



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Marta Salvado Abreu Castelo Branco

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Terapia Génica na Diabetes *Mellitus* tipo 1” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Ana Pedro, da Dra. Andreia Ferreira e do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019

**Marta Salvado Abreu Castelo Branco**

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Terapia Génica na Diabetes *Mellitus* tipo I” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Ana Pedro, da Dra. Andreia Ferreira e do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

**Setembro 2019**



UNIVERSIDADE D  
**COIMBRA**

Eu, Marta Salvado Abreu Castelo Branco, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº2014213871, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Terapia génica na Diabetes *Mellitus* tipo I” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 4 de setembro de 2019.

Marta Salvado Abreu Castelo Branco

(Marta Salvado Abreu Castelo Branco)

## **Agradecimentos**

Chegou ao fim uma das etapas mais gratificantes, desafiantes e importantes da minha vida. Neste sentido, não podia deixar de expressar a minha reconhecida gratidão a todos os que, de alguma forma, contribuíram para que estes 5 anos fossem incríveis.

À minha mãe, Ana Maria Salvado, por todo o carinho, atenção e disponibilidade. Por todas as chamadas a ouvir os meus monólogos, por todas as idas a Coimbra para garantir que era bem alimentada em alturas de exames e por todas as sopinhas, que são as melhores do mundo, e que me fizeram tanta companhia em noites e madrugadas de estudo. Obrigada por seres o meu braço direito em tudo!

Ao meu pai, João Castelo Branco, por ser um incrível ouvinte de todos os meus dramas e preocupações e por me demonstrar que com trabalho, dedicação e determinação, tudo é possível. Obrigada por teres sempre acreditado em mim!

Ao meu maninho, Tiago Castelo Branco, que é um chato e que, quando quer, enerva-me solenemente. Mas se não fosse assim, não era um irmão a sério, certo? Obrigada por tudo maninho!

Ao meu namorado, Dinis Lucas, que certamente é um amor para a vida, e que sempre me apoiou e acreditou em mim. Obrigada por me teres feito crescer e por me teres tornado uma pessoa mais completa. Sem ti, Coimbra, não teria tido sentido!

A toda a minha família, por todo o carinho e apoio ao longo destes anos!

Ao Ferozinho, que é o melhor cão do mundo. Obrigada pela companhia e pelos dias tão felizes que já partilhámos!

Às minhas amigas, Miléne Ferreira e Sandra Vale, por terem sido, genuinamente, a minha base ao longo destes 5 anos. Guardo-vos com grande carinho e com a certeza de que partilharemos muitos mais momentos incríveis ao longo dos próximos anos. Obrigada por todas as memórias que criámos juntas.

À minha madrinha de praxe, Margarida Dias, por todos os resumos e powerpoints com apontamentos milagrosos. Não podia ter pedido melhor pessoa para me guiar nestes anos. Obrigada por todo o carinho, paciência e atenção.

Às minhas colegas de casa, Beatriz Melo, Margarida Batista, e Alexandra Rodrigues, por terem sido a minha alegria do início ao fim do dia. Obrigada por me terem feito sentir em casa, na nossa casa incrível, e por tudo o que crescemos juntas.

À Marta Silva, a minha companheira de casa mais tardia, que me inspirou com os seus pratos quase vegetarianos, e que partilhou comigo o desespero de vésperas de exames. Obrigada pela companhia e pela partilha destes últimos meses!

Aos meus amigos de Viseu, que já fazem parte da minha vida há bastante tempo. Os cafezinhos de sábado e as férias muito mal planeadas, mas muito felizes, fizeram, fazem e farão sempre parte de nós. Obrigada por continuarem sempre presentes!

A toda a equipa do desenvolvimento galénico da Bluepharma, pela atenção, carinho e disponibilidade.

A toda a equipa da Farmácia Mouro por terem sido incansáveis comigo.

A todos os professores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por terem contribuído para a minha formação académica.

Ao Professor Doutor Luís Pereira de Almeida, pela disponibilidade e por me inspirar a ser melhor profissional todos os dias.

A Coimbra, por me ter recebido tão bem, e por me ter feito sentir em casa. Não podia ter tido mais sorte com a cidade que escolhi.

O meu mais sincero obrigada a todos!

## Índice

### Parte I - Relatório de Estágio Curricular em Indústria Farmacêutica

|  |    |
|--|----|
| <b>Abreviaturas</b> .....                                    | 9  |
| <b>1. Introdução</b> .....                                   | 10 |
| <b>2. Sector de Desenvolvimento Galénico</b> .....           | 11 |
| <b>3. Análise SWOT – Bluepharma</b> .....                    | 12 |
| <b>3.1. Pontos Fortes</b> .....                              | 12 |
| 3.1.1. Ambiente de Trabalho .....                            | 12 |
| 3.1.2. Formações contínuas.....                              | 13 |
| 3.1.3. Processo de seleção.....                              | 13 |
| 3.1.4. Filosofia <i>Kaizen</i> .....                         | 13 |
| <b>3.2. Pontos Fracos</b> .....                              | 14 |
| 3.2.1. Duração de estágio .....                              | 14 |
| 3.2.2. MICF e Indústria farmacêutica.....                    | 14 |
| <b>3.3. Oportunidades</b> .....                              | 15 |
| 3.3.1. Competências extracurriculares.....                   | 15 |
| 3.3.2. Experiência na área de Desenvolvimento Galénico ..... | 15 |
| <b>3.4. Ameaças</b> .....                                    | 18 |
| 3.4.1. Limitações nas instalações .....                      | 18 |
| 3.4.2. Concorrência profissional .....                       | 18 |
| <b>4. Conclusão</b> .....                                    | 19 |
| <b>5. Anexos</b> .....                                       | 20 |
| <b>6. Bibliografia</b> .....                                 | 24 |

### Parte II - Relatório de Estágio Curricular em Farmácia Comunitária

|   |    |
|---|----|
| <b>Abreviaturas</b> .....                                 | 26 |
| <b>1. Introdução</b> .....                                | 27 |
| <b>2. Análise SWOT – Farmácia Mouro</b> .....             | 28 |
| <b>2.1. Pontos Fortes</b> .....                           | 28 |
| 2.1.1. Localização.....                                   | 28 |
| 2.1.2. Horário alargado .....                             | 28 |
| 2.1.3. Planificação do Estágio: aprendizagem faseada..... | 29 |
| 2.1.4. Equipa técnica.....                                | 31 |
| 2.1.5. Serviços disponibilizados.....                     | 31 |
| <b>2.2. Pontos Fracos</b> .....                           | 32 |
| 2.2.1. Timing do estágio .....                            | 32 |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.2.2. MICF e Farmácia Comunitária.....  | 33        |
| <b>2.3. Oportunidades .....</b>  | <b>33</b> |
| 2.3.1. Heterogeneidade de utentes .....  | 33        |
| 2.3.2. Papel do Farmacêutico.....  | 33        |
| 2.3.3. Formações contínuas.....  | 34        |
| <b>2.4. Ameaças.....</b>   | <b>35</b> |
| 2.4.1. Concorrência de estabelecimentos de venda de medicamentos não sujeitos a<br>receita médica.....       | 35        |
| 2.4.2. Produtos esgotados .....  | 35        |
| 2.4.3. Pedido de medicamentos sujeitos a receita médica sem apresentação de receita<br>médica.....           | 36        |
| <b>3. Conclusão .....</b>  | <b>37</b> |
| <b>4. Anexo .....</b>  | <b>38</b> |
| <b>5. Bibliografia.....</b>  | <b>39</b> |
| <b>Parte III - Monografia “Terapia Génica na Diabetes Mellitus tipo I”</b>                                   |           |
| <b>Resumo.....</b>   | <b>41</b> |
| <b>Abstrat.....</b>  | <b>42</b> |
| <b>Abreviaturas.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>1. Introdução .....</b>   | <b>45</b> |
| <b>2. Epidemiologia.....</b>   | <b>46</b> |
| <b>3. Diabetes Mellitus tipo I .....</b>   | <b>46</b> |
| 3.1. Contextualização da terapêutica atual.....  | 48        |
| <b>4. Terapia Génica.....</b>  | <b>49</b> |
| 4.1. Breve contextualização histórica.....   | 49        |
| 4.2. Princípios e aplicações.....  | 49        |
| 4.3. Sistemas de transporte: vetores.....  | 51        |
| 4.3.1. Vetores virais .....  | 52        |
| <b>5. Terapia Génica na Diabetes Mellitus tipo I auto-imune .....</b>  | <b>54</b> |
| <b>5.1. Prevenção da destruição auto-imune das células <math>\beta</math> pancreáticas.....</b>              | <b>54</b> |
| 5.1.1. Imunorregulação com citocinas .....   | 55        |
| 5.1.2. Considerações relativas à prevenção da destruição auto-imune das células $\beta$<br>pancreáticas..... | 56        |
| <b>5.2. Regeneração de células <math>\beta</math> pancreáticas .....</b>                                     | <b>56</b> |
| 5.2.1. O pâncreas.....   | 58        |
| 5.2.2. Transdiferenciação de células somáticas adultas em células $\beta$ pancreáticas .....                 | 60        |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.2.2.1 Considerações relativas à transdiferenciação de células somáticas adultas em células $\beta$ pancreáticas.....                             | 61        |
| 5.2.3. Diferenciação de células $\beta$ pancreáticas a partir de células estaminais pluripotentes induzidas(iPSC).....                             | 62        |
| 5.2.3.1 Considerações relativas à diferenciação de células $\beta$ pancreáticas a partir de células estaminais pluripotentes induzidas (iPSC)..... | 63        |
| <b>5.3. Produção de insulina em células não <math>\beta</math></b> .....   | <b>64</b> |
| 5.3.1. Características do órgão/célula alvo .....  | 64        |
| 5.3.2. Características da insulina produzida.....  | 66        |
| 5.3.3. Características do sistema de transporte .....  | 67        |
| 5.3.4. Considerações relativas à produção de insulina em células não $\beta$ .....   | 67        |
| <b>5.4. Sistematização das principais características das estratégias de terapia génica abordadas</b> .....  | <b>68</b> |
| <b>6. Conclusão</b> .....  | <b>69</b> |
| <b>7. Anexos</b> .....   | <b>70</b> |
| <b>8. Bibliografia</b> .....   | <b>72</b> |



# **Parte I - Relatório de Estágio Curricular em Indústria Farmacêutica**

Bluepharma, Indústria Farmacêutica, S.A.



**Orientadora:** Dra. Ana Pedro

## Abreviaturas

|          |  |
|----------|--|
| BHA      | Butilhidroxianisol                                     |
| CTD      | <i>Common Technical Document</i>                       |
| DAG      | Desenvolvimento Analítico e Galénico                   |
| EPI      | Equipamentos de proteção individual                    |
| I&D      | Investigação e Desenvolvimento                         |
| INFARMED | Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde |
| IPC      | <i>In-process control</i>                              |
| MICF     | Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas           |
| RP       | Medicamento de referência                              |
| SWOT     | <i>Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats</i>   |

## I. Introdução

O plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) culmina com a realização de um estágio curricular em áreas que envolvam o sector farmacêutico, de forma a favorecer a familiarização com as futuras saídas profissionais.

Neste contexto, além do estágio em Farmácia Comunitária, optei por estagiar também em Indústria Farmacêutica, uma vez que considero ser uma área com manifesto e crescente relevo na sociedade e no mercado atual entendendo, também, ser pertinente perceber qual a função do farmacêutico na mesma.

Assim, estagiei de 7 de janeiro a 29 de março na Bluepharma, enquadrada no departamento de Desenvolvimento Analítico e Galénico (DAG), sob orientação da Dra. Ana Pedro e com a cooperação da restante equipa. Durante este período, foi-me dado a conhecer o funcionamento geral da empresa e, em particular, a atividade e funcionalidades do sector de desenvolvimento galénico na Bluepharma.

A Bluepharma é uma empresa farmacêutica com atividade industrial sediada em Coimbra, que produz formas farmacêuticas sólidas: comprimidos e cápsulas. A sua atividade percorre toda a cadeia de valor do medicamento, desde a Investigação e Desenvolvimento (I&D) até ao mercado, centralizando-se em 3 áreas: na produção de medicamentos próprios e para terceiros, na investigação, desenvolvimento e registo de medicamentos e na comercialização de medicamentos genéricos<sup>1</sup>.

Com a intensa globalização dos últimos tempos, o setor farmacêutico tem-se tornado cada vez mais competitivo e complexo, sendo por isso essencial, a par das atividades de investigação, apostar no desenvolvimento de novas formulações que respondam às crescentes necessidades do mercado de patentes e que assegurem elevados níveis de qualidade, segurança e eficácia<sup>2</sup>. Para tal, é fulcral que exista um setor de desenvolvimento galénico que tenha como principal objetivo a expansão do portfólio de medicamentos genéricos.

O presente relatório é elaborado sob a forma de uma análise SWOT (do inglês: *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), e nesse contexto, salientarei a nível interno, os pontos fortes e os pontos fracos e a nível externo, as oportunidades e ameaças, que resultam de uma avaliação crítica do estágio e da Bluepharma.

## 2. Sector de Desenvolvimento Galénico

Como já foi referido, tive oportunidade de integrar o Departamento de Desenvolvimento Analítico e Galénico (DAG), que se subdivide nos seguintes sectores: Desenvolvimento Analítico (I, II, III), Apoio ao Galénico, Estabilidades e Desenvolvimento Galénico.

Na Bluepharma, o DAG tem como principal objetivo o desenvolvimento de medicamentos genéricos, que segundo a Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (INFARMED), são “medicamentos com a mesma substância ativa, forma farmacêutica, dosagem e indicação terapêutica que o medicamento original, de marca, que serviu de referência (RP), estando dispensada a apresentação de ensaios pré-clínicos e clínicos desde que demonstrada a bioequivalência com base em estudos de biodisponibilidade”<sup>3</sup>.

O sector de desenvolvimento galénico, onde estagiei, é responsável pelo desenvolvimento de formulações e processos de fabrico com vista à obtenção de medicamentos genéricos, como referido anteriormente. Tem também como função a optimização de técnicas quer para a melhoria dos processos de fabrico, quer para a implementação de transferências de tecnologia, possuindo, para esse efeito, um laboratório de scale-up, onde são produzidos os lotes de registo dos medicamentos.

Além disso, é também responsável pela preparação da documentação necessária para submissão às entidades regulamentares, nomeadamente a seção 3.2.P.2 do *Common Technical Document* (CTD).

É notório que, pelo referido anteriormente, o setor de desenvolvimento galénico tem um papel essencial e integrante no desenvolvimento do produto farmacêutico, em particular no desenvolvimento de genéricos, devendo assegurar que estes apresentam elevados padrões de qualidade. Nesse contexto, os desenvolvimentos integram tanto quanto possível a abordagem de *Quality by Design*, que defende que a qualidade não deve ser testada, mas sim planeada e incorporada num produto, começando com objetivos predefinidos e assegurando o controlo dos processos e procedimentos, alicerçando-se em metodologias de gestão de riscos<sup>4</sup>.

A Bluepharma dispõe de dois laboratórios onde podem ser efetuados testes galénicos: o laboratório de formulações, onde são desenvolvidas as pré-formulações, formulações e os processos de fabrico à escala laboratorial e o laboratório Scale-up onde é realizado o aumento de escala de lotes laboratoriais para tamanhos de lote pré-piloto, *feasibility* e piloto, onde se pode avaliar o impacto da mudança de escala e proceder às necessárias alterações no processo de fabrico. Após a validação do método de fabrico à escala piloto, estes lotes

são submetidos a ensaios clínicos, para demonstração da bioequivalência pivotal entre o medicamento genérico e o RP.

O laboratório Scale-up tem ainda uma zona de contenção, onde são manipulados medicamentos potentes, cujos efeitos negativos para a saúde de um operador se atingem a concentrações muito pequenas e por isso requerem mais cuidado na manipulação e contenção dos processos. Esta zona permite minimizar ou eliminar a exposição dos operadores e/ou áreas envolventes à substância ativa que está a ser manipulada.

Durante o desenvolvimento galénico é importante, em cumprimento das boas práticas de fabrico, assegurar a limpeza e higienização de todas as instalações e equipamentos onde ocorra manipulação do produto.

Importante também é, antes da manipulação de qualquer produto, consultar a ficha de dados de segurança da substância ativa e dos excipientes em questão, de forma a conhecer os equipamentos de proteção individual (EPI) a utilizar.

### 3. Análise SWOT – Bluepharma

**Tabela I -** Matriz SWOT do estágio na Bluepharma

|                  | <b>Pontos Fortes</b>                            | <b>Pontos Fracos</b>          |
|------------------|---|-------------------------------|
| Dimensão interna | Ambiente de trabalho                            | Duração de estágio            |
|                  | Formações contínuas                             |                               |
|                  | Processo de seleção                             | MICF e Indústria farmacêutica |
|                  | Filosofia <i>Kaizen</i>                         |                               |
|                  | <b>Oportunidades</b>                            | <b>Ameaças</b>                |
| Dimensão externa | Competências extracurriculares                  | Limitações nas instalações    |
|                  | Experiência na área de Desenvolvimento Galénico | Concorrência profissional     |

#### 3.1. Pontos Fortes

##### 3.1.1. Ambiente de Trabalho

Certamente sem ser inovadora, considero este ponto primordial uma vez que acredito que o sucesso de qualquer estágio em geral, e deste em particular, em muito depende do ambiente e da forma como somos recebidos, enquadrados no serviço e guiados durante o período de estágio.

Neste aspeto, o balanço não podia ser mais positivo.

Desde o primeiro dia existiu predisposição de todos os colaboradores do departamento visando a minha inclusão, com atitudes que em muito contribuíram para um saudável ambiente de compreensão, cumplicidade e partilha de conhecimentos.

Na Bluepharma, a cada estagiário é atribuído um tutor que é responsável pela sua integração na empresa e em particular no departamento. No meu caso, foi a Dra. Ana Pedro, mas como já referi, rapidamente senti apoio e acompanhamento por parte de toda a equipa, a quem muito agradeço.

### **3.1.2. Formações contínuas**

Ao longo dos 3 meses de estágio na Bluepharma, tive oportunidade de assistir a mais de 10 formações, desde as iniciais, sobre o funcionamento e estrutura da empresa, bem como formações contínuas que abordavam temas relevantes nas mais diversas áreas.

Neste seguimento, posso destacar a formação em “Sistema de Gestão integrado e Boas Práticas de Fabrico”, “Melhoria Contínua” e “Ambiente, Saúde e Segurança no Trabalho”.

Considero que estas formações são extremamente importantes, uma vez que potenciam a familiarização com a empresa e com as várias áreas transversais do sector farmacêutico. Além disso, constituem ferramentas, que aliadas ao conhecimento adquirido durante os cinco anos de MICF, complementam a nossa formação, permitindo que nos destaquemos dos demais.

### **3.1.3. Processo de seleção**

Na Bluepharma, há valorização do Curriculum Vitae e realização de uma entrevista, ambos decisivos na seleção do candidato. Considero que este processo é uma mais-valia, uma vez que, para além de serem avaliados outros aspetos que não só a média curricular, ao candidato a estágio permite uma consciencialização de que uma nova etapa vai começar, constituindo uma aprendizagem para o futuro, visto que nos permite compreender, preparar e antecipar o ambiente de uma entrevista de trabalho.

Para além disso, nessa ocasião é também clarificado qual o departamento que vai ao encontro das nossas expectativas e com o que antecipamos maiores ligações permitindo um maior aproveitamento do estágio.

### **3.1.4. Filosofia Kaizen**

A filosofia *Kaizen*, desenvolvida por Masaaki Imai, surgiu no Japão no início da década de 50, como um modelo de gestão que se baseia na produtividade, eficiência operacional,

organização e melhoria contínua. Inicialmente foi aplicada ao sector automóvel, no entanto, atualmente é conhecida e utilizada em todo o mundo<sup>5</sup>.

A equipa do setor de desenvolvimento galénico também a implementou na sua metodologia de trabalho com o objetivo de mudar (“*Kai*”) para melhor (“*Zen*”), o que possibilita a deteção de problemas e a sua resolução muito mais rapidamente<sup>5</sup>.

Neste contexto, são efetuadas reuniões diárias em que são expostos os constrangimentos referentes ao dia anterior, tornando assim possível que todos os elementos do departamento fiquem ao corrente das várias fases dos diversos projetos e que as soluções sejam discutidas, ponderadas e ajustadas em conjunto, permitindo otimizar e tirar maior proveito destas sessões de grupo.

Considero este ponto muito importante porque assimilei bastantes conhecimentos nestas reuniões quer pelo facto de constituírem um meio facilitador de apreender os vários projetos em desenvolvimento no departamento quer, ainda, as suas dificuldades e como superá-las, permitindo complementar toda a minha aprendizagem durante o estágio.

## **3.2. Pontos Fracos**

### **3.2.1. Duração de estágio**

A Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, primando pela diferença, dá oportunidade aos seus alunos de estagiar na área de indústria farmacêutica. No entanto, creio que a duração de estágio neste sector está longe de ser o ideal pelo que entendo que deveria ser ajustada.

O estágio na Bluepharma teve a duração de 3 meses, o que considero ser escasso, uma vez que é necessário consumir parte desse período na habitual integração dos estagiários, em geral, na empresa e, em particular, no departamento a que ficam adstritos para estágio.

Neste enquadramento, entendo que teria sido proveitoso um estágio mais prolongado, para que a aprendizagem fosse mais completa e consolidada o que tenderia a permitir um incremento de autonomia, conhecimento e agilidade nos procedimentos e processos do sector de desenvolvimento galénico.

### **3.2.2. MICF e Indústria farmacêutica**

Embora o plano curricular do MICF seja diversificado em várias áreas do conhecimento, este estágio, permitiu-me identificar algumas lacunas na formação, que envolvem a indústria farmacêutica, e que podem ser melhoradas.

Assim, considero importante que haja sensibilização das diversas funções e da potencialidade que um farmacêutico pode ter numa indústria farmacêutica, assunto que para mim constituiu novidade.

Para além disso, creio ser pertinente um maior investimento no conhecimento da área de assuntos regulamentares que, contrariamente ao que pensava, é transversal aos diversos departamentos da indústria farmacêutica, inclusive ao setor de desenvolvimento galénico, que como já referi anteriormente, é responsável pela elaboração da seção 3.2.P.2 do CTD.

### **3.3. Oportunidades**

#### **3.3.1. Competências extracurriculares**

O plano curricular do MICF contempla a nossa formação académica e confere-nos as bases essenciais para que no futuro consigamos desempenhar as nossas funções como agente do medicamento. No entanto, ao longo do estágio, pude constatar que existem *soft-skills* que requerem experiência profissional para serem desenvolvidas. Deste modo, o espírito de equipa, entajuda e comunicação são capacidades fundamentais para desempenharmos as nossas funções de forma harmoniosa dentro do nosso departamento e com os restantes departamentos. O domínio do inglês é também imprescindível, uma vez que é uma língua universal e a maioria dos clientes da Bluepharma são estrangeiros.

Assim, durante estes três meses, aprendi a valorizar e a desenvolver estas novas competências que por certo se revelarão fundamentais no futuro.

#### **3.3.2. Experiência na área de Desenvolvimento Galénico**

No decorrer do estágio, tive oportunidade de acompanhar vários projetos, o que tornou a experiência bastante enriquecedora, porque pude aprender algumas particularidades dos diferentes processos de fabrico envolvidos.

Por uma questão de confidencialidade, é política da Bluepharma denominar de “Blue” todos os projetos que estão em desenvolvimento galénico. Dos vários Blues que acompanhei, destacarei o Blue 075 (Anexos – Tabela 1 e 2).

O projeto Blue 075 é uma transferência de tecnologia, o que significa que o medicamento foi desenvolvido por outra indústria farmacêutica, houve uma transferência do processo de fabrico para a Bluepharma, podendo ser necessário o scale-up, implementação e validação do processo.

A forma farmacêutica do RP é em comprimidos, mas o objetivo proposto foi implementar o processo de fabrico que resulte em cápsulas com *pellets* e/ou microcomprimidos, optando



pela forma farmacêutica cujo perfil de dissolução demonstre ser bioequivalente em ensaios clínicos.

É transversal a todas as etapas do processo a utilização de máscara panorâmica equipada com filtros de pó P3, *coverall*, luvas de nitrilo, fardas e sapatos com proteções de aço (biqueira), que são os EPI necessários para garantir a segurança do operador.

A substância ativa utilizada é fotossensível e por isso, de forma a evitar a sua fotodegradação, que ocorre maioritariamente a comprimentos de onda baixos entre 500 e 300nm (radiação visível azul, violeta e ultravioleta), as lâmpadas utilizadas durante as etapas de fabrico deverão emitir luz num comprimento de onda acima dos 520nm/540nm (*in actinic light*).

O processo de fabrico, quer dos *pellets* quer dos microcomprimidos, inicia-se com uma micronização da substância ativa, utilizando um moinho a jato. No fundo, é um processo de redução do tamanho de partículas recorrendo, neste caso, a nitrogénio, por ser um gás inerte. O princípio de funcionamento baseia-se numa alimentação de pó tangencial à câmara de moagem, através do sistema de Venturi. Uma vez no interior desta câmara, as partículas de pó são aceleradas por uma série de jatos alimentados pelo sistema Anelar, que entram num movimento em espiral, promovendo a colisão entre as partículas e por sua vez, a redução do seu tamanho<sup>6</sup>. Nesta fase é necessário utilizar um EPI adicional: protetores auriculares.

No caso da produção dos *pellets*, após a micronização, há o revestimento de esferas de açúcar com uma suspensão de substância ativa micronizada. Posteriormente, revestem-se os *pellets* com a suspensão de revestimento (Opadry<sup>®</sup> AMB), que confere proteção contra a humidade. O revestimento e simultânea secagem com fluxo de ar quente é efetuado num equipamento de leite fluidizado, através de um processo de *bottom spray* (*Wurster coating*). Estas etapas constituem a *pelletização*, que mostrou ser uma fase crítica, uma vez é um processo demorado e sensível, que requer acompanhamento constante.

Seguidamente, procede-se ao enchimento de cápsulas com os *pellets* formados.

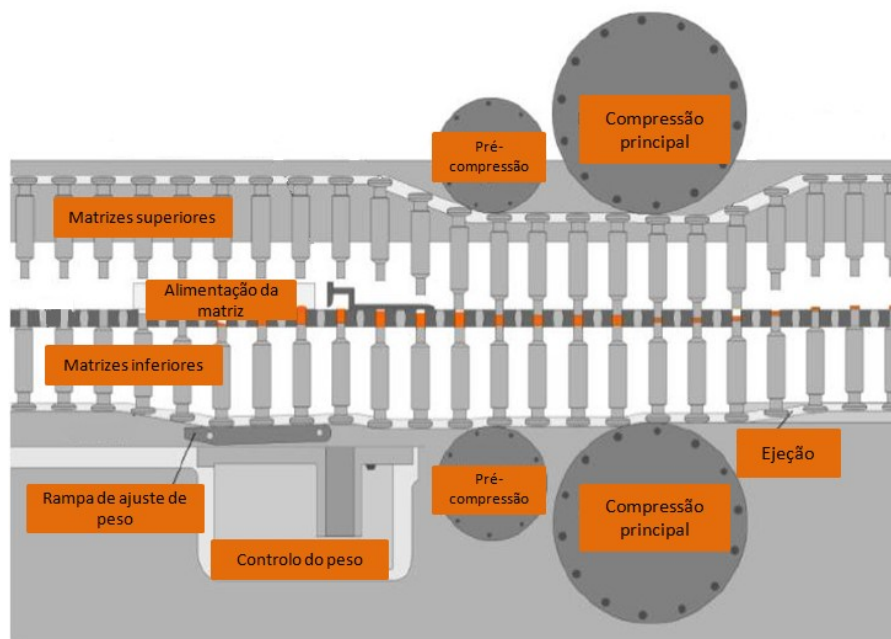
No caso da produção dos microcomprimidos, após a micronização, é feita uma mistura da celulose microcristalina com uma solução etanólica de butilhidroxianisol (BHA), um antioxidante que previne a degradação da substância ativa. De seguida, são adicionados os restantes componentes e misturados de forma a garantir a distribuição uniforme de todos os constituintes. Nesta fase, é feita uma amostragem, para se determinar o doseamento no topo, meio e fundo da mistura e comprovar a sua homogeneidade. Posteriormente, adiciona-se lubrificante à mistura e efetua-se uma granulação a seco, utilizando um compactador de

rolos. A granulação transforma partículas de pó em aglomerados sólidos, que apresentam inúmeras vantagens, como maior facilidade de escoamento, maior compressibilidade e resistência mecânica entre outras<sup>7</sup>. Na granulação a seco, a pressão utilizada na compactação é o agente promotor da formação dos aglomerados sólidos<sup>7</sup>.

Ao granulado formado, é adicionada a segunda parte de lubrificante, seguindo-se novamente uma fase de mistura. Finalmente, estão reunidas as condições para se efetuar uma compressão, formando assim, os microcomprimidos, que serão posteriormente encapsulados à semelhança do referido para os *pellets*.

Na compressão, a mistura é sujeita a uma pressão exercida por dois punções (superior e inferior) no interior de uma câmara, a matriz. Este processo envolve 4 etapas (Figura 1): o enchimento das matrizes, a pré-compressão, com o objetivo de eliminar o ar da mistura e a compressão principal, donde resultam deformações plásticas, elásticas ou fraturas dos constituintes da mistura. Posteriormente, há ejeção do microcomprimido, por elevação da punção inferior.

Ao longo dos processos são efetuados IPC (*in-process control*), de forma a monitorizar os parâmetros considerados críticos. No caso da compressão, são controlados os pesos e as durezas, ajustando, nesse contexto, os *settings* referentes ao enchimento e à compressão.



**Figura 1** – Etapas da fase de compressão. Alimentação e enchimento das matrizes, pré-compressão, compressão principal e ejeção do comprimido<sup>8</sup>.

Igualmente, quer nos processos de fabrico envolvendo *pellets* quer nos microcomprimidos, há realização de diversos testes analíticos, nomeadamente, testes de dissolução, testes de

homogeneidade de mistura, doseamento, impurezas e Karl-Fischer, com o objetivo de aferir a qualidade do produto.

### **3.4. Ameaças**

#### **3.4.1. Limitações nas instalações**

Ao longo dos seus 18 anos, a Bluepharma transformou uma unidade industrial que empregava 58 pessoas numa que, atualmente, emprega cerca de 580 colaboradores <sup>9</sup>. Este crescimento exponencial fez com que as instalações começassem a ser insuficientes para proporcionar as melhores condições aos seus colaboradores e ao desenvolvimento e produção de medicamentos.

Assim, creio que, à semelhança do que já vem sendo feito, a Bluepharma deve continuar a investir na melhoria das suas instalações, para que seja possível acolher mais colaboradores e novos projetos fomentando, deste modo, a sua expansão e reforçando a sua posição no mercado farmacêutico.

#### **3.4.2. Concorrência profissional**

Ao longo do estágio, foi perceptível a versatilidade do farmacêutico na indústria farmacêutica: desde funções em laboratório - como controlo de qualidade e investigação -, a funções em assuntos regulamentares ou desenvolvimento de negócio, o papel do farmacêutico é relevante nas mais diversas áreas.

De acordo com o Estatuto da Ordem dos Farmacêuticos na versão introduzida pela Lei n° 131/2015, de 4 de Setembro (Diário da República, 1ª série n° 173), o “Ato Farmacêutico é da exclusiva competência e responsabilidade dos farmacêuticos” (Cfr Artigo 74 n°1 da supra mencionada Lei)<sup>10</sup>, nomeadamente a atividade de “desenvolvimento e preparação da forma farmacêutica dos medicamentos” (Cfr Artigo 75 a) da supra mencionada Lei)<sup>11</sup>.

Ainda assim, e apesar da equipa de desenvolvimento galénico ser maioritariamente constituída por farmacêuticos, durante estes três meses, tive oportunidade de contactar com profissionais de outras áreas de formação, constatando, neste contexto, que muitos dos colaboradores que não têm instrução base na área do medicamento conseguem, igualmente, responder a muitas necessidades requeridas pela indústria farmacêutica.

Deste modo, resulta evidente a competitividade e concorrência neste sector sendo, por isso, fulcral a contínua formação e especialização do farmacêutico, de forma a garantir a singularidade da sua competência e saber específico para que a Bluepharma continue a ter mercado de trabalho, também, para os farmacêuticos.

#### **4. Conclusão**

Atualmente, devido à crescente competitividade no sector farmacêutico, torna-se da máxima importância um maior empenho na nossa formação académica para que nos consigamos destacar e alcançar um brilhante futuro profissional.

Nesse contexto, o estágio na Bluepharma foi uma experiência muito enriquecedora, uma vez que surgiu como uma oportunidade de consolidar e colocar em prática os conhecimentos adquiridos ao longo do MICEF.

Para além disso, possibilitou o desenvolvimento de novas competências e aptidões, que serão certamente essenciais tanto para o meu crescimento pessoal como profissional.

A área de desenvolvimento galénico mostrou ser bastante desafiante, porque concilia e abrange conhecimento que é transversal a diversas áreas e requer uma grande capacidade de planeamento, comunicação e gestão de tempo.

Fascinou-me, também, por não ser uma atividade rotineira, originando uma constante reflexão e flexibilidade com vista à superação de desafios.

Por outro lado, e não menos importante, é inegável que o desenvolvimento galénico é fundamental na indústria farmacêutica, uma vez que é um agente essencial na aposta em novas formulações e no caso da Bluepharma, em genéricos, que se traduzem em opções económicas mais acessíveis a toda a população, com a garantia de qualidade, segurança e eficácia exigidas.


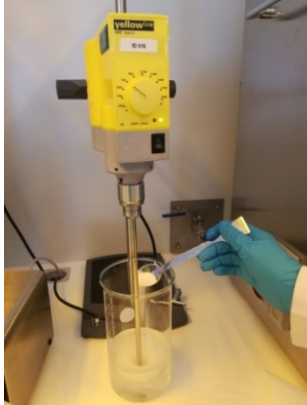

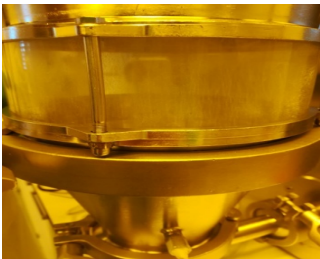
Se tudo o que vai dito permite, em conclusão, apelar de muito positivo o estágio que desenvolvi na Bluepharma não posso, neste momento, deixar de mencionar que tal êxito se deveu, em grande parte, à equipa extraordinária que tive o privilégio de integrar.




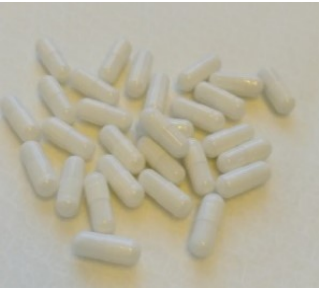
Sendo assim, não podia concluir, sem deixar a minha reconhecida gratidão a todos os elementos do desenvolvimento galénico, pela paciência, carinho, atenção e partilha de saber que me concederam, superando expectativas e tornando a minha experiência de estágio inesquecível.

Obrigada a todos!



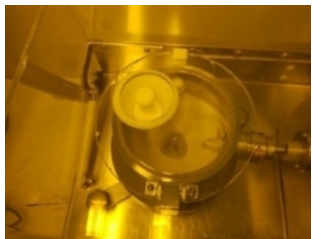


## 5. Anexos



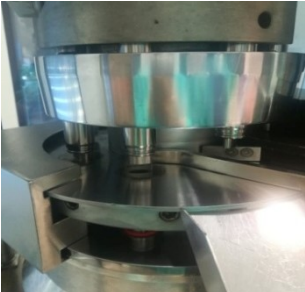

**Tabela I** – Etapas do Processo do Blue 075 - Pellets

| Etapas do Processo   | Parâmetros de processo   | Análises efetuadas  |
|--|--|---|
| <p><b>1) Micronização</b></p> <p><i>Jet Mill</i></p> <p><i>(Moinho a jato)</i></p> |  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Velocidade de alimentação (g/min)</li> <li>• Pressão de Venturi (bar)</li> <li>• Pressão Anelar (bar)</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Tamanho de partícula</li> </ul>  |
| <p><b>2) Preparação da suspensão de API</b></p> <p><i>IKA mixer</i></p>            |  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tempo (min)</li> <li>• Rotação (rpm)</li> </ul>  | <p>Não aplicável</p>  |
| <p><b>3) Revestimento dos Pellets (I)</b></p> <p><i>Mini-Glatt FBD Wurster</i></p> |   <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tempo (min)</li> <li>• T<sup>a</sup> do processo (°C)</li> <li>• Pressão do ar do processo (bar)</li> <li>• Velocidade da bomba peristáltica (rpm)</li> <li>• Pressão do ar de Pulverização (bar)</li> <li>• Peso da suspensão</li> <li>• T<sup>a</sup> do produto</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Doseamento da substância ativa</li> <li>✓ Doseamento do BHA</li> </ul> |

| Etapas do Processo   |   | Parâmetros de processo   | Análises efetuadas   |
|--|---|--|--|
| <p><b>4) Preparação da suspensão de revestimento (Opadry® AMB)</b></p> <p><i>IKA mixer</i></p> |    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tempo (min)</li> <li>• Rotação (rpm)</li> </ul>   | <p>Não aplicável</p>   |
| <p><b>5) Revestimento dos Pellets (II)</b></p> <p><i>Mini-Glatt FBD Wurster</i></p>            | <br> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tempo (min)</li> <li>• T<sup>a</sup> do processo (°C)</li> <li>• Pressão do ar do processo (bar)</li> <li>• Velocidade da bomba peristáltica (rpm)</li> <li>• Pressão do ar de Pulverização (bar)</li> <li>• Peso da suspensão</li> <li>• T<sup>a</sup> do produto</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Doseamento da substância ativa</li> <li>✓ Doseamento do BHA</li> </ul>  |
| <p><b>6) Enchimento de cápsulas</b></p> <p><i>Manual</i></p>                                   |    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Peso das cápsulas</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Doseamento da substância ativa</li> <li>✓ Doseamento do BHA</li> <li>✓ Dissolução</li> <li>✓ Karl-Fischer</li> <li>✓ Impurezas</li> </ul> |

**Tabela 2 – Etapas do Processo do Blue 075 – Microcomprimidos**

| Etapas do Processo  |   | Parâmetros de processo   | Análises efetuadas  |
|---|---|--|---|
| <p><b>1) Micronização</b></p> <p><i>Jet Mill</i></p> <p><i>(Moinho a jato)</i></p>      |    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Velocidade de alimentação</li> <li>• (g/min)</li> <li>• Pressão de Venturi (bar)</li> <li>• Pressão Anelar (bar)</li> </ul> | <p>✓ Tamanho de partícula</p>   |
| <p><b>2) Wetting</b></p> <p><i>High-shear Granulator</i></p> <p><i>Mini Glatt</i></p>   | <br> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tempo (min)</li> <li>• Velocidade das pás do misturador e triturador (rpm)</li> </ul>                                       | <p>Não aplicável</p>  |
| <p><b>3) Mistura</b></p> <p><i>Double cone blender</i></p> <p><i>Erweka</i></p>         |    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tempo (min)</li> <li>• Rotação (rpm)</li> </ul>   | <p>✓ Doseamento: topo, meio e fundo (Teste de homogeneidade de mistura)</p> |
| <p><b>4) Mistura Final I</b></p> <p><i>Double cone blender</i></p> <p><i>Erweka</i></p> |    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tempo (min)</li> <li>• Rotação (rpm)</li> </ul>   | <p>Não aplicável</p>  |

| Etapas do Processo   |   | Parâmetros de processo  | Análises efetuadas   |
|--|---|---|--|
| <p><b>5) Granulação a seco</b></p> <p><i>Alexander Werk<br/>WPI 20</i></p>     |    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alimentação do sem fim (rpm)</li> <li>• Pressão (bar)</li> <li>• Espaçamento entre rolos (mm)</li> </ul>                   | <p>Não aplicável</p>   |
| <p><b>6) Mistura Final II</b></p> <p><i>Double cone blender<br/>Erweka</i></p> |    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tempo (min)</li> <li>• Rotação (rpm)</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Doseamento: topo, meio e fundo (Teste de homogeneidade de mistura)</li> <li>✓ Doseamento: topo, meio e fundo (BHA)</li> </ul>                 |
| <p><b>7) Compressão</b></p> <p><i>Compressing Machine<br/>Ronchi</i></p>       |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dureza</li> <li>• Espessura</li> <li>• Diâmetro</li> <li>• Pré-compressão</li> <li>• Enchimento</li> <li>• Peso</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Dissolução</li> <li>✓ Doseamento da substância ativa</li> <li>✓ Doseamento do BHA</li> <li>✓ Desagregações</li> <li>✓ Friabilidade</li> </ul> |
| <p><b>8) Enchimento de cápsulas</b></p> <p><i>Manual</i></p>                   |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Peso das cápsulas</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Dissolução</li> <li>✓ Doseamento da substância ativa</li> <li>✓ Doseamento do BHA</li> <li>✓ Impurezas</li> <li>✓ Karl-Fischer</li> </ul>     |



## 6. Bibliografia

1. BLUEPHARMA - **Quem somos**. [Acedido a 25 de fevereiro de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.bluepharma.pt/about-us.php>
2. BLUEPHARMA - **Desenvolvimento Galénico e Analítico**. [Acedido a 10 de fevereiro de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.bluepharma.pt/innovation/development.php>
3. INFARMED, I.P – **Perguntas Frequentes, Medicamentos de Uso Humano, Medicamentos Genéricos**. [Acedido a 3 de fevereiro de 2019]. Disponível na Internet: [http://www.infarmed.pt/web/infarmed/perguntas-frequentes-area-transversal/medicamentos\\_uso\\_humano/muh\\_medicamentos\\_genericos](http://www.infarmed.pt/web/infarmed/perguntas-frequentes-area-transversal/medicamentos_uso_humano/muh_medicamentos_genericos)
4. ICH – **Consensus guideline Q8, pharmaceutical development**, 2007. [Acedido a 4 de fevereiro de 2019]. Disponível na Internet: [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q8\\_R1/Step4/Q8\\_R2\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf)
5. KAIZEN INSTITUTE - **Quem somos**. [Acedido a 9 de fevereiro de 2019]. Disponível na Internet: <https://pt.kaizen.com/quem-somos/significado-de-kaizen.html>
6. JET MILL MFG - **Jet Mill Working Principle**. [Acedido a 20 de fevereiro de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.jetmillmfg.com/jet-mill-working-principle/>
7. PETROVICK, G. F.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. - **Granulação e revestimento em leite fluidizado**. Caderno de Farmácia. **22** (2006) 107-118.
8. TA, J.- **Tablet Compression**, 2018. [Acedido a 11 de fevereiro de 2019]. Disponível na Internet em: <https://www.vitexpharma.com/2018/06/04/tablet-compression/>
9. BLUEPHARMA - **Grupo Bluepharma**. [Acedido a 1 de março de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.bluepharma.pt/about-bluepharmagroup.php>
10. PORTUGAL. Diário da República – **Decreto-Lei nº131/2015**, de 4 de setembro, Capítulo VI, Artigo 74º, Série I de 2015-09-04. Ministério da Saúde.
11. PORTUGAL. Diário da República – **Decreto-Lei nº131/2015**, de 4 de setembro, Capítulo VI, Artigo 75º, Série I de 2015-09-04. Ministério da Saúde.

# **Parte II - Relatório de Estágio Curricular em Farmácia Comunitária**

Farmácia Mouro



**Orientadora:** Dra. Andreia Ferreira

## Abreviaturas

|       |  |
|-------|--|
| AFP   | Associação de Farmácias de Portugal                  |
| ANF   | Associação Nacional de Farmácias                     |
| ARA   | Antagonista dos recetores da angiotensina            |
| CCF   | Centro de Conferência de Faturas                     |
| IECA  | Inibidores da enzima de conversão da angiotensina    |
| MICF  | Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas         |
| MNSRM | Medicamento não sujeito a receita médica             |
| MSRM  | Medicamento sujeito a receita médica                 |
| SNS   | Sistema Nacional de Saúde                            |
| SWOT  | <i>Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats</i> |

## I. Introdução

Nos últimos tempos, a farmácia comunitária tem evoluído gradualmente para um espaço mais próximo da sociedade, que disponibiliza uma gama variada de produtos e serviços que promovem a saúde do utente e aumentam a sua qualidade de vida, com atendimentos personalizados e dirigidos às suas necessidades. Na verdade, para uma grande maioria dos utentes, a farmácia constitui o primeiro local onde explanam as suas preocupações e procuram soluções para os seus problemas de saúde.

Nesse contexto, o farmacêutico comunitário tem um papel extremamente relevante na adesão à terapêutica e no uso responsável do medicamento, na deteção de comportamentos de risco e na educação para a saúde. Assim, é imprescindível, como futuros profissionais de saúde e do medicamento, que desenvolvamos um conjunto de características que tornem o aconselhamento farmacêutico de excelência. A comunicação, o saber escutar e a empatia que criamos junto ao utente é imprescindível para ganhar a sua confiança. No entanto, são características que requerem prática e perseverança para serem desenvolvidas e por isso, como futura farmacêutica, considero ser essencial um estágio curricular em farmácia comunitária, que me permita contactar com a realidade profissional e desenvolver novas competências, técnicas e sociais, essenciais para um bom desempenho profissional. Para além disso, é mais uma oportunidade de complementar a minha formação e consolidar os conhecimentos adquiridos ao longo do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF).

Neste contexto, o meu estágio curricular ocorreu na Farmácia Mouro, em Viseu, sob orientação da Dra. Andreia Ferreira e direção técnica da Dra. Ana Paula Pipa. O estágio iniciou-se no dia 1 de abril e terminou a 13 de julho e, durante este período, foi-me dada a conhecer a dinâmica de uma farmácia comunitária e a importância do farmacêutico na mesma.

O presente relatório é elaborado sob a forma de uma análise SWOT (do inglês: *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), e nesse contexto, salientarei a nível interno, os pontos fortes e os pontos fracos e a nível externo, as oportunidades e ameaças, que resultam de uma avaliação crítica do estágio e da Farmácia Mouro.

## 2. Análise SWOT – Farmácia Mouro

**Tabela I** - Matriz SWOT da Farmácia Mouro

|                  | <b>Pontos Fortes</b>                             | <b>Pontos Fracos</b>  |
|------------------|--|---|
| Dimensão interna | Localização                                      | Timing do estágio   |
|                  | Horário alargado                                 |   |
|                  | Planificação do estágio:<br>aprendizagem faseada | MICF e Farmácia Comunitária   |
|                  | Equipa técnica                                   |   |
|                  | Serviços disponibilizados                        |   |
|                  | <b>Oportunidades</b>                             | <b>Ameaças</b>  |
| Dimensão externa | Heterogeneidade de utentes                       | Concorrência de estabelecimentos de venda de medicamentos não sujeitos a receita médica |
|                  | Papel do Farmacêutico                            | Produtos esgotados  |
|                  | Formações contínuas                              | Pedido de medicamentos sujeitos a receita médica sem apresentação de receita médica     |

### 2.1. Pontos Fortes

#### 2.1.1. Localização

A Farmácia Mouro encontra-se situada na proximidade de três grandes instituições de saúde - do Hospital São Teotónio, do Centro de Saúde Viseu III e da CUF Viseu -, usufruindo, deste modo, de uma posição estratégica que amplia a procura de serviços farmacêuticos. Além disso, está numa zona de fácil acesso no que diz respeito a transportes públicos, dispondo também de um grande área envolvente de estacionamento, o que facilita o acesso dos utentes em viatura própria. Tudo isto se configura muito convidativo e promove a grande afluência de utentes que caracteriza esta farmácia.

#### 2.1.2. Horário alargado

O horário de funcionamento da Farmácia Mouro é bastante alargado: de segunda a sábado das 8h às 23h. De facto, é um aspeto muito vantajoso, porque assim é possível garantir o atendimento a um maior número de pessoas, abrangendo as diferentes disponibilidades horárias dos utentes.

### 2.1.3. Planificação do Estágio: aprendizagem faseada

O estágio na Farmácia Mouro envolveu diversas fases, as quais me permitiram perceber as diferentes funcionalidades de uma farmácia e o enquadramento do ato farmacêutico nas mesmas.

Inicialmente, as minhas funções focaram-se na área do *back-office*, nomeadamente na receção de encomendas, verificação de prazos de validade e arrumação de produtos farmacêuticos de acordo com a regra “*first in, first out*”. Esta etapa foi fundamental, uma vez que me permitiu contactar com todos os medicamentos existentes na farmácia e assim potenciar a familiarização com os nomes comerciais, ultrapassando, desta forma, parte da fragilidade, inicial dos estagiários, em associar a substância ativa ao nome do medicamento. Para além disso, deu-me a conhecer alguns dos aspetos que envolvem a gestão de uma farmácia que, hoje em dia, é fundamental para a manter economicamente viável, designadamente a importância de gerir stocks de uma forma inteligente e consoante as saídas mensais dos produtos. Durante esta fase, fiquei também encarregue de efetuar a reposição diária dos produtos farmacêuticos nas gavetas e nos lineares, de forma a conhecer a sua disposição, para a posteriori, agilizar o atendimento ao balcão.

Depois, seguiu-se a fase de verificação e processamento de receituário. Esta etapa revelou-se fundamental para garantir a dispensa correta de medicamentos ao balcão, bem como a recuperação do valor das participações, salvaguardando tanto os interesses do utente como os da farmácia. Neste seguimento, aprendi a analisar e interpretar uma receita materializada e as suas particularidades e, ainda, a selecionar os regimes de participação e sistemas de complementaridade aplicáveis a cada caso. Na farmácia Mouro existem dois momentos de verificação destas receitas: o primeiro é feito ao balcão, em que é observado a existência de um conjunto de elementos necessários para se processar a receita e aviar os medicamentos, tais como os dados do utente (nome, número de utente), exceção legal, validade, vinheta e assinatura do médico. O corpo da receita, onde estão descritos os medicamentos a aviar, deve ser claro e cumprir as regras do número máximo de dispensa de medicamentos. No caso de existirem rasuras, estas devem ser devidamente rubricadas pelo médico. O segundo e último momento de verificação de receitas fica a cargo de um dos colaboradores, sendo tarefa de rotação mensal entre todos os membros da Farmácia Mouro. Nesta fase que é feita gradualmente ao longo do mês, para detetar mais precocemente possíveis erros, são novamente verificados os elementos obrigatórios já referidos, bem como se os medicamentos prescritos coincidem com os medicamentos cedidos. À medida que são analisadas, as receitas vão sendo organizadas por lotes, cada um

com 30 receitas e divididos de acordo com o sistema de comparticipação ou as complementaridades respetivas. Quando são detetadas irregularidades, são colocadas de parte para posterior análise e resolução. Após terminar o processo de validação de receitas, estas são guardadas até ao fecho da faturação, que consiste na organização mensal de toda a documentação necessária para enviar às entidades responsáveis pelo pagamento das comparticipações à farmácia. Assim sendo, todas as receitas comparticipadas pelo Sistema Nacional de Saúde (SNS) são enviadas para o Centro de Conferência de Faturas (CCF) e as restantes complementaridades à Associação de Farmácias de Portugal (AFP), no caso da farmácia Mouro, ou à Associação Nacional de Farmácias (ANF), no caso das farmácias consideradas farmácias portuguesas.

Durante o estágio, tive também oportunidade de observar e preparar alguns medicamentos manipulados, com a supervisão de um farmacêutico experiente nesta área. A elaboração de medicamentos manipulados é uma mais-valia, em geral, para a farmácia e, em particular, para o farmacêutico, por constituir uma área de excelência de demonstração dos seus conhecimentos teórico-práticos.

Após esta fase inicial e introdutória à farmácia e às suas rotinas, a minha atividade centralizou-se preferencialmente no atendimento ao balcão. Comecei por assistir a vários atendimentos da equipa técnica da Farmácia Mouro, tendo a oportunidade de aprender e constatar a importância da comunicação e do papel do farmacêutico no aconselhamento e na adesão à terapêutica, aspetos fundamentais para um atendimento de excelência. De seguida, iniciei o atendimento ao balcão, acompanhada pela minha tutora Dra. Andreia, que me apoiava sempre que necessário. Posteriormente, comecei a atender ao balcão de uma forma mais autónoma, mas sabendo sempre que poderia contar com a disponibilidade de qualquer elemento da equipa para o esclarecimento de dúvidas. Esta fase, que se prolongou até ao final do estágio, foi muito desafiante, uma vez que tive de aprimorar as minhas capacidades de comunicação, adaptando os conhecimentos que adquiri ao longo do curso a cada situação, porque cada utente é diferente e por isso, a abordagem é necessariamente diferente e personalizada. Deste modo, é possível garantir um atendimento de qualidade e a satisfação do utente, que é o nosso propósito final enquanto futuros profissionais de saúde.

Sem dúvida que, a planificação sequencial do estágio foi fundamental, uma vez que me permitiu uma aprendizagem mais consolidada e abrangente do ciclo de vida dos produtos farmacêuticos, desde da sua entrada na farmácia até à dispensa ao utente. Por outro lado, permitiu a minha evolução de uma forma gradual, faseada e concisa, o que tornou esta experiência muito gratificante.

#### **2.1.4. Equipa técnica**

A Farmácia Mouro é constituída por uma equipa técnica de excelência com grande espírito de equipa e ética profissional, determinação em fazer bem, educação e competência, aspetos que são valorizados e reconhecidos pelos utentes, motivando a sua fidelização a esta farmácia.

Durante o período de estágio, tive oportunidade de acompanhar cada um dos membros desta equipa, e assim, contactar com diferentes particularidades de atendimentos e comunicações com o utente, o que enriqueceu a minha formação. Para além disso, é de valorizar e agradecer a disponibilidade de toda a equipa para o esclarecimento de qualquer dúvida que surgisse, bem como todas as explicações fornecidas com o objetivo de melhorar o meu desempenho. Da mesma forma, mostraram-se sempre recetivos a novas sugestões e ideias que funcionassem igualmente como oportunidade de melhoria para a farmácia. Inegável também é o carinho, paciência e atenção com que me receberam e integraram tão bem nesta equipa durante quatro meses.

Contactar com profissionais desta qualidade e disponibilidade, foi fundamental durante o meu estágio, o que contribuiu para uma maior naturalidade e confiança no atendimento ao balcão.

#### **2.1.5. Serviços disponibilizados**

A Farmácia Mouro preocupa-se em disponibilizar um conjunto de serviços que promovam e garantam a saúde do utente. Ao mesmo tempo que fomenta a sua dinamização e diferenciação relativamente a outras farmácias, consegue fazer um acompanhamento mais personalizado a cada utente, contribuindo para o aumento da sua qualidade de vida.

Disponibiliza três serviços de saúde principais: a avaliação de parâmetros bioquímicos, o serviço de nutrição e o serviço de podologia.

Neste seguimento, num dos gabinetes da Farmácia Mouro é possível avaliar vários parâmetros bioquímicos, como a glicémia, o colesterol e os triglicéridos, bem como a medição da pressão arterial, a administração de vacinas e injetáveis, o tratamento de feridas e a realização de curativos. Estes serviços, prestados diariamente, são muito requisitados pelos utentes, e revelam-se de enorme importância, uma vez que permitem uma monitorização mais regular destes valores, e no limite a sinalização de casos para o médico. A prestação destes serviços foi mais uma oportunidade para completar a minha formação, uma vez que pude avaliar alguns destes parâmetros, principalmente os bioquímicos, e ajustar o aconselhamento farmacêutico a cada caso.



O serviço de nutrição é efetuado por uma nutricionista do programa DIETA EASYSLIM, todas as terças e quartas-feiras. Este serviço disponibiliza um acompanhamento altamente especializado e individualizado com o propósito de combater a obesidade ou fomentar hábitos de vida mais saudáveis<sup>1</sup>. Este objetivo é cumprido recorrendo a um plano de dieta estruturado, seguro e adaptado a cada utente, consoante as metas definidas a atingir. A Farmácia Mouro disponibiliza uma vasta gama de produtos da DIETA EASYSLIM, como suplementos e produtos alimentares. Sendo certo que a preocupação pela adoção de uma dieta equilibrada e de hábitos de vida saudáveis tem crescido substancialmente na população em geral, este serviço é uma boa aposta da Farmácia Mouro, e tem um retorno muito positivo por parte dos utentes.

O serviço de podologia é disponibilizado todas as quartas-feiras, e é efetuado por uma podologista licenciada, e permite a avaliação, monitorização e prevenção de patologias do pé, nomeadamente o tratamento de fungos nas unhas. Este serviço tem, também, muita procura ajudando a fidelizar e a atrair novos utentes para a farmácia.

Além dos descritos anteriormente, a Farmácia Mouro também disponibiliza outros serviços aos utentes, de carácter mensal, como as ecografias emocionais da bebé 4D, e mais ocasionalmente, rastreios capilares com a clínica Saúde Viável e visitas de conselheiras de cosmética.

## **2.2. Pontos Fracos**

### **2.2.1. Timing do estágio**

O plano curricular do MICF consagra a realização de um estágio curricular no 2º semestre do último ano de curso, a fim de proporcionar um contexto da realidade profissional aos seus alunos, princípio com que concordo. No entanto, entendo que o timing do estágio curricular podia ser diferente. No verão do meu 3º ano, decidi, voluntariamente, realizar um estágio curricular numa farmácia comunitária, e na altura escolhi a Farmácia Mouro. Apesar do estágio ter decorrido muito no *back-office* e na receção de encomendas, senti que foi uma mais-valia, uma vez que me permitiu uma primeira familiarização com a dinâmica de uma farmácia e fez com que ficasse alerta para as competências e conhecimentos que tinha que adquirir para um bom desempenho profissional numa farmácia comunitária. Isso permitiu que, no meu 4º e 5º ano, encarasse a matéria teórica lecionada também numa perspetiva de aplicação prática. Por isso, creio que a partir do 3º/4º já temos bases suficientes que nos permitem tirar partido de um estágio em contexto profissional, quer seja em farmácia comunitária, quer noutra vertente profissional. Assim, sou da opinião, que um estágio repartido por estes anos seria importante, uma vez que nos proporcionaria um contacto

gradual e por sua vez uma aprendizagem mais consolidada e faseada dos conhecimentos necessários para o dia-a-dia, neste caso, numa farmácia comunitária.

### **2.2.2. MICF e Farmácia Comunitária**

O MICF apresenta um plano curricular rico e abrangente. No entanto, existem determinadas áreas presentes numa farmácia, com as quais temos pouco contacto durante o curso, nomeadamente a puericultura, a cosmética e a suplementação. Assim, no início do estágio tornou-se mais difícil o aconselhamento nestas áreas, dado a variedade de marcas, produtos e opções dentro de cada uma delas. Todavia, durante o estágio estas dificuldades foram sendo ultrapassadas, o que em muito se deve às explicações e conselhos de todos os membros da equipa técnica da Farmácia Mouro. Por conseguinte, creio que seria muito proveitoso para os alunos, um maior investimento nestas temáticas e áreas de intervenção, que cada vez são mais procuradas e requisitas pelos utentes. O farmacêutico, como profissional de saúde, deve ser capaz de esclarecer as eventuais dúvidas dos utentes nestas áreas, pelo que, beneficia de uma aprendizagem mais consolidada e pormenorizada que lhe permita fazer um aconselhamento seguro e de excelência.

## **2.3. Oportunidades**

### **2.3.1. Heterogeneidade de utentes**

A Farmácia Mouro é uma farmácia de referência em Viseu. Isto faz com que consiga uma elevada afluência de utentes, de diferentes faixas etárias, diferentes extratos sociais e com necessidades distintas. Por conseguinte, esta heterogeneidade de utentes torna o atendimento ao balcão muito desafiante e versátil, promovendo uma constante atualização de conhecimentos, transversais às mais diversas áreas, de forma a responder às diferentes necessidades e questões dos utentes.

Para mim, constituiu mais uma oportunidade de ganhar traquejo, experiência, conhecimentos e capacidade de comunicação, complementando, assim, a minha formação.

### **2.3.2. Papel do Farmacêutico**

De acordo com o Estatuto da Ordem dos Farmacêuticos na versão introduzida pela Lei nº 131/2015, de 4 de Setembro (Diário da República, 1ª série nº173), o farmacêutico é *“um agente de saúde, cumprindo-lhe executar todas as tarefas que ao medicamento concernem, todas as que respeitam às análises clínicas ou análises de outra natureza de idêntico modo suscetíveis de contribuir para a salvaguarda da saúde pública e todas as ações de educação dirigidas à comunidade no âmbito da promoção da saúde”* (Cfr Artigo 78 nº1 da supra mencionada Lei)<sup>2</sup>.

Este estágio constituiu uma grande oportunidade para mim, porque para além de contribuir em grande medida para a minha formação, ensinou-me a valorizar e a engrandecer ainda mais o papel do farmacêutico comunitário. Durante este período, apercebi-me da confiança que os utentes colocam em nós e como valorizam o nosso aconselhamento. Neste contexto, houve um caso que me deixou particularmente realizada, pelo aconselhamento farmacêutico que promovi (Anexos - Tabela I). Um utente, do sexo masculino, num quadro de monitorização bisemanal dos seus valores de pressão arterial, apresentou queixas de tosse seca e irritativa, que o impediam de dormir há cerca de 15 dias. Confirmando que o medicamento ministrado na altura pertencia à classe dos inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA) e sabendo que esta sintomatologia poderia constituir um efeito secundário dessa mesma classe, aconselhei o utente a consultar o médico, uma vez que era possível estar num quadro de efeito colateral da medicação que lhe tinha sido prescrita. Enquanto não fosse ao médico, aconselhei o *Grintuss*<sup>®</sup>, para aliviar o desconforto da tosse seca e irritativa e permitir um maior descanso nocturno. Passado uma semana, e com uma nova prescrição, o utente voltou à farmácia, agradecendo o aconselhamento anterior, que veio a ser confirmado pelo médico.

O caso acabado de descrever, entre outros, contribuiu para a consciencialização de como a comunicação é fundamental para estabelecer um elo de confiança com o utente, e assim, facilitar a nossa intervenção na educação para a saúde, no controlo do uso irresponsável do medicamento ou para contrariar o ceticismo quanto aos medicamentos genéricos.

De facto, os utentes valorizam o carinho com os que os tratamos e a atenção com que os escutamos e tentamos solucionar os seus problemas. Foi muito gratificante, apesar de em tão pouco tempo, contribuir para melhorar a qualidade de vida de algumas pessoas.

### **2.3.3. Formações contínuas**

É da responsabilidade do farmacêutico garantir a constante renovação e atualização dos seus conhecimentos em resposta às crescentes necessidades da sociedade e às novas soluções terapêuticas existentes no mercado. Por conseguinte, é necessário investir tempo em aprendizagem, que lhe permita consolidar alguns conhecimentos e adquirir novas competências. Para tal, existem várias ações de formação promovidas pela ANF ou por alguns laboratórios, que estão ao dispor de todos os farmacêuticos do nosso país. Durante estes quatro meses de estágio, tive oportunidade de frequentar algumas, sobre temáticas pertinentes e atuais, como “Farmácia e o Aconselhamento à Mulher em Atendimento” e “II Encontro de Feridas”. Estas ações de formação constituíram mais uma ferramenta para consolidar os meus conhecimentos, mas creio que, no geral, a classe farmacêutica, tal como

todas as outras profissões, deve investir seriamente na formação contínua, uma vez que proporciona uma atualização de conhecimentos, que se reflete no aconselhamento ao utente, e por sua vez, num melhor desempenho profissional.

## **2.4. Ameaças**

### **2.4.1. Concorrência de estabelecimentos de venda de medicamentos não sujeitos a receita médica**

A venda de medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) fora das farmácias, como em parafarmácias ou superfícies comerciais, constitui uma grande ameaça à sustentabilidade das farmácias comunitárias. De facto, estes estabelecimentos são muito atrativos para os utentes, porque conseguem praticar preços mais baixos, com os quais as farmácias não conseguem competir. Por isso, a grande vantagem que as farmácias oferecem relativamente a estes locais, é uma equipa altamente especializada e com aconselhamento de excelência. Deste modo, é imperativo que invistam neste fator de diferenciação, de forma a atrair e fidelizar utentes à farmácia.

Por outro lado, creio que deve haver uma consciencialização e uma preocupação crescente quanto à automedicação irresponsável, que acaba por ser facilitada quando são vendidos medicamentos em locais, cujos colaboradores têm uma reduzida preparação científica para o fazer. A minha questão é: estão a ser salvaguardados os interesses do utente ou interesses económicos alheios?

### **2.4.2. Produtos esgotados**

Durante o meu estágio, contactei com o desespero de alguns utentes porque os seus medicamentos habituais estavam esgotados. Na verdade, com a colocação dos dispositivos de prevenção de adulterações na embalagem secundária, nomeadamente o código datamatrix, alguns medicamentos como a Aspirina® e o Adalat CR® estiveram esgotados grande parte do período do meu estágio.

Esta situação, apesar de ser provisória, revelou-se penosa para o utente que já está habituado a um determinado medicamento, e mesmo explicando que a farmácia é alheia a esta situação, nem todos compreendem, acabando por culpar a farmácia pela falta dos seus medicamentos.

### **2.4.3. Pedido de medicamentos sujeitos a receita médica sem apresentação de receita médica**

Durante o meu estágio, apercebi-me que é muito frequente a solicitação de medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM), sem a apresentação da mesma, nomeadamente da classe das benzodiazepinas.

Durante o atendimento ao balcão, fui confrontada com esta situação e sentia a pressão e insistência exercida pelos utentes, que utilizavam como justificação a dificuldade de marcarem uma consulta médica, “ a farmácia x já me cedeu sem receita médica” ou “já é medicação habitual”. Em algumas situações, foi difícil que os utentes aceitassem que não é possível ceder MSRM, sem a apresentação da receita. A resposta negativa ao aviamento do medicamento pretendido, acabava por gerar sentimentos de desagrado e revolta dirigidos, injustamente, à farmácia e à sua equipa técnica.

### 3. Conclusão

O estágio na Farmácia Mouro constituiu uma importante, desafiante e gratificante etapa na minha formação, uma vez que me permitiu incorporar novas competências que requerem o contacto com a realidade profissional para serem desenvolvidas: o à vontade e comunicação com o utente, a confiança e segurança no aconselhamento farmacêutico entre outras. Para além disso, permitiu-me aplicar e consolidar os conhecimentos teóricos e práticos adquiridos ao longo do MICF e adequá-los a cada situação.

Estes quatro meses proporcionaram-me um enorme crescimento enquanto pessoa e enquanto profissional. Durante este período esforcei-me ao máximo para superar as minhas dificuldades e seguir todos os conselhos e sugestões fornecidas pela equipa da Farmácia Mouro, de forma a melhorar a minha prestação e o meu à vontade no atendimento ao balcão.

Para além disso, este estágio permitiu-me perceber a dinâmica do dia-a-dia numa farmácia comunitária e a importância do farmacêutico na melhoria da qualidade de vida dos utentes, na deteção de comportamentos de risco e na educação para a saúde.

Como estagiária, tenho noção de como é importante a forma como somos integrados na equipa de profissionais do local que nos acolhe. E nesse contexto, não podia sentir-me mais sortuda, pelo privilégio de ter integrado a equipa da Farmácia Mouro. Assim, não podia concluir sem prestar o meu reconhecido agradecimento a todos os membros desta equipa:

Por serem incansáveis;

Pela atenção e carinho;

Por me apoiarem em todos os momentos;

Por me formarem e me tornarem uma profissional mais completa e dotada.

Sem vocês teria sido bem mais difícil.

Obrigada a todos!

#### 4. Anexo

**Tabela I** - Caso de estudo

| 1ª Terapêutica Prescrita – Inibidor da enzima de conversão da angiotensina (IECA) |  |   |
|---|--|---|
| Medicamento   | Mecanismo de Ação  | Queixas do utente                                   |
| Capoten® 50 mg<br>(Captopril)   | Inibe a enzima de conversão da angiotensina, diminuindo a formação da angiotensina II, potente vasoconstritor <sup>3</sup> | Tosse seca, não produtiva e irritativa <sup>3</sup> |
| 2ª Terapêutica Prescrita – Antagonista dos recetores da angiotensina (ARA)        |  |   |
| Medicamento   | Mecanismo de Ação  | Queixas do utente                                   |
| Cozaar® 50 mg<br>(Losartan)   | Antagonista do recetor da angiotensina II, impedindo a sua ligação e ação <sup>4</sup>                                     | Sem queixas   |

## 5. Bibliografia

1. DIETA EASYSLIM. - **Como Funciona a Dieta Easyslim**. [Acedido a 22 de julho de 2019]. Disponível na internet: <https://www.dietaeasyslim.com/dieta-easyslim/>
2. PORTUGAL. Diário da República - **Decreto-Lei nº131/2015**, de 4 de setembro, Capítulo VII, Artigo 78º, Série I de 2015-09-04. Ministério da Saúde.
3. INFARMED - **Resumo das características do Medicamento: Capoten**. (2016). [Acedido a 20 de julho de 2019]. Disponível na internet: [http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=1434&tipo\\_doc=rcm](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=1434&tipo_doc=rcm)
4. INFARMED - **Resumo das características do Medicamento: Cozaar**. (2018). [Acedido a 15 de julho de 2019]. Disponível na internet: [http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=2237&tipo\\_doc=rcm](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=2237&tipo_doc=rcm)



## **Parte III - Monografia**

# **“Terapia Génica na Diabetes *Mellitus* tipo I”**

**Orientador:** Professor Doutor Luís Pereira de Almeida

## Resumo

A Diabetes *Mellitus* é uma doença metabólica com elevada prevalência a nível mundial, cuja incidência aumenta de ano para ano. A Diabetes *Mellitus* tipo I, um dos tipos de diabetes existente, resulta, maioritariamente, da destruição auto-imune das células  $\beta$  pancreáticas, e, conseqüentemente, está associada a um déficit absoluto de insulina endógena.

Atualmente, a terapêutica convencional da Diabetes *Mellitus* tipo I envolve um controlo dos níveis de glicose, mas permanecem riscos de hipoglicémia e de complicações micro e macrovasculares associadas à hiperglicémia que afetam a qualidade de vida dos utentes, havendo assim necessidade de desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas que melhorem o panorama atual. Neste contexto, a terapia génica surgiu como umas das potenciais alternativas para este tipo de diabetes.

A terapia génica recorre à utilização de ácidos nucleicos, DNA ou RNA, para obter efeitos terapêuticos. No âmbito da Diabetes *Mellitus* tipo I, a terapia génica pode modular o sistema imunitário ou repor os níveis de insulina, através da promoção da regeneração de células  $\beta$  pancreáticas ou através da indução da produção de insulina em células não  $\beta$ .

Ao longo desta revisão sistemática serão contextualizadas as várias estratégias de terapia génica aplicadas à Diabetes *Mellitus* tipo I, explanando as suas vantagens, limitações e perspetivas futuras.

**Palavras-chave:** Diabetes *Mellitus* tipo I, Terapia Génica, Células  $\beta$  pancreáticas, Transdiferenciação, Diferenciação, Células estaminais pluripotentes induzidas, Insulina.

## **Abstrat**

Diabetes *Mellitus* is a metabolic disease with a high prevalence worldwide, whose number of cases increases every year. Type I Diabetes *Mellitus* is one of the existing types of diabetes, in most cases an autoimmune disease resulting from the destruction of pancreatic  $\beta$  cells and as a consequence associated with a complete deficit of endogenous insulin.

Presently, the conventional therapeutic treatment of type I Diabetes *Mellitus* involves a control of glucose levels, but still prone to micro and macrovascular complications associated with hyperglycemia and risks associated with hypoglycemia. These complications affect the quality of life of patients, and therefore new therapeutic alternatives are desirable to improve the current situation. In this context, gene therapy emerged has a potential solution for this disorder.

Gene Therapy uses nucleic acids such as DNA or RNA to produce therapeutic effects. Within the scope of type I Diabetes *Mellitus*, gene therapy can modulate the immune system or reinstate the levels of insulin, through the induction of regeneration of pancreatic  $\beta$  cells or through the production of insulin in non  $\beta$  cells.

Over this systematic revision, the main strategies of gene therapy applied to type I Diabetes *Mellitus* will be contextualized, explaining the advantages, the limitations and the future perspectives.

**Keywords:** Type I Diabetes *Mellitus*, Gene Therapy, Pancreatic  $\beta$  cells, Transdifferentiation, Differentiation, Induced Pluripotent Stem Cells, Insulin.

## Abreviaturas

|               |  |
|---------------|--|
| AA            | Autoantigenios   |
| ADA-SCID      | Imunodeficiência severa combinada de adenosina deaminase                 |
| BCR           | Recetor dos linfócitos   |
| CTL-4         | <i>Cytotoxic lymphocyte associated Antigen-4</i>                         |
| c-Myc         | <i>Master Regulator of Cell Cycle Entry and Proliferative Metabolism</i> |
| DM            | Diabetes Mellitus  |
| DMI           | Diabetes Mellitus tipo I   |
| DMIAI         | Diabetes Mellitus tipo I auto-imune                                      |
| dsDNA         | Cadeia dupla de DNA  |
| EMA           | Agência Europeia do Medicamento  |
| ESC           | Células estaminais embrionárias  |
| FDA           | <i>Food and Drug Administration</i>                                      |
| Fox A2        | <i>Forkhead box A2</i>   |
| GIRE          | <i>Glucose-inducible response elements</i>                               |
| GLP           | Gânglios linfáticos pancreáticos   |
| GLUT-2        | Transportador de glicose 2   |
| GK            | Glucocinase  |
| HLA           | Antigénio Leucocitário Humano  |
| IL1 $\beta$   | Interleucina 1 $\beta$   |
| IL- 4         | Interleucina- 4  |
| IGFBP I       | <i>Insulin-like growth factor binding protein-1</i>                      |
| IFN           | Interferão   |
| IFN- $\gamma$ | Interferão $\gamma$  |
| Ins- VNTR     | <i>Insulin gene variable number of tandem repeats</i>                    |
| iPSC          | Células estaminais pluripotentes induzidas                               |
| kB            | Quilobase  |

|         |   |
|---------|---|
| Klf4    | <i>Krüppel-like factor 4</i>                                    |
| LADA    | <i>Latent Autoimmune Diabetes in Adults</i>                     |
| LPLD    | Deficiência de lipoproteína lipase                              |
| L-PK    | L- piruvato cinase  |
| Maf     | <i>v-Maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A</i> |
| MHC     | Complexo maior de histocompatibilidade                          |
| Neurod1 | <i>Neurogenic differentiation factor 1</i>                      |
| NFkβ    | Fator de transcrição kβ   |
| Ngn3    | <i>Neurogenin 3</i>   |
| NKT     | Células T Natural Killer  |
| Nkx6.1  | <i>Nk6 homeobox protein 1</i>                                   |
| Oct4    | <i>Octamer-binding transcription factor 4</i>                   |
| PC1/3   | Pró-hormona convertase 1/3                                      |
| PC2     | Pró-hormona convertase 2  |
| Pdx1    | <i>Pancreas/duodenum homeobox protein 1</i>                     |
| Ptfla   | <i>Pancreas transcription factor 1 subunit alpha</i>            |
| PTPN22  | <i>Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 22</i>        |
| RE      | Retículo Endoplasmático   |
| Sox2    | <i>Sex determining region Y-box 2</i>                           |
| Sox 9   | <i>Sex determining region Y-box 9</i>                           |
| Sox 17  | <i>Sex determining region Y box 17</i>                          |
| ssDNA   | <i>Cadeia simples de DNA</i>                                    |
| +ssRNA  | <i>Cadeia simples de RNA de polaridade positiva</i>             |
| STAT1   | <i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>       |
| TCR     | Recetor dos linfócitos T  |
| TNFα    | Fator de necrose tumoral α                                      |

## I. Introdução

A Diabetes *Mellitus* (DM) é uma doença metabólica caracterizada por elevados níveis de glicose no sangue, maioritariamente associados a uma falha na secreção ou ação da insulina. A insulina, sintetizada por células  $\beta$  pancreáticas, localizadas nos Ilhéus de Langerhans, é uma hormona pancreática que garante a entrada de glicose nas células do tecido adiposo e músculo-esquelético. Quando as células  $\beta$  pancreáticas se tornam incapazes de segregar insulina suficiente para suprir as necessidades do organismo ou em situações de resistência à insulina, a entrada de glicose nas células é condicionada (Regazzi, 2018). No caso da Diabetes *Mellitus* tipo I (DMI), na grande maioria dos casos, há destruição auto-imune das células  $\beta$  pancreáticas, resultando em défices de insulina e, por sua vez, em hiperglicémias (Kroger et al., 2018).

A longo prazo, a persistência de hiperglicémias aumenta o risco de desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares, associadas a nefropatia, retinopatia, neuropatia bem como doenças cardiovasculares como o enfarte agudo do miocárdio e o acidente vascular cerebral (Prina et al., 2014 ; Tan et al., 2019). Com o aumento da incidência nos últimos anos da DM no geral, e da DMI em particular, estas complicações têm-se tornado mais comuns, sendo, deste modo, notória a importância do controlo desta patologia, de forma a garantir a qualidade de vida dos utentes e a redução de custos de saúde pública (Regazzi, 2018).

Apesar do progresso e do investimento dos últimos anos, a terapêutica convencional para o tratamento da DMI não é eficaz na eliminação ou reversão da progressão da doença (Prina et al., 2014; Regazzi, 2018). Por esta razão, a comunidade científica tem apostado em estratégias e alternativas terapêuticas emergentes nesta área, nomeadamente a terapia génica (Regazzi, 2018).

Na presente monografia será feita uma abordagem dos progressos atuais da terapia génica aplicada à Diabetes *Mellitus* tipo I, bem como os seus desafios e perspetivas futuras no tratamento desta patologia.

## 2. Epidemiologia

Segundo dados de 2017 da Federação Internacional da Diabetes, cerca de 425 milhões de pessoas em todo o mundo, com idades compreendidas entre os 20 e os 79 anos, padecem de DM e estima-se que até 2045 esse número atinja os 629 milhões. Para além disso, mais de um milhão de crianças e adolescentes têm DMI (IDF, 2017).

Preocupante também é que uma em cada duas pessoas não são diagnosticadas e, no ano de 2017, esta patologia foi responsável por cerca de 4 milhões de mortes a nível mundial e pelo gasto de cerca de 727 milhares de milhão de dólares em saúde (IDF, 2017).

Na realidade portuguesa, o cenário não é diferente, dado que, segundo dados da Direção Geral de Saúde, em 2015, cerca de 13,3% da população com idades compreendidas entre os 20 e os 79 anos, foi diagnosticada com DM. No mesmo ano, cerca de 0.09% de crianças com idades até aos 14 anos apresentavam DMI (DGS, 2017).

## 3. Diabetes Mellitus tipo I

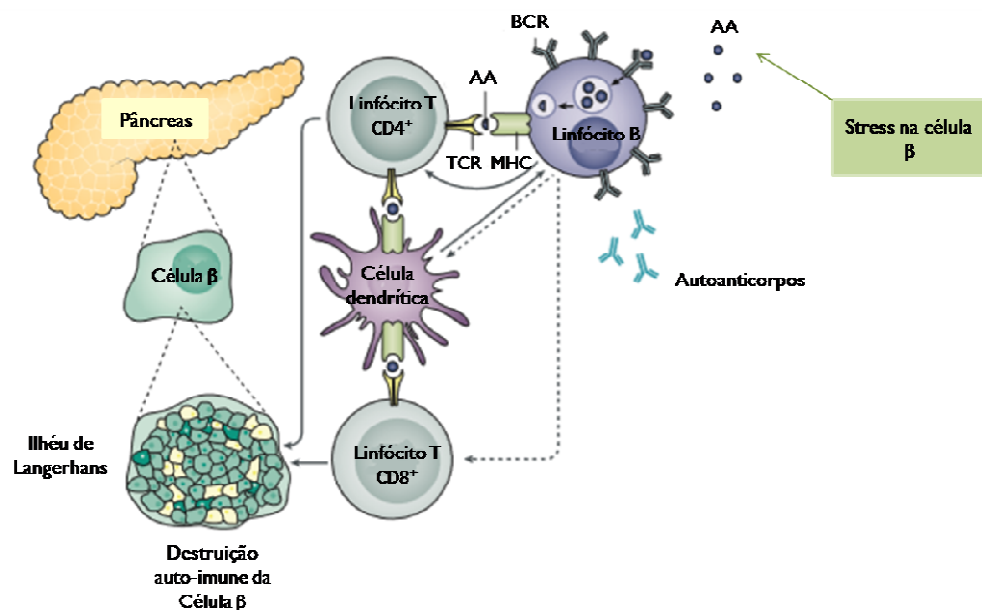
A Diabetes Mellitus tipo I (DMI) representa cerca de 10% de todos os casos de diabetes (Katsarou et al., 2017). Geralmente manifesta-se em crianças ou adolescentes, mas também pode surgir no adulto, sendo designada de LADA (Do inglês: *Latent Autoimmune Diabetes in Adults*) (Schwartz et al., 2017). Pode subdividir-se em DMI autoimune, mais comum, e em DMI idiopática, mais rara (Katsarou et al., 2017). Em qualquer um dos casos, há destruição de todas (ou quase todas) as células  $\beta$  pancreáticas, resultando numa insulinoopenia absoluta (Regazzi, 2018).

A DMI autoimune (DMIAI) é resultado da destruição progressiva das células  $\beta$  pancreáticas provocada por uma resposta auto-imune exacerbada, mediada por linfócitos T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  auto-reativos, ativados por células apresentadoras de antígenos, como os linfócitos B e as células dendríticas (Figura 1) (Kroger et al., 2018; Noguchi, 2010). Clinicamente, podem ser detetados autoanticorpos, que estão presentes em aproximadamente 85% dos pacientes com esta patologia (Wong, Hawthorne e Manolios, 2011). A maioria desses autoanticorpos é dirigida às células dos ilhéus de Langerhans, à insulina, à descarboxilase do ácido glutâmico 65, ao transportador de zinco 8 e à proteína fosfatase da tirosina IA-2 e IA-2 $\beta$  (Redondo et al., 2018). Estes autoanticorpos surgem anos antes do início de sintomas mais comuns, tais como poliúria, fadiga e polidipsia, podendo ser utilizados para estimar a probabilidade de desenvolver este tipo de diabetes, funcionando, por isso, como biomarcadores da autoimunidade (Katsarou et al., 2017; Tan et al., 2019).

Apesar de ainda não existir uma associação clara à etiologia da auto-imunidade relativa à destruição das células  $\beta$  pancreáticas, a DMIAI é uma doença multifatorial, que pode estar associada a fatores genéticos e ambientais (como infecções virais) (Miao et al., 2018; Tan et al., 2019). De entre as várias predisposições genéticas relacionadas a este tipo de diabetes, é possível destacar os polimorfismos no antígeno leucocitário humano (HLA), que estão presentes em cerca de 40 a 50% dos casos de DMIAI (Pathak et al., 2019). Estes genes codificam proteínas de superfície que permitem a interação entre as várias células do sistema imune, responsáveis pela resposta imunológica (Rock, Reits e Neeffes, 2016). A suscetibilidade a esta patologia é principalmente associada aos HLA de classe II, nomeadamente aos haplótipos HLA-DR4-DQ8 e HLA-DR3-DQ2 (Andrzejewski et al., 2019; Smith, Simmons e Cambier, 2017). Outras predisposições genéticas envolvem polimorfismos no gene da insulina (*Ins-VNTR*, *IDDM2*), no gene *CTLA-4* (do inglês: *Cytotoxic lymphocyte associated Antigen-4*) e *PTPN22* (do inglês: *Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type22*). No fundo, a DMIAI é uma doença multifatorial que tem início quando um indivíduo geneticamente suscetível é sujeito a um estímulo ambiental desencadeador, resultando numa resposta imunológica exacerbada (Noguchi, 2010).

A forma idiopática apresenta uma baixa prevalência e a sua etiologia é desconhecida. No entanto, sabe-se que não está associada a qualquer processo autoimune (American Diabetes Association, 2018; Pathak et al., 2019).

Ao longo desta revisão sistemática, focar-me-ei apenas na DMI com origem auto-imune (DMIAI).



**Figura 1**- Patogênese da DMIAI. Os autoantígenos da célula  $\beta$  vão ser detetados pelos linfócitos B e células dendríticas. Essas células vão apresentar os autoantígenos aos linfócitos T  $CD4^+$  e  $CD8^+$ , ativando-os. A exposição dos linfócitos B aos autoantígenos desencadeia a formação de autoanticorpos, que funcionam como biomarcadores da auto-imunidade. BCR- recetor dos linfócitos B; TCR: recetor dos linfócitos T; MHC- complexo major de histocompatibilidade; AA- autoantígenos (Adaptado de Katsarou et al., 2017)



### 3.1. Contextualização da terapêutica atual

Atualmente, ainda não há cura para a DMIAI (*Handorf, Sollinger e Alam, 2015*). No entanto, existem estratégias terapêuticas, que associadas a uma alimentação saudável e equilibrada, permitem o controlo dos níveis de glicose no sangue e, assim, minimizam os riscos de complicações micro e macrovasculares associados a esta patologia.

A terapêutica convencional da DMIAI é a insulinoterapia exógena (*Pathak et al., 2019*). Na verdade, a insulinoterapia exógena aumenta a esperança de vida dos utentes com DMIAI e reduz o risco de aparecimento de complicações secundárias associadas a esta patologia. Para além disto, nos últimos anos, na perspetiva de proporcionar uma maior qualidade de vida aos utentes, foram desenvolvidos novos sistemas como os sensores de glicose, os sistemas subcutâneos de perfusão contínua de insulina (dispositivos PSCI) e o “pâncreas artificial”, que são procedimentos menos invasivos e que proporcionam um maior controlo glicémico (*Handorf, Sollinger e Alam, 2016*). Todavia, ainda assim, a insulina exógena acarreta um risco de hipoglicémias, uma vez que não consegue mimetizar na totalidade o comportamento fisiológico das células  $\beta$  pancreáticas, em resposta a flutuações dos níveis de glicémia (*Handorf, Sollinger e Alam, 2015; Pathak et al., 2019*).

Outra das alternativas envolve a reposição das células  $\beta$  pancreáticas, nomeadamente através do transplante do pâncreas total e do transplante do ilhéu de Langerhans, que se tornou viável com a divulgação do protocolo de Edmonton. Apesar destas alternativas apresentarem um maior controlo glicémico comparativamente com a insulinoterapia exógena, o seu alcance é limitado, uma vez que o número de dadores é reduzido e há necessidade de toma continuada de imunossuppressores para evitar a rejeição do enxerto transplantado (*Aghazadeh e Nostro, 2017; Pathak et al., 2019*).

Posto isto, é perceptível a necessidade de investir em novas alternativas terapêuticas para a DMIAI.

A terapia génica é uma das potenciais e promissoras terapêuticas para a DMIAI, podendo atuar em diferentes fases de progressão da doença: (1) Como estratégia de profilaxia, uma das possíveis alternativas envolve a modulação do sistema imunitário, evitando, assim, a destruição das células  $\beta$  pancreáticas; (2) Numa fase posterior da doença, quando já há destruição das células  $\beta$  pancreáticas, a estratégia envolverá o investimento em técnicas que permitam a reposição dos níveis normais de insulina. Isso pode ser conseguido através da regeneração de células  $\beta$  pancreáticas ou através da indução de produção de insulina noutras células do organismo (*Handorf, Sollinger e Alam, 2016; Wong, Hawthorne e Manolios, 2011; Yechoor e Chan, 2005*).

Ao longo desta monografia, serão abordadas as vantagens, desvantagens e perspectivas futuras de cada uma das estratégias de terapia génica aplicadas à DMIAI.

## **4. Terapia Génica**

### **4.1. Breve contextualização histórica**

Passados cerca de 30 anos desde o primeiro ensaio clínico em humanos, em 1989, a terapia génica, aliada aos progressos em biologia molecular, tem nutrido uma atenção crescente por parte da comunidade científica por demonstrar ter um enorme potencial na cura, prevenção e tratamento de doenças com origem genética (Keeler, ElMallah e Flotte, 2017; Prina et al., 2014). Apesar de alguns insucessos passados, têm vindo a acumular-se as histórias de êxito associadas à terapia génica. Na verdade, em 2012, surgiu o primeiro medicamento aprovado pela Agência Europeia do Medicamento (EMA), o Glybera<sup>®</sup>, para o tratamento da deficiência da lipoproteína lipase (LPLD). No entanto, como não foi aprovado pela FDA (do inglês: *food and drug administration*) e não era economicamente viável, em 2017 foi retirado do mercado. Todavia, a verdade é que abriu caminho para outros medicamentos em terapia génica e neste seguimento, em 2016, surge o segundo medicamento aprovado pela EMA, o Strimvelis<sup>®</sup>, para o tratamento da imunodeficiência severa combinada de adenosina deaminase (ADA-SCID) (Wirth, Parker e Ylä-Herttuala, 2013).

### **4.2. Princípios e aplicações**

A terapia génica baseia-se na manipulação do material genético de uma célula, com a finalidade de corrigir os genes mutados responsáveis por uma determinada doença e, assim, obter o efeito terapêutico pretendido (Trent e Alexander, 2004). Esse objetivo pode ser conseguido através da introdução de um gene, que está em falta ou em pequena quantidade ou através da reparação de genes mutados, por adição de um gene funcional ou pelo silenciamento dos genes que causam a doença (Chellappan et al., 2018).

Em terapia génica, só é permitido utilizar como células alvo as de origem somática, ou seja, aquelas em que as alterações produzidas não são transmitidas à geração seguinte. Assim, por questões éticas, as células germinativas não são alvo de terapia génica (Trent e Alexander, 2004; Wirth, Parker e Ylä-Herttuala, 2013).

O gene terapêutico é introduzido na célula alvo, através de sistemas de transporte como os vetores virais ou não virais, existindo duas estratégias de entrega para esse efeito: *in vivo* ou *ex vivo* (Anexos - Figura 1) (Bouard, Alazard-Dany e Ali, 2009).

Na terapia génica *ex vivo*, as células alvo são extraídas do doente, e *in vitro*, há inserção do gene terapêutico por um vetor, etapa denominada de transfeção ou transdução se se tratar

de um sistema não viral ou viral, respetivamente. Posteriormente, quando as células manipuladas desenvolvem o fenótipo pretendido, são re-implantadas no organismo do doente (Al-Allaf et al., 2010; Nayerossadat, Ali e Maedeh, 2012).

O método alternativo, *in vivo*, envolve injeções do vetor contendo o transgene na corrente sanguínea (entrega sistémica) ou injeções diretas (*in situ*) do vetor no tecido alvo. Neste caso, a transfeção ou transdução das células alvo ocorre *in vivo* (Nayerossadat, Ali e Maedeh, 2012; Prina et al., 2014).

Cada uma destas abordagens apresenta vantagens e limitações (Tabela 1), que é essencial conhecer para o sucesso da terapia génica. Da mesma forma, é imprescindível garantir que a transferência e inserção do gene terapêutico são eficientes e seletivas para a célula-alvo (Pena et al., 2019). Para tal, é fundamental conhecer os vários sistemas de transporte disponíveis, bem como os seus prós e contras, para saber adequá-los à aplicação terapêutica pretendida.

**Tabela 1** - Sistematização das principais vantagens e desvantagens da terapia génica *in vivo* e *ex vivo*.

| <b>Estratégias de terapia génica</b> |  |   |  |
|--------------------------------------|--|---|--|
|                                      | <i>In vivo</i>   | <i>Ex vivo</i>  | Referências  |
| Vantagens                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- É uma técnica mais simples, que não exige técnicas laboratoriais tão elaboradas;</li> <li>- Custos mais reduzidos;</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Maior controlo da qualidade e segurança das células alvo;</li> <li>- Evita a transfeção ou transdução de células não alvo, diminuindo a toxicidade do vetor;</li> <li>- Apenas são re-implantadas as células que apresentam as características pretendidas;</li> </ul> | Al-Allaf et al., 2010; Prina et al., 2014            |
| Desvantagens                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Não há controlo, a priori, da qualidade da célula transfetada ou transduzida;</li> <li>- Risco de inserção aleatória e genotóxica do transgene na célula alvo;</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Técnica trabalhosa e morosa;</li> <li>- Risco de falha na re-implantação da célula transfetada ou transduzida;</li> </ul>  | Al-Allaf et al., 2010; Chan, Fujimiya e Kojima, 2003 |

### 4.3. Sistemas de transporte: vetores

Para ultrapassar as barreiras biológicas do organismo humano, é necessário recorrer a sistemas de transporte que garantam e facilitem a entrada do gene terapêutico nas células alvo. Para este efeito recorre-se à codificação ou inserção do gene de interesse (transgene) num vetor. Este pode mediar transfeção ou transdução de células alvo específicas com o gene terapêutico que é transportado para o núcleo das células onde permanece sob a forma episomal ou é integrado nos cromossomas. O transgene fica assim em condições de poder ser transcrito e traduzido, de forma a desencadear o efeito terapêutico pretendido (*Pena et al., 2019*).

A eficácia da terapia génica na DMIAI depende de vetores eficazes, seguros e seletivos que garantam uma expressão génica sustentada e a sobrevivência duradoura das células transfetadas ou transduzidas (*Al-Allaf et al., 2010; Pena et al., 2019*). No entanto, a obtenção de um vetor com as particularidades acima referidas continua a ser um grande desafio para a terapia génica (*Al-Allaf et al., 2010*).

Um vetor ideal deve apresentar determinadas características, nomeadamente: (1) capacidade ilimitada de *packaging* ou seja, capacidade ilimitada de inserção do gene terapêutico; (2) produção simples e reprodutível em larga escala; (3) expressão sustentada e regulada do gene terapêutico; (4) capacidade de infetar células com e sem capacidade de divisão; (6) transfeção ou transdução eficiente e seletiva do gene terapêutico na célula alvo, de modo a alcançar especificidade de ação e evitar a toxicidade do vetor; (7) no caso de vetores que façam integração cromossómica, idealmente esta não deveria ser aleatória, mas sim num local específico e conhecido do genoma, evitando assim a possibilidade de mutagénese insercional (*Al-Allaf et al., 2010; Wong, Hawthorne e Manolios, 2011*). No entanto, ainda não se conseguiu obter o vetor ideal, pelo que todos os sistemas de transporte apresentam limitações. Por conseguinte, a escolha de um vetor em detrimento de outro, será decidida consoante as características que melhor se adaptam ao perfil desejado (*Naso et al., 2017*).

Os sistemas de transporte podem ser agrupados em vetores de origem viral ou não viral (*Chellappan et al., 2018*). No entanto, na DMIAI, os vetores virais são preferencialmente utilizados, uma vez que possuem uma maior eficiência de transdução, garantindo uma expressão estável, que é geralmente desejável na DMIAI (*Handorf, Sollinger e Alam, 2015*).

### 4.3.1. Vetores virais

Os vírus têm uma capacidade inata para parasitar as células humanas inserindo nestas o seu material genético (DNA ou RNA), o que os torna bastante atrativos para utilização em terapia génica (Naso et al., 2017).

No entanto, para o seu uso como sistemas de transporte é necessário garantir que não são patogénicos para o organismo-alvo. Neste seguimento, é necessário impedir a replicação viral, ou seja, garantir que os vetores virais, após infetarem a célula alvo, são incapazes de produzir partículas virais infecciosas. Isto é conseguido, através da eliminação de todos os genes que estão associados à patogenicidade do vírus, substituindo-os pelo gene terapêutico. Em resultado, só são mantidos os genes responsáveis pela regulação das sequências virais, ou seja, os que codificam para as proteínas virais necessárias ao ciclo de vida do vírus. Teoricamente, se forem bem preparados, estes vetores virais recombinantes não são patogénicos nem capazes de replicar na célula alvo (Al-Allaf et al., 2010; Handorf, Sollinger e Alam, 2016; Pena et al., 2019; Prina et al., 2014).

De uma forma geral, os vetores virais manifestam elevada capacidade e eficácia de transdução, o que os torna bastante vantajosos. No entanto, também apresentam limitações, como a capacidade reduzida de inserção de genes (devido ao reduzido tamanho que apresentam) e o risco de desencadear reações imunológicas no organismo humano (Pena et al., 2019; Prina et al., 2014).

Existem diversos vetores virais utilizados em terapia génica, sendo possível destacar, os retrovírus e lentivírus, vírus de RNA, e os adenovírus e vírus adeno-associados, vírus de DNA. Cada um destes vetores virais apresenta atributos únicos, que podem ser vantajosos ou limitantes, consoante o perfil desejado (Chellappan et al., 2018). Por exemplo, caso se pretenda uma expressão transiente, ou seja, por um curto período de tempo, a opção ideal será um vírus que não faça integração cromossómica, como é o caso dos adenovírus. No entanto, se for necessária uma expressão permanente, nesse caso, poder-se-á optar por um vetor viral que faça integração cromossómica, como os retrovírus ou lentivírus (Handorf, Sollinger e Alam, 2016).

Na tabela 2 são ilustradas as principais vantagens e desvantagens dos vetores virais mais utilizados em terapia génica na DMIAI.

**Tabela 2** – Sistematização das principais vantagens e desvantagens dos vetores virais mais utilizados em terapia gênica na DMIAI.

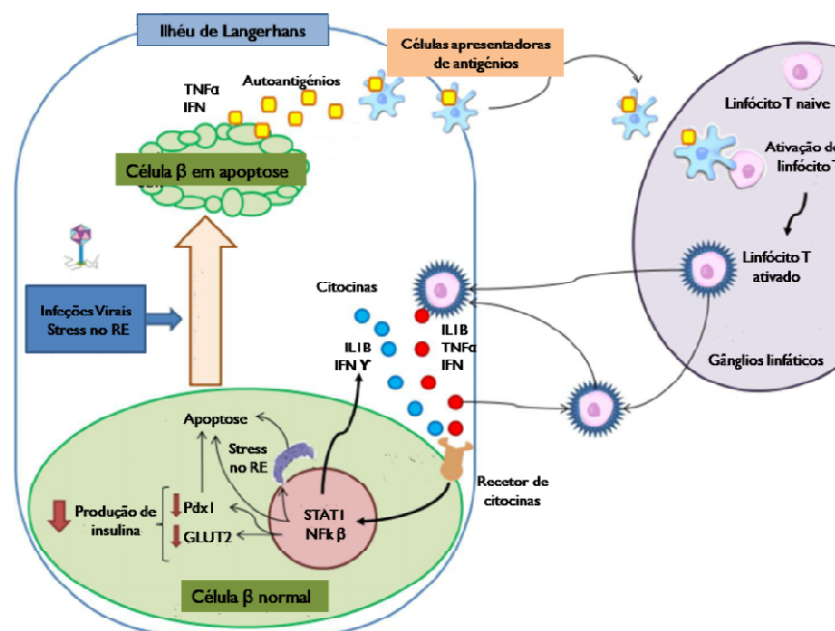
| Vetor                         | Vantagens  | Desvantagens   | Referências   |
|-------------------------------|--|--|---|
| Retrovírus (+ssRNA)           | Expressão estável e permanente;<br>Boa capacidade de inserção de transgenes (8-9 kB);  | Infecta apenas células em divisão;<br>Risco de mutagênese insercional devido à integração cromossômica;<br>Risco de ativação de oncogenes; | <i>Chellappan et al., 2018;</i><br><i>Pena et al., 2019</i> |
| Lentivírus (+ssRNA)           | Infecta células com e sem capacidade de divisão;<br>Boa capacidade de inserção de transgenes (8-9kB);<br>Expressão estável e permanente;<br>Não há evidência de ativação de oncogenes;   | Risco de mutagênese insercional devido à integração cromossômica;  | <i>Chellappan et al., 2018;</i><br><i>Pena et al., 2019</i> |
| Adenovírus (dsDNA)            | Infecta células com e sem capacidade de divisão;<br>Boa capacidade de inserção de transgenes (8-9kB);<br>Baixo risco de mutagênese insercional;  | Muito imunogênico;<br>Expressão transiente;  | <i>Pena et al., 2019</i>                                    |
| VírusAdeno-associados (ssDNA) | Infecta células com e sem capacidade de divisão;<br>Biologicamente seguro (Não foi associada patogenicidade ao vírus selvagem);<br>Integração mínima em células com capacidade de divisão;<br>Expressão estável em células quiescentes ; | Capacidade reduzida de inserção de transgenes (<5kB);<br>Expressão transiente em células em divisão;                                       | <i>Naso et al., 2017;</i><br><i>Pena et al., 2019</i>       |

kB - quilobase; +ssRNA - cadeia simples de RNA de polaridade positiva; dsDNA - cadeia dupla de DNA; ssDNA - cadeia simples de DNA

## 5. Terapia Génica na Diabetes Mellitus tipo I auto-imune

### 5.1. PREVENÇÃO DA DESTRUIÇÃO AUTO-IMUNE DAS CÉLULAS $\beta$ PANCREÁTICAS

Como referido anteriormente, a DMIAI está associada a uma destruição auto-imune das células  $\beta$  pancreáticas. Apesar de ainda não ser clara a origem da auto-imunidade associada a esta patologia, a DMIAI é uma doença multifatorial, que ocorre quando um indivíduo geneticamente suscetível é sujeito a um estímulo ambiental que desencadeia a resposta imunitária (Noguchi, 2010). Na verdade, agressões externas, como infeções virais, podem induzir a acumulação de proteínas que perderam a sua conformação tridimensional normal, causando stress no retículo endoplasmático, que por sua vez, pode promover a apoptose da célula  $\beta$  pancreática, com subsequente libertação de auto-antígenos. Numa situação normal, os linfócitos T não reconhecem os auto-antígenos como estranhos. No entanto, na DMIAI, há uma desregulação da tolerância imunológica, e por isso, os auto-antígenos vão ativar as células apresentadoras de antígenos (como as células dendríticas ou os linfócitos B), que por sua vez, ativam os linfócitos T. Posteriormente, estes linfócitos T autorreativos vão detetar os auto-antígenos retidos nas restantes células  $\beta$ , desencadeando uma reação inflamatória denominada de insulite (Figura 2) (Vega-Monroy, la e Fernandez-Mejia, 2011).



**Figura 2-** Hipótese para o desenvolvimento de insulite na célula  $\beta$  pancreática. Uma agressão externa, como uma infeção viral, pode provocar stress na célula  $\beta$ , promovendo a sua apoptose. Em resultado, há libertação de autoantígenos, que vão ser detetados pelas células apresentadoras de antígenos, que promovem a ativação de linfócitos T nos gânglios linfáticos. Os linfócitos T vão reencontrar os autoantígenos retidos nas restantes células  $\beta$  normais, libertando citocinas e originando insulite. A produção de citocinas pelos linfócitos T ativa a transcrição de STAT1 e NF $\kappa$ B, que por sua vez diminuem a expressão de Pdx1 e GLUT2, originando uma diminuição da produção de insulina. A expressão de STAT1 e NF $\kappa$ B também promovem stress no retículo endoplasmático, com subsequente apoptose e libertação de citocinas. TNF $\alpha$ - fator de necrose tumoral  $\alpha$ ; IFN- interferão; IFN- $\gamma$  - interferão  $\gamma$ ; IL1 $\beta$ - interleucina 1 $\beta$ ; Pdx1- *pancreas/duodenum homeobox protein 1*; GLUT-2: transportador de glicose 2; NF $\kappa$ B- fator de transcrição  $\kappa$ B; STAT1- *signal transducer and activator of transcription 1*; RE- retículo endoplasmático. (Adaptado de Vega-Monroy e Fernandez-Mejia, 2011)

Assim, dada a etiologia auto-imune da DMIAI, a terapia gênica mais lógica para esta patologia, a título preventivo, seria impedir a destruição auto-imune das células  $\beta$  pancreáticas. Inicialmente, estas estratégias envolviam a indução de tolerância imunológica ou o bloqueio da apoptose da célula  $\beta$  (Handorf, Sollinger e Alam, 2016). Mais tarde, a imunorregulação com citocinas surgiu também como uma potencial estratégia terapêutica neste âmbito. Esta monografia focar-se-á apenas na imunorregulação com citocinas.

### 5.1.1. Imunorregulação com citocinas

Uma das tentativas para evitar a destruição auto-imune das células  $\beta$  pancreáticas envolve a utilização de citocinas imunorreguladoras, como é o caso da IL-4 (interleucina-4) (Wong, Hawthorne e Manolios, 2011).

Ao longo dos últimos anos, diversos estudos têm procurado clarificar o papel imunorregulador da IL-4. Um deles, foi efetuado por Creusot e colaboradores, que promoveram a transdução, *in vitro* com lentívirus que codificavam para a IL-4, de células dendríticas derivadas da medula óssea de murganhos. Como as células dendríticas são fáceis de gerar e possuem capacidade de migrar para os nódulos linfáticos pancreáticos onde regulam a resposta imune, são boas candidatas neste contexto. Na verdade, este grupo verificou que ocorria uma diminuição gradual da expressão de IL-4 nos gânglios linfáticos pancreáticos (GLP) de murganhos diabéticos comparativamente com os de murganhos não diabéticos. Para além disso, verificaram também que os GLP de murganhos diabéticos apresentavam uma expressão alterada de determinados genes comparativamente aos GLP de murganhos não diabéticos. Posto isto, o objetivo deste grupo era perceber se conseguiriam promover o aumento de IL-4 nos GLP, inferindo sobre o seu impacto na regularização da expressão dos genes alterados, e subsequentemente, no controlo do desenvolvimento da DMIAI. Sendo assim, este grupo injetou, por via intravenosa, células dendríticas tratadas com IL-4 em murganhos pré-diabéticos com 12 semanas de idade (grupo experimental) e monitorizou os níveis de glicémia. No grupo controlo, que não foi transduzido com IL-4, 80% dos animais desenvolveram diabetes às 30 semanas de idade. No grupo experimental, que tinha sido transduzido com IL-4, a DMIAI só se manifestou às 35 semanas de idade, sendo que apenas 30% dos murganhos a desenvolveram. Assim, foi possível concluir que a IL-4 apresenta um efeito protetor no desenvolvimento de DMIAI. Para além disso, com o aumento dos níveis de IL-4, houve também normalização em mais de 85% dos genes cuja expressão estava alterada nos GLP dos murganhos diabéticos. Neste sentido, este grupo associou a ação protetora da IL-4 na DMIAI à capacidade de regularizar a expressão dos



genes alterados, que poderão estar associados ao início de insulite na DMIAI (Creusot et al., 2008).

### **5.1.2. Considerações relativas à prevenção da destruição auto-imune das células $\beta$ pancreáticas**

As estratégias de prevenção da destruição auto-imune das células  $\beta$  pancreáticas são promissoras, mas apresentam algumas limitações ao seu uso em profilaxia: (1) Baseiam-se na detecção precoce da DMIAI, o que se afigura difícil, uma vez que quando há aparecimento de sintomatologia, já houve uma perda de mais de 80% das células  $\beta$  funcionais. Assim, mesmo que se conseguisse proteger as células  $\beta$  remanescentes, ainda existiriam quadros de hiperglicémia, dado o número reduzido de células  $\beta$  funcionais; (2) O carácter multifatorial da DMIAI dificulta a identificação dos indivíduos em risco de a desenvolver; (3) O sistema imunitário é complexo e o seu funcionamento ainda não é totalmente conhecido (Handorf, Sollinger e Alam, 2016). No entanto, as técnicas de prevenção da destruição auto-imune, em geral, e a imunorregulação com citocinas, em particular, poder-se-ão configurar bastante úteis quando associadas às estratégias de regeneração de células  $\beta$  pancreáticas (Wong, Hawthorne e Manolios, 2011).

## **5.2. REGENERAÇÃO DE CÉLULAS $\beta$ PANCREÁTICAS**

Na DMIAI há destruição de células  $\beta$  pancreáticas, o que origina défices de insulina e elevados níveis de glicose no sangue (Kroger et al., 2018). Assim, um dos possíveis tratamentos para esta patologia envolve a reposição do número normal de células  $\beta$  pancreáticas funcionais (Ge, Chen e Chen, 2017). Atualmente, em meio clínico, é possível atingir este propósito recorrendo ao transplante pancreático ou transplante dos ilhéus de Langerhans, purificados de cadáveres humanos (Duffy et al., 2018). No entanto, o seu uso é limitado, uma vez que, à semelhança do que sucede no transplante de outros órgãos, o número de doadores cadavéricos disponíveis é reduzido, acabando por não acompanhar o número crescente de novos doentes com DMIAI (Kondo et al., 2018). Além disso, para evitar a rejeição imune, é necessária a toma crónica de imunossuppressores, com riscos inerentes para a saúde do doente (Cierpka-Kmiec, Wronska e Kmiec, 2019). Posto isto, é notória a importância de gerar novas fontes de células  $\beta$  pancreáticas, acessíveis a um maior número de diabéticos (Shahjalal et al., 2018).

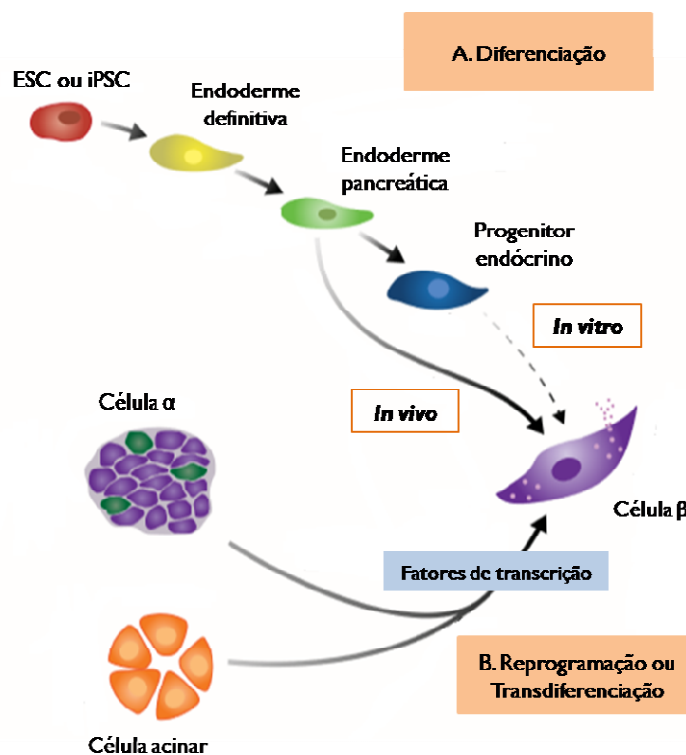
O conhecimento de novas técnicas de terapia génica, aliadas a um progresso contínuo em áreas de biologia molecular e celular, vieram revolucionar e proporcionar fontes alternativas

de células  $\beta$  pancreáticas (Cierpka-Kmiec, Wronska e Kmiec, 2019). Neste contexto, existem duas estratégias principais para regenerar estas células.

Uma das abordagens envolve a reprogramação direta ou transdiferenciação de células somáticas adultas (como células  $\alpha$  e células acinares), baseando-se na expressão forçada de determinados fatores de transcrição que são característicos da célula  $\beta$  pancreática, com o objetivo de estimular a transdiferenciação dessas células em células  $\beta$  pancreáticas (Figura 3) (Randolph, Bhattacharyya e Lian, 2018).

A segunda abordagem envolve a diferenciação *in vitro* de células estaminais pluripotentes, nomeadamente as células estaminais embrionárias (ESC) e as células estaminais pluripotentes induzidas (iPSC), utilizando determinadas vias de sinalização que induzam a sua diferenciação e mimetizem os diferentes estágios de desenvolvimento da célula  $\beta$  pancreática (Figura 3) (Randolph, Bhattacharyya e Lian, 2018).

Ambas as abordagens necessitam de um conhecimento e entendimento profundo das etapas de desenvolvimento de uma célula  $\beta$  pancreática ou pelo menos do seu perfil transcricional (Randolph, Bhattacharyya e Lian, 2018).



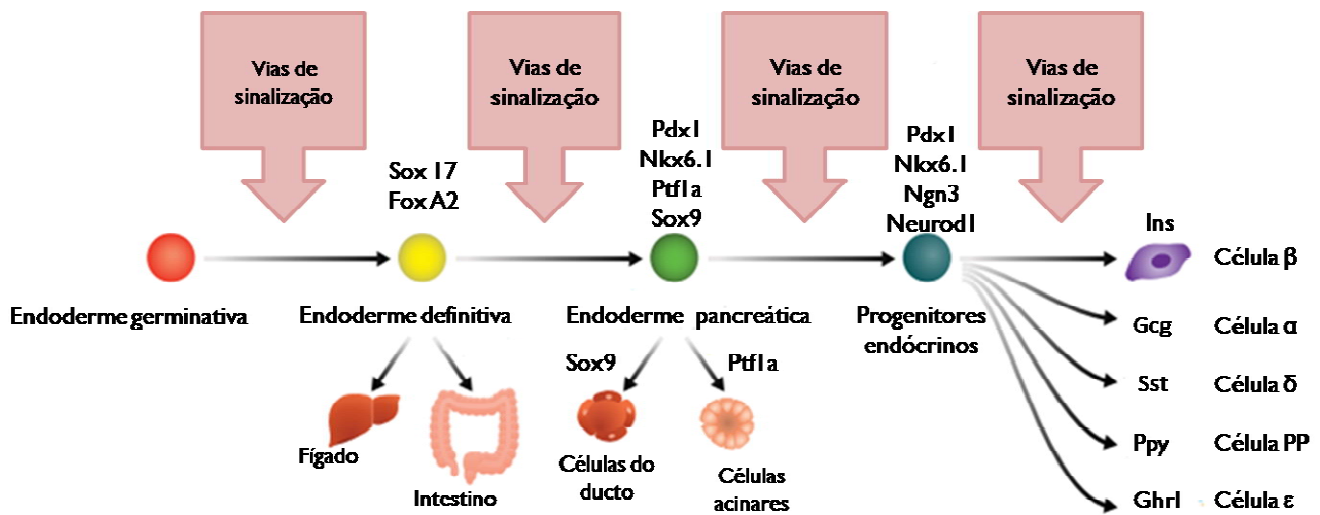
**Figura 3** - Regeneração da célula  $\beta$  pancreática. A) Diferenciação a partir de ESC ou iPSC, que mimetiza as diferentes fases de desenvolvimento pancreático. B) Reprogramação direta ou transdiferenciação a partir de células somáticas, como as células  $\alpha$  ou as células acinares, pela expressão forçada de determinados fatores de transcrição (Adaptado de Pagliuca e Melton, 2013).

### 5.2.1. O pâncreas

O pâncreas é uma glândula complexa, responsável pela produção de hormonas essenciais à homeostase da glicose, bem como, pela produção de enzimas essenciais ao processo de digestão. É constituído por uma componente exócrina, que compreende as células acinares – produzem enzimas digestivas – e as células ductais, que produzem fluidos ricos em bicarbonato que juntamente com as enzimas digestivas, formam o suco pancreático. As células endócrinas, localizadas no Ilhéu de Langerhans, são responsáveis por produzir diferentes células, que por sua vez, segregam diferentes hormonas: (1) as células  $\alpha$  segregam o glucagon, que participa na homeostase da glicose; (2) as células  $\delta$  segregam somatostatina, que inibe a libertação da hormona de crescimento e a libertação de insulina e glucagon; (3) as células PP segregam o polipeptídeo pancreático; (4) as células  $\epsilon$  produzem grelina, que tal como o polipeptídeo pancreático, regulam o apetite; (5) as células  $\beta$ , como já referido anteriormente, produzem insulina, uma hormona essencial para regular os níveis de glicose no sangue (Aghazadeh e Nostro, 2017; Randolph, Bhattacharyya e Lian, 2018).

O desenvolvimento pancreático durante a embriogénese é altamente complexo (Figura 4). Na verdade, os vários tecidos e órgãos do nosso organismo têm origem em três camadas germinativas: ectoderme, mesoderme ou endoderme. O pâncreas, originário da endoderme, inicia o seu desenvolvimento aquando da diferenciação da endoderme germinativa na endoderme definitiva. Existem outros órgãos que também têm origem na endoderme, designadamente o fígado e o intestino, tornam-se, por isso, muito atrativos como órgãos alvo de algumas estratégias de terapia génica aplicada à DMIAI. Após a formação da endoderme definitiva (para simplificar, nesta monografia são omitidas as fases intermédias de formação do tubo digestivo primitivo), desenvolve-se a endoderme pancreática, que engloba todas as células progenitoras do pâncreas. Essas células, por sua vez, originam as células endócrinas e as células exócrinas (Cierpka-Kmiec, Wronska e Kmiec, 2019; Pagliuca e Melton, 2013).

Todas estas etapas de diferenciação estão associadas à expressão de fatores de transcrição e à indução de determinadas vias de sinalização, essenciais conhecer para promover a regeneração de células  $\beta$  pancreáticas (Shahjalal et al., 2018) (Figura 4). Na tabela 3 estão enumeradas as funções dos principais fatores de transcrição.



**Figura 4** - Diferenciação pancreática durante a embriogênese. O desenvolvimento pancreático está associado a vias de sinalização (quadrados a rosa) e à expressão de fatores de transcrição específicos (por cima de cada uma das etapas). Ins- insulina; Gcg- glucagon; Sst- somatostatina; Ppy- polipeptídeo pancreático; Ghrl- grelina (Adaptado de Pagliuca e Melton, 2013).

**Tabela 3** - Principais fatores de transcrição envolvidos na diferenciação pancreática

| Fatores de Transcrição | Designação (Do inglês)  | Função   | Referências                          |
|------------------------|---|--|--------------------------------------|
| Sox 17                 | <i>Sex determining region Y-box 17</i>                          | Diferenciação da endoderme definitiva e regulação do FoxA2;                                  | Cierpka-Kmiec, Wronska e Kmiec, 2019 |
| Fox A2                 | <i>forkhead box A2</i>  | Diferenciação da endoderme definitiva;   |                                      |
| Pdx1                   | <i>pancreas/duodenum homeobox protein 1</i>                     | Organogênese pancreática; Maturação da célula β;   | Zhu et al., 2017                     |
| Nkx6.1                 | <i>Nk6 homeobox protein 1</i>                                   | Diferenciação da endoderme pancreática; Ativação da expressão do gene de insulina;           | Gupta et al., 2018                   |
| Ptf1a                  | <i>pancreas transcription factor 1 subunit alpha</i>            | Diferenciação das células acinares;  | Cierpka-Kmiec, Wronska e Kmiec, 2019 |
| Sox9                   | <i>Sex determining region Y box 9</i>                           | Manutenção da multipotência dos progenitores endócrinos; Diferenciação das células do ducto; | Seymour, 2014                        |
| Neurog 3 (Ngn3)        | <i>Neurogenin 3</i>   | Diferenciação dos progenitores endócrinos;   | Zhu et al., 2017                     |
| Neurod1                | <i>Neurogenic differentiation factor 1</i>                      | Ativação do gene de insulina na célula β e repressão da somatostatina na célula δ;           | Itkin-Ansari et al., 2005            |
| Maf                    | <i>v-Maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A</i> | Chave para a maturação da célula β; Ativação da expressão do gene de insulina;               | Zhu et al., 2017                     |

### 5.2.2. Transdiferenciação de células somáticas adultas em células $\beta$ pancreáticas

Durante muito tempo, considerou-se que era impossível reverter o estado de diferenciação de uma célula somática adulta para um estado de maior plasticidade. No entanto, a evolução na reprogramação nuclear e a descoberta, em 2006, das células estaminais pluripotentes induzidas alterou o panorama vigente até então (Randolph, Bhattacharyya e Lian, 2018). Assim, as técnicas de transdiferenciação/reprogramação direta, ou seja, o processo de conversão de uma célula diferenciada noutro tipo celular sem atingir um estado de pluripotência, têm nutrido um grande interesse por parte da comunidade científica, nomeadamente, para obtenção de células  $\beta$  pancreáticas (Tan et al., 2019).

O objetivo da reprogramação direta é originar células que sejam tão semelhantes às células  $\beta$  nativas quanto possível, nomeadamente, na capacidade de sintetizar insulina quase instantaneamente, em resposta a elevados níveis de glicémia. Para tal, é necessário conhecer os fatores de transcrição que desempenham um papel crítico na diferenciação celular da célula  $\beta$  pancreática, nomeadamente os referidos anteriormente (Tabela 3). Em contexto de terapia génica na DMIAI, o objetivo é sobreexpressar esses fatores de transcrição em células somáticas adultas consideradas células alvo, e assim, promover a sua diferenciação em células  $\beta$  pancreáticas (Handorf, Sollinger e Alam, 2016).

Ao longo dos últimos anos, têm sido feitos diversos estudos no âmbito da transdiferenciação de células somáticas adultas em células  $\beta$  pancreáticas. Na verdade, em 2008, um grupo coordenado pelo Dr. Douglas Melton promoveu a expressão mediada por adenovírus, *in vivo*, de três fatores de transcrição chave do desenvolvimento de uma célula  $\beta$  pancreática, designadamente, *Pdx1*, *Ngn3* e *Mafa*, em células acinares de origem murina (Pagliuca e Melton, 2013; Zhou e Melton, 2008). As células obtidas apresentavam características muito atrativas, nomeadamente: (1) tamanho, forma e estrutura semelhante ao das células  $\beta$  nativas; (2) secreção de insulina; (3) expressão de marcadores genéticos característicos da célula  $\beta$ , como o *Nkx6.1*. (Pagliuca e Melton, 2013; Randolph, Bhattacharyya e Lian, 2018; Zhou e Melton, 2008). No entanto, as células obtidas não se organizavam em estruturas semelhantes aos ilhéus de Langerhans como acontece nas células  $\beta$  nativas, o que dificultou a resposta a elevados níveis de glicémia (Randolph, Bhattacharyya e Lian, 2018; Sneddon et al., 2018; Zhou e Melton, 2008). Com base nas descobertas deste grupo, em 2014, Li e colaboradores, expressaram os mesmos três fatores de transcrição em células acinares, mas através de uma expressão policistronica mediada por adenovírus. Na verdade, observaram a formação de estruturas semelhantes aos ilhéus de Langerhans, o que permitiu a sobrevivência e maturação sustentada das células obtidas (Randolph, Bhattacharyya e Lian, 2018). Posto isto,

foi possível concluir que o sucesso da reprogramação de células acinares em células  $\beta$  é superior quando há expressão policistrónica de *Pdx1*, *Ngn3* e *Mafa*, ao invés da expressão monocistrónica de cada um dos fatores de transcrição em separado, como outrora feito pelo grupo do Dr. Douglas Melton (*Cavelti-Weder et al., 2017*). Por outro lado, também se verificou um aumento da regulação de insulina em resposta a elevados níveis de glicémia, confirmando a importância do ambiente promovido pelos ilhéus de Langerhans na restituição da funcionalidade das células  $\beta$  pancreáticas (*Randolph, Bhattacharyya e Lian, 2018*). Mais recentemente, em 2018, Xiao e colaboradores, reprogramaram células  $\alpha$  de origem murina em células  $\beta$  pancreáticas, pela transdução mediada por vírus adenoassociados que codificavam para os fatores *Pdx1* e *Mafa*. As células  $\beta$  obtidas demonstraram ser altamente funcionais e muito semelhantes às células  $\beta$  nativas (*Osipovich e Magnuson, 2018; Xiao et al., 2018*).

#### **5.2.2.1. Considerações finais relativas à transdiferenciação de células somáticas adultas em células $\beta$ pancreáticas**

A regeneração de células  $\beta$  pancreáticas, a partir de técnicas de transdiferenciação, tem demonstrado resultados muito promissores, como fontes alternativas de células  $\beta$  pancreáticas (*Randolph, Bhattacharyya e Lian, 2018*). Na verdade, baseiam-se na expressão forçada de determinados factores de transcrição numa célula somática adulta, com o objetivo de promover a sua transdiferenciação em células  $\beta$  pancreáticas. Na grande maioria dos casos, as células somáticas escolhidas possuem uma origem embrionária próxima à da célula  $\beta$ , como é o caso das células acinares e das células  $\alpha$ , o que é facilitador da transdiferenciação. Para além disso, quando se regenera uma célula  $\beta$  deve-se ter também em conta a importância do microambiente fornecido pelos ilhéus de Langerhans, que está comprovado influenciar a funcionalidade de uma célula  $\beta$  pancreática (*Zhou e Melton, 2008*). No entanto, apesar de ser uma estratégia promissora no âmbito da DMIAI, as células  $\beta$  substitutas continuam a estar sujeitas à pré-imunidade existente característica desta patologia (*Handorf, Sollinger e Alam, 2016*). Assim sendo, para que esta estratégia possa ser considerada uma realidade clínica, é essencial um investimento em técnicas de imunomodulação, de forma a garantir a proteção das células  $\beta$  regeneradas (*Randolph, Bhattacharyya e Lian, 2018*). Para além disso, é necessário um contínuo investimento em sistemas de transporte eficazes e seguros e otimizar os protocolos de reprogramação direta, de forma a que seja possível a transposição para o homem.

### 5.2.3. Diferenciação de células $\beta$ pancreáticas a partir de células estaminais pluripotentes induzidas (iPSC)

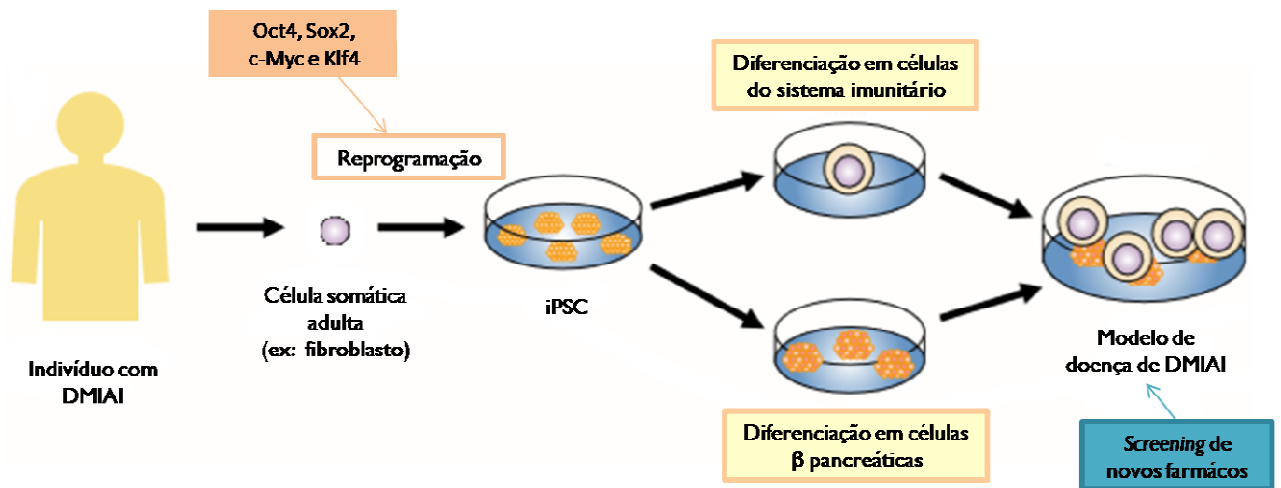
As células estaminais pluripotentes têm capacidade de auto-renovação ilimitada e potencial para se diferenciarem em qualquer tipo de célula adulta. Estas células podem ser diferenciadas em células  $\beta$  pancreáticas através da indução ou inibição de vias de sinalização específicas, que mimetizam o desenvolvimento embrionário pancreático (Figura 3) (Cierpka-Kmiec, Wronska e Kmiec, 2019; Ge, Chen e Chen, 2017). Em particular, as células estaminais embrionárias (ESC) têm demonstrado enorme potencial na regeneração de células  $\beta$  pancreáticas (Pathak et al., 2019; Shahjalal et al., 2018; Millman e Pagliuca, 2017)). Aliás, encontram-se a decorrer ensaios clínicos em fase 1 e/ou 2 com células progenitoras pancreáticas derivadas de ESC, no âmbito da DMIAI (Anexos – Tabela I) (ClinicalTrials.gov referência: NCT02239354; NCT03162926; NCT03163511).

Outra das alternativas neste contexto envolve a utilização de células estaminais pluripotentes induzidas (iPSC). Em 2006, o grupo japonês liderado por Shynia Yamanaka demonstrou que a expressão forçada de quatro fatores de transcrição (*Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* e *Klf4*) introduzidos por retrovírus em fibroblastos de murganhos adultos, induziam a reprogramação de células somáticas para um estado de pluripotência, originando, as iPSC. (Takahashi e Yamanaka, 2006).

De facto, estas células são muito promissoras uma vez que possuem potencial de diferenciação muito semelhante às ESC, mas têm a vantagem de ter origem em células somáticas adultas, ultrapassando assim, as questões éticas associadas às ESC, principalmente quando estas implicam a destruição de embriões (Shahjalal et al., 2018). As iPSC, à semelhança das ESC, têm sido utilizadas em diversos estudos no âmbito da regeneração de células  $\beta$  pancreáticas. Neste sentido, em 2014, Pagliuca e colaboradores obtiveram mais de 33% de células  $\beta$  pancreáticas *in vitro* derivadas de ESC/iPSC. Para além disto, as células  $\beta$  obtidas expressavam marcadores de células  $\beta$  nativas, e respondiam a variações de glicose associadas ao aumento de cálcio intracelular. Este protocolo provou que as células estaminais pluripotentes (ESC e iPSC) podem constituir fontes alternativas de células  $\beta$  pancreáticas (Ge, Chen e Chen, 2017; Pagliuca et al., 2014; Randolph, Bhattacharyya e Lian, 2018).

Para além disto, as iPSC podem ter origem numa célula somática de um doente com DMIAI, o que pode ser vantajoso se se pretender realizar um autotransplante ou ainda na criação de modelos de doença e *screening* de novos fármacos (Kondo et al., 2018). Na verdade, é possível extrair uma célula somática de um indivíduo com DMIAI (ex: fibroblasto),

reprogramá-la *in vitro* numa iPSC, e posteriormente diferenciá-la numa célula  $\beta$  pancreática ou numa célula do sistema imunitário. Este potencial das iPSC pode contribuir para um maior entendimento da fisiopatologia da DMIAI e para a criação de modelos de doença *in vitro*, que facilitam a descoberta de novas alternativas terapêuticas (Figura 5) (Hossainet *al.*, 2016).



**Figura 5** - Importância das iPSC na criação de modelos de doença na DMIAI. A partir de uma célula somática adulta de um indivíduo com DMIAI, é possível originar iPSC, através da expressão forçada de *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* e *Klf4*. Para que haja a reprodução fidedigna do fenótipo da DMIAI, é importante mimetizar o ambiente auto-imune desta patologia. A criação de modelos de doença potencia o screening de novos fármacos. *Oct4*- octamer-binding transcription factor 4; *Sox2*- sex determining region Y-box 2; *c-Myc*: Master Regulator of Cell Cycle Entry and Proliferative Metabolism; *Klf4*- Krüppel-like factor 4 (Adaptado de Kondo *et al.*, 2017).

### 5.2.3.1. Considerações relativas à diferenciação de células $\beta$ pancreáticas a partir de células estaminais pluripotentes induzidas (iPSC)

As células estaminais pluripotentes, nomeadamente as células estaminais embrionárias (ESC) e as células estaminais pluripotentes induzidas (iPSC), têm demonstrado um enorme potencial em terapia celular e génica na DMIAI (Jacobson e Tzanakakis, 2017). Apesar de ainda não existirem, de momento, ensaios clínicos com células  $\beta$  pancreáticas derivadas de iPSC, estas células apresentam características muito atrativas e por isso é provável que tenham um futuro muito promissor como estratégia terapêutica na DMIAI (Kondo *et al.*, 2018). No entanto, apesar dos avanços significativos nos protocolos de diferenciação destas células (ESC e iPSC), há uma multiplicidade de protocolos, não existindo consenso relativamente ao melhor protocolo. Deste modo, é importante investir na optimização e padronização destes protocolos, de modo a aumentar a eficiência de diferenciação, na redução da probabilidade de alterações genómicas nas ESC/iPSC com potencial oncogénico (formação de tumores), na redução da variabilidade entre as linhas celulares obtidas e



maximização do seu custo-efetividade (Jacobson e Tzanakakis, 2017). Para além disso, após obter a célula  $\beta$  pancreática, é necessário garantir a sua proteção da auto-imunidade pré-existente da DMIAI. Neste sentido, surgiu a hipótese de encapsular estas células em dispositivos, que sejam imunoprotetores e semi-permeáveis, ou seja, que garantam a entrada de nutrientes, oxigénio, glicose, mas que protejam as células do sistema imunitário. Estes dispositivos são implantados subcutaneamente e são passíveis de ser retirados caso necessário (Anexos, Figura 2). De momento, há ensaios clínicos a decorrer para testar a segurança e eficácia destes dispositivos na encapsulação de células progenitoras pancreáticas derivadas de ESC (Sneddon et al., 2018).

### **5.3. PRODUÇÃO DE INSULINA EM CÉLULAS NÃO $\beta$**

Dada a etiologia auto-imune associada à DMIAI, a aplicabilidade das estratégias de regeneração das células  $\beta$  pancreáticas anteriormente descritas pode ser limitada (Handorf, Sollinger e Alam, 2015). Neste contexto, e tendo em conta que a função primária das células  $\beta$  pancreáticas é produzir insulina, a comunidade científica tem apostado na indução da produção de insulina em células não  $\beta$  (Han et al., 2011; Handorf, Sollinger e Alam, 2016). Embora a insulina seja um autoantígeno associado à natureza auto-imune da DMIAI, o risco teórico de recorrência de autoimunidade é bastante reduzido (Handorf, Sollinger e Alam, 2016).

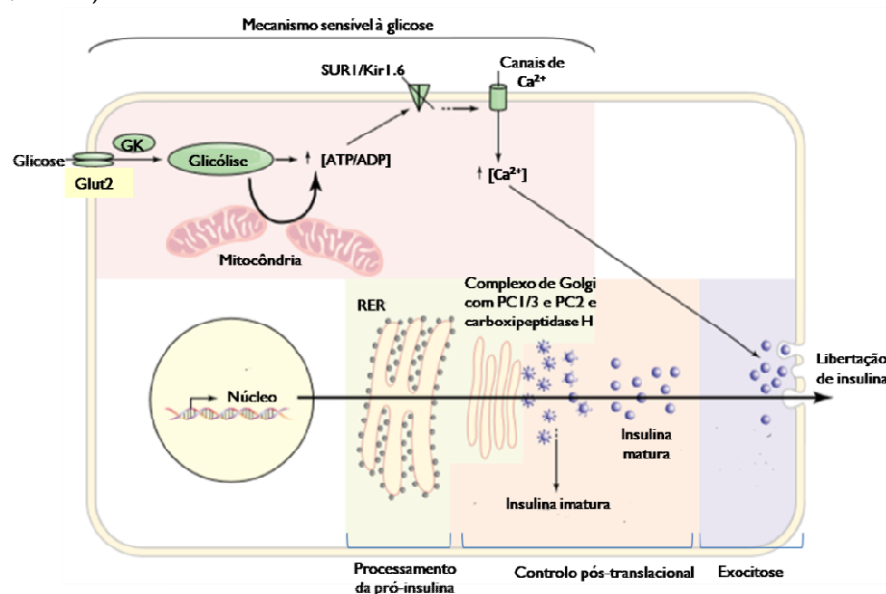
De facto, as células  $\beta$  pancreáticas possuem uma extraordinária capacidade de síntese e libertação de insulina, em resposta a elevados níveis de glicémia (Chan, Fujimiya e Kojima, 2003). Esta estratégia terapêutica, só poderá constituir uma opção viável na DMIAI, se conseguir mimetizar de alguma forma a capacidade de resposta destas células (Figura 6). Para tal, devem ser tidos em conta determinados critérios: (1) Características do órgão/célula - alvo: idealmente, deve ser sensível a variações de glicémia, armazenar insulina em vesículas secretoras e libertá-la de forma rápida; (2) Características da insulina produzida: idealmente, a expressão do transgene de insulina deve ser regulada de acordo com as variações de glicémia, ou seja, deve aumentar, em situações de hiperglicémia, e diminuir em situações de euglicémia; (3) Características do vetor a utilizar: idealmente, deve ser seguro, seletivo e eficaz na manutenção da expressão sustentada do transgene de insulina na célula-alvo (Handorf, Sollinger e Alam, 2015 e 2016).

#### **5.3.1. Características do órgão/célula alvo**

Uma das características essenciais que a célula alvo deve ter é a capacidade de detetar flutuações de glicémia e, subsequentemente, libertar insulina (Chan, Fujimiya e Kojima, 2003).

Isto implica que as células alvo expressem o transportador de glicose-2 (GLUT-2) e a glucocinase (GK), que são considerados os “sensores de glicose” da célula  $\beta$  pancreática (Figura 6). O GLUT-2 é uma proteína transmembranar que permite o transporte de glicose para dentro das células, enquanto que a glucocinase é uma enzima que fosforila a glicose, dando início ao seu metabolismo intracelular (Handorf, Sollinger e Alam, 2016). Além das células  $\beta$  pancreáticas, as únicas células que expressam simultaneamente GLUT-2 e GK são os hepatócitos, as células do hipotálamo e do intestino delgado (Handorf, Sollinger e Alam, 2015). De todos os mencionados, as células alvo mais utilizadas são os hepatócitos, uma vez que apresentam características que os tornam particularmente atrativos: têm origem na endoderme, tal como o pâncreas e as suas células e desempenham um papel importante na homeostase da glicose (Handorf, Sollinger e Alam, 2016; Wong, Hawthorne e Manolios, 2011). Para além disso, após detetarem alterações dos níveis de glicémia através do GLUT-2 e GK, as células alvo têm de ter a capacidade de produzir insulina. Para tal, é necessário que processem a pró-insulina - uma forma precursora de insulina – em insulina madura, uma vez que a pró-insulina tem menos de 10% da atividade da insulina madura (Handorf, Sollinger e Alam, 2016). Para o processamento adequado da pró-insulina, são necessárias as pró-hormonas convertases 1/3 e 2 (PC1/3 e PC2) e a carboxipeptidase H (Figura 6) (Chan, Fujimiya e Kojima, 2003).

Por fim, a célula alvo deve ter a capacidade de armazenar insulina em grânulos de secreção após uma fase de hiperglicémia. No entanto, os hepatócitos não têm capacidade nem para armazenar insulina em vesículas secretoras nem para expressar a PC1/3 e PC2 (Handorf, Sollinger e Alam, 2015).



**Figura 6** - Mecanismo de produção de insulina pela célula  $\beta$  pancreática: Sensores de glicose como o GLUT-2 e GK, essenciais para a entrada e metabolismo da glicose; Processamento da pró-insulina em insulina madura pela PC1/3 e PC2 e carboxipeptidase H; Liberação de insulina através de exocitose (Adaptado de Chan, Fujimiya e Kojima, 2003).

### 5.3.2. Características da insulina produzida

Um dos parâmetros mais críticos para o sucesso desta estratégia terapêutica é a construção do transgene de insulina. Idealmente, deve ser sensível a variações dos níveis de glicemia, de forma a produzir quantidade suficiente de insulina para os regularizar (*Handorf, Sollinger e Alam, 2015*). Para cumprir este propósito, têm sido utilizados promotores específicos para os hepatócitos, que respondam às variações dos níveis de glicemia, como é o caso do promotor da glucose-6-fosfatase utilizado por Chen e colaboradores. Este grupo comprovou que o aumento da atividade do promotor estava associado ao aumento dos níveis de glicemia e que a produção subsequente de insulina promoveu a diminuição de hiperglicemia em murganhos diabéticos (*Chen, Meseck e Woo, 2001*).

No entanto, também é possível utilizar promotores específicos do fígado, em que a sensibilidade à glicose é induzida através da incorporação de sequências que respondem à glicose - GIRE (do inglês: *glucose-inducible response elements*). Os GIRE são sequências de DNA sensíveis à glicose encontradas nas regiões promotoras de alguns genes como o gene da L-piruvato cinase (L-PK) (*Handorf, Sollinger e Alam, 2016*). Neste contexto, Thulé e colaboradores, incorporaram uma sequência GIRE no promotor de IGFBI (*Do inglês: insulin-like growth factor binding protein-1*), resultando numa expressão de insulina dependente de glicose (*Thulé, Liu e Phillips, 2000*). Todavia, quer o promotor da glucose-6-fosfatase quer o promotor de IGFBI com GIRE, apesar de responderem a variações de glicose, são inibidos pela insulina (*Chen, Meseck e Woo, 2001; Thulé, Liu e Phillips, 2000*). Para tentar ultrapassar esta limitação, Handorf e colaboradores, utilizaram outro promotor específico do fígado, o promotor de albumina, que não respondia nem à insulina nem a variações de glicose. De seguida, introduziram a sequência GIRE, com o objetivo de originar um promotor que respondesse a variações de glicose, mas que não fosse inibido pela insulina. Este grupo observou que os níveis de glicemia em murganhos diabéticos diminuíram, o que comprovou a eficácia de GIRE na indução da sensibilidade à glicose. No entanto, estes efeitos obtidos utilizando um adenovírus como vetor foram transientes, manifestando-se apenas durante cerca de um mês (*Handorf, Sollinger e Alam, 2016*).

Outro aspeto fundamental no *design* do transgene de insulina é a sequência de preproinsulina. A preproinsulina forma a pró-insulina, que é a forma precursora da insulina madura. Como os hepatócitos não expressam a PC1/3 e PC2, essenciais ao processamento de pró-insulina em insulina madura, é necessário efetuar alterações à sequência de preproinsulina, de forma a compensar a ausência de PC1/3 e PC2. Neste contexto, a modificação mais comum é a incorporação de sequências de clivagem que sejam

reconhecidas pela furina - uma protease que cliva eficazmente proteínas e que está presente no fígado - e que por isso é utilizada para clivar a pró-insulina (Chan, Fujimiya e Kojima, 2003). Por fim, após aprimorar o *design* do transgene de insulina, o passo seguinte é escolher um sistema de transporte, seguro, eficaz e seletivo, que permita a transfeção ou transdução das células alvo (Handorf, Sollinger e Alam, 2016).

### **5.3.3. Características do sistema de transporte**

Para eleger o melhor sistema de transporte que veicule o transgene de insulina, é necessário que apresente determinadas características, como: (1) Ser seletivo para a célula alvo; (2) Infetar células com e sem capacidade de divisão; (3) Ser não imunogénico; (4) Promover uma expressão sustentada da insulina, para evitar administrações repetidas, que tendem a ser ineficazes, principalmente se o organismo tiver desenvolvido anticorpos contra o vetor; (5) Ser passível de produção fácil e em grande escala (Handorf, Sollinger e Alam, 2015 e 2016).

Neste âmbito, os vetores virais são preferencialmente utilizados, nomeadamente os adeno-vírus, os vírus adeno-associados, os retrovírus e os lentivírus. Dos mencionados anteriormente, os lentivírus são candidatos particularmente bons, uma vez que são pouco imunogénicos, infetam células com e sem capacidade de divisão, induzem uma expressão permanente e estável do transgene de insulina e não há evidência que promovam a ativação de oncogenes (Handorf, Sollinger e Alam, 2015). Neste contexto, Ren e colaboradores, usaram lentivírus para que o fígado de murganhos diabéticos induzidos por estreptozotocina expressasse insulina (Ren et al., 2007). Este grupo observou níveis normais de glicémia e não houve evidência de comprometimento hepático nem reação auto-imune aos hepatócitos transduzidos (Handorf, Sollinger e Alam, 2016).

### **5.3.4. Considerações relativas à produção de insulina em células não $\beta$**

Pelo descrito anteriormente, é notório que a produção de insulina em hepatócitos é uma estratégia promissora, que tem tido avanços significativos na perspetiva de otimizar a sua aplicação (Handorf, Sollinger e Alam, 2015). É uma estratégia simples em comparação com as restantes e que poderá contornar a auto-imunidade pré-existente característica da DM1A. Uma das principais dificuldades desta estratégia terapêutica é garantir que a expressão de insulina é sensível a variações dos níveis de glicémia. Para isso, são utilizados promotores específicos do fígado e sensíveis para a glicose, como é o caso do promotor da glucose-6-fosfatase. Para além disso, com a descoberta das sequências GIRE, foi possível induzir a sensibilidade à glicose em promotores como o IGFBP, que a priori não tinham essa capacidade. Apesar destes promotores promoverem um controlo satisfatório dos níveis de

glicémia, ainda não conseguem reproduzir na totalidade a rapidez de resposta de uma célula  $\beta$  pancreática (Handorf, Sollinger e Alam, 2016).

De facto, para que seja possível a aplicação clínica desta estratégia terapêutica, é necessário investir no desenvolvimento de sistemas de transporte, que optimizem a expressão sustentada do transgene de insulina. Na verdade, apesar dos lentivírus apresentarem características bastante atrativas, ainda são difíceis de produzir em larga escala (Handorf, Sollinger e Alam, 2016). Por outro lado, apesar desta estratégia terapêutica já ter apresentado resultados bastante promissores em modelos animais (como murganhos), estes modelos não reproduzem na totalidade o organismo humano, principalmente quando há uma origem auto-imune associada, como no caso da DM1A1 (Handorf, Sollinger e Alam, 2015).

#### 5.4. Sistematização das principais características das estratégias de terapia génica abordadas

|                            | Prevenção da destruição auto-imune das células $\beta$   | Regeneração da célula $\beta$   | Produção de insulina em células não $\beta$  |
|----------------------------|--|---|--|
| <b>Benefícios</b>          | Utilização promissora no transplante de células $\beta$ pancreáticas regeneradas, a fim de evitar a sua destruição pela auto-imunidade preexistente;   | Fonte muito atrativa para regenerar células $\beta$ e ultrapassar a limitação da escassez de dadores nos transplantes pancreáticos; | Poderá contornar a auto-imunidade pré-existente característica da DM1A1;   |
| <b>Obstáculos</b>          | <u>Obstáculos em utilização preventiva:</u><br>É necessária uma detecção precoce da DM1A1;<br>É difícil prever os indivíduos que estão em risco de desenvolver DM1A1;<br>O sistema imunitário é altamente complexo;                  | As células $\beta$ regeneradas necessitam de proteção da auto-imunidade preexistente;   | Os promotores utilizados não reproduzem na totalidade a rapidez de resposta de uma célula $\beta$ a variações de glicémia; |
| <b>Perspetivas Futuras</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Necessidade de investimento em sistemas de transporte simultaneamente eficazes, seguros e seletivos para a célula-alvo;</li> <li>Necessidade de transposição para modelos humanos;</li> </ul> |   |  |

## 6. Conclusão

A *Diabetes Mellitus* é uma doença metabólica com elevada prevalência a nível mundial. Em particular, a *Diabetes Mellitus* tipo I afeta um grande número de crianças, adolescentes e também adultos. Atualmente, a terapêutica convencional envolve insulina exógena, que apesar de controlar os níveis de glicémia, apresenta risco de causar hipoglicémias. Por outro lado, existe a possibilidade do transplante pancreático ou de ilhéu de Langerhans, que permitem um maior controlo glicémico quando comparado com a insulino-terapia exógena, mas apresentam como limitação um número reduzido de doadores e a necessidade de imunossupressão crónica. Por tudo isto, a terapia génica surgiu como potencial alternativa terapêutica nesta patologia.

A *Diabetes Mellitus* tipo I resulta, maioritariamente, de uma destruição auto-imune das células  $\beta$  pancreáticas, o que origina défices de insulina e em consequência, hiperglicémias. Neste contexto, a terapia génica pode atuar em três ângulos diferentes.

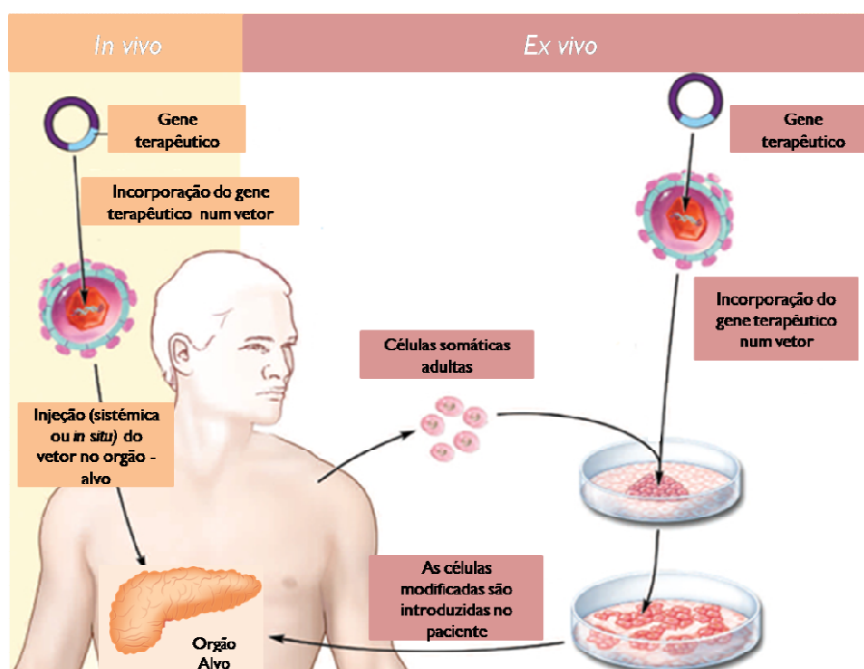
Primeiramente, é possível evitar a destruição auto-imune das células  $\beta$  através de estratégias de imunorregulação, nomeadamente imunorregulação com citocinas, como é o caso da IL-4. Esta estratégia é promissora, mas para que tenha aplicabilidade clínica em título de profilaxia, é necessário um diagnóstico precoce desta patologia. A verdade é que, geralmente, quando há manifestação de sintomatologia, já houve perda significativa de células  $\beta$  pancreáticas.

Por outro lado, é possível regenerar as células  $\beta$  pancreáticas, através da reprogramação direta de células somáticas ou através da diferenciação de células estaminais pluripotentes. Estas estratégias são muito promissoras como fontes alternativas de células  $\beta$ , mas é necessário garantir a proteção das células obtidas contra a auto-imunidade pré-existente.

A última estratégia abordada nesta monografia envolve a indução da produção de insulina, função primária das células  $\beta$ , noutras células do organismo, nomeadamente nos hepatócitos. Neste contexto, têm surgido promotores cada vez mais completos e eficazes, mas que ainda não conseguem reproduzir a rapidez de uma célula  $\beta$  em resposta a variações dos níveis de glicémia.

Em conclusão, é notório o avanço que a terapia génica tem tido com vista ao tratamento da *Diabetes Mellitus* tipo I. No entanto, é necessário um investimento contínuo em protocolos mais eficientes e em sistemas de transporte simultaneamente seguros e eficazes. Na verdade, apesar de ainda existirem limitações, a terapia génica é uma estratégia muito promissora, e que no futuro, poderá constituir uma realidade clínica na *Diabetes Mellitus* tipo I.

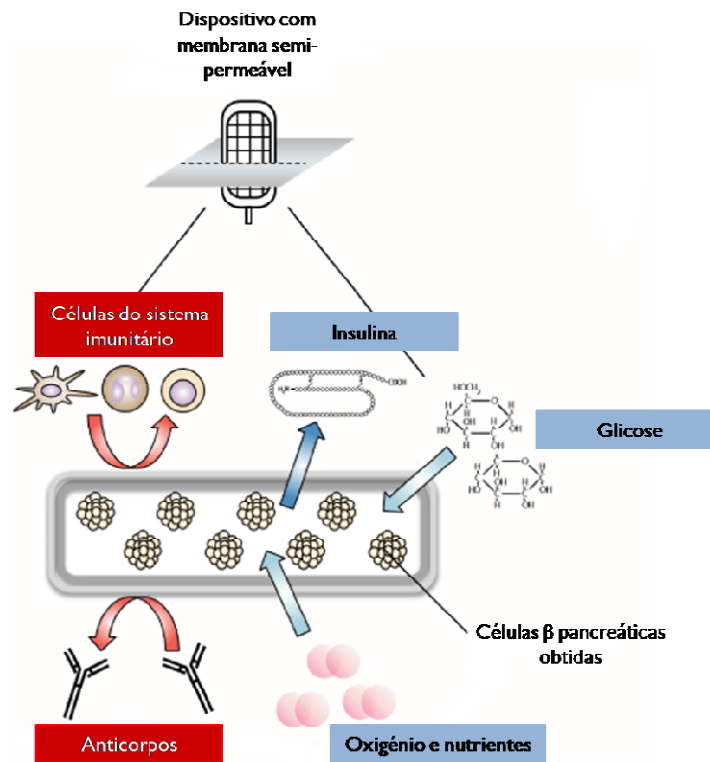
## 7. Anexos



**Figura 1** - Diferenças entre a terapia gênica *in vivo* e *ex vivo*. Na terapia gênica *in vivo* há injeção sistêmica ou *in situ* do vetor na célula alvo. Na terapia gênica *ex vivo*, são retiradas células somáticas do paciente, ocorrendo posteriormente transfeção ou transdução dessas células, *in vitro*, pelo vetor contendo o gene terapêutico. Quando as células modificadas desenvolvem o fenótipo pretendido, são re-implantadas no organismo do doente (Adaptado de Zwaka, 2006).

**Tabela 1** - Ensaios Clínicos a decorrer, utilizando células progenitoras pancreáticas derivadas de ESC.

| Nome  | Data de Início   | Fase             | Localização  | Referência                                 |
|---|------------------|------------------|--------------|--|
| A Prospective, Multicenter, Open-Label, First-in-Human Phase 1/2 Study With Two Cohorts to Evaluate the Safety, Tolerability, and Efficacy of Various Doses of VC-01™ Combination Product in Subjects With Type 1 Diabetes Mellitus | Setembro, 2014   | Fase 1<br>Fase 2 | USA e Canadá | ClinicalTrials.gov referência: NCT02239354 |
| An Open-Label Study Evaluating the Safety and Tolerability of VC-02™ Combination Product in Subjects With Type 1 Diabetes Mellitus  | 5 de Julho, 2017 | Fase 1           | Canadá       | ClinicalTrials.gov referência: NCT03162926 |
| An Open-Label, First-In-Human Study Evaluating the Safety, Tolerability, and Efficacy of VC-02™ Combination Product in Subjects With Type 1 Diabetes Mellitus and Hypoglycemia Unawareness  | 6 de Julho, 2017 | Fase 1<br>Fase 2 | USA e Canadá | ClinicalTrials.gov referência: NCT03163511 |



**Figura 2-** Modelo de dispositivo imunoprotetor. Este dispositivo deve ser semi-permeável, ou seja, deve ter a capacidade de proteger as células  $\beta$  pancreáticas do sistema imune, mas ao mesmo tempo, permitir a sua oxigenação e nutrição (Adaptado de *Kondo et al., 2018*).



## 8. Bibliografia

REGAZZI, R. - **MicroRNAs as therapeutic targets for the treatment of diabetes mellitus and its complications.** Expert Opinion on Therapeutic Targets. **22** (2018) 153-160.

KROGER, C. J.; CLARK, M.; KE, Q.; TISCH, R. M. - **Therapies to Suppress  $\beta$  Cell Autoimmunity in Type I Diabetes.** Frontiers in Immunology. **9** (2018).

PRINA, M. R. C. M.; ALVES, J. M.; SOBRINHO, J. L. S.; RIBEIRO, A. J. - **Diabetes gene therapy by means of nanoparticles.** Boletim Informativo Geum. **5** (2014) 100-112.

TAN, S. Y.; WONG, J. L. M.; SIM, Y. J.; WONG, S. S.; ELHASSAN, S. A. M.; TAN, S. H.; LIM, G. P. L.; TAY, N. W. R.; ANNAN, N. C.; BHATTAMISRA, S. K.; CANDASAMY, M. - **Type I and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention.** Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews. **13** (2019) 364-372.

BÉLGICA. International diabetes federation. **IDF Diabetes Atlas 8th edition.** Bruxelas: IDF, 2017.

PORTUGAL. Direção-geral da saúde. **Programa Nacional para a Diabetes.** Lisboa: DGS, 2017.

KATSAROU, A.; GUDBJÖRNSDOTTIR, S.; RAWSHANI, A.; DABELEA, D.; BONIFACIO, E.; ANDERSON, B. J.; JACOBSEN, L. M.; SCHATZ, D. A.; LERNMARK, A. - **Type I diabetes mellitus.** Nature Reviews Disease Primers. **3** (2017) 1-17.

SCHWARTZ, S. S.; EPSTEIN, S.; CORKEY, B. E.; GRANT, S. F. A.; GAVIN III, J. R.; AGUILAR, R. B.; HERMAN, M. E. - **A Unified Pathophysiological Construct of Diabetes and its Complications.** Trends in Endocrinology & Metabolism. **28** (2017) 645-655.

NOGUCHI, H. – **Gene therapy for diabetes.** CHERNAJOVSKY, Y.; ROBBINS, R. D. Gene Therapy for Autoimmune and Inflammatory Diseases, Basel : Springer Basel, Inc., 2010, ISBN: 9783034601658. p. 39-46.

WONG, M. S.; HAWTHORNE, W. J.; MANOLIOS, N. - **Gene therapy in diabetes.** Self/Nonsel. **1** (2010) 165-175.

REDONDO, M. J.; GEYER, S.; STECK, A. K.; SHARP, S.; WENTWORTH, J. M.; WEEDON, M. N.; ANTINOZZI, P.; SOSENKO, J.; ATKINSON, M.; PUGLIESE, A.; ORAM, R.A; THE

TYPE I DIABETES TRIALNET STUDY GROUP - **A Type I Diabetes Genetic Risk Score Predicts Progression of Islet Autoimmunity and Development of Type I Diabetes in Individuals at Risk.** *Diabetes Care.* **41** (2018) 1887-1894.

MIAO, C.; CHANG, J.; ZHANG, G.; FANG, Y. - **MicroRNAs in type I diabetes: new research progress and potential directions.** *Biochemistry and Cell Biology.* **96** (2018) 498-506.

PATHAK, V.; PATHAK, N. M.; O'NEILL, C. L.; GUDURIC-FUCHS, J.; MEDINA, R. J. - **Therapies for Type I Diabetes: Current Scenario and Future Perspectives.** *Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes.* **12** (2019)1-13.

ROCK, K. L.; REITS, E.; NEEFJES, J. - **Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules.** *Trends in Immunology.* **37** (2016) 724-737.

ANDRZEJEWSKI, S.; MURALI, A.; RAMLOGAN-STEEL, C.; EDWARDS, K. P.; EFRON, N.; STEEL, J. C.; LAYTON, C. J. - **Adeno-associated virus neutralising antibodies in type I diabetes mellitus.** *Gene Therapy.* **26** (2019) 250-263.

SMITH, M. J.; SIMMONS, K. M.; CAMBIER, J. C. - **B cells in type I diabetes mellitus and diabetic kidney disease.** *Nature Reviews Nephrology.* **13** (2017) 712-720.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - **Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018.***Diabetes Care.***41** (2018) 13-27.

HANDORF, A. M.; SOLLINGER, H. W.; ALAM, T. - **Insulin Gene Therapy for Type I Diabetes Mellitus.***Experimental and Clinical Transplantation.* **13** (2015) 37-45.

HANDORF, A. M.; SOLLINGER, H. W.; ALAM, T. - **Insulin Gene Therapy for Type I Diabetes Mellitus: Unique Challenges Require Innovative Solutions.***Modern Tools for Genetic Engineering. InTechOpen,* **157** (2016) 153-165.

AGHAZADEH, Y.; NOSTRO, M. C. - **Cell Therapy for Type I Diabetes: Current and Future Strategies.** *Current Diabetes Reports.***17**(2017) 1-9.

YECHOOR, V.; CHAN, L. - **Gene Therapy Progress and Prospects: Gene therapy for diabetes mellitus.***Gene Therapy.* **12** (2005) 101-107.

KEELER, A. M.; ELMALLAH, M. K.; FLOTTE, T. R. - **Gene Therapy 2017: Progress and Future Directions.** *Clinical and Translational Science.* **10** (2017) 242-248.

WIRTH, T.; PARKER, N.; YLÄ-HERTTUALA, S. - **History of gene therapy.** *Gene.* **525** (2013) 162-169.

TRENT, R. J. A.; ALEXANDER, I. E. - **Gene therapy: applications and progress towards the clinic.**Internal Medicine Journal. **34** (2004) 621-625.

CHELLAPPAN, D. K.; SIVAM, N. S.; XIANG, T. K.; PAN, L. W.; FUI, T. Z.; KIEN, C.; NICO, K.; YI, F. J.; CHELLIAN, J.; CHENG, L. L.; DAHIYA, R.; GUPTA, G.; SINGHVI, G.; NAMMI, S.; HANSBRO, P. M.; DUA, K. - **Gene therapy and type I diabetes mellitus.** Biomedicine & Pharmacotherapy. **108** (2018) 1188-1200.

BOUARD, D.; ALAZARD-DANY, N.; COSSET, F. L. - **Viral vectors: from virology to transgene expression.** British Journal of Pharmacology. **157** (2009) 153-165.

AL-ALLAF, F. A.; COUELLE, C.; WADDINGTON, S. N.; DAVID, A. L.; HARBOTTLE, R.; THEMIS, M.- **LDLR-Gene therapy for familial hypercholesterolaemia: problems, progress, and perspectives.**International Archives of Medicine. **3** (2010) 1-25.

NAYEROSSADAT, N.; MAEDEH, T.; ALI, P. A.- **Viral and nonviral delivery systems for gene delivery.**Advanced Biomedical Research. **1**(2012) 1-11.

PENA, S. A.; IYENGAR, R.; ESHRAGHI, R. S.; BENCIE, N.; MITTAL, J.; ALJOHANI, A.; MITTAL, R.; ESHRAGHI, A. A. - **Gene Therapy for Neurological Disorders: Challenges and Recent Advancements.**Journal of Drug Targeting. **1** (2019) 1-18.

CHAN, L.; FUJIMIYA, M.; KOJIMA, H. - **In vivo gene therapy for diabetes mellitus.** Trends in Molecular Medicine. **9** (2003) 430-435.

NASO, M. F.; TOMKOWICZ, B.; PERRY III, W. L.; STROHI, W. R. - **Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy.**BioDrugs. **31** (2017) 317-334.

LAZO DE LA VEGA-MONROY, M. L.; FERNANDEZ-MEJI, C. - **Beta-Cell Function and Failure in Type I Diabetes.**Type I Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy. InTechOpen, **1** (2011) 93-116.

CREUSOT, R. J.; YAGHOUBI, S. S.; KODAMA, K.; DANG, D. N.; DANG, V. H.; BRECKPOT, K.; THIELEMANS, K.; GAMBHIR, S. S.; FATHMAN, C. G. - **Tissue-targeted therapy of autoimmune diabetes using dendritic cells transduced to express IL-4 in NOD mice.** Clinical Immunology. **127** (2008) 176-187.

GE, Q.; CHEN, L.; CHEN, K. - **Treatment of Diabetes Mellitus Using iPS Cells and Spice Polyphenols.**Journal of Diabetes Research. **1** (2017) 1-11.

DUFFY, C.; PRUGUE, C.; GLEW, R.; SMITH, T.; HOWELL, C.; CHOI, G.; COOK, A. D. - **Feasibility of Induced Pluripotent Stem Cell Therapies for Treatment of Type I**

**Diabetes.** Tissue Engineering Part B: Reviews. **24** (2018) 482-492.

KONDO, Y.; TOYODA, T.; INAGAKI, N.; OSAFUNE, K. - **iPSC technology-based regenerative therapy for diabetes.** Journal of Diabetes Investigation. **9** (2018) 234-243.

CIERPKA-KMIEC, K.; WRONSKA, A.; KMIEC, Z. - **In vitro generation of pancreatic  $\beta$ -cells for diabetes treatment. I.  $\beta$ -like cells derived from human pluripotent stem cells.** Folia Histochemica et Cytobiologica. **57** (2019) 1-14.

SHAHJALAL, H. M. D.; DAYEM, A. A.; LIM, K. M.; JEON, T.; CHO, S. - **Generation of pancreatic  $\beta$  cells for treatment of diabetes: advances and challenges.** Stem Cell Research & Therapy. **9**(2018) 1-19.

RANDOLPH, L. N.; BHATTACHARYYA, A.; LIAN, X. L. - **Human Beta Cells Generated from Pluripotent Stem Cells or Cellular Reprogramming for Curing Diabetes.**Regenerative Engineering and Translational Medicine. **5**(2018) 42-52.

PAGLIUCA, F. W.; MELTON, D. A. - **How to make a functional  $\beta$ -cell.** Development. **140** (2013) 2472-2483.

ZHU, Y.; LIU, Q.; ZHOU, Z.; IKEDA, Y. - **PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration.**Stem Cell Research & Therapy. **8**(2017) 1-7.

GUPTA, S. K.; WESOLOWSKA-ANDERSEN, A.; RINGGAARD, A. K.; JAISWAL, H.; SONG, L.; HASTOY, B.; INGVORSEN, C.; TAHERI-GHAHFAROKHI, A.; MAGNUSSON, B.; MARESCA, M.; JENSEN, R. R.; BEER, N. L.; FELS, J. J.; GRUNNET, L. G.; THOMAS, M. K.; GLOYN, A. L.; HICKS, R.; MCCARTY, M. I.; HANSSON, M.; HONORÉ, C. -**NKX6.1 induced pluripotent stem cell reporter lines for isolation and analysis of functionally relevant neuronal and pancreas populations.**Stem Cell Research. **29** (2018) 220-231.

SEYMOUR, P. A. - **Sox9: A Master Regulator of the Pancreatic Program.**The Review of Diabetic Studies. **11** (2014) 51-83.

ITKIN-ANSARI, P.; MARCORA, E.; GERON, I.; TYRBERG, B.; DEMETERCO, C.; HAO, E.; PADILLA, C.; RATINEAU, C.; LEITER, A.; LEE, J. E.; LEVINE, F. - **NeuroDI in the Endocrine Pancreas: Localization and Dual Function as an Activator and Repressor.**Developmental Dynamics. **233** (2005) 946-953.

ZHOU, Q.; MELTON, D. A. - **Extreme Makeover: Converting One Cell into Another.** Cell Stem Cell. **3** (2008) 382-388.

SNEDDON, J. B.; TANG, Q.; STOCK, P.; BLUESTONE, J. A.; ROY, S.; DESAI, T.; HEBROK, M. - **Stem Cell Therapies for Treating Diabetes: Progress and Remaining Challenges.** Cell Stem Cell. **22** (2018) 810-823.

CAVELTI-WEDER, C.; ZUMSTEG, A.; LI, W.; ZHOU, Q. - **Reprogramming of pancreatic acinar cells to functional beta cells by In vivo transduction of a polycistronic construct containing Pdx1, Ngn3, MafA in mice.** Current Protocols in Stem Cell Biolog. **40** (2017) 1-16.

OSIPOVICH, A. B.; MAGNUSON, M. A. - **Alpha to Beta Cell Reprogramming: Stepping toward a New Treatment for Diabetes.** Cell Stem Cell. **22** (2018) 12-13.

XIAO, X.; GUO, P.; SHIOTA, C.; ZHANG, T.; COUDRIET, G. M.; FISCHBACH, S.; PRASADAN, K.; FUSCO, J.; RAMACHANDRAN, S.; WITKOWSKI, P.; PIGANELLI, J. D.; GITTES, G. K.- **Endogenous Reprogramming of Alpha Cells into Beta Cells, Induced by Viral Gene Therapy, Reverses Autoimmune Diabetes.**Cell Stem Cell. **22** (2018) 78-90.

MILLMAN, J. R.; PAGLIUCA, F. W. - **Autologous Pluripotent Stem Cell-Derived  $\beta$ -Like Cells for Diabetes Cellular Therapy.** Diabetes. **66** (2017) 1111-1120.

CLINICALTRIALS.GOV - **NCT02239354.** [Acedido a 3 de setembro de 2019]. Disponível na internet: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02239354>

CLINICALTRIALS.GOV - **NCT03162926.** [Acedido a 2 de setembro de 2019]. Disponível na internet: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03162926>

CLINICALTRIALS.GOV- **NCT03163511.** [Acedido a 2 de setembro de 2019]. Disponível na internet: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03163511>

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. - **Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors.**Cell. **126** (2006) 663-676.

PAGLIUCA, F. W.; MILLMAN, J. R.; GÜRTLER, M.; SEGEL, M.; DERVORT, A. V.; RYU, J. H.; PETERSON, Q. P.; GREINER, D.; MELTON, D. A. - **Generation of functional human pancreatic  $\beta$  cells *in vitro*.** Cell. **159** (2014) 428-439.

HOSSAIN, M. K.; DAYEM, A. A.; HAN, J.; SAHA, S. K.; YANG, G.; CHOI, H. Y.; CHO, S. - **Recent Advances in Disease Modeling and Drug Discovery for Diabetes Mellitus Using Induced Pluripotent Stem Cells.** International Journal of Molecular Sciences. **17** (2016) 1-17.

JACOBSON, E. F.; TZANAKAKIS, E. S. - **Human pluripotent stem cell differentiation to functional pancreatic cells for diabetes therapies: Innovations, challenges and future directions.** *Journal of Biological Engineering.* **11** (2017) 1-13.

HAN, J.; MCLANE, B.; KIM, E.; YOON, J.; JUN, H. - **Remission of Diabetes by Insulin Gene Therapy Using a Hepatocyte-specific and Glucose-responsive Synthetic Promoter.** *Molecular Therapy.* **19** (2011) 470-478.

CHEN, R.; MESECK, M. L.; WOO, S. L. C. - **Auto-regulated Hepatic Insulin Gene Expression in Type I Diabetic Rats.** *Molecular Therapy.* **3** (2001) 584-590.

THULÉ, P. M.; LIU, J.; PHILLIPS, L. S. - **Glucose regulated production of human insulin in rat hepatocytes.** *Gene Therapy.* **7** (2000) 205-214.

REN, B.; O'BRIEN, B. A.; SWAN, M. A.; KOINA, M. E.; NASSIF, N.; WEI, M. Q.; SIMPSON, A. M. - **Long-term correction of diabetes in rats after lentiviral hepatic insulin gene therapy.** *Diabetologia.* **50** (2007) 1910-1920.

ZWAKA, T P. **Use of genetically modified stem cells in experimental gene therapies,** 2006. [Acedido a 14 de julho de 2019]. Disponível na internet: [https://stemcells.nih.gov/info/Regenerative\\_Medicine/2006Chapter4.htm](https://stemcells.nih.gov/info/Regenerative_Medicine/2006Chapter4.htm)