nos vários passos metabólicos [186].

Relativamente aos níveis de PREG, este encontravam-se significativamente aumentando no córtex temporal de doentes com DA, a partir de amostras de tecido cerebral de homens e mulheres (n=81; 40 DA, 41 grupo controlo). Nesta região, os níveis correlacionaram-se positivamente com a severidade do *Braak and Braak stage*. Estes dados são consistentes com um estudo anterior no CPF, a partir de um conjunto de amostras mais limitado de indivíduos do género masculino (n=29; 14 DA, 15 grupo controlo). Este aumento no córtex temporal também é consistente com níveis tendencialmente aumentados de PREG no LCR de doentes com DA. Usando um conjunto de amostras mais alargado de indivíduos de ambos os géneros, poder-se-á colocar a hipótese de que níveis de PREG estariam, de igual forma, aumentados significativamente no CPF de doentes com DA, uma vez que os seus níveis se encontram próximos (22,24 ng/g e 20,50 ng/g) [176, 179]. Estas observações entram em concordância com o estudo que descreveu um aumento de PREG em células SH-SY5Y tratadas com doses tóxicas de péptido A β na forma agregada [185].

Isto sugere-nos que alterações dos níveis deste neuroesteróide poderão ter uma relevância funcional, diminuindo a possibilidade de que a descoberta de níveis aumentados de PREG na DA seja apenas um epifenómeno. Posto isto, será relevante salientar que a PREG possui propriedades que suportam a hipótese de que o aumento dos seus níveis no córtex temporal e CPF em doentes com DA poderá surgir de uma forma compensatória na doença.

Devido às suas propriedades de potenciação de memória, efeitos na estabilização de microtúbulos, ação positiva no crescimento de neurites e prevenção de aumentos intracelulares de Ca²⁺ induzidos pelo péptido A β , os aumentos observados dos níveis de PREG na DA poderão resultar em eventos pleiotrópicos que impactam processos neurobiológicos relevantes na doença, no entanto a etiologia precisa destas alterações e as suas consequências funcionais requerem mais estudos [187–189].

12. Conclusão

Atualmente, os tratamentos aprovados para a DA são apenas direcionados ao controlo de sintomas e não demonstram eficácia na modificação da progressão da doença. Apesar de esforços contínuos para estudar novas moléculas com potencial para mudar o curso da DA, as terapias anti-amiloide têm falhado na demonstração de eficácia em fases tardias dos ensaios clínicos e as terapias anti-tau encontram-se em fases iniciais de desenvolvimento [40]. Evidência crescente sugere que a desregulação de níveis endógenos de neuroesteróides tenha um papel na patofisiologia da DA, sendo que o estudo sobre os níveis de PREG e PREG-S, o precursor de todos os neuroesteróides e o seu conjugado sulfatado, em doentes com DA deverá ser explorado.

Existem, no entanto, poucas investigações focadas na comparação dos níveis de PREG e PREG-S em amostras biológicas de doentes com DA e indivíduos sem a doença. Contudo, esta revisão sistemática permitiu-nos debruçar sobre a potencialidade destes neuroesteróides, tanto na terapêutica como no diagnóstico da DA.

Tendo em conta a análise de dados decorrentes dos cinco estudos elegíveis para esta revisão sistemática, parece haver uma tendência para níveis aumentados de PREG e PREG-S em amostras de sangue, LCR, CPF e córtex temporal de doentes com DA, face a grupos controlo sem demência. Estes dados poderão ser importantes, uma vez que foi sugerido que o aumento dos níveis de PREG surja de uma maneira compensatória na doença, baseado nas suas propriedades de potenciação de crescimento de neurites, estabilização de microtúbulos e efeitos de

neuroproteção. Adicionalmente, foi observada uma correlação entre os níveis de PREG no córtex temporal de doentes com DA e a severidade do estágio neuropatológico da doença.

Ainda que a PREG tenha demonstrado efeitos neuroprotetores contra a toxicidade induzida pelo péptido A β [160, 161], o mecanismo que leva ao aumento dos níveis de PREG em doentes com DA permanece por esclarecer. No entanto, poderá sugerir-se um envolvimento da proteína TSPO. Esta proteína facilita o transporte de colesterol até à matriz mitocondrial, onde é subsequentemente metabolizado a PREG pela enzima P450sc. Um aumento da síntese de PREG foi demonstrado em modelos celulares de DA, através da ativação da proteína TSPO [164, 190].

A realização de ensaios clínicos controlados e randomizados a larga escala poderá ser útil para avaliar a eficácia de uma suplementação de PREG ou PREG-S no declínio cognitivo em doentes com DA. Os resultados deste tipo de ensaios clínicos poderiam, ainda, fornecer evidência sobre a utilidade da PREG e PREG-S como biomarcadores na DA.

Uma correlação positiva entre os níveis de PREG no córtex temporal de doentes com DA e a severidade do estágio neuropatológico da doença, bem como uma correlação entre os níveis de PREG no córtex temporal e em amostras de LCR dos mesmos indivíduos, sugere a necessidade de realização de estudos prospetivos para avaliar os mecanismos das mudanças de concentração de PREG e PREG-S a longo prazo.

A identificação de biomarcadores para a realização de um diagnóstico precoce de DA é essencial para o desenvolvimento de novas terapias modificadoras de doença e estratégias de tratamento. Neste contexto, a crescente acessibilidade a métodos analíticos, altamente sensíveis e específicos, para a quantificação de neuroesteróides abre portas para estudos futuros sobre a potencialidade da PREG como biomarcador no diagnóstico da DA, bem como para avaliar a progressão e o estado da doença.

13. Referências

- [1] “2020 Alzheimer’s disease facts and figures,” *Alzheimer’s and Dementia*, vol. 16, no. 3, pp. 391–460, Mar. 2020, doi: 10.1002/alz.12068.
- [2] C. A. Lane, J. Hardy, and J. M. Schott, “Alzheimer’s disease,” *European Journal of Neurology*, vol. 25, no. 1, pp. 59–70, Jan. 2018, doi: 10.1111/ene.13439.
- [3] M. A. Deture and D. W. Dickson, “The neuropathological diagnosis of Alzheimer’s disease,” *Molecular Neurodegeneration*, vol. 14, no. 1. BioMed Central Ltd., pp. 1–18, Aug. 02, 2019, doi: 10.1186/s13024-019-0333-5.
- [4] A. Bejanin *et al.*, “Tau pathology and neurodegeneration contribute to cognitive impairment in Alzheimer’s disease,” *Brain*, vol. 140, no. 12, pp. 3286–3300, Dec. 2017, doi: 10.1093/brain/awx243.
- [5] W. Jagust, “Imaging the evolution and pathophysiology of Alzheimer disease HHS Public Access,” *Nat Rev Neurosci*, vol. 19, no. 11, pp. 687–700, 2018, doi: 10.1038/s41583-018-0067-3.
- [6] K. Y. Liu, A. E. Stringer, S. J. Reeves, and R. J. Howard, “The neurochemistry of agitation in Alzheimer’s disease: a systematic review,” *Ageing Research Reviews*, vol. 43. Elsevier Ireland Ltd, pp. 99–107, May 01, 2018, doi: 10.1016/j.arr.2018.03.003.

- [7] M. P. Murphy and H. Levine, "Alzheimer's disease and the amyloid- β peptide," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 19, no. 1. IOS Press, pp. 311–323, 2010, doi: 10.3233/JAD-2010-1221.
- [8] G. S. Bloom, "Amyloid- β and tau: The trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis," *JAMA Neurology*, vol. 71, no. 4, pp. 505–508, 2014, doi: 10.1001/jamaneurol.2013.5847.
- [9] R. Briggs, S. P. Kennelly, and D. O'Neill, "Drug treatments in Alzheimer's disease," *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London*, vol. 16, no. 3, pp. 247–253, Jun. 2016, doi: 10.7861/clinmedicine.16-3-247.
- [10] J. A. Hardy and G. A. Higgins, "Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis," *Science*, vol. 256, no. 5054. Science, pp. 184–185, 1992, doi: 10.1126/science.1566067.
- [11] R. Ricciarelli and E. Fedele, "The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind," *Current Neuropharmacology*, vol. 15, no. 6, p. 926, Aug. 2017, doi: 10.2174/1570159x15666170116143743.
- [12] J. A. Soria Lopez, H. M. González, and G. C. Léger, "Alzheimer's disease," in *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 167, Elsevier B.V., 2019, pp. 231–255.
- [13] X. Q. Chen and W. C. Mobley, "Alzheimer disease pathogenesis: Insights from molecular and cellular biology studies of oligomeric A β and tau species," *Frontiers in Neuroscience*, vol. 13, no. JUN. Frontiers Media S.A., p. 659, Jun. 21, 2019, doi: 10.3389/fnins.2019.00659.
- [14] M. Goedert and M. G. Spillantini, "A century of Alzheimer's disease," *Science*, vol. 314, no. 5800. Science, pp. 777–781, Nov. 03, 2006, doi: 10.1126/science.1132814.
- [15] L. A. Amos, "Why do brains need tau (MAPT)?," *FEBS Journal*, vol. 281, no. 21, pp. iv–v, Nov. 2014, doi: 10.1111/febs.13094.
- [16] N. Nanavaty, L. Lin, S. H. Hinckley, and J. Kuret, "Detection and quantification methods for fibrillar products of in vitro tau aggregation assays," in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1523, Humana Press Inc., 2017, pp. 101–111.
- [17] K. Iqbal, F. Liu, C.-X. Gong, and I. Grundke-Iqbal, "Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies," *Current Alzheimer Research*, vol. 7, no. 8, pp. 656–664, Dec. 2010, doi: 10.2174/156720510793611592.
- [18] A. D. C. Alonso, B. Li, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal, "Polymerization of hyperphosphorylated tau into filaments eliminates its inhibitory activity," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 23, pp. 8864–8869, Jun. 2006, doi: 10.1073/pnas.0603214103.
- [19] Y. Kitagishi, A. Nakanishi, Y. Ogura, and S. Matsuda, "Dietary regulation of PI3K/AKT/GSK-3 β pathway in Alzheimer's disease," *Alzheimer's Research and Therapy*, vol. 6, no. 3. BioMed Central Ltd., p. 35, Jun. 20, 2014, doi: 10.1186/alzrt265.
- [20] A. L. Howes *et al.*, "Akt-mediated cardiomyocyte survival pathways are compromised by Gq α -induced phosphoinositide 4,5-bisphosphate depletion," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 41, pp. 40343–40351, Oct. 2003, doi: 10.1074/jbc.M305964200.

- [21] V. Shukla, S. Skuntz, and H. C. Pant, "Deregulated Cdk5 Activity Is Involved in Inducing Alzheimer's Disease," *Archives of Medical Research*, vol. 43, no. 8. Arch Med Res, pp. 655–662, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.arcmed.2012.10.015.
- [22] A. D. C. Alonso, I. Grundke-Iqbal, H. S. Barra, and K. Iqbal, "Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: Sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 1, pp. 298–303, Jan. 1997, doi: 10.1073/pnas.94.1.298.
- [23] G. M. McKhann *et al.*, "The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease," *Alzheimer's and Dementia*, vol. 7, no. 3, pp. 263–269, 2011, doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.005.
- [24] J. C. Morris, "Early-stage and preclinical Alzheimer disease," in *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, Jul. 2005, vol. 19, no. 3, pp. 163–165, doi: 10.1097/01.wad.0000184005.22611.cc.
- [25] R. A. Sperling *et al.*, "Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease," *Alzheimer's and Dementia*, vol. 7, no. 3, pp. 280–292, 2011, doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.003.
- [26] R. A. Sperling *et al.*, "Amyloid-related imaging abnormalities in amyloid-modifying therapeutic trials: Recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup," *Alzheimer's and Dementia*, vol. 7, no. 4, pp. 367–385, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.jalz.2011.05.2351.
- [27] F. T. Hane, M. Robinson, B. Y. Lee, O. Bai, Z. Leonenko, and M. S. Albert, "Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 3: Diagnosis and Treatment," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 57, no. 3. IOS Press, pp. 645–665, 2017, doi: 10.3233/JAD-160907.
- [28] M. S. Albert *et al.*, "The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease," *Alzheimer's and Dementia*, vol. 7, no. 3, pp. 270–279, 2011, doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.008.
- [29] D. S. Knopman *et al.*, "Practice parameter: Diagnosis of dementia (an evidence-based review): Report of the quality standards subcommittee of the american academy of neurology," *Neurology*, vol. 56, no. 9, pp. 1143–1153, May 2001, doi: 10.1212/WNL.56.9.1143.
- [30] B. T. Hyman *et al.*, "National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease," *Alzheimer's and Dementia*, vol. 8, no. 1, pp. 1–13, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.jalz.2011.10.007.
- [31] D. R. Thal, U. Rüb, M. Orantes, and H. Braak, "Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD," *Neurology*, vol. 58, no. 12, pp. 1791–1800, Jun. 2002, doi: 10.1212/WNL.58.12.1791.

- [32] H. Braak and K. del Tredici, "The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty," *Acta Neuropathologica*, vol. 121, no. 2, pp. 171–181, Feb. 2011, doi: 10.1007/s00401-010-0789-4.
- [33] H. Braak and E. Braak, "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes," *Acta Neuropathologica*, vol. 82, no. 4. Springer-Verlag, pp. 239–259, Sep. 1991, doi: 10.1007/BF00308809.
- [34] S. S. Mirra *et al.*, "The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease," *Neurology*, vol. 41, no. 4, pp. 479–486, 1991, doi: 10.1212/wnl.41.4.479.
- [35] B. T. Hyman and J. Q. Trojanowski, "Editorial on consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer disease from the national institute on aging and the Reagan institute working group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer disease," *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 56, no. 10, pp. 1095–1097, 1997, doi: 10.1097/00005072-199710000-00002.
- [36] A. Atri, J. L. Molinuevo, O. Lemming, Y. Wirth, I. Pulte, and D. Wilkinson, "Memantine in patients with Alzheimer's disease receiving donepezil: New analyses of efficacy and safety for combination therapy," *Alzheimer's Research and Therapy*, vol. 5, no. 1, p. 6, 2013, doi: 10.1186/alzrt160.
- [37] S. D. Rountree, A. Atri, O. L. Lopez, and R. S. Doody, "Effectiveness of antidementia drugs in delaying Alzheimer's disease progression," *Alzheimer's and Dementia*, vol. 9, no. 3. Elsevier Inc., pp. 338–345, 2013, doi: 10.1016/j.jalz.2012.01.002.
- [38] A. Atri, "Current and Future Treatments in Alzheimer's Disease," *Seminars in Neurology*, vol. 39, no. 2, pp. 227–240, 2019, doi: 10.1055/s-0039-1678581.
- [39] R. Briggs, S. P. Kennelly, and D. O'Neill, "Drug treatments in Alzheimer's disease," *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London*, vol. 16, no. 3, pp. 247–253, Jun. 2016, doi: 10.7861/clinmedicine.16-3-247.
- [40] M. Vaz and S. Silvestre, "Alzheimer's disease: Recent treatment strategies," *European Journal of Pharmacology*, vol. 887. Elsevier B.V., p. 173554, Nov. 15, 2020, doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173554.
- [41] M. Timmers *et al.*, "Profiling the dynamics of CSF and plasma A β reduction after treatment with JNJ-54861911, a potent oral BACE inhibitor," *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, vol. 2, no. 3, pp. 202–212, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.trci.2016.08.001.
- [42] F. Panza *et al.*, "BACE inhibitors in clinical development for the treatment of Alzheimer's disease," *Expert Review of Neurotherapeutics*, vol. 18, no. 11. Taylor and Francis Ltd, pp. 847–857, Nov. 02, 2018, doi: 10.1080/14737175.2018.1531706.
- [43] M. E. Kennedy *et al.*, "The BACE1 inhibitor verubecestat (MK-8931) reduces CNS β -Amyloid in animal models and in Alzheimer's disease patients," *Science Translational Medicine*, vol. 8, no. 363, pp. 363ra150-363ra150, Nov. 2016, doi: 10.1126/scitranslmed.aad9704.

- [44] G. Cebers *et al.*, “AZD3293: Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects in healthy subjects and patients with Alzheimer’s disease,” *Journal of Alzheimer’s Disease*, vol. 55, no. 3, pp. 1039–1053, Jan. 2017, doi: 10.3233/JAD-160701.
- [45] R. S. Doody *et al.*, “A Phase 3 Trial of Semagacestat for Treatment of Alzheimer’s Disease,” *New England Journal of Medicine*, vol. 369, no. 4, pp. 341–350, Jul. 2013, doi: 10.1056/nejmoa1210951.
- [46] V. Coric *et al.*, “Targeting prodromal Alzheimer disease with avagacestat: A randomized clinical trial,” *JAMA Neurology*, vol. 72, no. 11, pp. 1324–1333, Nov. 2015, doi: 10.1001/jamaneurol.2015.0607.
- [47] R. C. Green *et al.*, “Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: A randomized controlled trial,” *JAMA - Journal of the American Medical Association*, vol. 302, no. 23, pp. 2557–2564, Dec. 2009, doi: 10.1001/jama.2009.1866.
- [48] M. S. Rafii *et al.*, “A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase II Study of Oral ELND005 (scyllo -Inositol) in Young Adults with Down Syndrome without Dementia,” *Journal of Alzheimer’s Disease*, vol. 58, no. 2, pp. 401–411, Jan. 2017, doi: 10.3233/JAD-160965.
- [49] S. Abushakra *et al.*, “Clinical Effects of Tramiprosate in APOE4/4 Homozygous Patients with Mild Alzheimer’s Disease Suggest Disease Modification Potential,” *The journal of prevention of Alzheimer’s disease*, vol. 4, no. 3, pp. 149–156, 2017, doi: 10.14283/jpad.2017.26.
- [50] S. Abushakra *et al.*, “Clinical Benefits of Tramiprosate in Alzheimer’s Disease Are Associated with Higher Number of APOE4 Alleles: The ‘APOE4 Gene-Dose Effect’.”, *The journal of prevention of Alzheimer’s disease*, vol. 3, no. 4, pp. 219–228, 2016, doi: 10.14283/jpad.2016.115.
- [51] J. A. Hey *et al.*, “Clinical Pharmacokinetics and Safety of ALZ-801, a Novel Prodrug of Tramiprosate in Development for the Treatment of Alzheimer’s Disease,” *Clinical Pharmacokinetics*, vol. 57, no. 3, pp. 315–333, Mar. 2018, doi: 10.1007/s40262-017-0608-3.
- [52] C. Carmassi, C. del Grande, C. Gesi, L. Musetti, and L. Dell’Osso, “A new look at an old drug: neuroprotective effects and therapeutic potentials of lithium salts,” *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, vol. Volume 12, pp. 1687–1703, Jul. 2016, doi: 10.2147/NDT.S106479.
- [53] C. M. Wischik, P. C. Edwards, R. Y. K. Lai, M. Roth, and C. R. Harrington, “Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 20, pp. 11213–11218, Oct. 1996, doi: 10.1073/pnas.93.20.11213.
- [54] C. M. Wischik *et al.*, “Tau aggregation inhibitor therapy: An exploratory phase 2 study in mild or moderate Alzheimer’s disease,” *Journal of Alzheimer’s Disease*, vol. 44, no. 2, pp. 705–720, Jan. 2015, doi: 10.3233/JAD-142874.
- [55] T. C. Baddeley *et al.*, “Complex disposition of methylthioninium redox forms determines efficacy in tau aggregation inhibitor therapy for Alzheimer’s disease,” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 352, no. 1, pp. 110–118, Jan. 2015, doi: 10.1124/jpet.114.219352.

- [56] “Study to Evaluate the Safety, Tolerability and the Effect of BMS-241027 on Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Subjects With Mild Alzheimer’s Disease - Full Text View - ClinicalTrials.gov.” <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01492374> (accessed Jan. 18, 2021).
- [57] B. H. Morimoto, D. Schmechel, J. Hirman, A. Blackwell, J. Keith, and M. Gold, “A Double-Blind, Placebo-Controlled, Ascending-Dose, Randomized Study to Evaluate the Safety, Tolerability and Effects on Cognition of AL-108 after 12 Weeks of Intranasal Administration in Subjects with Mild Cognitive Impairment,” *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, vol. 35, no. 5–6, pp. 325–339, May 2013, doi: 10.1159/000348347.
- [58] A. Bittar, N. Bhatt, and R. Kaye, “Advances and considerations in AD tau-targeted immunotherapy,” *Neurobiology of Disease*, vol. 134. Academic Press Inc., p. 104707, Feb. 01, 2020, doi: 10.1016/j.nbd.2019.104707.
- [59] “Phase 2 Study of BIIB092 in Participants With Early Alzheimer’s Disease - Full Text View - ClinicalTrials.gov.” <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03352557> (accessed Jan. 18, 2021).
- [60] “A Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Semorinemab in Patients With Prodromal to Mild Alzheimer’s Disease - Full Text View - ClinicalTrials.gov.” <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03289143> (accessed Jan. 18, 2021).
- [61] “A Study of Semorinemab in Patients With Moderate Alzheimer’s Disease - Full Text View - ClinicalTrials.gov.” <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03828747> (accessed Jan. 18, 2021).
- [62] “A Study of LY3303560 in Participants With Early Symptomatic Alzheimer’s Disease - Full Text View - ClinicalTrials.gov.” <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03518073> (accessed Jan. 18, 2021).
- [63] J. Jacob *et al.*, “Membrane estrogen receptors: Genomic actions and post transcriptional regulation,” *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 246, no. 1–2, pp. 34–41, Feb. 2006, doi: 10.1016/j.mce.2005.11.015.
- [64] S. R. Wilkenfeld, C. Lin, and D. E. Frigo, “Communication between genomic and non-genomic signaling events coordinate steroid hormone actions,” *Steroids*, vol. 133, pp. 2–7, May 2018, doi: 10.1016/j.steroids.2017.11.005.
- [65] D. S. Reddy, “Neurosteroids. Endogenous role in the human brain and therapeutic potentials,” in *Progress in Brain Research*, vol. 186, no. C, Elsevier B.V., 2010, pp. 113–137.
- [66] M. Vallée, W. Mayo, and M. le Moal, “Role of pregnenolone, dehydroepiandrosterone and their sulfate esters on learning and memory in cognitive aging,” in *Brain Research Reviews*, 2001, vol. 37, no. 1–3, pp. 301–312, doi: 10.1016/S0165-0173(01)00135-7.
- [67] W. L. Miller and R. J. Auchus, “The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders,” *Endocrine Reviews*, vol. 32, no. 1, pp. 81–151, Feb. 2011, doi: 10.1210/er.2010-0013.
- [68] A. K. Agarwal and R. J. Auchus, “Minireview: Cellular redox state regulates hydroxysteroid dehydrogenase activity and intracellular hormone potency,” *Endocrinology*, vol. 146, no. 6. Endocrinology, pp. 2531–2538, Jun. 2005, doi: 10.1210/en.2005-0061.

- [69] H. S. Bose, R. M. Whittal, M. A. Baldwin, and W. L. Miller, "The active form of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR, appears to be a molten globule," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 13, pp. 7250–7255, Jun. 1999, doi: 10.1073/pnas.96.13.7250.
- [70] J. Repalli, "Translocator Protein (TSPO) Role in Aging and Alzheimer's Disease," *Current Aging Science*, vol. 7, no. 3, pp. 168–175, Dec. 2014, doi: 10.2174/1874609808666141210103146.
- [71] J. Liu, M. B. Rone, and V. Papadopoulos, "Protein-Protein Interactions Mediate Mitochondrial Cholesterol Transport and Steroid Biosynthesis *," 2006, doi: 10.1074/jbc.M608820200.
- [72] M. E. John, M. C. John, V. Boggaram, E. R. Simpson, and M. R. Waterman, "Transcriptional regulation of steroid hydroxylase genes by corticotropin," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 83, no. 13, pp. 4715–4719, 1986, doi: 10.1073/pnas.83.13.4715.
- [73] S. H. Mellon and C. Vaisse, "cAMP regulates P450sc gene expression by a cycloheximide-insensitive mechanism in cultured mouse Leydig MA-10 cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 86, no. 20, pp. 7775–7779, 1989, doi: 10.1073/pnas.86.20.7775.
- [74] P. Q. Barrett *et al.*, "Role of calcium in angiotensin II-mediated aldosterone secretion," *Endocrine Reviews*, vol. 10, no. 4, pp. 496–518, 1989, doi: 10.1210/edrv-10-4-496.
- [75] C. C. Moore, S. T. Brentano, and W. L. Miller, "Human P450sc gene transcription is induced by cyclic AMP and repressed by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and A23187 through independent cis elements.," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 10, no. 11, pp. 6013–6023, Nov. 1990, doi: 10.1128/mcb.10.11.6013.
- [76] E. E. Baulieu, "Neurosteroids: A novel function of the brain," in *Psychoneuroendocrinology*, Nov. 1998, vol. 23, no. 8, pp. 963–987, doi: 10.1016/S0306-4530(98)00071-7.
- [77] R. J. Auchus, T. C. Lee, and W. L. Miller, "Cytochrome b5 augments the 17,20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 6, pp. 3158–3165, Feb. 1998, doi: 10.1074/jbc.273.6.3158.
- [78] M. C. Lorence, B. A. Murry, J. M. Trant, and J. I. Mason, "Human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5 \rightarrow 4 isomerase from placenta: Expression in nonsteroidogenic cells of a protein that catalyzes the dehydrogenation/isomerization of c21 and c19 steroids," *Endocrinology*, vol. 126, no. 5, pp. 2493–2498, 1990, doi: 10.1210/endo-126-5-2493.
- [79] J. Simard, M. L. Ricketts, S. Gingras, P. Soucy, F. A. Feltus, and M. H. Melner, "Molecular biology of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase gene family," *Endocrine Reviews*, vol. 26, no. 4, Endocr Rev, pp. 525–582, Jun. 2005, doi: 10.1210/er.2002-0050.
- [80] M. C. Lorence, C. J. Corbin, N. Kamimura, M. S. Mahendroo, and J. I. Mason, "Structural analysis of the gene encoding human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4-

Isomerase,” *Molecular Endocrinology*, vol. 4, no. 12, pp. 1850–1855, 1990, doi: 10.1210/mend-4-12-1850.

[81] E. Rhéaume *et al.*, “Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta 5$ - $\Delta 4$ -isomerase in Human adrenals and gonads,” *Molecular Endocrinology*, vol. 5, no. 8, pp. 1147–1157, Aug. 1991, doi: 10.1210/mend-5-8-1147.

[82] K. Nishimoto *et al.*, “Adrenocortical zonation in humans under normal and pathological conditions,” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 95, no. 5, pp. 2296–2305, 2010, doi: 10.1210/jc.2009-2010.

[83] T. Kawamoto *et al.*, “Role of steroid 11β -hydroxylase and steroid 18 -hydroxylase in the biosynthesis of glucocorticoids and mineralocorticoids in humans,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 4, pp. 1458–1462, 1992, doi: 10.1073/pnas.89.4.1458.

[84] K. M. Curnow *et al.*, “The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex,” *Molecular Endocrinology*, vol. 5, no. 10, pp. 1513–1522, 1991, doi: 10.1210/mend-5-10-1513.

[85] E. R. Simpson *et al.*, “Aromatase cytochrome p450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis,” *Endocrine Reviews*, vol. 15, no. 3, pp. 342–355, 1994, doi: 10.1210/edrv-15-3-342.

[86] C. N. Falany, “Enzymology of human cytosolic sulfotransferases,” *The FASEB Journal*, vol. 11, no. 4, pp. 206–216, Mar. 1997, doi: 10.1096/fasebj.11.4.9068609.

[87] C. A. Strott, “Sulfonation and molecular action,” *Endocrine Reviews*, vol. 23, no. 5, pp. 703–732, Oct. 2002, doi: 10.1210/er.2001-0040.

[88] C. Corpechot, P. Robel, M. Axelson, J. Sjövall, and E. E. Baulieu, “Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 78, no. 8 I, pp. 4704–4707, 1981, doi: 10.1073/pnas.78.8.4704.

[89] C. Corpéchet *et al.*, “Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain,” *Brain Research*, vol. 270, no. 1, pp. 119–125, Jun. 1983, doi: 10.1016/0006-8993(83)90797-7.

[90] T. Inoue *et al.*, “Progesterone production and actions in the human central nervous system and neurogenic tumors,” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 87, no. 11, pp. 5325–5331, Nov. 2002, doi: 10.1210/jc.2002-012096.

[91] A. Furukawa, A. Miyatake, T. Ohnishi, and Y. Ichikawa, “Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous: System: Colocalization of StAR, cytochrome P-450(SCC) (CYP XIA1), and 3β -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain,” *Journal of Neurochemistry*, vol. 71, no. 6, pp. 2231–2238, 1998, doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.71062231.x.

[92] Y. Hojo *et al.*, “Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 α and P450 aromatase localized in neurons,” *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, vol. 101, no. 3, pp. 865–870, Jan. 2004, doi: 10.1073/pnas.2630225100.

[93] M. Shimada *et al.*, “Identification of ST2A1 as a rat brain neurosteroid sulfotransferase mRNA,” *Brain Research*, vol. 920, no. 1–2, pp. 222–225, Nov. 2001, doi: 10.1016/S0006-8993(01)03061-X.

[94] R. C. Agís-Balboa *et al.*, “Characterization of brain neurons that express enzymes mediating neurosteroid biosynthesis,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 39, pp. 14602–14607, Sep. 2006, doi: 10.1073/pnas.0606544103.

[95] B. Stoffel-Wagner *et al.*, “Allopregnanolone serum levels and expression of 5 α -reductase and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms in hippocampal and temporal cortex of patients with epilepsy,” *Epilepsy Research*, vol. 54, no. 1, pp. 11–19, Apr. 2003, doi: 10.1016/S0920-1211(03)00036-6.

[96] B. Stoffel-Wagner, “Neurosteroid metabolism in the human brain,” *European Journal of Endocrinology*, vol. 145, no. 6. BioScientifica Ltd., pp. 669–679, 2001, doi: 10.1530/eje.o.1450669.

[97] S. H. Mellon and W. L. Miller, “Extraadrenal steroid 21-hydroxylation is not mediated by P450c21,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 84, no. 5, pp. 1497–1502, 1989, doi: 10.1172/JCI114325.

[98] M. L. Casey, C. A. Winkel, and Paul C. MacDonald, “Conversion of progesterone to deoxycorticosterone in the human fetus: Steroid 21-hydroxylase activity in fetal tissues,” *Journal of Steroid Biochemistry*, vol. 18, no. 4, pp. 449–452, 1983, doi: 10.1016/0022-4731(83)90064-X.

[99] R. R *et al.*, “Progesterone receptor-mediated effects of neuroactive steroids,” *Neuron*, vol. 11, no. 3, 1993, doi: 10.1016/0896-6273(93)90156-L.

[100] D. S. Reddy, “Pharmacology of endogenous neuroactive steroids,” *Critical Reviews in Neurobiology*, vol. 15, no. 3–4. Crit Rev Neurobiol, pp. 197–234, 2003, doi: 10.1615/CritRevNeurobiol.v15.i34.20.

[101] M. MD, “Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance,” *Progress in neurobiology*, vol. 38, no. 4, 1992, doi: 10.1016/0301-0082(92)90025-A.

[102] A. M. Hosie, M. E. Wilkins, and T. G. Smart, “Neurosteroid binding sites on GABAA receptors,” *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 116, no. 1. Pergamon, pp. 7–19, Oct. 01, 2007, doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.03.011.

[103] A. M. Hosie, L. Clarke, H. da Silva, and T. G. Smart, “Conserved site for neurosteroid modulation of GABAA receptors,” *Neuropharmacology*, vol. 56, no. 1, pp. 149–154, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.07.050.

[104] C. Wang, C. E. Marx, A. L. Morrow, W. A. Wilson, and S. D. Moore, “Neurosteroid modulation of GABAergic neurotransmission in the central amygdala: A role for NMDA

receptors,” *Neuroscience Letters*, vol. 415, no. 2, pp. 118–123, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.neulet.2007.01.004.

[105] R. A. J. McIlhinney, E. Molnár, J. R. Atack, and P. J. Whiting, “Cell surface expression of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1a requires the co-expression of the NR2A subunit in transfected cells,” *Neuroscience*, vol. 70, no. 4, pp. 989–997, Feb. 1996, doi: 10.1016/0306-4522(95)00419-X.

[106] A. Malayev, T. T. Gibbs, and D. H. Farb, “Inhibition of the NMDA response by pregnenolone sulphate reveals subtype selective modulation of NMDA receptors by sulphated steroids,” *British Journal of Pharmacology*, vol. 135, no. 4, pp. 901–909, 2002, doi: 10.1038/sj.bjp.0704543.

[107] F. S. Wu, T. T. Gibbs, and D. H. Farb, “Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor.,” *Molecular Pharmacology*, vol. 40, no. 3, 1991, Accessed: Jan. 26, 2021. [Online].

[108] T. Maurice, F. J. Roman, and A. Privat, “Modulation by neurosteroids of the in vivo (+)-[3H]SKF-10,047 binding to σ_1 receptors in the mouse forebrain,” *Journal of Neuroscience Research*, vol. 46, no. 6, pp. 734–743, 1996, doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19961215)46:6<734::AID-JNR10>3.0.CO;2-U.

[109] T. P. Su, E. D. London, and J. H. Jaffe, “Steroid binding at σ receptors suggests a link between endocrine, nervous, and immune systems,” *Science*, vol. 240, no. 4849, pp. 219–221, 1988, doi: 10.1126/science.2832949.

[110] P. Zheng, “Neuroactive steroid regulation of neurotransmitter release in the CNS: Action, mechanism and possible significance,” *Progress in Neurobiology*, vol. 89, no. 2. Prog Neurobiol, pp. 134–152, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.07.001.

[111] M. Carta, L. D. Partridge, D. D. Savage, and C. F. Valenzuela, “Neurosteroid modulation of glutamate release in hippocampal neurons: Lack of an effect of a chronic prenatal ethanol exposure paradigm,” *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, vol. 27, no. 7, pp. 1194–1198, Jul. 2003, doi: 10.1097/01.ALC.0000075828.50697.70.

[112] M. Mameli, M. Carta, L. D. Partridge, and C. F. Valenzuela, “Neurosteroid-induced plasticity of immature synapses via retrograde modulation of presynaptic NMDA receptors,” *Journal of Neuroscience*, vol. 25, no. 9, pp. 2285–2294, Mar. 2005, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3877-04.2005.

[113] D. A. Meyer, M. Carta, L. D. Partridge, D. F. Covey, and C. F. Valenzuela, “Neurosteroids enhance spontaneous glutamate release in hippocampal neurons. Possible role of metabotropic sigma1-like receptors.,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 32, pp. 28725–28732, 2002, doi: 10.1074/jbc.M202592200.

[114] L. Chen and M. Sokabe, “Presynaptic modulation of synaptic transmission by pregnenolone sulfate as studied by optical recordings,” *Journal of Neurophysiology*, vol. 94, no. 6, pp. 4131–4144, Dec. 2005, doi: 10.1152/jn.00755.2004.

[115] Y. Dong, Y. M. Fu, J. L. Sun, Y. H. Zhu, F. Y. Sun, and P. Zheng, “Neurosteroid enhances glutamate release in rat prelimbic cortex via activation of α_1 -adrenergic and σ_1 receptors,”

Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 62, no. 9, pp. 1003–1014, May 2005, doi: 10.1007/s00018-005-5004-8.

[116] A. R. Schiess and L. D. Partridge, “Pregnenolone sulfate acts through a G-protein-coupled σ_1 -like receptor to enhance short term facilitation in adult hippocampal neurons,” *European Journal of Pharmacology*, vol. 518, no. 1, pp. 22–29, Jul. 2005, doi: 10.1016/j.ejphar.2005.06.007.

[117] L. D. Partridge and C. F. Valenzuela, “Neurosteroid-induced enhancement of glutamate transmission in rat hippocampal slices,” *Neuroscience Letters*, vol. 301, no. 2, pp. 103–106, Mar. 2001, doi: 10.1016/S0304-3940(01)01613-5.

[118] M. J. Thomas, M. Mameli, M. Carta, C. F. Valenzuela, P. K. Li, and L. D. Partridge, “Neurosteroid paradoxical enhancement of paired-pulse inhibition through paired-pulse facilitation of inhibitory circuits in dentate granule cells,” *Neuropharmacology*, vol. 48, no. 4, pp. 584–596, 2005, doi: 10.1016/j.neuropharm.2004.11.014.

[119] A. R. B. Schiess, C. S. Scullin, and L. D. Partridge, “Neurosteroid-induced enhancement of short-term facilitation involves a component downstream from presynaptic calcium in hippocampal slices,” *Journal of Physiology*, vol. 576, no. 3, pp. 833–847, Nov. 2006, doi: 10.1113/jphysiol.2006.118505.

[120] J. L. Sun, Y. L. Dong, Y. M. Fu, Y. H. Zhu, Y. Dong, and P. Zheng, “Neurosteroid pregnenolone sulfate inhibits stimulus-evoked EPSC via presynaptic inhibition of protein kinase A in rat prelimbic cortical neurons,” *Neuropharmacology*, vol. 49, no. 3, pp. 389–399, Sep. 2005, doi: 10.1016/j.neuropharm.2005.03.022.

[121] A. Teschemacher, S. Kasparov, E. A. Kravitz, and R. Rahamimoff, “Presynaptic action of the neurosteroid pregnenolone sulfate on inhibitory transmitter release in cultured hippocampal neurons,” *Brain Research*, vol. 772, no. 1–2, pp. 226–232, Oct. 1997, doi: 10.1016/S0006-8993(97)00872-X.

[122] M. Vallée *et al.*, “Neurosteroids: Deficient cognitive performance in aged rats depends on low pregnenolone sulfate levels in the hippocampus,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 26, pp. 14865–14870, Dec. 1997, doi: 10.1073/pnas.94.26.14865.

[123] M. Darnaudéry, M. Koehl, P. V. Piazza, M. le Moal, and W. Mayo, “Pregnenolone sulfate increases hippocampal acetylcholine release and spatial recognition,” *Brain Research*, vol. 852, no. 1, pp. 173–179, Jan. 2000, doi: 10.1016/S0006-8993(99)01964-2.

[124] M. Darnaudéry, M. Pallarès, P. V. Piazza, M. le Moal, and W. Mayo, “The neurosteroid pregnenolone sulfate infused into the medial septum nucleus increases hippocampal acetylcholine and spatial memory in rats,” *Brain Research*, vol. 951, no. 2, pp. 237–242, Oct. 2002, doi: 10.1016/S0006-8993(02)03166-9.

[125] M. Darnaudéry, M. Koehl, M. Pallarès, M. le Moal, and W. Mayo, “The neurosteroid pregnenolone sulfate increases cortical acetylcholine release: A microdialysis study in freely moving rats,” *Journal of Neurochemistry*, vol. 71, no. 5, pp. 2018–2022, 1998, doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.71052018.x.

- [126] M. Verhage *et al.*, “Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion,” *Science*, vol. 287, no. 5454, pp. 864–869, Feb. 2000, doi: 10.1126/science.287.5454.864.
- [127] P. A. Zamudio-Bulcock and C. F. Valenzuela, “Pregnenolone sulfate increases glutamate release at neonatal climbing fiber-to-Purkinje cell synapses,” *Neuroscience*, vol. 175, pp. 24–36, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.11.063.
- [128] H. Y. Wang, D. H. S. Lee, M. R. D’Andrea, P. A. Peterson, R. P. Shank, and A. B. Reitz, “ β -Amyloid₁₋₄₂ binds to $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer’s disease pathology,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 8, pp. 5626–5632, Feb. 2000, doi: 10.1074/jbc.275.8.5626.
- [129] G. W. Arendash, G. J. Sengstock, P. R. Sanberg, and W. R. Kem, “Improved learning and memory in aged rats with chronic administration of the nicotinic receptor agonist GTS-21,” *Brain Research*, vol. 674, no. 2, pp. 252–259, Mar. 1995, doi: 10.1016/0006-8993(94)01449-R.
- [130] Z. Mtchedlishvili and J. Kapur, “A presynaptic action of the neurosteroid pregnenolone sulfate on GABAergic synaptic transmission,” *Molecular Pharmacology*, vol. 64, no. 4, pp. 857–864, Oct. 2003, doi: 10.1124/mol.64.4.857.
- [131] T. S. Otis, K. J. Staley, and I. Mody, “Perpetual inhibitory activity in mammalian brain slices generated by spontaneous GABA release,” *Brain Research*, vol. 545, no. 1–2, pp. 142–150, Apr. 1991, doi: 10.1016/0006-8993(91)91280-E.
- [132] G. Carlson, Y. Wang, and B. E. Alger, “Endocannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus,” *Nature Neuroscience*, vol. 5, no. 8, pp. 723–724, 2002, doi: 10.1038/nn879.
- [133] T. Maurice, M. Strehaiano, F. Duhr, and N. Chevallier, “Amyloid toxicity is enhanced after pharmacological or genetic invalidation of the $\sigma 1$ receptor,” *Behavioural Brain Research*, vol. 339, pp. 1–10, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.bbr.2017.11.010.
- [134] M. D. Majewska, M. T. Bluet-Pajot, P. Robel, and E. E. Baulieu, “Pregnenolone sulfate antagonizes barbiturate-induced hypnosis,” *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, vol. 33, no. 3, pp. 701–703, 1989, doi: 10.1016/0091-3057(89)90410-3.
- [135] M. H. Ratner, V. Kumaresan, and D. H. Farb, “Neurosteroid Actions in Memory and Neurologic/Neuropsychiatric Disorders.,” *Frontiers in endocrinology*, vol. 10, no. APR, p. 169, 2019, doi: 10.3389/fendo.2019.00169.
- [136] G. Akk, J. Bracamontes, and J. H. Steinbach, “Pregnenolone sulfate block of GABAA receptors: Mechanism and involvement of a residue in the M2 region of the α subunit,” *Journal of Physiology*, vol. 532, no. 3, pp. 673–684, May 2001, doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.0673e.x.
- [137] J. M. Mienville and S. Vicini, “Pregnenolone sulfate antagonizes GABAA receptor-mediated currents via a reduction of channel opening frequency,” *Brain Research*, vol. 489, no. 1, pp. 190–194, Jun. 1989, doi: 10.1016/0006-8993(89)90024-3.
- [138] M. R. Bowlby, “Pregnenolone sulfate potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor channels in hippocampal neurons.,” *Molecular Pharmacology*, vol. 43, no. 5, 1993, Accessed: Jan. 29, 2021. [Online].

- [139] R. P. Irwin, S. Z. Lin, M. A. Rogawski, R. H. Purdy, and S. M. Paul, "Steroid potentiation and inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated intracellular Ca⁺⁺ responses: structure-activity studies.," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 271, no. 2, 1994, Accessed: Jan. 29, 2021. [Online].
- [140] G. L. Collingridge, S. J. Kehl, and H. McLennan, "Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus.," *The Journal of Physiology*, vol. 334, no. 1, pp. 33–46, Jan. 1983, doi: 10.1113/jphysiol.1983.sp014478.
- [141] S. F. Traynelis *et al.*, "Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function," *Pharmacological Reviews*, vol. 62, no. 3. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, pp. 405–496, Sep. 2010, doi: 10.1124/pr.109.002451.
- [142] L. N. Gui, K. Inenaga, T. Nagatomo, and H. Yamashita, "Sodium nitroprusside modulates NMDA response in the rat supraoptic neurons in vitro," *Brain Research Bulletin*, vol. 35, no. 3, pp. 253–260, 1994, doi: 10.1016/0361-9230(94)90131-7.
- [143] F. Asztely, H. Wigström, and B. Gustafsson, "The Relative Contribution of NMDA Receptor Channels in the Expression of Long-term Potentiation in the Hippocampal CA1 Region," *European Journal of Neuroscience*, vol. 4, no. 8, pp. 681–690, 1992, doi: 10.1111/j.1460-9568.1992.tb00177.x.
- [144] Z. I. Bashir, S. Alford, S. N. Davies, A. D. Randall, and G. L. Collingridge, "Long-term potentiation of NMDA receptor-mediated synaptic transmission in the hippocampus," *Nature*, vol. 349, no. 6305, pp. 156–158, 1991, doi: 10.1038/349156a0.
- [145] R. G. M. Morris, E. Anderson, G. S. Lynch, and M. Baudry, "Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5," *Nature*, vol. 319, no. 6056, pp. 774–776, 1986, doi: 10.1038/319774a0.
- [146] J. Sabeti, T. E. Nelson, R. H. Purdy, and D. L. Gruol, "Steroid pregnenolone sulfate enhances NMDA-receptor-independent long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses: Role for L-type calcium channels and sigma-receptors," *Hippocampus*, vol. 17, no. 5, pp. 349–369, 2007, doi: 10.1002/hipo.20273.
- [147] L. Chen, Y. Miyamoto, K. Furuya, N. Mori, and M. Sokabe, "PREGS induces LTP in the hippocampal dentate gyrus of adult rats via the tyrosine phosphorylation international cooperative research CREB signaling," *Journal of Neurophysiology*, vol. 98, no. 3, pp. 1538–1548, 2007, doi: 10.1152/jn.01151.2006.
- [148] A. Sliwinski, F. P. Monnet, M. Schumacher, and M. P. Morin-Surun, "Pregnenolone sulfate enhances long-term potentiation in CA1 in rat hippocampus slices through the modulation of N-methyl-D-aspartate receptors," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 78, no. 5, pp. 691–701, Dec. 2004, doi: 10.1002/jnr.20332.
- [149] M. Vallée *et al.*, "Pregnenolone can protect the brain from cannabis intoxication," *Science*, vol. 343, no. 6166, pp. 94–98, 2014, doi: 10.1126/science.1243985.
- [150] W. Wang *et al.*, "Atypical Endocannabinoid Signaling Initiates a New Form of Memory-Related Plasticity at a Cortical Input to Hippocampus," *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, vol. 28, no. 7, pp. 2253–2266, Jul. 2018, doi: 10.1093/cercor/bhx126.

- [151] M. Daniels, "THE ROLE OF MICROTUBULES IN THE GROWTH AND STABILIZATION OF NERVE FIBERS," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 253, no. 1, pp. 535–544, 1975, doi: 10.1111/j.1749-6632.1975.tb19227.x.
- [152] K. M. Yamada, B. S. Spooner, and N. K. Wessells, "Axon growth: roles of microfilaments and microtubules.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 66, no. 4, pp. 1206–1212, 1970, doi: 10.1073/pnas.66.4.1206.
- [153] R. D. Sloboda and L. M. Belfi, "Purification of tubulin and microtubule-associated proteins by membrane ion-exchange chromatography," *Protein Expression and Purification*, vol. 13, no. 2, pp. 205–209, 1998, doi: 10.1006/prep.1998.0902.
- [154] M. L. Shelanski, F. Gaskin, and C. R. Cantor, "Microtubule assembly in the absence of added nucleotides.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 70, no. 3, pp. 765–768, 1973, doi: 10.1073/pnas.70.3.765.
- [155] R. P. Tucker, "The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review," *Brain Research Reviews*, vol. 15, no. 2. Brain Res Brain Res Rev, pp. 101–120, 1990, doi: 10.1016/0165-0173(90)90013-E.
- [156] A. Matus, "Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology.," *Annual review of neuroscience*, vol. 11. Annu Rev Neurosci, pp. 29–44, 1988, doi: 10.1146/annurev.ne.11.030188.000333.
- [157] K. Murakami, A. Fellous, E. E. Baulieu, and P. Robel, "Pregnenolone binds to microtubule-associated protein 2 and stimulates microtubule assembly," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 7, pp. 3579–3584, Mar. 2000, doi: 10.1073/pnas.97.7.3579.
- [158] J. H. Weng *et al.*, "Pregnenolone activates CLIP-170 to promote microtubule growth and cell migration," *Nature Chemical Biology*, vol. 9, no. 10, pp. 636–642, Oct. 2013, doi: 10.1038/nchembio.1321.
- [159] S. J. Nuwayhid and L. L. Werling, "Steroids modulate N-methyl-D-aspartate-stimulated [3H]dopamine release from rat striatum via σ receptors," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 306, no. 3, pp. 934–940, Sep. 2003, doi: 10.1124/jpet.103.052324.
- [160] E. Gursoy, A. Cardounel, and M. Kalimi, "Pregnenolone protects mouse hippocampal (HT-22) cells against glutamate and amyloid beta protein toxicity," *Neurochemical Research*, vol. 26, no. 1, pp. 15–21, 2001, doi: 10.1023/A:1007668213330.
- [161] P. Akan, S. Kizildag, M. Ormen, S. Genc, M. A. Öktem, and M. Fadiloglu, "Pregnenolone protects the PC-12 cell line against amyloid beta peptide toxicity but its sulfate ester does not," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 177, no. 1, pp. 65–70, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.cbi.2008.09.016.
- [162] F. el Bitar *et al.*, "Neuroprotection by the synthetic neurosteroid enantiomers ent-PREGS and ent-DHEAS against A β 25–35 peptide-induced toxicity in vitro and in vivo in mice," *Psychopharmacology*, vol. 231, no. 17, pp. 3293–3312, Sep. 2014, doi: 10.1007/s00213-014-3435-3.

- [163] F. Yasuno *et al.*, “Increased Binding of Peripheral Benzodiazepine Receptor in Alzheimer’s Disease Measured by Positron Emission Tomography with [11C]DAA1106,” *Biological Psychiatry*, vol. 64, no. 10, pp. 835–841, Nov. 2008, doi: 10.1016/j.biopsych.2008.04.021.
- [164] I. Lejri *et al.*, “TSPO Ligands Boost Mitochondrial Function and Pregnenolone Synthesis,” *Journal of Alzheimer’s Disease*, vol. 72, no. 4, pp. 1045–1058, 2019, doi: 10.3233/JAD-190127.
- [165] W. Mayo *et al.*, “Infusion of neurosteroids into the nucleus basalis magnocellularis affects cognitive processes in the rat,” *Brain Research*, vol. 607, no. 1–2, pp. 324–328, Apr. 1993, doi: 10.1016/0006-8993(93)91524-V.
- [166] J. F. Flood, J. E. Morley, and E. Roberts, “Memory-enhancing effects in male mice of pregnenolone and steroids metabolically derived from it,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 5, pp. 1567–1571, 1992, doi: 10.1073/pnas.89.5.1567.
- [167] J. F. Flood, J. E. Morley, and E. Roberts, “Pregnenolone sulfate enhances post-training memory processes when injected in very low doses into limbic system structures: The amygdala is by far the most sensitive,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 23, pp. 10806–10810, Nov. 1995, doi: 10.1073/pnas.92.23.10806.
- [168] D. S. Reddy and S. K. Kulkarni, “The effects of neurosteroids on acquisition and retention of a modified passive-avoidance learning task in mice,” *Brain Research*, vol. 791, no. 1–2, pp. 108–116, Apr. 1998, doi: 10.1016/S0006-8993(98)00085-7.
- [169] T. Maurice, T. P. Su, and A. Privat, “Sigma1 (σ_1) receptor agonists and neurosteroids attenuate b25-35-amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism,” *Neuroscience*, vol. 83, no. 2, pp. 413–428, 1998, doi: 10.1016/S0306-4522(97)00405-3.
- [170] L. Chen, R. Yang, L. Chen, H. Wang, B. Xu, and H. Tomimoto, “Anti-amnesic effect of neurosteroid PREGS in A β 25-35- injected mice through σ_1 receptor- and α_7 nAChR-mediated neuroprotection,” *Neuropharmacology*, vol. 63, no. 6, pp. 1042–1050, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.07.035.
- [171] S. Liu *et al.*, “Metabolic alteration of neuroactive steroids and protective effect of progesterone in Alzheimer’s disease-like rats,” *Neural Regeneration Research*, vol. 8, no. 30, pp. 2800–2810, Oct. 2013, doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.30.002.
- [172] L. A. Glantz and D. A. Lewis, “Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia,” *Archives of General Psychiatry*, vol. 57, no. 1, pp. 65–73, 2000, doi: 10.1001/archpsyc.57.1.65.
- [173] C. E. Marx *et al.*, “Olanzapine and fluoxetine administration and coadministration increase rat hippocampal pregnenolone, allopregnanolone and peripheral deoxycorticosterone: Implications for therapeutic actions,” *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 84, no. 4, pp. 609–617, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.pbb.2006.07.032.
- [174] S. Weill-Engerer *et al.*, “Neurosteroid quantification in human brain regions: Comparison between alzheimer’s and nondemented patients,” *Journal of Clinical*

Endocrinology and Metabolism, vol. 87, no. 11, pp. 5138–5143, Nov. 2002, doi: 10.1210/jc.2002-020878.

[175] M. Vaňková *et al.*, “Preliminary evidence of altered steroidogenesis in women with Alzheimer’s disease: Have the patients ‘OLDER’ adrenal zona reticularis?,” *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 158, pp. 157–177, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.12.011.

[176] J. C. Naylor *et al.*, “Allopregnanolone levels are reduced in temporal cortex in patients with Alzheimer’s disease compared to cognitively intact control subjects,” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1801, no. 8, pp. 951–959, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.bbalip.2010.05.006.

[177] C. J. Pike, “Sex and the development of Alzheimer’s disease,” *Journal of Neuroscience Research*, vol. 95, no. 1–2. John Wiley and Sons Inc., pp. 671–680, Jan. 01, 2017, doi: 10.1002/jnr.23827.

[178] “Ottawa Hospital Research Institute.” http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp (accessed Feb. 12, 2021).

[179] C. E. Marx *et al.*, “The Neurosteroid Allopregnanolone Is Reduced in Prefrontal Cortex in Alzheimer’s Disease,” *Biological Psychiatry*, vol. 60, no. 12, pp. 1287–1294, Dec. 2006, doi: 10.1016/j.biopsych.2006.06.017.

[180] J. C. Naylor *et al.*, *Cerebrospinal fluid dehydroepiandrosterone levels are correlated with brain dehydroepiandrosterone levels, elevated in Alzheimer’s disease, and related to neuropathological disease stage.*, vol. 93, no. 8. Endocrine Society, 2008, pp. 3173–3178.

[181] M. Wang, C. Wang, and X. Han, “Selection of internal standards for accurate quantification of complex lipid species in biological extracts by electrospray ionization mass spectrometry—What, how and why?,” *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 36, no. 6. John Wiley and Sons Inc., pp. 693–714, Nov. 01, 2017, doi: 10.1002/mas.21492.

[182] A. A. Alomary, R. L. Fitzgerald, and R. H. Purdy, “Neurosteroid analysis,” *International Review of Neurobiology*, vol. 46, pp. 97–115, 2001, doi: 10.1016/S0074-7742(01)46060-0.

[183] D. S. Wolf, M. Gearing, D. A. Snowdon, H. Mori, W. R. Markesbery, and S. S. Mirra, “Progression of regional neuropathology in Alzheimer disease and normal elderly: Findings from the Nun Study,” *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, vol. 13, no. 4, pp. 226–231, 1999, doi: 10.1097/00002093-199910000-00009.

[184] C. L. Joachim, J. H. Morris, and D. J. Selkoe, “Diffuse senile plaques occur commonly in the cerebellum in Alzheimer’s disease,” *American Journal of Pathology*, vol. 135, no. 2, pp. 309–319, 1989, Accessed: Feb. 18, 2021. [Online]. Available: [/pmc/articles/PMC1879919/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC1879919/?report=abstract).

[185] O. G. Calan, P. Akan, A. Cataler, C. Dogan, and S. Kocturk, “Amyloid Beta Peptides Affect Pregnenolone and Pregnenolone Sulfate Levels in PC-12 and SH-SY5Y Cells Depending on Cholesterol,” *Neurochemical Research*, vol. 41, no. 7, pp. 1700–1712, Jul. 2016, doi: 10.1007/s11064-016-1886-0.

- [186] M. Vaňková *et al.*, “Reduced sulfotransferase SULT2A1 activity in patients with Alzheimer’s disease,” *Physiological Research*, vol. 64, pp. S265–S273, 2015, doi: 10.33549/physiolres.933160.
- [187] M. Kato-Negishi and M. Kawahara, “Neurosteroids block the increase in intracellular calcium level induced by Alzheimer’s β -amyloid protein in long-term cultured rat hippocampal neurons.,” *Neuropsychiatric disease and treatment*, vol. 4, no. 1, pp. 209–18, Feb. 2008, doi: 10.2147/ndt.s2059.
- [188] V. Fontaine-Lenoir *et al.*, “Microtubule-associated protein 2 (MAP2) is a neurosteroid receptor,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 12, pp. 4711–4716, Mar. 2006, doi: 10.1073/pnas.0600113103.
- [189] H. J. Hsu, M. R. Liang, C. T. Chen, and B. C. Chung, “Pregnenolone stabilizes microtubules and promotes zebrafish embryonic cell movement,” *Nature*, vol. 439, no. 7075, pp. 480–483, Jan. 2006, doi: 10.1038/nature04436.
- [190] A. Grimm *et al.*, “Mitochondria modulatory effects of new TSPO ligands in a cellular model of tauopathies,” *Journal of Neuroendocrinology*, vol. 32, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1111/jne.12796.

Capítulo 2 – Estágio em Farmácia Comunitária

1. Introdução

Após termos obtido as competências técnicas e científicas, o estágio curricular representa o culminar do que é tornar-se farmacêutico. Eu escolhi realizá-lo em farmácia comunitária, pois considero que esta seja a vertente que nos coloca no local mais próximo do doente e, muitas das vezes, representa a linha da frente no que respeita ao primeiro contacto entre o doente e o profissional de saúde.

A farmácia comunitária tem, por isso, uma importância fulcral, em conjunto com o SNS (Sistema Nacional de Saúde), sendo um espaço que se caracteriza pela prestação de cuidados de saúde de grande exigência técnico-científica e que pretende servir a comunidade com a maior disponibilidade e qualidade nos serviços prestados [1].

É nesta vertente que representa a face mais visível da profissão de farmacêutico que temos oportunidade de aplicar os conhecimentos obtidos anteriormente, bem como expandir a nossa área de conhecimento, uma vez que muitos dos objetos de estudo são consolidados com a prática profissionalizante.

O meu estágio curricular foi realizado na FG (Farmácia Gândara), em Vila Nova de Gaia, entre 2 de fevereiro e 19 de junho de 2020, sob orientação do farmacêutico Dr. Vítor Almeida e restante equipa profissional da farmácia.

2. Caracterização e Organização Geral da Farmácia Gândara

2.1. Localização e Horário

A FG está localizada na rua Escola do Maninho, em Vila Nova de Gaia e caracteriza-se por ser uma zona de fácil acesso, com uma paragem de autocarro a poucos metros da farmácia e situando-se ao lado de uma grande superfície comercial e de uma clínica de medicina geral, participando, muitas das vezes, na rota diária dos seus utentes.

O horário de funcionamento semanal está compreendido entre as 8h30 e as 20h30 e, aos sábados, das 9h às 13h e das 14h30 às 19h.

Aquando a declaração do Estado de Emergência Nacional que ocorreu durante o período de estágio, a direção técnica da FG restringiu o horário semanal para o mesmo que era praticado aos sábados num horário normal, das 9h às 13h e das 14h30 às 19h.

2.2. Instalações

2.2.1 Espaço exterior

A FG situa-se sob um prédio de moradores, sendo o acesso concedido através de um pequeno lance de escadas ou, mais ao lado, através de uma rampa que permite a entrada de pessoas com

mobilidade reduzida ou que necessitem de uma cadeira de rodas. A porta de entrada está dotada de um guarda-vento que foi fulcral durante o período de estágio curricular, uma vez que, em finais do mês de Março, a entrada dos utentes passou a ser controlada, de modo a que só estivesse dentro da farmácia um utente para cada profissional de saúde, na zona de atendimento. A sua identificação é fácil e rápida, com a designação “FARMÁCIA” seguida do nome e com a cruz verde devidamente iluminada. No exterior também é possível identificar o nome do diretor técnico e o horário de funcionamento, bem como informação relativa às escalas de turno das farmácias em serviço de disponibilidade [1].

Existe afixada, mais recentemente, informação relevante sobre como manter e praticar as normas de segurança relativamente à doença Covid-19, com protocolos de etiqueta respiratória e lavagem adequada das mãos, publicadas pela Direção Geral de Saúde.

2.2.2. Espaço interior

A FG tem um aspeto bastante profissional e calmo, garantindo aos seus utentes uma boa iluminação e boas condições de ventilação, cumprindo, também, todos os requisitos relativos à higiene de uma farmácia [1].

O espaço interior da farmácia está dividido em zona de atendimento ao público, armazém, laboratório, instalações sanitárias e gabinete de atendimento personalizado, respeitando todas as áreas mínimas das divisões, definidas por lei. Adicionalmente, existe um gabinete de direção técnica e uma zona de recolhimento/zona de cacifos para a equipa da FG [2].

Área de atendimento

Esta zona é composta por cinco postos devidamente espaçados entre si, conferindo uma privacidade adequada ao atendimento. Para se fazer cumprir as normas de segurança e distanciamento, apenas três dos cinco postos estiveram em funcionamento durante a maior parte do período de estágio, sendo assumidos por cada profissional alternadamente.

Em cada posto foi colocado um protetor acrílico frontal, com um postigo para a dispensa dos medicamentos e dois protetores laterais. Foi também colocado um dispensador com desinfetante de mãos para utilização dos utentes e, no chão, um cone de marcação para controlar a distância entre o utente e o profissional de saúde.

Nesta área, estão expostos, em lineares que se encontram atrás dos balcões de atendimento ao público, MNSRM (Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica), suplementos alimentares, produtos dietéticos e de emagrecimento e produtos de higiene oral. Existe uma zona dos lineares que é fortemente influenciada pela sazonalidade, pelo que, quando iniciei o período de estágio, havia uma secção dedicada à tosse, congestão nasal e tratamento de sintomas da gripe e constipação que foi parcialmente substituída por produtos para alívio do prurido, picadas de inseto, queimaduras e repelentes, aquando aproximação da estação seguinte. Soluções desinfetantes de base alcoólica estiveram, de igual forma, em exposição durante quase todo o período de estágio curricular.

Fora do alcance dos utentes, encontram-se, em gavetas, produtos diversificados e medicamentos de alta rotatividade na FG, sendo que as máscaras cirúrgicas e de proteção respiratória, ligaduras, compressas, cremes para a hidratação de mãos, termómetros, descongestionantes

nasais, anti-histamínicos, xaropes para a tosse e paracetamol estiveram dentro dos produtos mais solicitados pelos utentes durante este período.

Na zona de circulação, o utente está em contacto com secções individualizadas de produtos dedicados à puericultura, podologia, saúde animal, perda de peso, higiene oral, ortopedia, dermocosmética e primeiros socorros. Existem, ainda, expositores dedicados à contraceção, expositores com perfumes e com óculos de sol e de leitura.

O acesso direto aos expositores supramencionados foi restrito a partir da declaração nacional de Estado de Emergência, uma vez que seria importante evitar que os utentes contaminassem, potencialmente, os produtos de saúde.

Área de armazenamento

Esta área encontra-se fora do alcance dos utentes e está dividida em duas partes: uma zona contendo gavetas deslizantes e uma zona de armazenamento em prateleiras.

Nas gavetas deslizantes, os MSRM (Medicamentos Sujeitos a Receita Médica) encontram-se separados de acordo com a sua forma farmacêutica e por ordem alfabética, conforme DCI (Denominação Comum Internacional) ou nome comercial. Existem, ainda, gavetas atribuídas a fármacos de uso veterinário, preparações semissólidas cutâneas como cremes e pomadas, produtos de uso retal e vaginal, inaladores, sistemas transdérmicos e injetáveis, gavetas destinadas a fármacos psicotrópicos (devidamente separadas das restantes) e gavetas para produtos de maior dimensão, tais como soluções orais, pós e granulados. Adicionalmente, há duas gavetas para produtos definidos ao abrigo do protocolo da Diabetes Mellitus, como tiras-teste e lancetas [3]. Ao lado, encontra-se o frigorífico, onde são guardados medicamentos que necessitem de um controlo mais restrito da temperatura, sendo conservados entre 2 a 8°C, tais como anéis vaginais, colírios, insulinas e vacinas [4]. As prateleiras estão divididas em módulos contendo suplementos alimentares, produtos de dermocosmética e produtos com grande *stock* na farmácia, ordenados por ordem alfabética.

Gabinete de atendimento personalizado

Este local permite aos utentes uma comunicação mais confidencial com o farmacêutico, cumprindo todas as normas respeitantes à boa ventilação da sala e ausência de perturbações que possam colocar em causa a qualidade da consulta farmacêutica [1].

É aqui que são determinados parâmetros bioquímicos como o perfil lipídico e a glicémia capilar, realiza-se o controlo da pressão arterial e a administração de medicamentos injetáveis e vacinas não incluídas no Plano Nacional de Vacinação, cumprindo todos os requisitos relativamente aos equipamentos e materiais necessários [5, 6].

Existe um segundo gabinete que é destinado a consultas de nutrição, tratamento especializado em podologia e prestação de cuidados e serviços de enfermagem.

Laboratório

Este espaço está devidamente equipado com almofarizes, balança de precisão, espátulas, tamises, entre outros, possuindo todo o equipamento mínimo obrigatório que está descrito na Deliberação n.º 1500/2004, de 7 de dezembro [7]. Apesar de não serem preparados medicamentos manipulados na FG, é aqui que se realizam preparações extemporâneas, tais como a reconstituição de pós em suspensões orais de antibióticos.

Gabinete de farmacêutico Diretor Técnico

É neste local que o proprietário/farmacêutico DT (Diretor Técnico) trata de toda a gestão respeitante à farmácia, realiza encomendas, reúne com delegados de propaganda médica e outros colaboradores.

2.3. Recursos humanos

Na FG existem três farmacêuticos, incluindo o farmacêutico DT e o farmacêutico substituto, duas técnicas de farmácia e uma técnica de limpeza. A farmácia dispõe assim de, pelo menos, um farmacêutico DT e um farmacêutico adicional, sendo que o quadro farmacêutico constitui a maioria dos trabalhadores na FG, como descrito no artigo 23º e 24º do Decreto-Lei n.º 307/2007, de 31 de agosto [8].

2.3.1 Farmacêutico DT – Deveres e responsabilidades

Tendo em conta o que está previsto no artigo 21º do Decreto-Lei n.º 307/2007 de 31 de agosto, alterado pelo Decreto-Lei n.º 171/2012, de 1 de agosto, ao farmacêutico DT compete:

- Responsabilidade nos atos farmacêuticos praticados na farmácia;
- Esclarecimento sobre o modo de utilização dos medicamentos e o seu uso racional;
- Dispensa de MSRM devidamente justificada, quando a receita está ausente;
- Boa conservação de todos os produtos da farmácia;
- Garantia de condições adequadas de higiene e segurança, bem como zelo para que a equipa que trabalha na farmácia mantenha a higiene em permanência;
- Assegurar um aprovisionamento suficiente de medicamentos;
- Verificação do cumprimento das regras deontológicas;
- Cumprimento dos princípios e deveres previstos na legislação.

O farmacêutico DT deve ser coadjuvado por farmacêuticos e demais funcionários devidamente habilitados [9].

2.4. Recursos Informáticos

O programa informático utilizado em todos os computadores da FG é o SIFARMA2000. O SIFARMA2000 é um sistema informático bastante completo, pois possui todas as ferramentas necessárias para o auxílio das funções desempenhadas por um farmacêutico comunitário. Tem um papel valioso nos processos de gestão, permitindo um controlo eficaz do *stock* existente na farmácia, permite o controlo dos prazos de validade e do processo de receção de encomendas, estando, sobretudo, direcionado para o bom aconselhamento do utente. Este programa dispõe, ainda, de informações atualizadas e de fácil acesso ao farmacêutico sobre contra-indicações, interações medicamentosas e reações adversas ao medicamento que é dispensado.

Durante o estágio curricular, o SIFARMA2000 foi-me bastante útil no ato de aconselhamento farmacêutico, pois, através do sistema informático, pude aceder ao histórico de dispensa de medicamentos de vários utentes, promovendo um aconselhamento com mais segurança e qualidade. Por exemplo, optar, quando possível, pela escolha de paracetamol, em detrimento de ibuprofeno, para o tratamento de sintomas da gripe em doentes com HT (hipertensão arterial).

2.5. Documentação científica

Uma vez que a informação na área científica está constantemente a ser revista e dado que, diariamente, os farmacêuticos têm de responder às questões dos utentes da forma mais atualizada possível, as Boas Práticas de Farmácia Comunitária propõem que estes possuam fontes de informação durante todo o horário de abertura da farmácia. Aquando a dispensa da medicação, o farmacêutico deve ter acesso físico ou eletrónico a meios que contenham informação sobre indicações terapêuticas, contraindicações, interações medicamentosas, posologia e precauções com a utilização do medicamento. A FG dispõe, para isso, da Farmacopeia Portuguesa, Prontuário Terapêutico, Resumo das Características do Medicamento, formulários relevantes, a Legislação Farmacêutica e Documentação Oficial de Regulação da Atividade [1]. Além disso, pode ser contactado o Centro de Informação do Medicamento da Ordem dos Farmacêuticos, para questões e informação atualizada sobre medicamentos [10].

Num atendimento durante o estágio curricular, através de uma receita médica contendo suplementação com ácido fólico e ferro, percebi que se tratava de uma utente que estava grávida. A utente solicitou, adicionalmente, um gel indicado para o tratamento de problemas circulatórios superficiais não sujeito a receita médica, no entanto, através do acesso à composição deste produto, constatei que este compreendia excipientes potencialmente nocivos para o grupo em que a utente se insere e aconselhei uma alternativa mais adequada, à base de extratos naturais. Considero este exemplo paradigmático da necessidade de acesso à informação e características do medicamento.

3. Aprovisionamento e Armazenamento

3.1. Fornecedores

A obtenção de medicamentos e demais produtos de saúde é feita através de encomendas a armazenistas ou fornecedores, sendo que estas também podem ser feitas diretamente aos laboratórios. Normalmente, as encomendas são geradas pelo farmacêutico DT da farmácia, Dr. Júlio Canedo, no entanto esta função poderá ser atribuída a um outro profissional devidamente habilitado para a realizar. Os fornecedores são escolhidos tendo em conta o tempo de entrega na farmácia e o devido cumprimento da entrega às horas previstas, o *stock* que possui cada distribuidor e se este vai ao encontro das necessidades da FG, bem como diversas negociações comerciais, incluindo descontos e bonificações.

O fornecedor mais requisitado pela FG é a OCP Portugal®, no entanto são realizadas encomendas à Alliance Healthcare®, em menor escala. São entregues duas encomendas diárias através da OCP Portugal®, por volta das 8h30 e 14h30, no entanto, durante o período de confinamento geral, passou a realizar-se apenas uma entrega diária de manhã, em maior quantidade e respeitando as políticas de distribuição definidas por este fornecedor. No caso de algum produto faltar através do fornecedor principal, recorre-se, então, à Alliance Healthcare®. Existem fornecedores de menor peso que são utilizados esporadicamente, principalmente na aquisição de produtos de uso veterinário.

Regularmente, no início de cada mês, são realizadas encomendas diretamente a laboratórios de grandes quantidades de medicamentos com alta rotatividade na farmácia.

3.2. Receção de encomendas

Depois de as encomendas serem efetuadas, os produtos chegam à farmácia, normalmente, em contentores verdes de plástico e estes são colocados numa área destinada à receção de

encomendas, na zona de armazenamento, pelos fornecedores. Existem contentores diferenciados dos restantes através da cor azul e, no seu interior, da presença de bolsas que mantêm a temperatura baixa, para o transporte de medicamentos termolábeis ou produtos que necessitem de condições especiais de armazenamento. Quando recebidos, os contentores ficam organizados em pilhas, sendo que os contentores azuis refrigerados são colocados no topo para, posteriormente, os produtos serem rececionados e armazenados em primeiro lugar, mantendo assim a cadeia de segurança de todos os produtos.

Devido à necessidade de cumprimento de todas as normas de segurança, relativamente ao surto pandémico que atravessámos, os fornecedores deixaram de colocar as encomendas na área de receção, passando a deixá-las na porta de entrada da farmácia, evitando assim cruzamentos com a equipa profissional e mantendo a distância de segurança.

Dentro dos contentores, podemos encontrar a fatura da encomenda em duplicado, verificando posteriormente se esta se destina à FG. Para procedermos à receção, abrimos o programa SIFARMA2000 e acedemos à aba “RECEÇÃO DE ENCOMENDAS”. De seguida, selecionamos a encomenda pretendida, introduzindo a fatura associada através de um *scanner* e o valor descrito na fatura. Uma fatura pode estar associada a várias referências de encomenda, sendo que, nesse caso, o programa informático permite agrupá-las através de um atalho.

Inicia-se, então, a entrada da encomenda e, tal como referido, em primeiro lugar deve dar-se entrada aos produtos que necessitem de condições especiais de armazenamento, os quais são introduzidos e rapidamente armazenados no frigorífico da farmácia. Esta entrada é feita através de uma leitura ótica com o *scanner* ou introdução manual do CNP (Código Nacional de Produto). Depois de devidamente acondicionados, seguimos para a entrada dos restantes produtos, da mesma forma, controlando a integridade das embalagens e verificando os prazos de validade e o PVP (Preço de Venda ao Público).

Quando o prazo de validade do produto que vem na encomenda está mais próximo de atingir que o dos produtos que já se encontram em *stock* na farmácia ou quando o *stock* está a zero, devemos ter especial cautela e alterá-lo no programa, introduzindo o prazo de validade que termina mais cedo.

Quando o PVP que aparece previamente no programa é diferente do PVP que vem descrito na embalagem rececionada, atualizamos o PVP no caso de não haver *stock* na farmácia ou, caso haja *stock*, identificamos o produto recebido com um elástico. Em relação a este último caso, quando o *stock* de produtos com o preço antigo terminar, podemos proceder à atualização do PVP no SIFARMA2000.

Depois de rececionar todos os produtos, recorre-se à fatura da encomenda para retificar o PVF (Preço de Venda à Farmácia), as margens de lucro e eventuais condições e se o número de unidades às quais demos entrada coincide com o número descrito na fatura. Apesar de ser um acontecimento raro, é possível que, no fim, as unidades não correspondam entre si e, nesse caso, teremos de comunicar ao fornecedor.

Durante o estágio, tive oportunidade de efetuar uma reclamação através da linha de apoio da OCP Portugal®. Foi-me pedido para identificar a farmácia, o número da fatura e o produto em falta. Posteriormente, foi realizada uma nota de crédito, como é norma, sendo que, alternativamente, poderia ter sido feito o envio do produto.

Depois de verificado o valor total faturado, termina-se a receção da encomenda e arquiva-se a fatura.

O sistema informático permite uma receção direta das encomendas diárias e das encomendas instantâneas com fatura associada à encomenda diária, porém, no caso de encomendas feitas diretamente ao laboratório, há necessidade de criar manualmente a encomenda na aba “GESTÃO DE ENCOMENDAS”, introduzindo o fornecedor em questão, o CNP de todos os produtos e a sua quantidade unitária. Depois de criada, a encomenda é aprovada e rececionada como já descrito.

3.3. Tipos de encomendas

3.3.1. Encomenda diária

A encomenda diária, tal como o nome indica, é uma encomenda que é feita diariamente, em grande volume, dos produtos que foram vendidos durante o dia na farmácia e alteraram o *stock* no programa informático, atingindo um valor inferior ao *stock* mínimo estabelecido para o produto, no SIFARMA2000. O programa tem a capacidade de gerar uma proposta automática, com base no *stock* mínimo e máximo estabelecido para cada produto, sendo validada posteriormente pelo operador da encomenda.

3.3.2. Encomenda instantânea

Este tipo de encomenda é realizada quando queremos solicitar medicamentos ou produtos específicos em situações como, por exemplo, quando um utente nos apresenta uma receita médica com um fármaco cuja marca ou laboratório não esteja disponível na farmácia, no ato da dispensa.

A disponibilidade do produto pode ser consultada a partir da respetiva ficha do produto, no SIFARMA2000, mediante a escolha do fornecedor para realizar a entrega. Adicionalmente, pode ser consultado o PVP do produto, bem como o dia e horas às quais está prevista a entrega. Durante o estágio curricular, tive a oportunidade de efetuar várias encomendas instantâneas, sendo que este processo também é bastante útil para informar o utente acerca da disponibilidade do medicamento desejado. Algumas vezes, um dado fármaco estava indisponível no fornecedor primário da FG mas disponível no fornecedor secundário, realçando assim a importância de haver, pelo menos, um fornecedor adicional que colmate as eventuais falhas do primeiro. Quando o produto desejado se encontra indisponível em todos os fornecedores, existe a opção de contactar uma farmácia que tenha o produto em *stock*.

3.3.3. Encomenda manual

Este tipo de encomendas são comumente realizadas quando os produtos são comprados diretamente ao laboratório. Durante o período de estágio, tive a oportunidade de criar várias encomendas manuais. Depois de chegada a encomenda com a respetiva fatura associada, é necessário aceder, no SIFARMA2000, a “GESTÃO DE ENCOMENDAS” e selecionar a opção “MANUAL”, identifica-se o fornecedor correspondente e fazemos uma listagem no programa de todos os produtos através do CNP e a sua respetiva quantidade, como mencionado anteriormente. No fim, aprova-se a encomenda e faz-se o “envio para papel”, sendo que esta já poderá ser acedida e rececionada posteriormente pelo operador.

3.4. Armazenamento

Depois de rececionados, nem todos os medicamentos requerem as mesmas condições de armazenamento. A maior parte dos produtos pode ser armazenada à temperatura ambiente,

havendo o cuidado para que esta não ultrapasse os 25°C. Os medicamentos termolábeis e todos os produtos que necessitam de refrigeração devem oscilar a uma temperatura que vai desde os 2 a 8°C e são colocados no frigorífico [4]. As condições de humidade também são de extrema importância para manter a estabilidade dos produtos, sendo que os medicamentos devem permanecer, normalmente, a uma humidade relativa inferior a 60%. De notar que estes devem estar protegidos de um contacto direto com a luz solar.

Para efetuar o controlo da temperatura e humidade nos vários locais onde se encontram armazenados os produtos, a FG dispõe de três termohigrómetros (aparelhos que medem a temperatura e condições higroscópicas), estando localizados na área de armazenamento, frigorífico e área de atendimento.

Todos os produtos são organizados segundo o método FEFO (*First Expired First Out*), ou seja os medicamentos cujo prazo de validade termina mais rapidamente são vendidos em primeiro lugar, como mencionado anteriormente. Quando os prazos de validade coincidem, coloca-se o produto que chegou há mais tempo à farmácia em primeiro lugar. Este sistema permite uma rotação de *stocks* facilitada, uma vez que evita o *stock* de medicamentos com prazos de validade curtos.

3.5. Prazos de validade

Para além da obrigatoriedade de garantir o bom estado de conservação de todos os produtos vendidos na farmácia, é de particular importância que não se forneça medicamentos ou outros produtos de saúde que tenham excedido o prazo de validade ou que tenham sido retirados do mercado [9].

O controlo dos prazos de validade inicia-se no ato da receção da encomenda e passa pela utilização da metodologia FEFO aquando armazenamento. Para além disso, todos os meses é emitida uma lista, através do SIFARMA2000, com os produtos cuja validade termine dentro de um mês, de modo a que estes possam ser devolvidos. Depois de emitida a lista com todos os produtos, é realizada, por vários membros da equipa da farmácia, uma verificação manual dos produtos e, caso expirem efetivamente no mês seguinte, estes são retirados do local onde estão armazenados e colocados num contentor para serem devolvidos aos respetivos fornecedores. Se a devolução for aceite, é emitida uma nota de crédito à farmácia e, em caso de não ser, os produtos são devolvidos novamente. Aqueles produtos cujo prazo de validade se verifique superior ao que está na lista necessitam de uma retificação no SIFARMA2000.

No decorrer do meu estágio, tive oportunidade de auxiliar a realização deste processo, o que me ajudou não só a perceber a importância de assegurar o controlo dos prazos de validade como também a estar familiarizado com todos os produtos da farmácia.

3.6. Devoluções

De maneira a não quebrar a cadeia de segurança dos medicamentos ou demais produtos de saúde, é importante que haja um processo que permita a sua devolução quando estes não se encontram em conformidade.

Motivos como danos na integridade da embalagem, produtos cujo prazo de validade vem expirado ou com um prazo de validade muito curto, recolha de produtos notificada pelo INFARMED ou por detentores de AIM (Autorização de Introdução no Mercado), engano no envio do produto pelo fornecedor ou engano na encomenda são exemplos que podem gerar devoluções.

Para tal, deve ser criada uma nota de devolução, através do separador “GESTÃO DE DEVOLUÇÕES” no SIFARMA2000. Indicamos qual o fornecedor, o produto e o motivo da devolução e a nota é emitida em triplicado, sendo que, depois de devidamente assinados, dois exemplares são reencaminhados juntamente com o produto até ao fornecedor e o terceiro fica na farmácia. O fornecedor pode aceitar a devolução, reembolsando a farmácia através de uma nota de crédito ou substituindo por outros produtos. Num cenário oposto, o produto volta para a farmácia e é colocado para quebras.

4. Interação farmacêutico-utente-medicamento

A farmácia é o local onde os utentes se dirigem, muitas vezes, em primeiro lugar, quando pretendem recorrer a cuidados de saúde, encarando o farmacêutico num primeiro contacto. Por essa razão, este deve pautar-se pelo cumprimento das normas deontológicas, manter-se atualizado técnica e cientificamente e desempenhar um papel de agente de saúde pública [11].

Uma vez que uma grande parte dos utentes da FG se enquadra na faixa etária da população mais idosa e sendo que se podem notar discrepâncias a nível social e cultural entre os diversos tipos de utentes, o modo como a informação é transmitida pelo farmacêutico comunitário tem um peso importante na adesão à terapêutica, devendo este ter a capacidade de se adaptar e individualizar o aconselhamento a cada utente e a cada situação.

Quando se trata de medicação crónica, habitual na rotina do utente, deve reforçar-se, verbalmente, tanto a posologia como o modo de administração e, caso necessário, complementar-se com informação escrita, através de etiquetas coladas na embalagem dos medicamentos. Quando o utente inicia uma terapêutica nova, para além do que foi mencionado anteriormente, devem ser referidas possíveis interações medicamentosas, a duração da terapêutica e efeitos adversos mais comuns, tendo, no entanto, cuidado para não afastar o utente da terapêutica e apenas ressalvando para a eventual necessidade de ser feita alteração ou suspensão da medicação com o médico prescritor, neste último caso.

No ato da dispensa, o farmacêutico deve informar o utente da existência de medicamentos com a mesma substância ativa, forma farmacêutica, apresentação e dosagem do que lhe foi prescrito, bem como aqueles que são comparticipados e o que tem o preço mais baixo. As farmácias devem ter disponíveis, no mínimo, três medicamentos com a mesma substância ativa, forma farmacêutica e dosagem, de entre os que correspondem aos cinco preços mais baixos de cada grupo homogéneo, sendo que, na FG, era habitual o utente exercer o seu direito de opção e dispensar-se o fármaco de menor preço existente na farmácia [12].

5. Dispensa de medicamentos e outros produtos de saúde

Um medicamento é “toda a substância ou associação de substâncias apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em seres humanos ou dos seus sintomas ou que possa ser utilizada ou administrada no ser humano com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou, exercendo uma acção farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas”, tal como descrito no Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de agosto [13].

Relativamente ao critério de dispensa ao público, os medicamentos podem ser classificados em MSRM e MNSRM.

Além dessa distinção, os medicamentos também podem ser divididos entre medicamentos de marca e medicamentos genéricos. Um medicamento de marca foi devidamente autorizado com

base em documentação completa, incluindo resultados de ensaios farmacêuticos, pré-clínicos e clínicos, já um medicamento genérico tem a mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias ativas, a mesma forma farmacêutica e cuja bioequivalência com o medicamento de referência tenha sido demonstrada por estudos de biodisponibilidade apropriados [13].

5.1. Dispensa de medicamentos sujeitos a receita médica

Estão sujeitos a receita médica os medicamentos que possam constituir um risco para o doente, mesmo quando usados para o fim a que se destinam, em situações de ausência de vigilância médica, bem como medicamentos que possam constituir um risco quando sejam utilizados, com frequência, em quantidades consideráveis para fins diferentes daquele a que se destinam, que contenham substâncias cuja atividade ou reações adversas seja indispensável aprofundar e medicamentos que se destinem a ser administrados por via parentérica [13].

Os medicamentos, incluindo manipulados e contendo estupefacientes e psicotrópicos, devem ser prescritos através de meios eletrónicos, conforme estabelecido pela Portaria n.º 224/2015, de 27 de julho, algo que também é aplicável a produtos de saúde, com ou sem comparticipação pelo SNS, tais como produtos de ostomia, fraldas, géneros alimentícios destinados a uma alimentação particular, entre outros. A prescrição manual deverá ser realizada excecionalmente [14].

A prescrição por meios eletrónicos divide-se em receitas eletrónicas materializadas e receitas eletrónicas desmaterializadas ou sem papel que, por norma, são remetidas para o telemóvel do utente [14].

Durante o período de estágio, todas as receitas eletrónicas contendo medicação crónica e emitidas nos 6 meses anteriores ao dia 3 de abril de 2020 (vigência do Estado de Emergência) foram submetidas a uma renovação automática, para reduzir o deslocamento da população às unidades de saúde, tal como descrito pela Portaria n.º 90-A/2020, de 9 de abril [15]. Neste âmbito, foi, também, importante poder aceder às receitas através do código de dispensa enviado para o telemóvel dos utentes, uma vez que permitiu evitar contactos desnecessários com eventuais fómites. Através de uma receita eletrónica desmaterializada, foi possível aceder a toda a medicação sem que houvesse partilha de receitas materializadas. No início, esta abordagem parecia vir a dificultar a população mais envelhecida que frequenta a farmácia, mas tornou-se num método que, para além de mais seguro, foi bastante prático.

Qualquer que seja o modo de disponibilização de uma prescrição eletrónica, a receita deverá conter informação relativa ao seu número único, local de prescrição, identificação do médico e do utente, existência de entidade financeira, identificação do medicamento, posologia e duração do tratamento, existência de comparticipações especiais e data, a validar, para os casos de receita materializada e manual, antes de ser efetuada a dispensa.

As prescrições são feitas por DCI, indicando-se a forma farmacêutica, dosagem, apresentação, posologia e número de embalagens, no entanto estas podem, excecionalmente, incluir a denominação comercial do medicamento, por marca ou nome do titular de AIM, quando a substância ativa não existe num medicamento genérico comparticipado ou só exista num medicamento original ou caso haja uma justificação técnica do prescriptor, tal como margem ou índice terapêutico estreito, reação adversa prévia à substância ativa ou caso o tratamento tenha de ser feito num regime contínuo superior a 28 dias [14].

As receitas eletrónicas materializadas podem renovar-se, desde que contenham medicamentos destinados a tratamentos de longa duração. Estas admitem uma validade de 30 dias seguidos, a

partir da data da sua emissão. Em cada receita podem ser prescritos até 4 medicamentos diferentes, totalizando 4 embalagens por receita. No máximo, podem prescrever-se duas embalagens por medicamento, no entanto, se estes se apresentarem sob a forma de embalagem unitária, podem ser prescritas até 4 embalagens ou até 12, no caso de medicamentos de longa duração.

Nas receitas eletrónicas desmaterializadas, cada linha de prescrição tem somente um medicamento, até ao máximo de duas embalagens, em casos de tratamentos de curta a média duração ou até seis embalagens, em casos de tratamentos de longa duração. Quando os medicamentos se apresentam sob a forma de embalagem unitária, seguem-se as normas usadas nas receitas eletrónicas materializadas [14].

A prescrição pode ser feita manualmente em situações de falha informática, indisponibilidade da prescrição através de dispositivos móveis ou em situações em que o utente não tenha a possibilidade de receber a prescrição desmaterializada ou de a materializar, tendo em conta as alterações feitas na Portaria n.º 224/2015, de 27 de julho, pela Portaria n.º 390/2019, de 29 de outubro [16].

A prescrição manual tem validade de 30 dias seguidos, desde a data da sua emissão, sendo que esta é de preenchimento obrigatório. Podem ser prescritos 4 medicamentos diferentes num total de 4 embalagens por receita e, no máximo, duas embalagens por medicamento. No caso de se tratar de um medicamento apresentado sob forma de embalagem unitária, podem ser prescritas até 4 embalagens do mesmo medicamento.

A renovação de uma receita não pode ser emitida por via manual e os dados do médico prescriptor devem estar devidamente contemplados, juntamente com a vinheta e assinatura. Durante o período de estágio, identifiquei a falta da assinatura do médico prescriptor numa receita manual, sendo esta de carácter obrigatório, invalidando assim a sua comparticipação. Rasuras, caligrafias diferentes e prescrições a lápis também são motivos para a não comparticipação das receitas [14].

5.2. Regimes de comparticipação

Na legislação atual, existe a possibilidade de comparticipação de medicamentos através de um regime geral e de um regime especial, aplicando-se este último a situações específicas que abrangem determinadas patologias ou grupos de doentes [14].

5.2.1. Regime geral de comparticipação de medicamentos

No regime geral, o Estado encarrega-se de pagar uma percentagem do PVP dos medicamentos, de acordo com os seguintes escalões e consoante a classificação farmacoterapêutica dos medicamentos:

- O escalão A é de 90 % do PVP dos medicamentos;
- O escalão B é de 69 % do PVP dos medicamentos;
- O escalão C é de 37 % do PVP dos medicamentos;
- O escalão D é de 15 % do PVP dos medicamentos [17].

5.2.2. Regime especial de comparticipação de medicamentos

5.2.2.1. Beneficiários

O Estado comparticipa mais 5% no preço de medicamentos integrados no escalão A (95%), mais 15% no escalão B (84%), C (52%) e D (30%), para pensionistas do regime especial [14].

5.2.2.2. Patologias ou grupos especiais de utentes

Algumas patologias são uma causa importante de morbilidade e têm efeitos nefastos para os utentes, pois são incapacitantes a nível pessoal e socioeconómico, penalizando a sua qualidade de vida. Existem, por isso, regimes especiais que permitem um acesso facilitado ao medicamento, tais como:

- Portaria n.º 281/2017, de 21 de setembro: para os doentes com artrite reumatóide e espondilite anquilosante que sejam tratados com medicamentos que incluem metotrexato, dispensados em farmácias comunitárias [18];
- Despacho n.º 1234/2007, de 25 de janeiro: para medicamentos destinados ao tratamento da doença inflamatória intestinal, prescritos por médico especialista, em consultas de gastroenterologia, cirurgia geral, medicina interna e pediatria [19];
- Portaria n.º 329/2016, de 20 de dezembro: fármacos indispensáveis ao tratamento da dor crónica, não oncológica, moderada a forte, tais como fentanilo, hidromorfona, tapentadol, morfina, buprenorfina, oxicodona e associação de oxicodona com naloxona [20];
- Portaria n.º 331/2016, de 22 de dezembro: medicamentos para tratamento de dor oncológica, moderada a forte: buprenorfina, fentanilo, hidromorfona, tapentadol, morfina, oxicodona e associação de oxicodona com naloxona [21];
- Despacho n.º 13020/2011, de 20 de setembro: para a DA, as substâncias ativas dos medicamentos abrangidos compreendem donepezilo, galantamina, memantina e rivastigmina, quando prescritos por médico especialista [22];
- Despacho n.º 11387-A/2003, de 23 de maio: os custos dos medicamentos comparticipados pelo SNS necessários ao tratamento dos doentes com lúpus, hemofilia e hemoglobinopatias são integralmente suportados [23].

Durante o estágio curricular, tive a oportunidade de colocar em prática conhecimentos acerca dos regimes especiais de comparticipação, pois a um utente teria sido prescrito o fármaco rivastigmina por um médico de clínica geral, sendo que, dessa forma, teria um custo bastante elevado para o utente. Nesse contexto, realizei uma venda suspensa do fármaco para, mais tarde, após consulta de Neurologia, regularizar a venda com o regime especial de comparticipação.

5.3. Dispensa de medicamentos não sujeitos a receita médica

Os medicamentos que não preenchem qualquer das condições previstas para os MSRM não estão sujeitos a receita médica [13].

A automedicação está associada ao uso de MNSRM, sempre que se trate de uma situação de alívio ou tratamento de afeções passageiras e sem gravidade, com aconselhamento ou não de um profissional de saúde. Esta prática faz, por isso, parte do nosso sistema de saúde, contudo tem de ser restrita a situações clínicas bem delineadas. O farmacêutico desempenha um papel essencial neste âmbito, uma vez que, através da avaliação farmacoterapêutica e dos sintomas descritos pelo utente, poderá indicar um tratamento que seja seguro e eficaz ou, caso necessário, encaminhamento para consulta médica. Existe, por isso, no Despacho n.º 17690/2007, de 23 de julho, uma lista de situações passíveis de automedicação [24].

Além disso, existe uma subcategoria de MNSRM que é aplicável a medicamentos que cumpram certas condições estabelecidas em protocolos de dispensa. Estes podem ser dispensados em farmácia sem prescrição médica, se a sua DCI constar na lista do Anexo I do regulamento dos MNSRM-EF (Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica de Dispensa Exclusiva em Farmácia) e desde que cumpram as condições previstas nos protocolos de dispensa do Anexo II [25].

Durante o estágio curricular, tive oportunidade de realizar aconselhamento farmacêutico relativamente a várias patologias indicadas no despacho citado anteriormente, recorrendo a MNSRM e MNSRM-EF. Um dos exemplos baseou-se no controlo de um episódio de diarreia em adulto, utilizando MNSRM. Depois de fazer o despiste e descartar diarreia de origem bacteriana e diarreia do viajante, procedi ao aconselhamento de *Saccharomyces boulardii* (UL-250®) e medidas de reidratação oral, em detrimento de um antidiarreico como o cloridrato de loperamida. Assim, pretende-se restabelecer a flora intestinal do doente e permite-se a expulsão da possível causa etiológica da diarreia.

5.4. Medicamentos sujeitos a legislação especial

5.4.1. Medicamentos estupefacientes e psicotrópicos

Como já foi referido, este tipo de medicação exige regras especiais de armazenamento e dispensa, visto que a sua utilização indevida está ligada a abuso de drogas.

O Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de janeiro foi alterado pela vigésima quarta vez pela Lei n.º 15/2020, de 29 de maio e dispõe de uma lista com os medicamentos considerados estupefacientes e psicotrópicos, indicados nas tabelas I e II [26, 27].

Os MEP (Medicamentos estupefacientes e psicotrópicos) poderão estar na presença de outros medicamentos em prescrições desmaterializadas, estando isolados nos restantes casos de prescrição. No ato de dispensa de MEP, a farmácia regista a seguinte informação:

- Identidade do doente ou representante, com o nome, data de nascimento, número e data do bilhete de identidade ou da carta de condução ou o nome e número do cartão de cidadão;
- Identificação da prescrição através do número de prescrição;
- Identificação da farmácia, nomeadamente o nome e número de conferência de faturas;
- Identificação do medicamento, nomeadamente o número de registo e a quantidade dispensada;
- Data de dispensa.

Posteriormente, é conservada, pelo período de três anos, uma cópia em papel ou informatizada das receitas manuais ou materializadas que incluam MEP, organizadas por data de dispensa, onde conste o código do medicamento e a quantidade dispensada, bem como os dados do utente ou representante [28].

5.4.2. Dispensa ao abrigo de protocolo específico

Para promover uma maior adesão à prevenção e autocontrolo da Diabetes Mellitus, doença que afeta cada vez mais pessoas, foram definidos preços máximos para as tiras-teste de determinação da glicémia, cetonémia e cetonúria, bem como para agulhas, seringas e lancetas destinadas a pessoas com Diabetes Mellitus. A comparticipação foi fixada em 85% do PVP no

custo de aquisição das tiras-teste e em 100% do PVP no caso das agulhas, seringas e lancetas, descrito no artigo 3º da Portaria n.º 222/2014, de 4 de novembro [29].

Dada a alta prevalência da Diabetes em Portugal, durante o período de estágio foi recorrente dispensar tiras-teste e lancetas com uma comparticipação elevada ou gratuitamente, demonstrando assim os benefícios desta medida para a saúde pública.

6. Aconselhamento e dispensa de outros produtos de saúde

6.1. Produtos de dermofarmácia e higiene

Um produto cosmético designa-se por qualquer substância ou mistura de substâncias destinada ao contacto com a epiderme, sistemas piloso e capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e mucosas adjacentes, com a finalidade de os limpar, perfumar, modificar o aspeto, proteger ou corrigir odores [30].

Na FG, estão disponíveis várias marcas de produtos cosméticos que incluem La Roche Posay®, Avène®, Vichy®, Uriage®, A-Derma®, ISDIN®, Klorane®, Mustela® e Bioderma® entre as mais aconselhadas. Estas marcas têm, por isso, gamas de produtos especializados com indicações para os vários tipos e afeções que possam surgir na pele, couro cabeludo e cabelo, assim como demonstram especificações para as diversas faixas etárias, desde bebé a adulto.

Durante o período de estágio, tive a oportunidade de fazer aconselhamento num caso de dermatite seborreica em recém-nascido, comumente conhecida como “crosta láctea”. Esta condição está associada a uma produção excessiva de sebo que, subsequentemente, causa a formação de placas oleosas que se agarram à pele, originando um aspeto característico no couro cabeludo dos bebés. Depois de realizar o despiste, prossegui ao aconselhamento de um creme calmante e hidratante para eliminar as sensações de prurido e desconforto, alternado com um champô apropriado para lavar o creme que seria aplicado e deixado atuar durante a noite.

No contexto do surto pandémico que ocorreu durante o período de estágio, o uso massivo e recorrente de gel desinfetante de base alcóolica pela população geral levou a uma grande procura de cremes de hidratação de mãos, sendo que o final do estágio foi mais marcado pelo aconselhamento de protetores solares.

6.2. Produtos dietéticos para alimentação especial

Alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos são sujeitos a um processamento especial para satisfazer as necessidades nutricionais de doentes, destinando-se à alimentação exclusiva ou parcial de pessoas com capacidade alterada para ingerir, digerir, absorver, metabolizar ou excretar géneros alimentícios correntes ou alguns dos nutrientes neles contidos ou cujo estado de saúde determina necessidades nutricionais particulares, descrito pelo Decreto-Lei n.º 216/2008, de 11 de novembro [31].

Na FG, estão dipostos num linear vários produtos da marca Fortimel®, os quais foram requisitados ao longo do estágio curricular, com a finalidade de colmatar as necessidades nutricionais de casos geriátricos e de doentes oncológicos, podendo assim atingir as metas proteicas e calóricas com este tipo de suplementação oral.

6.3. Fitoterapia e Suplementos nutricionais

A DGAV (Direção-Geral de Alimentação e Veterinária) é responsável pela definição, execução e avaliação das políticas de segurança alimentar.

Os suplementos alimentares são géneros alimentícios que se destinam a complementar um regime dietético normal e constituem fontes concentradas de nutrientes comercializadas em forma doseada, como em cápsulas, pastilhas e comprimidos, tal como descrito no Decreto-Lei n.º 118/2015, de 23 de junho [32].

Na FG, o aconselhamento de suplementos que realizei mais recorrentemente destinou-se a casos de insuficiência venosa (pernas cansadas), ao fortalecimento de funções cognitivas e a cansaço geral tendo em conta a idade, o género e as necessidades de cada utente. Aconselhei, ainda, suplementos de arando vermelho para a profilaxia de infeções urinárias quando devidamente justificado, multivitamínicos para repor alguns défices de vitaminas, assim como magnésio e zinco isoladamente para casos de fadiga física e mental.

6.4. Produtos e medicamentos de uso veterinário

Tendo em conta o Decreto-Lei n.º 148/2008, de 29 de julho, um medicamento de uso veterinário constitui toda a substância ou associação de substâncias possuindo propriedades curativas ou preventivas em animais ou que possa ser utilizada com vista a estabelecer um diagnóstico ou exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas. Estes são classificados quanto ao seu tipo de dispensa em: medicamentos não sujeitos a receita médico-veterinária, medicamentos sujeitos a receita médico-veterinária e medicamentos de uso exclusivo por médicos veterinários [33].

Durante o estágio, os produtos de uso veterinário mais dispensados na FG foram desparasitantes externos em pipetas e *sprays* e desparasitantes internos em comprimidos para cães e gatos. O farmacêutico deve ter em conta qual o tipo de animal a que se destina e o seu peso, uma vez que as dosagens diferem entre espécies e dentro da mesma espécie, consoante fatores como o peso do animal.

6.5. Dispositivos médicos

Um dispositivo médico é qualquer instrumento, aparelho, equipamento, *software* ou material destinado pelo fabricante a ser utilizado em seres humanos para fins de:

- Diagnóstico, prevenção, controlo, tratamento ou atenuação de uma doença;
- Diagnóstico, controlo, tratamento, atenuação ou compensação de uma lesão ou deficiência;
- Estudo, substituição ou alteração da anatomia ou de um processo fisiológico;
- Controlo concecional [34].

Os dispositivos dividem-se nas classes I (baixo risco), IIa (baixo médio risco), IIb (alto médio risco) e III (alto risco), atendendo aos potenciais riscos decorrentes da conceção técnica e do seu fabrico:

- Dispositivos de classe I incluem dispositivos destinados à recolha de fluidos (sacos coletores de urina e de ostomia), à imobilização de partes do corpo e/ou aplicação de força ou de compressão (colares cervicais, meias de compressão, pulsos elásticos), dispositivos utilizados para suporte externo do doente (cadeiras de rodas, canadianas), dispositivos não invasivos (pensos oculares) e dispositivos destinados a conteúdos temporários (seringas sem agulha);

- Dispositivos de classe IIa incluem compressas de gaze hidrófila, cateteres urinários, termómetros e tensiómetros;
- Dispositivos de classe IIb incluem material de penso para feridas ulceradas e queimaduras graves, canetas de insulina e preservativos masculinos;
- Dispositivos de classe III incluem preservativos com espermicida e pensos com medicamento [34, 35].

Além dos dispositivos médicos supracitados, durante o período de estágio, os dispositivos mais cedidos na FG foram máscaras cirúrgicas, havendo o cuidado de explicar ao utente o modo de utilização, a duração recomendada de utilização e as circunstâncias em que o seu uso seria viável. Luvas e termómetros também foram o foco de uma grande procura, bem como compressas, gazes, ligaduras, testes de gravidez e, eventualmente, seringas com e sem agulha e aparelhos medidores de tensão.

7. Medicamentos manipulados e preparações extemporâneas

Um medicamento manipulado compreende qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico, sendo que uma preparação oficial é todo o medicamento preparado segundo indicações de uma Farmacopeia ou Formulário para um determinado doente e uma fórmula magistral é todo o medicamento preparado segundo uma receita médica para um doente específico [36].

Apesar de não ter tido oportunidade de preparar um medicamento manipulado, o farmacêutico deve verificar se este respeita as dosagens das substâncias ativas para a indicação farmacêutica pretendida e para as condições metabólicas do utente, a inexistência de incompatibilidades e interações das substâncias prescritas, a existência na farmácia de material e equipamento adequado para a manipulação e a possibilidade de disponibilizar ao utente o medicamento em tempo útil para o início da terapêutica [37].

Em relação a preparações extemporâneas, tive oportunidade de reconstituir antibióticos em pó para suspensão oral sob supervisão farmacêutica. Depois de agitar e bater no fundo do frasco para soltar as partículas de pó, adiciona-se água purificada até atingir o volume especificado no frasco e homogeniza-se. É, de igual forma, importante ressaltar ao utente as condições para conservação do antibiótico e para agitar antes de usar.

8. Serviços Farmacêuticos

A farmácia comunitária não é apenas um posto de cedência de medicamentos, sendo que a prestação de cuidados farmacêuticos de promoção da saúde e bem-estar da população faz parte de um dos papéis fulcrais do farmacêutico comunitário. Segundo a Portaria n.º 1429/2007, de 2 de novembro que foi alterada pela Portaria n.º 97/2018, de 9 de abril, o apoio ao domicílio, administração de medicamentos e vacinas não incluídas no Plano Nacional de Vacinação, campanhas de rastreio, consultas de nutrição e serviços simples de enfermagem fazem parte dos serviços que podem ser prestados numa farmácia comunitária [38, 39].

Na FG, é realizado o controlo da pressão arterial, perfil lipídico, glicémia capilar, administração de vacinas não incluídas no Plano Nacional de Vacinação e medicamentos injetáveis, serviços de nutrição, podologia e enfermagem.

8.1. Controlo da pressão arterial

Deve medir-se a pressão arterial pelo menos, duas vezes, sendo registado o valor mais baixo da PAS (pressão arterial sistólica) e da PAD (pressão arterial diastólica). Uma terceira medição pode ser realizada, se houver uma grande discrepância entre os dois valores iniciais. Este controlo é feito em gabinete apropriado e sem apressar o utente, estando este sentado e relaxado, durante aproximadamente cinco minutos e com a bexiga vazia [40].

Valores de referência em adulto*		
	Pressão sistólica	Pressão diastólica
Ideal	< 120 mmHg	< 80 mmHg
Normal	120 – 129 mmHg	80 – 84 mmHg
Normal-alto**	130 – 139 mmHg	85 – 89 mmHg
HT grau I	140 – 159 mmHg	90 – 99 mmHg
HT grau II	160 - 179 mmHg	100 - 109 mmHg
HT grau III	≥180 mmHg	≥ 110 mmHg

Tabela 4 – Valores de referência de PAS e PAD

Notas:

*Esta classificação é válida para adultos com 18 anos ou mais que não estejam medicados com anti-hipertensores e não apresentem um processo patológico agudo concomitante.

** PAS ≥140 mmHg e PAD < 90 mmHg corresponde a HT sistólica isolada [40].

Durante os dois primeiros meses de estágio, tive oportunidade de medir a pressão arterial de utentes da FG várias vezes, não tendo registado valores anormais, tendo em conta o contexto de cada utente, no entanto, devido ao início do surto pandémico, todos os serviços e controlo de parâmetros bioquímicos foram temporariamente suspensos e os utentes eram reencaminhados para o centro de saúde mais próximo.

8.2. Perfil lipídico

A avaliação de dislipidémias relaciona-se intrinsecamente com o risco cardiovascular. Em pessoas com um risco baixo a moderado, deve manter-se o valor de c-total inferior a 190 mg/dL e c-LDL inferior a 115 mg/dL. Para pessoas assintomáticas e com risco alto, assim como em dislipidémias familiares aterogénicas e HT de grau III, os valores de c-LDL devem ser mantidos abaixo de 100 mg/dL, já para pessoas com um risco muito alto, devem estar abaixo de 70 mg/dL [41].

Na FG, pude avaliar o controlo do perfil lipídico em vários utentes, promovendo, sempre que possível, intervenções no estilo de vida direcionadas para cada utente:

- Adoção de uma dieta equilibrada a nível nutricional;
- Prática de exercício físico;
- Controlo e manutenção do peso;
- Restrição do consumo de álcool e eliminação do tabaco;
- Diminuição do consumo de sal (inferior a 5,8 g/dia).

8.3. Glicémia capilar

Para uma população geral, o diagnóstico de Diabetes Mellitus é feito com base nos seguintes valores:

- Glicémia em jejum ≥ 126 mg/dL;
- Sintomas clássicos + glicémia ocasional ≥ 200 mg/dL;
- Glicémia ≥ 200 mg/dL depois de duas horas, na Prova de Tolerância à Glicose Oral com 75g de glicose;
- Hemoglobina glicada A1c $\geq 6,5\%$.

De realçar que o diagnóstico de Diabetes Mellitus não deve ser realizado na base de um único valor anormal de glicémia ou de HbA1c [42].

8.4. Vacinação e administração de injetáveis

A administração de vacinas não incluídas no Plano Nacional de Vacinação e de medicamentos injetáveis deve ser realizada por farmacêuticos com formação reconhecida pela Ordem dos Farmacêuticos.

Para garantir que esta atividade se processa adequadamente e com segurança dos utentes e dos farmacêuticos, é necessário que sejam cumpridos os requisitos constantes da Deliberação n.º 139/CD/2010, de 21 de outubro e Deliberação n.º 145/CD/2010, de 4 de novembro. O gabinete de atendimento deve, por isso, incluir:

- Marquesa reclinável;
- Armário para arrumação do material;
- Superfície de trabalho que permita a preparação;
- Contentores para resíduos adequados;
- Contentor com tampa e pedal para lixo comum;
- Desinfetante de mãos e de superfície, álcool a 70º, compressas, luvas e pensos rápidos.

Os dados de cada administração devem ser registado no SIFARMA2000, com o nome do utente, a data de nascimento, o nome do injetável ou vacina, lote e via de administração e a identificação profissional do farmacêutico [5, 6].

9. Conferência de receituário

O pagamento da comparticipação do Estado no PVP dos medicamentos dispensados a beneficiários do SNS é regulado pela Portaria n.º 223/2015, de 27 de julho, alterada pela Portaria n.º 255/2016, de 27 de setembro, sendo que, para tal, é necessário que haja uma conferência das receitas dispensadas.

As receitas manuais e eletrónicas materializadas são conferidas manualmente, verificando-se o preenchimento de campos obrigatórios, tais como a assinatura e vinheta do médico, local de prescrição, dados do utente, organismo de comparticipação e data. As receitas são, posteriormente, separadas consoante o plano de comparticipação e organizadas em lotes de 30 receitas, no máximo. No caso de receitas eletrónicas desmaterializadas, o processo é informatizado.

Até ao dia 10 do mês seguinte, são enviadas para o Centro de Conferência de Faturas as receitas manuais ou materializadas cujo pagamento esteja ao encargo do SNS, informação sobre receitas desmaterializadas, fatura eletrónica mensal correspondente ao valor da comparticipação do

Estado no PVP dos medicamentos e eventuais notas de débito. As receitas que são compartilhadas através de outras entidades são enviadas para a Associação Nacional de Farmácias, juntamente com um recibo assinado pelo utente em como a medicação foi dispensada [43, 44].

10. Covid-19 e a farmácia comunitária

Durante o período do meu estágio curricular, foi realizada uma declaração de pandemia pela Organização Mundial de Saúde, como resultado da infeção por SARS-CoV-2, agente causador da doença COVID-19.

Nesse âmbito, foram desenvolvidas medidas de saúde pública, sendo que as farmácias comunitárias têm um papel fulcral na transmissão de informação aos seus utentes e à população geral. Posto isto, foi recorrente sensibilizar para a adoção de regras que minimizem o risco de contágio, tais como:

- Lavar frequentemente as mãos com água e sabão ou recorrer ao uso de soluções desinfetantes e/ou antissépticas;
- Ter cuidado com a higienização das mãos em todas as circunstâncias que se adequem;
- Evitar tocar com as mãos na boca, nariz ou olhos;
- Praticar distanciamento social e regras de etiqueta respiratória;
- Fazer autovigilância de sintomas e abstenção social em caso de doença.

10.1. Medidas adotadas na FG

Para além das medidas mencionadas anteriormente, as quais foram praticadas por todos os profissionais da FG, outras medidas foram tomadas a fim de minimizar o risco dos utentes e o risco individual:

- Desinfecção regular e com recurso a agentes adequados dos balcões, dispensador de senhas, terminais de multibanco e canetas disponibilizadas aos utentes;
- Disponibilização de solução antisséptica de base alcoólica próxima do dispensador de senhas e na zona de atendimento;
- Identificação de pessoas vulneráveis (como idosos com mais de 65 anos e grávidas), a fim de aplicar a legislação referente ao atendimento prioritário;
- Evitar o contacto com objetos dos utentes, nomeadamente telemóveis.

Cada balcão de atendimento continha um frasco de solução antisséptica de base alcoólica, de fácil acesso e utilizado entre cada atendimento e a todo o *staff* da farmácia era provida uma máscara cirúrgica a cada 4-6 horas, salvo sempre que se encontrasse húmida e/ou deformada, sendo removida pelo elástico e substituída [45].

10.2. Informações disponibilizadas aos utentes

Toda a equipa responsável pelo atendimento deve estar capacitada a informar adequadamente os utentes e esclarecer as suas dúvidas sobre a COVID-19, nomeadamente sobre a forma de transmissão de SARS-CoV-2, o seu período de incubação, medidas a adotar de forma a evitar o contágio, o que fazer em caso de suspeita de infeção, entre outros.

A FG disponibilizou, ainda, na entrada, cartazes informativos obtidos no *site* da Direção Geral de Saúde que facilitassem a compreensão e reforçassem toda a informação verbal transmitida pelos farmacêuticos e técnicos de farmácia, bem como informação sobre a sintomatologia da COVID-19 e quais as situações em que a linha SNS24 deve ser contactada.

É de realçar a necessidade de uma constante atualização científica do farmacêutico comunitário, face a algumas notícias difundidas pelos meios de comunicação que poderão influenciar a população geral, pelo que foi recorrente informar alguns utentes sobre a ausência de evidência científica sobre a eficácia de fármacos como a hidroxicroquina, ivermectina e suplementos de vitamina D contra a COVID-19 [45].

10.3. Formas de minimização de contacto

No interior da FG, a área por onde os utentes podiam circular foi restrita com fita delimitadora e, mais tarde, foi colado no chão um trajeto a indicar a forma como teriam de circular, de modo a evitar cruzamentos que fossem desnecessários. Foram colocados cones de sinalização, de modo a assegurar que o atendimento se realizasse a, pelo menos, um metro de distância (idealmente dois metros), bem como sinalética à frente de cada balcão utilizado. Como já mencionado, apenas foi permitida a entrada e presença de três utentes de cada vez, ocupando todos os balcões disponíveis e devidamente espaçados entre si, salvo em casos excecionais, como quando estes vinham acompanhados de crianças ou em representação de utentes mais idosos. Os utentes em fila de espera aguardavam a sua chamada numa zona exterior à farmácia, adjacente à porta de entrada [45].

11. Referências

1. Ordem dos Farmacêuticos. Norma geral sobre as infraestruturas e equipamentos. 2015.
2. INFARMED. Deliberação nº 1502/2014. 2014.
3. Diário da República. Portaria nº 35/2016, de 1 de março. 2016.
4. INFARMED. Conservação de Medicamentos ao Calor. Disponível em: https://www.infarmed.pt/web/infarmed/profissionais-de-saude/prescricao-e-dispensa/medicamentos_e_calor/conservacao_medicamentos_calor
5. INFARMED. Deliberação nº 139/CD/2010. 2010.
6. INFARMED. Deliberação nº 145/CD/2010. 2010.
7. INFARMED. Deliberação nº 1500/2004. 2004.
8. Diário da República. Decreto-Lei nº 307/2007, de 31 de agosto. 2007.
9. INFARMED. Decreto-Lei nº 171/2012. 2012.
10. Ordem dos Farmacêuticos. Centro de Informação do Medicamento. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/servicos/cim/apresentacao/>
11. Ordem dos Farmacêuticos. Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos. 1998.

12. Diário da República. Decreto-Lei nº 20/2013, de 14 de fevereiro. 2013.
13. INFARMED. Decreto-Lei nº 176/2006. 2006.
14. INFARMED. Normas relativas à dispensa de medicamentos e produtos de saúde. 2019.
15. Diário da República. Portaria nº 90-A/2020, de 9 de abril. 2020.
16. Diário da República. Portaria nº 390/2019, de 29 de outubro. 2019.
17. Diário da República. Portaria nº 195-D/2015, de 30 de junho. 2015.
18. Diário da República. Portaria nº 281/2017, de 21 de setembro. 2017.
19. Diário da República. Despacho 1234/2007, de 25 de janeiro. 2007.
20. Diário da República. Portaria nº 329/2016, de 20 de dezembro. 2016.
21. Diário da República. Portaria nº 331/2016, de 22 de dezembro. 2016.
22. Diário da República. Despacho 13020/2011, de 29 de setembro. 2011.
23. Diário da República. Despacho 11387-A/2003, de 9 de junho. 2003.
24. Diário da República. Despacho 17690/2007, de 10 de agosto. 2007.
25. INFARMED. Lista de DCI - MNSRM-EF. Disponível em: https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/autorizacao-de-introducao-no-mercado/alteracoes_transferencia_titular_aim/lista_dci
26. INFARMED. Decreto-Lei nº 15/93. 1993.
27. Diário da República. Lei nº 15/2020, de 29 de maio. 2020.
28. Diário da República. Portaria nº 224/2015, de 27 de julho. 2015.
29. INFARMED. Portaria nº 222/2014. 2014.
30. Diário da República. Decreto-Lei nº 189/2008, de 24 de setembro. 2008.
31. Diário da República. Decreto-Lei nº 216/2008, de 11 de novembro. 2008.
32. Diário da República. Decreto-Lei nº 118/2015, de 23 de junho. 2015.
33. Diário da República. Decreto-Lei nº 148/2008, de 29 de julho. 2008.
34. Diário da República. Decreto-Lei nº 145/2009, de 17 de Junho. 2009.
35. INFARMED. Dispositivos médicos na farmácia. Disponível em: https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/dispositivos-medicos/aquisicao-e-utilizacao/dispositivos_medicos_farmacia

36. Diário da República. Decreto-Lei nº 95/2004, de 22 de abril. 2004.
37. Ordem dos Farmacêuticos. Referenciais Da Qualidade. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/servicos/qualidade/referenciais-da-qualidade/farmacia-comunitaria/>
38. Diário da República. Portaria nº 1429/2007, de 2 de novembro. 2007.
39. Diário da República. Portaria nº 97/2018, de 9 de abril. 2018.
40. Direção-Geral da Saúde. Hipertensão Arterial: definição e classificação. 2013;
41. DGS. Abordagem Terapêutica das Dislipidemias no Adulto. 2017.
42. DGS. Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus. 2011.
43. Diário da República. Portaria nº 223/2015, de 27 de julho. 2015.
44. Diário da República. Portaria nº 255/2016, de 27 de setembro. 2016.
45. INFARMED. [Orientações para as farmácias comunitárias. Infecção por SARS-CoV-2 \(COVID-19\)](https://www.infarmed.pt/web/infarmed/infarmed/-/journal_content/56/15786/3593312). Disponível em: https://www.infarmed.pt/web/infarmed/infarmed/-/journal_content/56/15786/3593312

Apêndices

Apêndice 1 – Estratégia de pesquisa

Pubmed	
1. Pregnenolone	7,508
2. Pregnenolone sulfate	632
3. Pregnenolone sulphate	1,228
4. Alzheimer	174,138
5. Senile dementia	165,213
6. ((1) OR (2)) OR (3)	7,508
7. ((1) OR (2)) OR (3)) AND (4)	50

b-on	
1. Pregnenolone	31,931
2. Pregnenolone sulfate	10,539
3. Pregnenolone sulphate	4,178
4. Alzheimer	1,366,559
5. Senile dementia	210,642

6. (1) AND (4)	3,526
7. ((1) [AB] AND (4) [AB])	59

Scopus	
1. Pregnenolone	21,707
2. Pregnenolone sulfate	6,918
3. Alzheimer	729,413
4. Senile dementia	63,685
5. (1) AND (4)	1,931
6. ABS(1) AND ABS(3)	51

Apêndice 2 – Escala NOS

Escala NOS

Referência	Pontos	Seleção			Comparabilidade				Resultados	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
M. Vanková, et al., 2015	6	1	0	0	1	1	1	1	1	0
C.E. Marx, et al., 2006	5	1	0	0	1	1	0	1	1	0
Naylor et al., 2008	5	1	0	0	1	1	0	1	1	0
Naylor et al., 2010	5	1	0	0	1	1	0	1	1	0
Weill-Engerer et al., 2002	5	1	0	0	1	1	0	1	1	0