



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Beatriz Pires Grilo

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Disfunção Mitocondrial na Diabetes” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Juliana Pratas, da Dra. Dália Gonçalves e do Professor Doutor José Barata Antunes Custódio 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

Beatriz Pires Grilo

Relatórios de estágio e monografia intitulada “Disfunção Mitocondrial na Diabetes” referentes à unidade curricular “Estágio” sob orientação da Dra. Juliana Pratas, Dra. Dália Gonçalves e Professor Doutor José Barata Antunes Custódio e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação e prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Eu, Beatriz Pires Grilo, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº2014201112, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Disfunção Mitocondrial na Diabetes” 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.

Beatriz Pires Grilo

(Beatriz Pires Grilo)

Agradecimentos

A todos os professores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra em especial ao Professor Doutor José Barata Antunes Custódio, pela sua orientação, total disponibilidade, pelo saber transmitido, total colaboração e incentivo na realização do presente trabalho.

À Dra. Juliana Pratas e a todos os elementos da equipa da Farmácia São Tomé por todo o apoio, acompanhamento, pela confiança depositada desde cedo e por todos os momentos de trabalho em equipa e amizade.

À Dra. Dália Gonçalves e restante equipa da Garantia da Qualidade da Farmalabor por todo o apoio, partilha de conhecimentos e confiança.

A Coimbra por me ter mostrado que nada se faz sem esforço e que tudo se torna mais fácil se estivermos rodeados das melhores pessoas a quem agradeço todo o apoio, carinho, amizade e momentos partilhados.

Por ultimo, com consciência que nada se faz sozinha, dirijo um especial agradecimento a toda a minha família, principalmente aos meus pais, à minha irmã e ao João por serem os grandes pilares desta jornada, por serem modelos de coragem e superação, pelo apoio e incentivo incondicional, por toda a paciência e total ajuda na superação de obstáculos ao longo desta caminhada.

A eles dedico este trabalho e a todos, um enorme obrigada!

Introdução ao Documento Único

A formação académica do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas contempla um ciclo de estudos de cinco anos, ou seja, 10 semestres, nos quais 9 de formação teórica, prática e teórico-prática, de carácter amplo e diversificado ministrada na universidade e um último semestre, construído por uma única unidade curricular, o Estágio Curricular.

O Estágio Curricular é realizado sob orientação interna, onde é desenvolvida a monografia mediante o tema escolhido e sob orientação externa no local de estágio (farmácia, farmácia hospitalar ou noutro serviço farmacêutico onde se inclui, por exemplo, a indústria farmacêutica).

Assim, o presente documento contempla os Relatórios de Estágio desenvolvidos em Farmácia Comunitária e em Indústria Farmacêutica, Parte I e Parte II, respetivamente, que se apresentam sob a forma de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*) com uma visão crítica e criteriosa das atividades desenvolvidas e ainda a apresentação dos resultados do questionário cedido à população sobre o conhecimento da *Diabetes Mellitus*.

Este documento único inclui ainda na Parte III uma monografia intitulada “Disfunção Mitocondrial na Diabetes”, tendo como objetivo a interligação dos conhecimentos adquiridos sobre esta patologia tão preponderante na sociedade atual com as novas descobertas, nomeadamente a influência da disfunção de um organelo chave em todo o metabolismo celular, a mitocôndria.

Índice

Capítulo I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária	viii
Abreviaturas	ix
1. Nota introdutória.....	1
2. Farmácia São Tomé.....	2
3. O estágio	2
4. Análise SWOT	3
4.1. Pontos Fortes	3
4.1.1. Equipa e ambiente de trabalho.....	3
4.1.2. Cuidados farmacêuticos	4
4.1.3. Localização e público alvo.....	4
4.1.4. Utentes fidelizados.....	4
4.1.5. Medicamentos manipulados e preparações extemporâneas.....	5
4.2. Pontos Fracos.....	5
4.2.1. Gestão de <i>stocks</i> e entrada de encomendas	5
4.3. Oportunidades	6
4.3.1. Desenvolvimento de competências sociais e de comunicação.....	6
4.4. Ameaças.....	6
4.4.1. Lacunas de conhecimento na formação académica.....	6
4.4.2. Medicação sem receita – Automedicação e a “Não dispensa”.....	7
4.4.3. Medicamentos esgotados ou rateados.....	8
4.4.4. Posição do utente em relação aos estagiários.....	8
5. Considerações Finais	9
6. Bibliografia.....	10
7. Anexos.....	11
Anexo A – Questionário realizado	11
Anexo B – Resultados obtidos	12
B.I. Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 1	13
B.II. Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 2	16
Capítulo II – Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica	x
Abreviaturas	xi
1. Nota introdutória.....	20
2. A Farmalabor.....	21

2.1.	O processo de fabrico na Farmalabor	21
3.	Estágio na Farmalabor	22
4.	Análise SWOT	24
4.1.	Pontos Fortes	24
4.1.1.	Departamento multidisciplinar.....	24
4.1.2.	Equipa e ambiente de trabalho.....	24
4.1.3.	Vasto portefólio da Farmalabor.....	25
4.2.	Pontos Fracos.....	25
4.2.1.	Contacto reduzido com outras áreas da Farmalabor.....	25
4.2.2.	Auditorias	25
4.3.	Oportunidades	26
4.3.1.	Nova perspetiva para saída profissional futura.....	26
4.3.2.	Desenvolvimento de competências em Excel® e Minitab®	26
4.3.3.	Relevância do trabalho realizado.....	27
4.4.	Ameaças.....	27
4.4.1.	Formação académica no âmbito da Garantia da Qualidade.....	27
4.4.2.	Subvalorização dos farmacêuticos.....	27
5.	Considerações Finais	28
6.	Bibliografia.....	29
Capítulo III – Disfunção Mitocondrial na Diabetes.....		xii
	Resumo.....	xiii
	Abstract.....	xiv
	Abreviaturas	xv
1.	Introdução.....	30
2.	A diabetes	32
3.	Transporte da glucose.....	34
4.	Ativação e libertação da insulina.....	35
5.	Vias de sinalização da insulina.....	36
6.	Metabolismo integrado	38
7.	Controlo da diabetes.....	39
7.1.	Fármacos antidiabéticos	40
7.1.1.	Insulinosensibilizadores.....	40
7.1.2.	Insulinosecretores.....	41
7.1.3.	Incretinas.....	41

7.1.4. Inibidores da α -glucosidase – Acarbose.....	42
7.1.5. Inibidores do co-transportador de sódio-glucose.....	42
7.1.6. Insulina.....	42
7.2. Procedimento terapêutico.....	43
8. Controlo da glicémia	44
8.1. Avaliação da Glicémia.....	44
8.2. Hemoglobina Glicada HbA1c.....	44
8.3. Prova de tolerância à glucose	44
8.4. Cetonúria e Cetonémia	45
9. Mitocôndria	45
9.1. Cadeia Respiratória.....	46
10. Disfunção mitocondrial	48
10.1. Acumulação lipídica e alteração da via de sinalização da insulina	49
10.2. Alteração da dinâmica mitocondrial.....	51
10.2.1. Fissão e Fusão.....	51
10.2.2. Biogénese.....	53
10.2.3. Mitofagia.....	54
10.2.4. Plasticidade Mitocondrial	57
11. Abordagens terapêuticas	59
11.1. Abordagem Farmacológica	59
11.2. Abordagem Não Farmacológica – Exercício Físico e Restrição Calórica.....	60
12. Conclusão	62
13. Bibliografia.....	63

Capítulo I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Abreviaturas

FST	Farmácia São Tomé
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
PUV	Preparações de Uso Veterinário
SWOT	<i>Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats</i>

I. Nota introdutória

É bastante antiga a referência à profissão farmacêutica. Inicialmente, estes profissionais eram conhecidos como boticários, dada a componente prática da profissão que incluía a preparação de medicamentos. Por esta componente produtiva a farmácia era denominada de “Farmácia de Oficina”. Progressivamente, com o aumento da industrialização, a vertente produtiva diminuiu e a profissão farmacêutica virou-se essencialmente para o cidadão, dando lugar à denominação “Farmácia Comunitária” (Ordem dos Farmacêuticos, 2019).

A elevada cobertura geográfica e os seus recursos técnico-científico tornam as farmácias num pilar bastante importante do Sistema Nacional de Saúde. As farmácias têm como missão zelar sempre pelo bem-estar da população de modo a garantir a acessibilidade ao medicamento e à prestação de diversos cuidados de saúde com um objetivo comum: a promoção da saúde.

O farmacêutico tem marcado cada vez mais a sua posição como figura chave na promoção da saúde pública, colaborando com a comunidade médica no desempenho das suas funções. Através da prestação de cuidados farmacêuticos, este profissional tem a capacidade de auxiliar na administração de medicamentos. Esta tarefa pode ser realizada por exemplo, através da preparação individualizada da medicação, esclarecimentos vários sobre o plano terapêutico, determinação de parâmetros bioquímicos determinantes na deteção de fatores de risco e referenciação atempada para cuidados médicos especializados e promoção da adesão à terapêutica (Ordem dos Farmacêuticos, 2019).

Dada a posição privilegiada do farmacêutico, com contacto constante com o utente, as farmácias passaram a ser, em diversas situações, o primeiro local de referência e confiança do utente.

No presente relatório será elaborada uma revisão retrospectiva e crítica, recorrendo à ferramenta de análise SWOT onde serão analisados os pontos fortes (*Strengths*) e pontos fracos (*Weaknesses*) bem como as oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*) do estágio realizado na Farmácia São Tomé (FST) em Condeixa-a-Nova, que decorreu entre os dias 7 de janeiro e 24 de abril, a fim de estabelecer um balanço final da importância do estágio em farmácia comunitária para a minha formação, tanto a nível profissional, como a nível pessoal.

2. Farmácia São Tomé

A Farmácia São Tomé localiza-se em Condeixa-a-Nova, na Urbanização Quinta de São Tomé, perto do centro da vila de Condeixa-a-Nova e de diversos espaços de saúde, nomeadamente o centro de saúde. Dada a localização privilegiada que detém, permite-lhe servir uma heterogeneidade de utentes que engloba tanto os residentes da própria vila, como os habitantes de freguesias vizinhas ou utentes que estão de passagem, verificando-se esta diversidade não só no aspeto socioeconómico como também etário.

Pertencente ao grupo SALRIFARMA, em conjunto com a Farmácia São Martinho, Farmácia Santa Cristina e a AnobraFarma, a parafarmácia do grupo, a FST é dotada de uma equipa extremamente eficiente e profissional destacando-se pela excelência tanto a nível técnico-científico como na relação humana. A equipa é constituída pela Dra. Juliana Pratas, diretora técnica, pelos farmacêuticos Dr. José Catré e Dra. Cristiana José, pelos técnicos de farmácia Paulo Costa e Nuno Paiva e pela auxiliar administrativa Vanda Albuquerque.

3. O estágio

A minha integração nas atividades diárias da farmácia decorreu de forma gradual, permitindo uma aprendizagem direcionada e focada numa determinada tarefa evitando a multiplicidade de tarefas desenvolvidas na farmácia que dificultariam o processo de integração.

Inicialmente, foquei-me sobretudo nas atividades de *back-office*, nomeadamente na arrumação de medicamentos e outros produtos de saúde rececionados e, mais tarde, na colocação de medicamentos no *Robot*, ferramenta chave para a organização, economia de tempo, gestão de *stocks* e recursos durante o atendimento. Percebi, desde logo, que se tratava de uma tarefa fundamental para o correto funcionamento da farmácia e para a minha integração dado que fomentou a familiarização com toda a organização da farmácia, revelando-se essencial para otimizar o tempo e a qualidade do atendimento que futuramente iria realizar.

Algumas semanas após a integração, comecei a assistir ao atendimento ao balcão, atividade bastante importante já que me permitiu apreender as particularidades do processamento dos vários tipos de receitas médicas (eletrónicas, desmaterializadas e manuais), acompanhar as mais diversas situações de aconselhamento farmacêutico e, também, a determinação de parâmetros bioquímicos, fisiológicos e físicos.

Por fim, a última etapa do estágio incluiu o atendimento ao público, inicialmente com supervisão e acompanhamento e, mais tarde, de forma mais autónoma.

Simultaneamente, participei nas atividades do fecho do mês com a verificação de todo o receituário e de todos os procedimentos associados, confirmação de *stocks* e validades.

De salientar que pude assistir a várias formações teóricas ao dispor da farmácia que considero bastante úteis já que preencheram algumas lacunas de conhecimento que detinha.

4. Análise SWOT

A análise SWOT engloba e expõe de forma crítica e esquemática diversas questões internas e externas que, no decorrer das 640 horas totais de estágio, influenciaram positiva e negativamente a aprendizagem. Numa visão interna, serão abordados os pontos que desempenharam um papel positivo no decorrer do estágio (Pontos Fortes) e os que, por diversas maneiras prejudicaram o meu desempenho (Pontos Fracos). Numa perspetiva externa, serão enumerados os aspetos que contribuiram para o meu crescimento profissional (Oportunidades), bem como os que constituíram um obstáculo à aprendizagem (Ameaças).

4.1. Pontos Fortes

4.1.1. Equipa e ambiente de trabalho

Na minha perspetiva, a equipa da FST constituiu um dos pontos fortes do meu estágio uma vez que, para além de todo o conhecimento técnico-científico, esta equipa pauta-se pelo enorme espírito de entreaajuda e colaboração entre todos, primando sempre pela boa disposição.

Todos, sem exceção, se mostraram inteiramente disponíveis para o esclarecimento das dúvidas que surgiam tanto ao nível do atendimento como nas atividades de *back-office*, contribuindo, claramente para o meu processo de integração.

Considero, sem dúvida que o ambiente vivido foi essencial para o meu processo de aprendizagem, motivando-me e depositando em mim a confiança e autonomia necessária ao desenvolvimento das mais diversas tarefas.

4.1.2. Cuidados farmacêuticos

Devido à posição privilegiada junto da população, a farmácia comunitária desempenha um papel fundamental na prevenção da doença e na promoção de saúde.

É possível definir o conceito de cuidados farmacêuticos como a participação do farmacêutico na assistência ao doente tanto na dispensa como no seguimento de um tratamento farmacoterapêutico, tendo como foco principal a melhoria da qualidade de vida do doente (EDQM, 2012).

A FST tem ao dispor dos utentes diversos serviços que incluem a determinação de parâmetros bioquímicos (glicémia, colesterol total, triacilgliceróis) e medição da pressão arterial, ambos úteis para o acompanhamento e/ou prevenção de diversas patologias, medição do peso, altura e cálculo do índice de massa corporal. Esta farmácia conta também com vários serviços como: acupuntura, consultas de podologia, consultas de nutrição, administração de injetáveis e preparação individual da medicação semanal, bastante útil numa população envelhecida, polimedicada e frequentemente isolada sem apoio próximo de nenhum cuidador.

4.1.3. Localização e público alvo

Apesar da FST se localizar numa vila com um rácio de habitantes relativamente jovem, abrange uma população muito heterogénea proveniente das aldeias e conselhos limítrofes, pertencentes a diferentes contextos socioeconómicos e níveis de literacia distintos.

Na minha perspetiva, esta diversidade constitui uma enorme vantagem, visto que viabilizou o contacto com diversas situações de atendimento, exigindo a adequação sistemática da abordagem realizada às particularidades de cada utente, nomeadamente na clareza de discurso.

4.1.4. Utentes fidelizados

Tudo quanto é realizado na FST tem como único objetivo a máxima satisfação do utente e das suas necessidades, garantindo que este tem ao seu dispor, em tempo útil, os medicamentos e outros produtos de saúde que pretenda. Este facto verifica-se devido ao recurso a diversas plataformas, à procura de alternativas caso sejam necessárias, ao contacto direto com os laboratórios em situações de produtos esgotados e/ou rateados para ter uma previsão de quando será repostos. Na FST, devido ao esforço de todos os colaboradores, consegue-se muitas vezes solucionar essa falta.

O utente é a prioridade número um da farmácia e como consequência do esforço de todos os elementos da equipa da FST, muitos destes encontram-se fidelizados à mesma. Estes utentes adquirem uma importância muito grande (não minimizando quaisquer outros) uma vez que permitem uma melhor gestão de *stock* visto as suas aquisições serem mais previsíveis.

O conhecimento do utente possibilita, sobretudo, uma relação mais próxima e de maior confiança com o farmacêutico, facto extremamente importante para o meu estágio dado à ligação que foi possível estabelecer com alguns utentes, contribuindo para estimular a minha confiança ao balcão.

4.1.5. Medicamentos manipulados e preparações extemporâneas

Segundo o Decreto-Lei nº 95/2004, de 22 de abril, um medicamento manipulado pode ser definido como “qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico”. A preparação destes medicamentos tem como foco a personalização da terapêutica. Contudo a sua prescrição tem perdido expressão, possivelmente devido ao aumento da resposta às necessidades de tratamento por parte da indústria farmacêutica a custos reduzidos.

Felizmente, tive oportunidade de participar na preparação de vários medicamentos manipulados, nomeadamente pomada de enxofre e vaselina utilizada no tratamento de escabiose e álcool boricado para lavagem auricular pela sua ação bacteriostática e fungicida.

Do meu ponto de vista, a possibilidade de preparar estes medicamentos constituiu um ponto forte do estágio, na medida em que me permitiu contactar com uma atividade farmacêutica cada vez menos frequente.

Ao longo do estágio, foi também necessário proceder à preparação extemporânea de suspensões orais, essencialmente antibióticos de uso pediátrico.

4.2. Pontos Fracos

4.2.1. Gestão de *stocks* e entrada de encomendas

Dado o facto de haver um colaborador unicamente responsável pela entrada de encomendas, não pude desenvolver esta vertente tão importante nas farmácias comunitárias como seria desejado. Todavia, foi-me explicado todo o funcionamento da receção de encomendas bem como todos os pormenores fulcrais para que o processo decorra de forma correta. Desde a atenção essencial às validades, às reservas pagas e não pagas, aos medicamentos que exigem condições especiais de armazenamento assim como aos preços de

custo e de fatura, às margens e às rentabilidades. Considero que, embora tenha feito várias receções de encomendas, poderia ter colocada mais em prática os ensinamentos prestados.

4.3. Oportunidades

4.3.1. Desenvolvimento de competências sociais e de comunicação

A determinação de parâmetros bioquímicos e fisiológicos foi uma das tarefas que mais vezes realizei, essencialmente na minha fase de integração. Estes serviços revestem-se de uma enorme importância uma vez que estimulam o ganho de confiança perante o utente, sendo considerados como uma grande oportunidade. Neste momento era questionando quais as patologias para as quais o utente era medicado, quais os medicamentos prescritos, a sua posologia, e ainda sobre os valores anteriores dos parâmetros testados para que pudesse ser realizado o acompanhamento do utente. Dada esta abertura com os utentes foi possível realizar alguns questionários sobre a diabetes e o conhecimento desta patologia com a resposta a diversas perguntas cujos resultados serão apresentados em anexo.

Neste momento eram sempre reforçadas as medidas não farmacológicas sobre hábitos saudáveis e a importância da adesão à terapêutica, ponto que considero de extrema importância para o sucesso da terapêutica que muitas vezes não são do conhecimento do utente.

4.4. Ameaças

4.4.1. Lacunas de conhecimento na formação académica

Apesar da FST se localizar numa vila, o público alvo é na sua maioria de contexto rural pelo que a componente agropecuária está bastante presente. Aliado a este contexto, encontra-se ao dispor do utente um leque relativamente alargado de medicamentos de uso veterinário.

No plano de estudos de MICF é incluída uma unidade curricular de Preparações de Uso Veterinário (PUV) onde são transmitidas algumas noções básicas sobre a área com a introdução de conceitos básicos, pelo que realço a sua importância.

Contudo, pelo seu tratamento teórico considero que a formação académica em PUV consiste numa ameaça ao meu desempenho ao longo do estágio, pela sua abordagem pouco prática limitando a minha capacidade de resposta às mais diversas situações no aconselhamento farmacêutico.

No entanto, com o apoio de toda a equipa técnica foi possível desenvolver competências e adquirir novos conhecimentos acerca desta temática tão presente no dia-a-dia da atividade farmacêutica.

4.4.2. Medicação sem receita – Automedicação e a “Não dispensa”

A relação entre o farmacêutico e o utente rege-se por diversos princípios e condutas éticas estabelecidas no código deontológico da profissão, tendo sempre como principal foco o doente e o seu bem-estar (Despacho n.º 2245/2003).

A auto-medicação constitui um problema atual com enorme destaque na população que urge o seu controlo. Para tal, é necessária a intervenção farmacêutica que deverá deter os conhecimentos necessários para esclarecer os riscos associados e a necessidade de aconselhamento. Portanto é tão importante saber nas mais diversas situações, qual, como e que produto de saúde ou medicamento dispensar como optar pela não dispensa (Despacho n.º 2245/2003).

A não dispensa poderá ter origem em situações que não se encontram ao alcance da atuação do farmacêutico, onde o utente deve ser encaminhado para outro profissional de saúde. Este facto verifica-se por dois motivos distintos. Por um lado, por questões de âmbito legal, como por exemplo a dispensa de medicamentos sujeitos a receita médica, nomeadamente antibióticos, frequentemente solicitados pelo utente. Por outro lado, por questões de âmbito ético como é o caso dos utentes que solicitam produtos por aconselhamento de vizinhos/conhecidos e que nem sempre se adequam ao próprio utente.

Por vezes, a decisão necessária a tomar é contrária à vontade do utente e torna-se difícil o entendimento, mas sendo o farmacêutico um agente de saúde pública deverá enaltecer sempre o bem-estar do utente, tendo a capacidade e sensibilidade para adaptar o seu discurso de modo a fazer entender que tal decisão tem como principal objetivo zelar pelo bem-estar do utente e fazer cumprir as normas em vigor.

4.4.3. Medicamentos esgotados ou rateados

No decorrer do estágio na FST foram várias as situações em que os medicamentos em stock tanto na farmácia como nos armazenistas não foram capazes de dar resposta às necessidades do utente, devido ao pedido de medicamentos rateados ou esgotados.

Dada a necessidade que o utente tem em adquirir o medicamento, são tomadas diversas medidas de modo a que as suas necessidades sejam preenchidas, através da substituição, por exemplo, do medicamento por outro do mesmo grupo homogéneo ou por um genérico. Contudo, nem sempre tal é possível e nesta situação tenta-se averiguar a disponibilidade do medicamento junto das farmácias do grupo SALRIFARMA ou noutras farmácias do meio envolvente ou em situações extremas, é necessário o contacto direto com o médico prescritor.

Esta é uma situação difícil de gerir, uma vez que o utente na maior parte das vezes não consegue compreender o porquê daquela situação, culpando a farmácia por tal acontecimento ou mesmo quem está ao balcão. Portanto, posso apontar como ponto fraco do meu estágio a existência destas falhas no mercado farmacêutico, uma vez que dificultaram diversas vezes o entendimento com o utente.

4.4.4. Posição do utente em relação aos estagiários

Apesar de todos os conhecimentos técnico-científicos adquiridos durante os 5 anos de MICF, a chegada ao mercado de trabalho através do estágio curricular carece de uma fase de aprendizagem e adaptação.

Quando comecei a estar mais presente a nível do atendimento, vivenciei algumas dificuldades inerentes a este processo. Numa fase inicial era perceptível uma certa desconfiança e a falta de segurança do utente perante o atendimento realizado por um estagiário. Tal facto salientava-se ainda mais pelo facto de a FST possuir uma grande fatia de utentes fidelizados. Portanto, sendo já conhecedores da farmácia e dos seus colaboradores, o atendimento por um estagiário era por vezes recusado ou em situações de aconselhamento, era demonstrada alguma desconfiança perante as informações dadas, preferindo o utente confirmar com outro colaborador da farmácia.

Numa fase inicial, considero que estas ocorrências se manifestaram como sendo uma ameaça, uma vez que diminuíram, em parte, a confiança e o à-vontade necessários ao atendimento e aconselhamento farmacêutico. Contudo, adotando um comportamento mais assertivo, passou a ser notável a aceitação e a segurança no aconselhamento prestado, permitindo deste modo o desenvolvimento próprio enquanto profissional de saúde.

5. Considerações Finais

O estágio curricular na FST constituiu uma grande oportunidade de contactar com as atividades desenvolvidas em Farmácia Comunitária, fazendo a ponte entre os conhecimentos adquiridos ao longo do MICF e a prática farmacêutica, contribuindo não só para o crescimento enquanto futura profissional farmacêutica, tanto a nível técnico e científico, como a nível humano.

A prática diária em Farmácia Comunitária, pela interação constante com a grande diversidade de utentes e com os vários produtos de saúde disponíveis, possibilitou-me aprofundar conhecimentos e capacidades na promoção do uso racional do medicamento e adesão à terapêutica. Pela relação estreita com o utente, ponto central da atividade do farmacêutico comunitário, denotei que a FST possui um estatuto único junto da população que vê no farmacêutico não só um especialista do medicamento e da saúde pública, como também alguém vocacionado para ouvir e aconselhar, com uma elevada capacidade científica, disponível nas mais diversas situações, contribuindo para o bem-estar físico e também emocional do utente. Tal facto estimulou, sem dúvida, a minha capacidade de comunicação, de adaptação, de saber ouvir e aconselhar, características que, até então, eram por mim desconhecidas.

Em relação à FST, sinto que fiz a escolha mais acertada e agradeço a toda a equipa pelo acolhimento exemplar, por todo o apoio, pelos conhecimentos transmitidos e por primar sempre pela boa disposição e entreatajuda fomentando um ótimo ambiente de trabalho. De facto, foi um fator determinante porque passadas algumas semanas já me sentia totalmente integrada, como se daquela equipa já fizesse parte.

Estabeleço, portanto, um balanço extremamente positivo desta experiência, que marcou indubitavelmente o meu percurso académico por permitir o contacto, em contexto prático, com esta atividade de tão grande prestígio. Concluo esta experiência com a certeza que este estágio contribuiu em grande medida para estimular o meu entusiasmo e plena admiração pela atividade farmacêutica, superando todas as minhas expectativas enquanto a atuação do farmacêutico comunitário, graças ao bom ambiente de trabalho e ao apoio de todos, a quem, mais uma vez, não posso deixar de agradecer.

6. Bibliografia

Decreto-Lei n.º 95/2004, de 22 de abril. Diário da República n.º 95/2004, Série I-A de 2004-04-22. Ministério da Saúde. Lisboa.

European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM) (2012). Policies and Practices for a Safer, More Responsible and Cost-effective Health System, [Acedido a 20 de junho de 2019]. Disponível em: https://www.edqm.eu/medias/fichiers/policies_and_practices_for_a_safer_more_responsibl.pdf

Ordem dos Farmacêuticos (2019). A Farmácia Comunitária. [Acedido a 22 de junho de 2019]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>

Despacho n.º 2245/2003, de 16 de janeiro. INFARMED - Gabinete Jurídico e Contencioso.

7. Anexos

Anexo A – Questionário realizado

O presente questionário, parte integrante do relatório de estágio do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, tem como objetivo avaliar o padrão de consumo de antidiabéticos. A participação no mesmo é voluntária e todos os dados recolhidos sofrerão tratamento estatístico sob confidencialidade e sigilo.

1. **Idade** <25 25-50 50-75 >75
2. **Sexo:** Feminino Masculino
3. **Tipo de diabetes:** Tipo 1 Tipo 2
4. **Há quanto tempo tem diabetes?** <1 ano 1-5 anos 5-10 anos >10 anos
5. **Tratamento da diabetes:** Oral Insulina Oral e Insulina
6. **Para além de medicado para a diabetes, encontra-se medicado para outra patologia?**
Sim Não
 - 6.1. **Se sim, indique qual ou quais:**
Hipertensão arterial Doença cardíaca
Dislipidémia (colesterol e triglicéridos) Obesidade
Doença neurológica Outra(s): _____
7. **Desde que iniciou a terapêutica antidiabética sentiu/sente algum efeito indesejado?**
Sim Não Não sabe
 - 7.1. **Se sim, indique qual ou quais:**
Hipoglicémia/ Fraqueza Variação de peso
Tonturas Perda de apetite
Enjoos/vómitos Alterações na visão
Diarreia Outros: _____
Flatulência (gases)
8. **Para o controlo dos valores da glicémia tem atenção a:**
Medição diária da glicémia Adoção de um estilo de vida saudável
Alimentação equilibrada
9. **Realiza periodicamente análises clínicas?**
Sim Não
 - 9.1. **Se respondeu SIM, com que periodicidade?**
1x por ano 2x por ano 3x por ano 4 ou mais x por ano
10. **Os valores da glicémia encontram-se controlados?**
Sim Não



Grata pelo seu contributo

Anexo B – Resultados obtidos

A análise estatística dos resultados do questionário revelou indícios de enviesamento amostral¹ em relação ao parâmetro estatístico *Tipo de Diabetes Mellitus*. De facto, tal como mostra a Figura B.1, das 238 respostas recolhidas, 197 doentes (representando 83% da amostra) são diabéticos do Tipo 1 e os restantes 41 doentes (representando 17% da amostra), diabéticos do Tipo 2. Seria de esperar uma distribuição estatística do mesmo parâmetro contrária à ocorrida no presente estudo.

O enviesamento amostral pode ser explicado por diversos fenómenos, contudo, no presente estudo estatístico, a técnica de amostragem deve ser apontada como principal causa. O planeamento da amostragem² inicial consistia na disponibilização presencial do questionário aos utentes diabéticos que frequentaram a farmácia. Porém, dada a reduzida dimensão da amostra (e conseqüente falta de robustez estatística) o questionário foi disponibilizado *online* para que uma maior quantidade de doentes pudesse responder. Nestas circunstâncias tornou-se difícil, se não impossível, controlar a difusão entre doentes (ou familiares destes, no caso de menores de idade) do questionário e o carácter aleatório requerido à amostragem foi comprometido, tendo-se observado que membros da população com *Diabetes Mellitus* Tipo 1 foram favorecidos, i.e., tiveram maior probabilidade de ser selecionados para amostragem.

O enviesamento amostral não inviabiliza os resultados do estudo estatístico, no entanto, dada a natureza não-aleatória da amostra, especial cuidado deve ser tomado no tratamento dos resultados para que não surjam interpretações erradas. O principal objetivo é remover o efeito do método de amostragem dos resultados. Existem modelos estatísticos que permitem corrigir o enviesamento amostral, mas neste trabalho é adotado uma solução mais simples: os resultados do questionário são subdivididos em função do parâmetro estatístico como maior impacto no enviesamento amostral – o *Tipo de Diabetes Mellitus*. Ao dividir a amostra inicial em dois subconjuntos e admitindo que para estes subconjuntos não existem problemas críticos de enviesamento, a análise isolada de cada um dos casos (Tipo 1 e Tipo 2) conduz a um estudo estatisticamente válido e consistente.

¹ Um processo de amostragem diz-se *enviesado* quando a amostra é recolhida de tal forma que alguns membros da população-alvo têm uma probabilidade de amostragem menor do que outros. Tal origina um erro sistemático que desvia o valor esperado da distribuição.

² Planeamento no qual são selecionados os elementos da População a serem observados, de acordo com um determinado parâmetro(s) estatístico(s) a estudar.

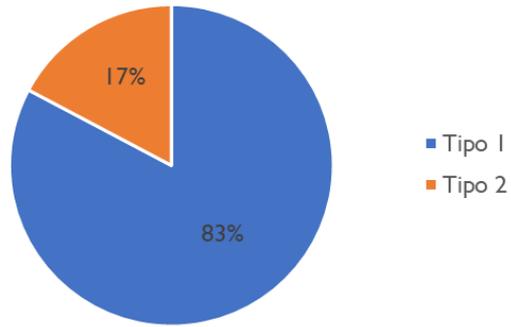


Figura B.1. Tipo de *Diabetes Mellitus*.

B.1. *Diabetes Mellitus* Tipo I

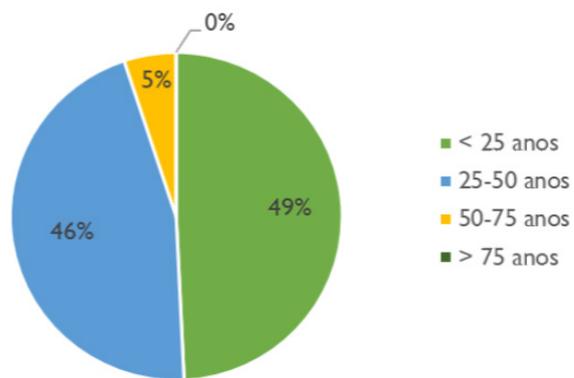


Figura B.2. Idade dos doentes.

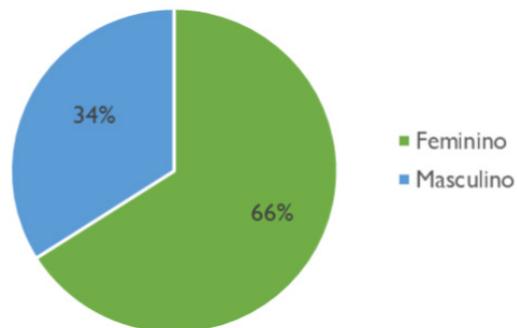


Figura B.3. Sexo dos doentes.

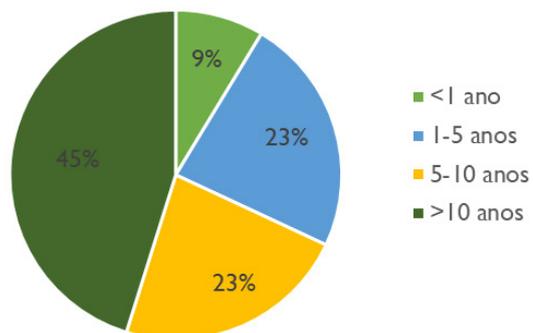


Figura B.4. Há quanto tempo tem diabetes?

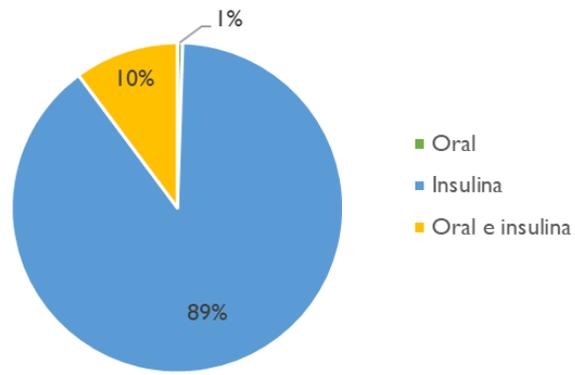


Figura B.5. Tratamento da diabetes.

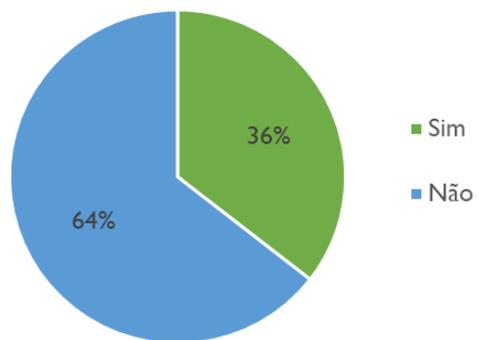


Figura B.6. Para além de medicado para a diabetes, encontra-se medicado para outra patologia?

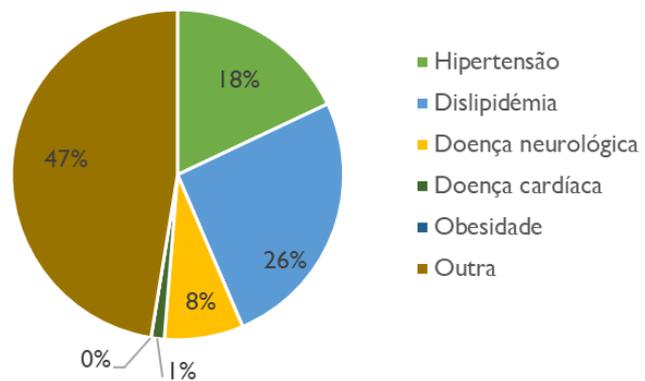


Figura B.7. Se sim, indique qual ou quais?

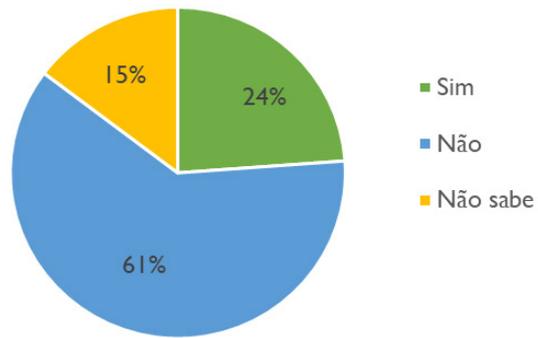


Figura B.8. Desde que iniciou a terapêutica antidiabética sentiu/sente algum efeito indesejado?

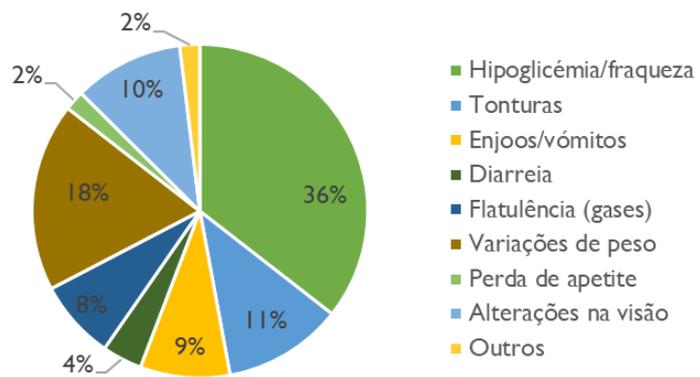


Figura B.9. Se sim, indique qual ou quais?

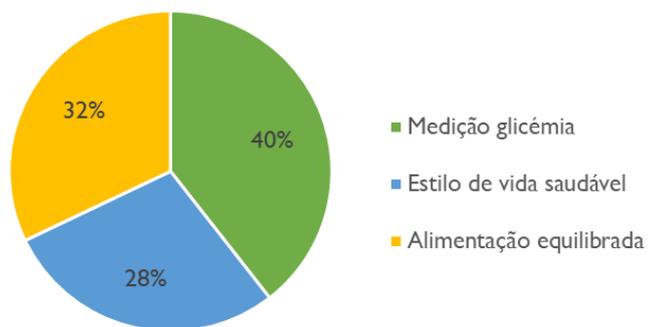


Figura B.10. Para o controlo dos valores da glicémia tem atenção a:

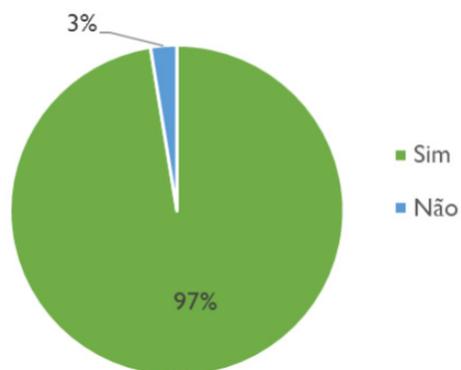


Figura B.11. Realiza periodicamente análises clínicas?

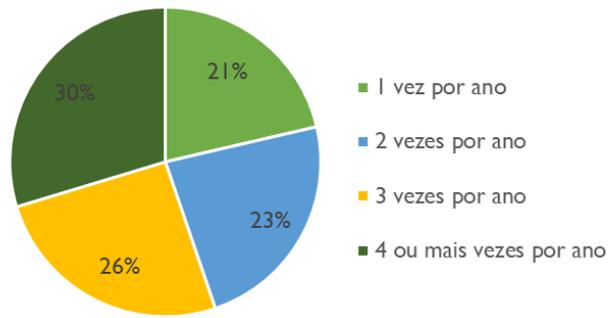


Figura B.12. Se respondeu SIM, com que periodicidade?

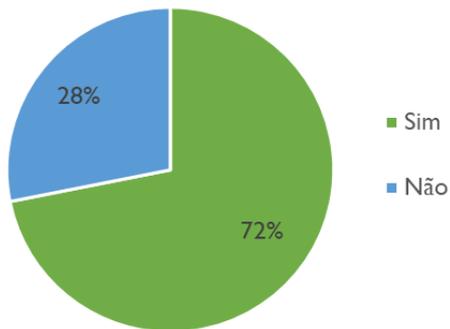


Figura B.13. Os valores da glicémia encontram-se controlados?

B.II. Diabetes *Mellitus* Tipo 2

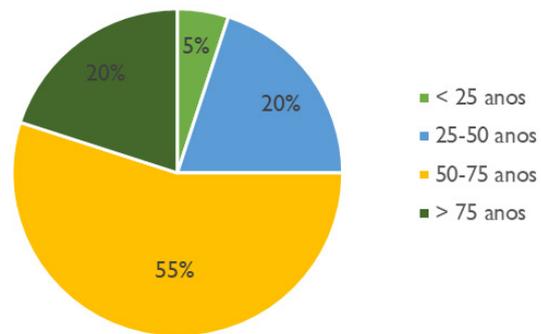


Figura B.14. Idade dos doentes.

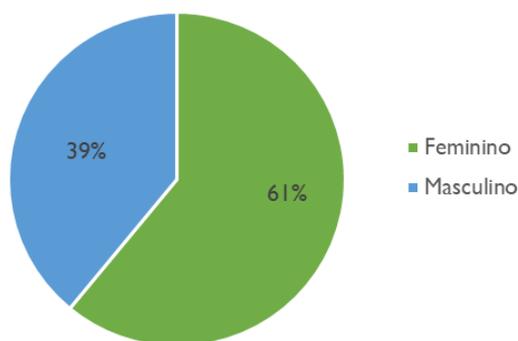


Figura B.15. Sexo dos doentes.

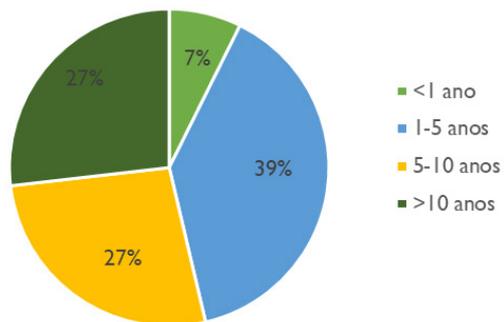


Figura B.16. Há quanto tempo tem diabetes?

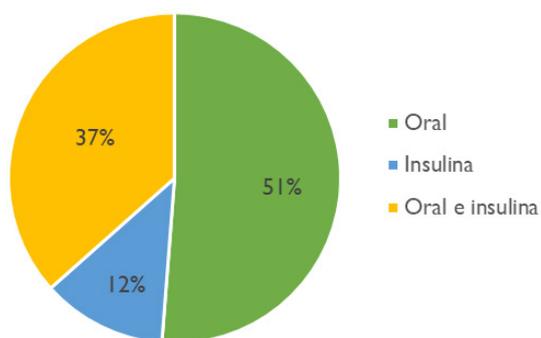


Figura B.17. Tratamento da diabetes.

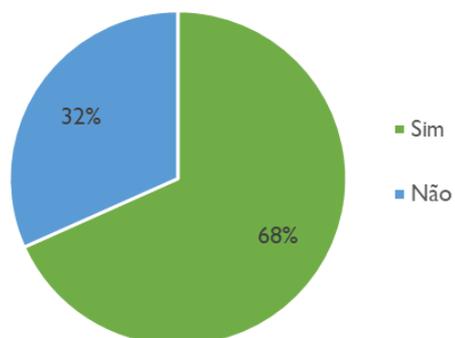


Figura B.18. Para além de medicado para a diabetes, encontra-se medicado para outra patologia?

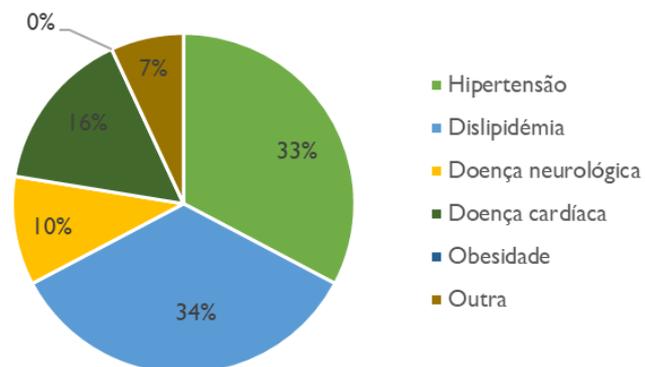


Figura B.19. Se sim, indique qual ou quais?

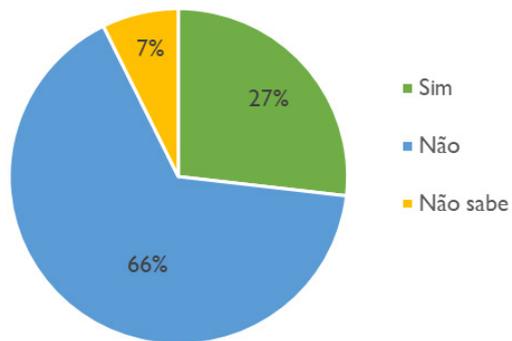


Figura B.20. Desde que iniciou a terapêutica antidiabética sentiu/sente algum efeito indesejado?

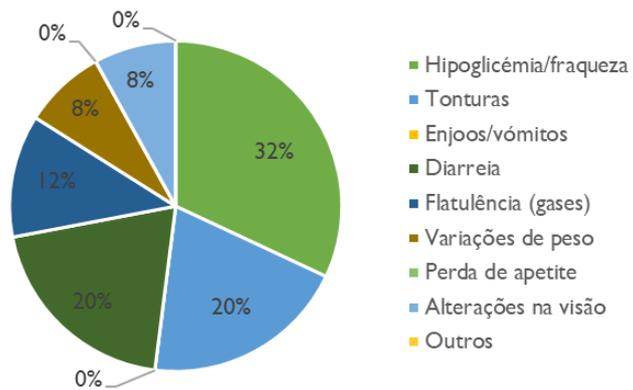


Figura B.21. Se sim, indique qual ou quais?

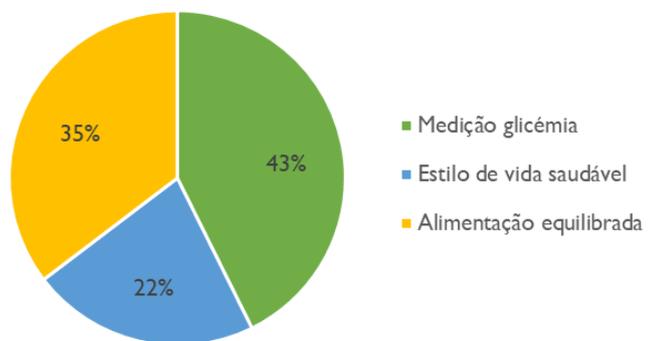


Figura B.22. Para o controlo dos valores da glicémia tem atenção a:

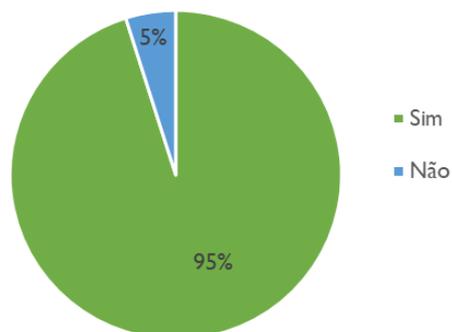


Figura B.23. Realiza periodicamente análises clínicas?

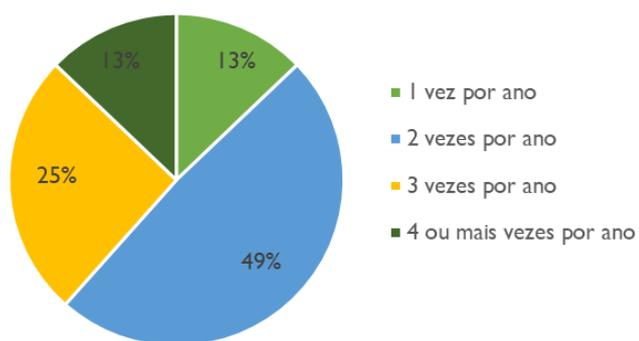


Figura B.24. Se respondeu SIM, com que periodicidade?

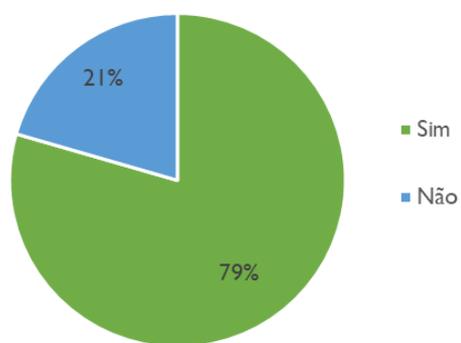


Figura B.25. Os valores da glicemia encontram-se controlados?

Capítulo II

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Abreviaturas

CAPA	Corrective Actions Preventive Actions
CQ	Controlo de qualidade
GQ	Garantia da qualidade
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
OOS	<i>Out of Specification</i>
RQP	Revisão da Qualidade do Produto
SWOT	<i>Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats</i>

I. Nota introdutória

Inicialmente a produção de medicamentos encontrava-se confinada às farmácias de oficina. Contudo, com a crescente industrialização e procura, a componente produtiva da farmácia deu lugar à indústria farmacêutica.

Para além de estar envolvida na produção em massa de medicamentos, a indústria farmacêutica encontra-se também ligada à pesquisa e descoberta de novos medicamentos, contribuindo para o aumento da qualidade de vida a toda a população, aumento da esperança média de vida culminando em elevados ganhos em saúde.

Em qualquer das fases do ciclo do medicamento, o farmacêutico tem um papel fundamental já que é responsável pela supervisão de todo o processo tendo como recurso os seus conhecimentos técnico-científicos e o respeito pelas boas práticas de fabrico.

O presente relatório tem como principal objetivo a análise das atividades desenvolvidas durante o período de estágio na Indústria Farmacêutica, integrado na área da Garantia da Qualidade da FARMALABOR - PRODUTOS FARMACÊUTICOS, S.A., pertencente ao grupo MEDINFAR, cumprindo confidencialidade e sigilo, tendo por base uma análise SWOT crítica e esquemática das atividades desenvolvidas, enumerando os seus Pontos Fortes e Fracos, bem como as Oportunidades ou Ameaças associadas.

2. A Farmalabor

A Farmalabor, fundada em 1962 em Coimbra com o nome de Euro-Labor, dedicava-se exclusivamente ao fabrico próprio. A partir de 1985 expandiu o seu fabrico para clientes e tal careceu de diversas adaptações na unidade fabril, nomeadamente a necessidade de construção de novas instalações. Dada a necessária expansão, esta unidade fabril veio a estabelecer-se na Zona Industrial de Condeixa-a-Nova, local onde permanece desde 1990.

À data, a Farmalabor centra a sua capacidade produtiva para dar resposta a terceiros (*Contract Manufacturing*), trabalhando por contrato com outras empresas desde a produção inicial ao produto final de formas farmacêuticas sólidas, líquidas e pastosas não estéreis.

É detentora de certificação tripla que compreende a ISO9001 (Qualidade), ISO14001 (Ambiente) e OHSAS18001 (Higiene e Segurança do Trabalho), e garante o cumprimento das Boas Práticas de Fabrico e Boas Práticas de Laboratório, aliada à confiança na qualidade, segurança e proteção do ambiente. Assim, torna possível atingir o principal objetivo da empresa, a melhoria contínua com foco no cliente, no rigor científico e trabalho em equipa.

2.1. O processo de fabrico na Farmalabor

O processo de fabrico de qualquer produto farmacêutico é precedido por diversas etapas fundamentais onde se disponibiliza toda a documentação de apoio ao fabrico, se averigua a disponibilidade de matérias-primas e se estimam os custos de produção.

Para que todo este processo seja agilizado, é necessária a colaboração de algumas áreas de suporte da FARMALABOR, nomeadamente Gestão de Clientes Industriais, o Planeamento Industrial, a Manutenção Industrial, e a Garantia da Qualidade, Ambiente e Segurança.

O Planeamento Industrial é responsável por controlar e definir toda a operação de fabrico de modo a fazer cumprir os prazos de produção agendados com os clientes; A Manutenção Industrial é responsável pela infraestrutura produtiva e garante que esta está nas melhores condições técnicas. De igual modo, participa na implementação operacional de novos equipamentos assim como a gestão de áreas não produtivas como os sistemas apoio; A área da Garantia da Qualidade (GQ), Ambiente e Segurança, departamento onde realizei o meu estágio curricular, centra a sua atuação na certificação/validação de todos os equipamentos que possam ter impacto na qualidade do produto e garante que são cumpridas as boas práticas de fabrico, bem como de toda a legislação aplicável; Por fim, a área de Gestão de Clientes Industriais empenha-se diariamente em fazer chegar o nome da FARMALABOR aquém e além fronteiras.

3. Estágio na Farmalabor

Dada a multidisciplinaridade do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêutica da Universidade de Coimbra (MICF), os estudantes têm ao seu dispor os mais vastos conhecimentos técnico-científicos em todas as fases do medicamento, nomeadamente o seu desenvolvimento, fabrico e controlo.

O meu estágio na Farmalabor decorreu no departamento da GQ, sob orientação da Dra. Dália Gonçalves entre os dias 2 de maio e 31 de julho.

Neste departamento é enaltecida a organização e a segurança de todas as atividades praticadas deste o desenvolvimento, a implementação e supervisão da qualidade dos produtos produzidos de modo a que a sua produção seja fiável e reproduzível, cumprindo todas as normas implementadas e todos os procedimentos de segurança, garantindo a colocação no mercado de produtos e medicamentos com qualidade, segurança e eficácia, rentabilizando recursos, diminuindo o número de não-conformidades e erros associados ao fabrico.

Dado que o foco principal da GQ assenta na gestão documental que reflete a política, visão, organização, estratégia e abordagens para o bom funcionamento da empresa, o primeiro contacto com a empresa foi, essencialmente, a familiarização com alguma documentação chave da Farmalabor, nomeadamente o Plano Mestre de Validação, o Manual de Instalação Fabril e diversos procedimentos gerais da qualidade referentes às Validações do Processo de Fabrico, à Revisão da Qualidade do Produto (RQP) e procedimentos de validação da higienização. Posteriormente tive oportunidade de avaliar criticamente os mesmos documentos e, no decorrer do estágio, participar ativamente na revisão de alguns deles.

No decorrer dos 3 meses de estágio foram diversas as atividades desenvolvidas, nomeadamente:

- Compilação de informação para análise de resultados fora de especificação - OOS (*out of specification*) - desde 2015. Quando surge um OOS é realizado o preenchimento individual da ocorrência indicando o produto envolvido, o que foi detetado e as possíveis causas, caso sejam possíveis de determinar, e as conclusões da investigação. Tal tarefa revestiu-se de elevada importância uma vez que foi possível fazer uma análise de tendências para posterior identificação de pontos de melhoria no processo e também na identificação de quais os produtos e os ensaios laboratoriais de controlo que estão na génese de maior número de OOS's de modo a que, futuramente, possam ser implementadas medidas corretivas e preventivas (CAPAs);

- Colaboração em diversas investigações sobre desvios no processo de fabrico de determinados produtos que manifestaram variações da qualidade, nomeadamente alterações no perfil de dissolução, espessura, dureza, fatores com impacto significativo na reprodutibilidade do efeito *in vivo* do produto final. As investigações iniciavam-se pela compilação/análise do histórico dos parâmetros dos lotes anteriormente produzido, avaliação de eventuais alterações no processo de fabrico tais como, alteração de matérias-primas, método de fabrico (tempos de mistura, velocidade de compressão). Tendo reunida toda a informação são equacionadas as possíveis causas e CAPA's a implementar;

- Colaboração no preenchimento de RQP. Este documento é constituído pelo resumo do histórico de todos os lotes produzidos, onde é avaliado periodicamente o padrão de qualidade de cada produto farmacêutico produzido. Tem como objetivo averiguar a consistência do processo de fabrico, adequabilidade das especificações estabelecidas e definição de uma tendência para avaliar a necessidade ou não de propor ao cliente a alteração de alguma especificação. Quando não se verificam alterações de destaque, o RQP atestará que a qualidade do produto está conforme e é reprodutível (Ec.europa.eu, 2013);

- Atualização de modelos de preenchimento e.g. OOS, estabilidades, fase de revestimento. A elaboração dos modelos de preenchimento das ocorrências são da responsabilidade da GQ com colaboração dos respetivos departamentos, nomeadamente CQ (controlo de qualidade) e produção. Estes documentos revestem-se de grande importância já que tudo o que é realizado, segundo normas em vigor, tem de ser documentado. É através desta informação que posteriormente se tomam decisões, pelo que o seu preenchimento tem de ser simples, rápido e com a menor ambiguidade possível. A minha intervenção prendeu-se, essencialmente, na simplificação destes documentos, diminuindo a necessidade de escrita e adição de mais variáveis, em colaboração com elementos do CQ e produção, para a melhor compreensão dos resultados obtidos e posterior tomada de decisões (Ec.europa.eu, 2011);

- Colaboração no controlo de alterações relativo à instalação de novos equipamentos. Quando se equaciona a alteração de algum equipamento, instalação ou processo que possa ter influência na qualidade do produto, segundo as normas, o fabricante é responsável por controlar todos os parâmetros críticos envolvidos e o impacto destes, documentando-os. Numa época de crescimento e constante modernização, durante o meu período de estágio a FARMALABOR sofreu algumas alterações, nomeadamente equipamentos de produção e embalagem. A minha intervenção foi ao nível da recolha e compilação dos parâmetros críticos do equipamento a substituir, produtos farmacêuticos envolvidos na mudança e comparação com os parâmetros do novo equipamento, de modo a demonstrar ao cliente que tal alteração não coloca em causa a qualidade do produto final (Ec.europa.eu, 2015).

4. Análise SWOT

A análise SWOT subdivide-se em dois níveis, o nível interno e o nível externo. Numa perspetiva interna, serão enaltecidos acontecimentos que durante o estágio influenciaram positivamente a experiência (Pontos Fortes), bem como os que influenciaram negativamente a aprendizagem (Pontos Fracos). Do ponto de vista externo, serão evidenciados os fatores que contribuíram positivamente para o crescimento a nível profissional (Oportunidades) e, contrariamente, aqueles que prejudicaram o seu desempenho (Ameaças).

4.1. Pontos Fortes

4.1.1. Departamento multidisciplinar

A multidisciplinaridade da GQ é facilmente compreendida já que é fulcral para toda a atividade industrial de modo a assegurar que todas as atividades desenvolvidas se regem pelos requisitos de qualidade exigidos, estando por isso em constante colaboração com os restantes setores da indústria ao longo de todo o ciclo de produção do medicamento.

Deste modo considero que a integração na equipa da GQ foi, sem dúvida, uma mais-valia na minha formação académica já que me permitiu adquirir uma visão mais abrangente sobre o trabalho desenvolvido na indústria farmacêutica. Possibilitou-me a oportunidade de contactar com a área da produção de formas sólidas e embalagem, manutenção e CQ, participando em várias atividades desde: processos de triagem de produtos cujos limites de qualidade aceitável não se encontravam conformes; acompanhamento da fase de revestimento de um produto que se apresentava em fase de investigação de desvio ao nível de desagregação; apoio nas medidas corretivas de uma reclamação de serialização; colaboração no preenchimento de diversos documentos de validação de um novo equipamento e atualização dos modelos de preenchimento em vigor.

4.1.2. Equipa e ambiente de trabalho

Considero que um dos pontos forte do estágio e também para o sucesso do mesmo foi a equipa e o ambiente vivido na GQ. Efetivamente, a colaboração e apoio nas tarefas desenvolvidas foram fulcrais em todo o processo de adaptação, depositando em mim a confiança necessária ao meu desenvolvimento profissional e exercício de todas as atividades.

Trata-se de uma equipa jovem, dinâmica, repleta de conhecimento, bastante cooperativa e, sem dúvida, o facto de ter contactado com este excelente exemplo de um ambiente

profissional saudável e motivador constituiu uma enorme aprendizagem, confirmando que, para além de possível, é indispensável aliar o profissionalismo a um bom ambiente de trabalho.

4.1.3. Vasto portefólio da Farmalabor

A Farmalabor tem a seu cargo uma vasta gama de produtos que vão desde os medicamentos, aos suplementos e, por fim à dermocosmética. Estes apresentam-se nas mais diversas formas farmacêuticas e, aliado ao vasto portefólio de produtos fabricados, encontra-se, naturalmente, a enorme variedade de métodos de fabrico, equipamentos industriais e todos os processos documentais e técnicos subjacentes. Assim, esta diversidade é apontada como um ponto bastante positivo pela oportunidade de poder contactar com tanta diversidade num curto espaço de tempo, mostrando-me uma realidade que até então era praticamente desconhecida.

4.2. Pontos Fracos

4.2.1. Contacto reduzido com outras áreas da Farmalabor

É possível apontar como ponto menos positivo a alteração da área de estágio. Inicialmente a proposta de estágio fazia referência à área do CQ. Contudo, no primeiro dia na Farmalabor fui informada que a minha área de estágio se centraria na GQ. Apesar de todas as vantagens que o estágio neste departamento teve para a minha formação, pela visão ampla e todos os conhecimentos adquiridos quanto ao funcionamento da indústria farmacêutica, não me foi possível experimentar uma das minhas áreas de interesse, o trabalho analítico.

Ainda que durante o estágio tenha tido a possibilidade de contactar com este departamento, apenas foi numa vertente de recolha de dados, nomeadamente de desvios e resultados fora de especificação e nunca num contexto prático.

4.2.2. Auditorias

As auditorias consistem numa análise criteriosa e planeada, mas nem sempre programada, das atividades desenvolvidas, podendo ser classificadas como externas quando são realizadas por clientes ou autoridades regulamentares ou internas quando são efetuadas por auditores internos ou por empresas subcontratadas.

Durante o período de estágio, a Farmalabor foi auditada por diversas entidades externas. Apesar de ter colaborado na realização de algumas atividades preparatórias para a receção

dos auditores, nomeadamente o preenchimento de questionários sobre os produtos auditados, não me foi possível acompanhar de perto nenhuma das visitas, não tendo por isso contacto com esta realidade tão importante para a indústria farmacêutica.

4.3. Oportunidades

4.3.1. Nova perspetiva para saída profissional futura

Apesar da multidisciplinaridade do curso de MICF, as saídas profissionais centram-se sobretudo na vertente de Farmácia Comunitária. É com a possibilidade de realizar estágio curricular noutras áreas de atuação farmacêutica que nos é dada a oportunidade de alargar horizontes e ver para além do que é normalmente feito.

A indústria farmacêutica reveste-se de uma grande importância no ciclo de vida do medicamento. A constante inovação, o aparecimento de regulamentação adicional e a busca de um portefólio cada vez maior estimula ao crescimento e desenvolvimento tanto a nível económico importante para a empresa, como a nível de todos os trabalhadores uma vez que o desafiar constante das suas capacidades para a resolução dos mais variados problemas, fomentando tanto desenvolvimento a nível profissional como pessoal.

Considero, portanto, que toda a dinâmica experienciada nestes 3 meses me fez alargar os meus horizontes quanto às saídas profissionais de MICF.

4.3.2. Desenvolvimento de competências em Excel® e Minitab®

Para a realização da maioria das tarefas propostas, nomeadamente a compilação de dados dos mais variados temas e o seu tratamento estatístico, foi necessário o contacto diário com diversos programas informáticos, nomeadamente Excel®, onde apenas detinha noções básicas e Minitab®, um programa informático voltado para o tratamento estatístico que, para mim, era totalmente desconhecido. Durante o estágio, com o apoio de toda a equipa da GQ e também com recurso a pesquisa, adquiri competências importantes para a utilização destes programas informáticos.

Considero que os conhecimentos adquiridos foram uma mais-valia e uma oportunidade, já que, no futuro, poderão ser uma ferramenta importante a nível pessoal e, essencialmente a nível profissional, dada a larga utilização destes para as mais variadas tarefas.

4.3.3. Relevância do trabalho realizado

Cada novo trabalho apresentado, desde o primeiro ao último dia de estágio era sempre enquadrado com uma pequena introdução teórica, onde era enaltecida a relevância do mesmo. Ainda que colaborasse apenas nas fases mais iniciais dos projetos, nomeadamente com compilações de resultados, tratamento estatístico e apresentação de possíveis conclusões, fui frequentemente enquadrada na tomada de decisões e seguimento de todo o processo, transmitindo-me a importância e utilidade do mesmo, tornando-se uma grande motivação para a execução das tarefas solicitadas.

4.4. Ameaças

4.4.1. Formação académica no âmbito da Garantia da Qualidade

O primeiro contacto com a área onde desenvolvi o estágio foi feito através da unidade curricular Gestão e Garantia de Qualidade (GGQ), onde são transmitidas algumas noções básicas com a introdução de conceitos que se tornaram fundamentais no decorrer do estágio, pelo que enalteço a utilidade desta unidade curricular.

Contudo, o seu tratamento teórico e clássico nem sempre torna fácil a compreensão da sua enorme importância, sendo muitas vezes desvalorizada por parte da comunidade estudantil. Deste modo, considero que a formação académica em GGQ atual consiste numa ameaça, uma vez que devido à sua abordagem centralizada na norma de qualidade faz com que seja pouco voltada para a aplicabilidade real em sede de Indústria Farmacêutica e tal poderá condicionar o interesse dos estudantes por um dos grandes pilares da indústria farmacêutica

No entanto, sinto que este estágio foi essencial para me proporcionar uma visão diferente acerca desta área, contribuindo seguramente para a construção de uma opinião bastante mais fundamentada e positiva sobre a GQ na indústria farmacêutica.

4.4.2. Subvalorização dos farmacêuticos

Sendo que o farmacêutico é visto como um especialista do medicamento, este deveria assumir uma posição de destaque na indústria farmacêutica. Contudo, grande parte dos colaboradores não têm esta formação académica, apresentando-se o farmacêutico numa pequena fatia do total dos 150 colaboradores desta empresa.

Apesar da multidisciplinaridade do curso de MICEF, a falta de especificidade em algumas áreas poderá ser um entrave no que respeita à indústria farmacêutica. Sendo o conhecimento

e experiência nesta área pouco vasto, poderá constituir uma desvantagem para um mercado de trabalho cada vez mais competitivo e de constante inovação. Para que seja possível acompanhar toda esta evolução, tal carece do acompanhamento pela componente letiva, adequando o plano de estudos à constante alteração e diversificação do setor, preenchendo as lacunas eventualmente existentes.

5. Considerações Finais

Considero uma mais-valia a oportunidade que a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra coloca ao dispor dos estudantes para a realização de estágio nas mais variadas vertentes de MICE, nomeadamente indústria farmacêutica.

Ainda que inesperada, a minha passagem pelo departamento da GQ da FARMALABOR, posso concluir que o culminar destes 3 meses de novas experiências e aquisição constante de conhecimentos, se fazem com um balanço positivo. Saliento o enorme privilégio de ter integrado uma empresa de pessoas dinâmicas, jovens e com um espírito de entreajuda gigante que contribuiu, sem dúvida, para o sucesso do meu estágio.

Numa perspetiva global, atribuo um destaque importantíssimo a este contacto com a realidade do mercado de trabalho, todos os desafios e dificuldades sentidas, e a necessidade de resolução dos mais diversos problemas, estabelecendo a ponte entre a vida estudantil e a vida profissional, com contributo marcante para o meu desenvolvimento pessoal e profissional, pelo que expresse a minha gratidão pela oportunidade concedida.

6. Bibliografia

- Ec.europa.eu. (2013). EudraLex - Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) Guidelines. - European Commission, Chapter 1: Pharmaceutical Quality System [Acedido a 25 julho de 2019] Disponível em: http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm
- Ec.europa.eu. (2011). EudraLex - Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) Guidelines. - European Commission, Chapter 4, Documentation [Acedido a 26 julho de 2019] Disponível em: http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm
- Ec.europa.eu. (2015). EudraLex - Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) Guidelines.- European Commission, Annex 15: Qualification and Validation [Acedido a 26 julho de 2019] Disponível em: http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm
- Medinfar. [Acedido a 20 de julho de 2019] Disponível em: <http://www.medinfar.pt/index.html>

Capítulo III

Disfunção Mitocondrial na Diabetes

Resumo

A Diabetes *Mellitus* (DM) é de uma doença do foro metabólico onde a hiperglicémia surge como consequência de alterações da secreção da insulina e/ou aumento da resistência à insulina (IR) nos tecidos alvo. Esta patologia é frequentemente associada à hiperprodução de espécies reativas de oxigénio (ROS) articulada com a diminuição da capacidade antioxidante da célula, salientando-se o contributo destas alterações para o início, desenvolvimento e progressão da doença com possível aparecimento a médio/longo prazo de complicações da diabetes.

A DM subdivide-se em diferentes categorias onde se destacam a Diabetes *Mellitus* tipo I (DMI), Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM2), Diabetes Gestacional e ainda outras formas da diabetes secundárias a outras patologias.

A insulina é uma hormona com papel determinante no metabolismo celular e na homeostase da glucose. É secretada ao nível das células β pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis de glucose na corrente sanguínea e é na desregulação da sua síntese, libertação e/ou ação que se centra o presente trabalho.

Recentemente, de entre as possíveis causas da desregulação do controlo homeostático da glucose surgiu o conceito de disfunção mitocondrial, ponto-chave na discussão do presente trabalho. Este é um conceito que não possui definição única já que engloba uma grande diversidade de mecanismos moleculares ao nível da mitocôndria que poderão estar na base da manifestação da IR. Aqui inclui-se a alteração da via de sinalização da insulina, da capacidade metabólica da mitocôndria, acumulação lipídica bem como alterações na população mitocondrial nomeadamente nos balanços fusão/fissão e biogénese/mitofagia.

Contudo, até ao momento, ainda não foi possível esclarecer se as alterações a nível mitocondrial são a causa ou a consequência do desenvolvimento da IR e, nomeadamente da DM2.

Palavras-chave: Diabetes, Insulina, Doença Metabólica, Mitocôndria, Disfunção.

Abstract

Diabetes *Mellitus* (DM) is a metabolic disease where hyperglycemia arises due to changes in the insulin secretion and/or increased insulin resistance (IR) in target tissues. This pathology is often associated with the hyperproduction of reactive oxygen species (ROS), which is linked to the reduction of the antioxidant capacity of the cell, emphasizing the contribution of these alterations in the onset, development and progression of the disease with possible medium/long term complications of diabetes.

DM is subdivided into different categories in which Type I Diabetes *Mellitus* (T1DM), Type 2 Diabetes *Mellitus* (T2DM), Gestational Diabetes and other forms of diabetes secondary to other pathologies stand out.

Insulin is a hormone that plays a role in cell metabolism and glucose homeostasis. It is secreted by pancreatic β cells in response to increased blood glucose levels and it is in the deregulation of its synthesis, release and/or action that the present work is centered.

Recently, among the possible causes of dysregulation of homeostatic glucose control, the concept of mitochondrial dysfunction emerged, a key point in the discussion of the present study. This is a concept that does not have a unique definition because it encompasses a great diversity of molecular mechanisms that involve the mitochondria that may be the cause of IR. This includes altering the insulin signaling pathway, the metabolic capacity of mitochondria, lipid accumulation as well as changes in the mitochondrial population, particularly in the fusion/fission balance and biogenesis/mitophagy.

However, to date, it has not been possible to clarify whether changes at the mitochondrial level are the cause or consequence of the development of IR, and particularly the development of T2DM.

Keywords: Diabetes, Insulin, Metabolic Disease, Mitochondria, Dysfunction.

Abreviaturas

Acil-CoA	Acil-Coenzima A
Acetil-CoA	Acetil-Coenzima A
ADP	Adenosina Difosfato
AG	Ácido Gordo
AGL	Ácido Gordo Livre
Akt	Proteína Cinase B
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPK	Proteína Cinase do AMP
ATP	Adenosina Trifosfato
CER	Ceramidas
CR	Cadeia Respiratória
CrAT	Carnitina Aciltransferase
DAG	Diacilgliceróis
DGS	Direção Geral de Saúde
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
DMI	Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 1
DM2	Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPP4	Dipeptidil Peptidase 4
DRP1	Proteína relacionada com a dinamina tipo 1
FADH ₂	Dinucleótido de flavina e adenina
FIS1	Proteína de Fissão Mitocondrial tipo 1
GIP	Peptídeo Inibidor Gástrico
GLP1	Peptídeo 1 semelhante ao Glucagon
GLUT-2/4	Transportador da Glucose Tipo 2/4
GTPase	Hidrolase da Guanosina Trifosfato
HbA1c	Hemoglobina Glicada A1c
IR	Insulinorresistência
IRS	Substrato do Recetor da insulina
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
MFN1/2	Mitofusina Tipo 1/2
MODY	<i>Maturity-Onset Diabetes of the Young</i>

MPP	<i>Mitochondrial Processing Peptidase</i>
MTS	<i>Mitochondrial Targeting Sequence</i>
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NF-K β	<i>Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NRF1/2	<i>Nuclear respiratory factor Type 1/2</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPA1	Atrofia Ótica Tipo I
PARKIN	Proteína Associada à Doença de Parkinson
PARL	<i>Presenilins-Associated Rhomboid-Like Protein</i>
PDK-1/2	Proteína cinase dependentes do PIP-3 Tipo 1/2
PGC-1 α	<i>Peroxisome Proliferator-activated receptor Gamma Coactivator-1 α</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinase
PINK1	<i>PTEN-induced putative kinase 1</i>
PIP-2	Fosfatidilinositol 4,5-difosfato
PIP-3	Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato
PKB	Proteína Cinase B
PKC	Proteína Cinase C
PPAR- γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SGLT 2	Co-Transportador de Sódio-Glucose Tipo 2
SIRT1	Sirtuína Tipo I
Tfam	Fator de Transcrição Mitocondrial A
TG	Triacilgliceróis
TM	Região Transmembranar
Δ pH	Gradiente de pH
$\Delta\Psi$	Potencial de membrana

I. Introdução

As alterações mitocondriais em consequência do normal envelhecimento e da associação aos distúrbios metabólicos são agora relacionadas com a fisiopatologia de diversas doenças incluindo a *Diabetes Mellitus* (DM).

A regulação do correto funcionamento mitocondrial é bastante complexo e não se encontra perfeitamente determinada. Contudo, é identificado que a sua adaptação às necessidades bioenergéticas da célula através dos processos de fissão, fusão, mitofagia e biogénese, capacidade em oscilar entre diferentes substratos metabólicos e capacidade de combater o stress oxidativo gerado são fatores a ter em conta.

As mitocôndrias possuem a capacidade de gerar energia na forma de ATP através da circulação de eletrões ao nível dos seus complexos da cadeia respiratória (CR). Estes eletrões são transportados pela CR após oxidação do NADH e FADH₂ provenientes das vias metabólicas anteriores, e são posteriormente aceites pelos complexos proteicos da cadeia respiratória mitocondrial. Associado ao fluxo de eletrões existe o bombeamento de prótons da matriz para o espaço intramembranar, gerando uma diferença do potencial ($\Delta\Psi$ e ΔpH) através da membrana interna da mitocôndria. Esta energia gerada é utilizada na síntese de ATP à medida que os prótons regressam à matriz mitocondrial. Embora o fluxo de eletrões tenha como aceitador final o oxigénio molecular para a produção de água, este mecanismo não é perfeito e verifica-se a fuga de eletrões, geralmente convertidos em espécies reativas. Assim, verifica-se que através do normal funcionamento mitocondrial são geradas, inevitavelmente, grandes quantidades de espécies reativas de oxigénio (ROS) com capacidade de provocar danos oxidativos que poderão estender-se para além da dupla membrana da mitocôndria. Estes danos podem envolver não só a constituição lipídica e proteica como também a alteração ao nível do material genético da célula. É aqui que se centram as várias opiniões da comunidade científica: a produção de ROS, a sua relação com as alterações mitocondriais e com a DM.

São indiscutíveis as evidências apontadas nas últimas décadas quanto à relação entre a IR e a DM com a disfunção mitocondrial devida tanto ao aumento do *stress* oxidativo, ao envelhecimento ou até mesmo devido à componente genética. Contudo, continua por esclarecer de forma inequívoca se esta anomalia se situa a montante ou a jusante do quadro clínico de IR.

Ao longo do presente trabalho é apresentado, de modo sumário, a descrição da fisiopatologia da DM, a sua contextualização como doença metabólica, o seu plano terapêutico e a sua relação com a disfunção mitocondrial. São ainda elucidados os mecanismos fisiológicos da síntese, libertação e ação da insulina e os desvios ao correto funcionamento destes, a sua

causa, onde se inclui a acumulação lipídica, a alteração da dinâmica mitocondrial e a inflexibilidade mitocondrial associada à hiperprodução de ROS bem como a relação com a patologia em análise.

Por fim serão apresentadas as mais recentes descobertas a nível científico para a melhoria da qualidade de vida do doente, com abordagens terapêuticas centradas e direcionadas para a mitocôndria, onde se incluem tanto medidas não farmacológicas, com a prática de exercício físico e restrição calórica, bem como medidas farmacológicas com base nas terapias convencionais.

2. A diabetes

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a diabetes é classificada como uma doença de carácter crónico em que o pâncreas se torna incapaz de produzir insulina ou ocorre uma incapacidade de resposta à presença desta hormona aquando do aumento dos níveis de glucose na corrente sanguínea (Roglic, 2014).

A diabetes é um problema de saúde pública com crescente número de novos casos. Segundo dados da OMS, estima-se que, globalmente, no ano de 2014, 422 milhões de adultos tinham diabetes em contraste com os 108 milhões em 1980. Estes dados permitem estimar que a prevalência desta patologia quase que duplicou desde os anos 80, passando de 4,7% para 8,5% muito devido a alterações do estilo de vida da população (Roglic, 2014).

Segundo a Norma da Direção Geral de Saúde (DGS) N° 2/2001, de 14/01/2011, os critérios para o diagnóstico são a glicémia em jejum superior a 126 mg/dL ou sintomatologia associável à diabetes com glicémia ocasional superior a 200 mg/dl e glicémia superior a 200 mg/dL às 2 horas na prova de tolerância à glucose oral ou valores de Hemoglobina Glicada A1c (HbA1c) superior ou igual a 6,5 % (DGS, 2011, 2015).

A Diabetes *Mellitus*, patologia globalmente conhecida, com uma prevalência crescente associada a quadros de elevada morbidade, de carácter crónico e progressivo é classificada em 4 categorias: a Diabetes *Mellitus* tipo 1 (DM1: vulgarmente referenciada como diabetes dependente de insulina ou juvenil) que se caracteriza pela incapacidade pancreática de produção de insulina (insulinopenia), decorrente da destruição das células β pancreáticas. É acompanhada pelo aparecimento de um quadro sintomatológico específico que inclui poliúria, polidipsia, polifagia, perda de peso, entre outros (Roglic, 2014; Yaribeygi, Farrokhi, *et al.*, 2019); a Diabetes tipo *Mellitus* 2 (DM2: vulgarmente referenciada como não dependente da insulina ou do adulto) é considerada um tipo heterogéneo dada a multiplicidade de fatores que poderão estar na sua génese, mas manifesta-se pela incapacidade progressiva de resposta celular à produção e secreção de insulina – resistência à insulina (IR) – face ao aumento dos níveis de glucose na corrente sanguínea (Roglic, 2014). Adicionalmente, como consequência da contínua estimulação pancreática devido à IR, poderá ocorrer a diminuição progressiva da função pancreática, originando também o quadro de insulinopenia. Trata-se da forma mais frequente da diabetes, com sintomatologia semelhante à anterior, mas de carácter mais ligeiro e de ocorrência gradual. Pode permanecer sem sintomatologia por grandes períodos de tempo até ao aparecimento de complicações decorrentes desta patologia (Roglic, 2014); a diabetes gestacional é uma situação patológica de carácter temporário resultante do aumento de

hormonas hiperglicemiantes na gravidez e que cessa após o término do período de gestação; a diabetes como manifestação secundária a outras condições surge, por exemplo, como as alterações pancreáticas de origem medicamentosa (Yaribeygi, Farrokhi, *et al.*, 2019).

No que diz respeito à prevenção, são várias as tentativas de abordagens a nível imunológico em modelos animais para prevenir o aparecimento de DM1. Em resultado, permanece a esperança que, a curto/médio prazo possam ser transpostas para o Homem abordagens com capacidade para retardar ou prevenir o aparecimento da patologia e das suas complicações (Roglic, 2014; Yaribeygi, Farrokhi, *et al.*, 2019).

A DM2 é caracterizada por fatores não modificáveis que incluem a genética, etnia e idade. Contudo, está também relacionada com fatores modificáveis que incluem as alterações do estilo de vida, como a prática de atividade física e alterações a nível nutricional de modo a reduzir a prevalência e os fatores de risco a médio/longo prazo (Yaribeygi *et al.*, 2019).

A insulina e o glucagon são as hormonas responsáveis pela manutenção da homeostase dos níveis de glucose, permitindo que esta oscile a sua concentração na corrente sanguínea dentro do intervalo 70 a 110 mg/dL, através do controlo da libertação da glucose na corrente sanguínea, absorção intestinal, captação pelos tecidos periféricos, mobilização (glucagon) ou armazenamento (insulina) desta em situações de carência e excesso nutricional, respetivamente (Hosseini Khorami *et al.*, 2015; Świdarska *et al.*, 2018). Quaisquer perturbações na sua síntese ou na sua via de sinalização poderão conduzir a falhas neste controlo. Em resultado, poderão levar ao aparecimento de situações de insulinopenia e/ou insulinoresistência e, conseqüentemente, originar o quadro clínico da DM (Jana *et al.*, 2018).

A incapacidade de regular o nível de glucose na corrente sanguínea leva à hiperglicémia, facto que relaciona a patologia às suas complicações. Sabe-se que a diabetes está tipicamente relacionada com IR ou alteração/diminuição da libertação da insulina, bem como a diminuição/interrupção das vias de sinalização desta nos tecidos periféricos. Observa-se a produção de grandes quantidades de radicais livres ou uma redução da capacidade antioxidante da célula, tornando-a suscetível à ação das ROS e azoto, bem como uma maior suscetibilidade à ocorrência de complicações micro e macrovasculares (Wu *et al.*, 2018).

É possível associar tanto a DM1 como a DM2, bem como as formas menos comuns, a complicações similares a longo prazo, mas a causa para a relação destas com a IR ainda não se encontra perfeitamente esclarecida. Contudo, estudos apontam que, pelo menos em parte, poderá estar associada a uma alimentação rica em lípidos, alterações a nível mitocondrial, com conseqüente disfunções multiorgânicas pelo aumento de ROS e libertação de mediadores inflamatórios (Jana *et al.*, 2018; Yaribeygi, Atkin, *et al.*, 2019).

3. Transporte da glucose

A glucose, para além de ser glúcido em maior abundância, é também o principal substrato metabólico para a generalidade das células. Mas, devido às suas características hidrofílicas e ao seu elevado peso molecular, a transposição das membranas celulares está condicionada e, portanto, é transportada para o interior das células por transportadores localizados na membrana citoplasmática (Yaribeygi *et al.*, 2018, 2019).

No epitélio intestinal e renal o transporte da glucose é feito contra o gradiente de concentração e encontra-se associado ao ião sódio, com consumo de energia, através dos transportados SGLT (Co-Transportador de Sódio-Glucose) localizados na membrana apical das células. Posteriormente, a glucose é transportada pelos GLUT (Transportador da Glucose), com capacidade de transporte bidirecional, localizados na membrana basolateral para difusão para o espaço intersticial (Yaribeygi, Farrokhi, *et al.*, 2019).

Destes transportadores são conhecidas diversas isoformas. Até à data encontram-se documentadas 14 membros desta família (GLUT-1 a GLUT-14) (Mueckler and Thorens, 2013). Contudo, as isoformas 1 a 4 são as que mais têm influência na homeostase da glucose (Yaribeygi, Farrokhi, *et al.*, 2019).

A classificação dos recetores prende-se com a afinidade dos mesmos à hexocinase, enzima responsável pela fosforilação da glucose a glucose-6-fosfato, momentos após esta entrar na célula. Esta é uma etapa fulcral uma vez que, após este passo metabólico, a afinidade para o transportador torna-se reduzida, impedindo que se processe o transporte reverso e esta saia da célula (Yaribeygi, Farrokhi, *et al.*, 2019). As isoformas 1 a 3 dos GLUT são totalmente independentes da ação da insulina. Já a isoforma 4 é dependente da ação da insulina e localiza-se, preferencialmente, ao nível do tecido adiposo, músculo esquelético e cardiomiócitos. Esta isoforma, encontra-se no interior das células, armazenada em vesículas, até que seja recrutada em resposta a um estímulo, nomeadamente aumento dos níveis de insulina. No decurso deste estímulo, a isoforma 4 é inserida na membrana celular onde exerce a sua ação: a entrada facilitada da glucose na célula, tal como será detalhado na secção seguinte (Mueckler & Thorens, 2013; Yaribeygi, Farrokhi, *et al.*, 2019).

4. Ativação e libertação da insulina

A insulina é uma hormona constituída por cerca de 51 amino ácidos e é composta por 2 cadeias ligadas por duas pontes dissulfureto. Esta é produzida ao nível dos ilhéus de Langerhans, nas células β pancreáticas, na forma de pré-proinsulina (Figura 1a), que, posteriormente, por clivagem da região N-terminal pelas enzimas microsossomais produz a proinsulina constituída pela cadeia A, cadeia B e peptídeo C (Figura 1b). Esta é armazenada em vesículas revestidas com clatrina, em conjunto com uma protease específica responsável pela clivagem, numa fase posterior, da ligação entre o peptídeo C e as restantes cadeias (Vakilian *et al.*, 2019).

Para a maturação da insulina, a vesícula perde o seu revestimento e a proinsulina sofre clivagem dando origem a dois fragmentos: as cadeias A e B ligadas entre si por pontes dissulfureto e o peptídeo C (Figura 1c). A clivagem da proinsulina não é total pelo que permanece, ainda que em quantidades vestigiais, na vesícula. Posteriormente, face ao aumento dos níveis de glucose, aminoácidos, ácidos gordos (AG) e também de hormonas como a gastrina e a secretina, a insulina é libertada na corrente sanguínea por exocitose, como será descrito posteriormente (Vakilian *et al.*, 2019).

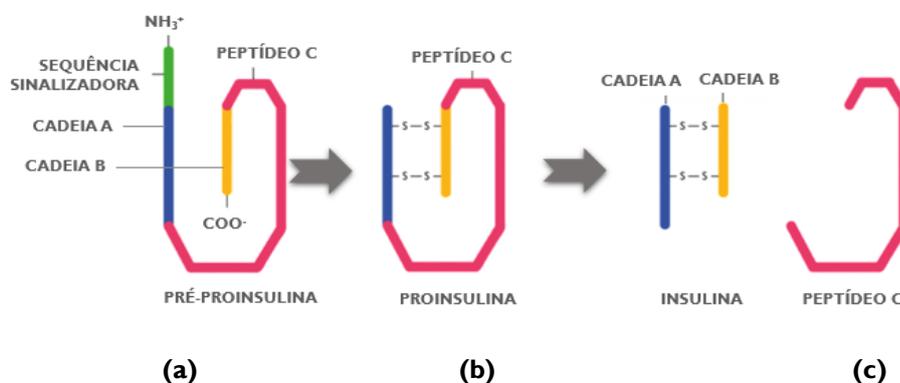


Figura 1. Ativação da insulina. (a) A pré-proinsulina é constituída pela região sinalizadora N-terminal, pela cadeia A, cadeia B e peptídeo C. (b) Após clivagem da região N-terminal, a sequência sinalizadora é removida dando origem à proinsulina. (c) Mediante um estímulo, tal como o aumento de glucose na corrente sanguínea, a proinsulina é clivada e dá origem ao peptídeo C e as cadeias A e B ligadas por pontes dissulfureto que dão origem à insulina que será libertada por exocitose (Vakilian *et al.*, 2019).

A entrada de glucose nas células β pancreáticas através dos transportadores GLUT é o primeiro estímulo para a libertação de insulina na corrente sanguínea. Ao entrar nestas células β , a glucose sofre fosforilação e entra na via metabólica para a produção de energia (ATP – Adenosina Trifosfato) na célula (Gerber & Rutter, 2017; Yaribeygi, Atkin, *et al.*, 2019). Com o aumento do quociente Adenosina Trifosfato/Adenosina Difosfato (ATP/ADP) há encerramento dos canais de potássio dependentes de voltagem com consequente

despolarização da membrana celular e aumento dos níveis de cálcio através da abertura dos canais de cálcio dependentes da voltagem. Neste seguimento, dá-se a exocitose dos grânulos de insulina para a corrente sanguínea (Gerber and Rutter, 2017). Ao ser libertada na corrente sanguínea, a insulina estimula a entrada da glucose nas células que é usada em diferentes vias metabólicas (Figura 2).

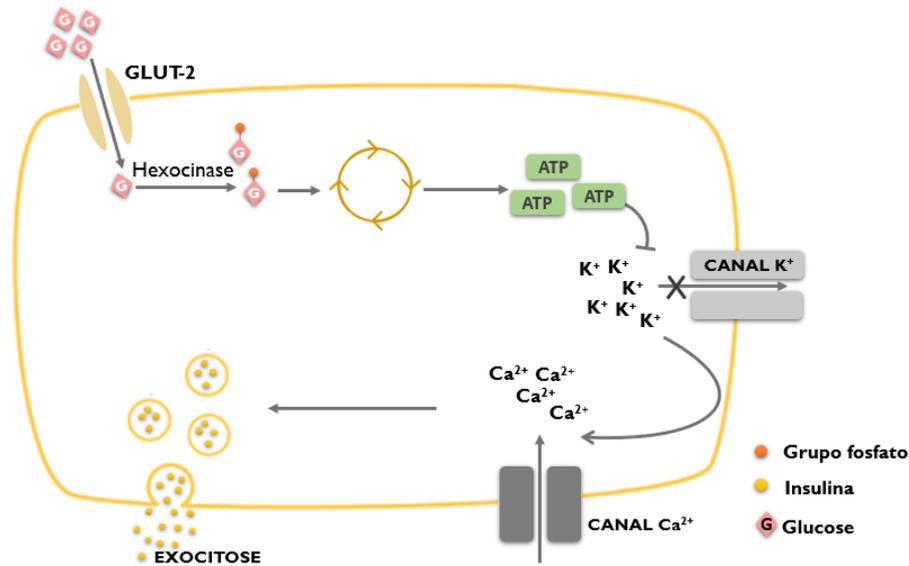


Figura 2. Libertação da insulina. Na fase pós-prandial verifica-se o aumento da concentração de glucose na corrente sanguínea. A glucose ao entrar nas células β pancreáticas sofre fosforilação pela hexocinase e integra o metabolismo oxidativo conduzindo à produção de ATP. Com o aumento dos níveis de ATP dá-se o encerramento dos canais de potássio dependentes da voltagem e, em resposta, a despolarização da membrana celular com abertura dos canais de cálcio dependentes da voltagem. Consequentemente há exocitose dos grânulos de insulina para a corrente sanguínea.

5. Vias de sinalização da insulina

Após aumentar a quantidade de glucose na corrente sanguínea são ativadas diversas vias de sinalização que levam a que esta retorne a valores normais de glicémia (70-110 mg/dL), nomeadamente através da ação da insulina nas células alvo (Yaribeygi, Farrokhi, et al., 2019).

Tal como ilustra a Figura 3, a via de sinalização da insulina inicia-se com a ligação desta ao seu recetor na membrana celular. Trata-se de uma proteína trimérica constituída por duas subunidades idênticas. Por sua vez, cada subunidade é constituída pela porção α , contendo o local de ligação da insulina estando localizada na superfície da membrana celular, e pela porção β transmembranar que se projeta para o interior da célula com atividade tirosina cinase, atividade esta inibida pela região α quando a insulina não se encontra ligada ao recetor (Haeusler, McGraw, & Accili, 2018; Yaribeygi, Atkin, et al., 2019). Quando a insulina liga ao recetor, as cadeias α fecham de modo a que esta fique aprisionada. Consequentemente, as

cadeias β , possuidoras de resíduos tirosina, adquirem atividade tirosina cinase e, na presença de ATP, sofrem autofosforilação. Tal acontecimento leva à alteração conformacional e ativação do recetor da insulina. Este vai permitir o recrutamento de moléculas endógenas como substratos do recetor da insulina (IRS) (Sivitz & Yorek, 2009; Haeusler *et al.*, 2018). Após a ligação do IRS-1, este é fosforilado pela cinase do recetor em vários locais, passando à sua forma ativa. Seguidamente, liga o fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K) que fosforila um fosfolípido da membrana celular, catalisando a conversão do fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP-2) a fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP-3). Este último migra ao longo da membrana celular e ativa proteínas cinases dependentes do PIP-3, nomeadamente a PDK-1 e PDK-2. No seu estado ativo, a PDK-1 ativa a proteína cinase B, fosforilando-a (PKB também conhecida como AKT). São produzidos diferentes estímulos que culminam no aumento da translocação de recetores GLUT-4 para a membrana celular de modo a facilitar a entrada de glucose na célula (Hosseini Khorami *et al.*, 2015; Świdarska *et al.*, 2018).

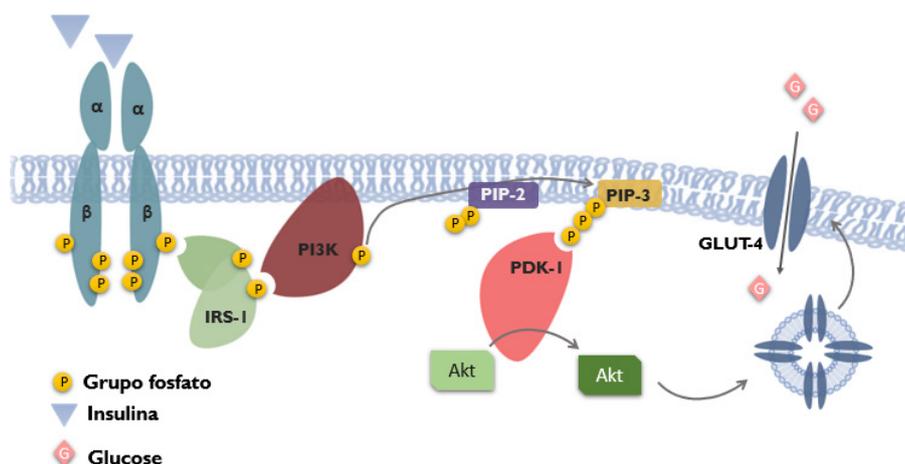


Figura 3. Via de sinalização da insulina. Quando a insulina liga ao recetor, as cadeias β aproximam-se e sofrem autofosforilação iniciando a propagação do sinal através da fosforilação de um dos seus substratos, o IRS-1, ativando-o. Por sua vez o IRS-1 ativado interagem com PI3K que leva à conversão do PIP-2 a PIP-3. Este último ao interagir com o PDK-1 ativa a AKT que, por uma sequência de eventos metabólicos, leva à inserção dos recetores GLUT-4 na membrana da célula.

Já na célula, a glucose pode integrar diversas vias metabólicas que compreendem as vias de produção de energia celular (ATP) e energia redutora (NADPH e NADH), bem como a produção de intermediários metabólicos. Pode ser ainda armazenada na forma de glicogénio e triacilgliceróis (TG) ou ser usada para a síntese de ácidos aminados tal como será detalhado na secção seguinte (Haeusler *et al.*, 2018; Yaribeygi, Farrokhi, *et al.*, 2019).

6. Metabolismo integrado

A fase pós-prandial (Figura 4a), é caracterizada pelo aumento dos níveis de glucose e, conseqüentemente, de insulina na corrente sanguínea tal como elucidado anteriormente. Já no interior das células, a glucose pode ser utilizada em diversas vias metabólicas. Em situações de carência energética, a glucose é processada pela via glicolítica (glicólise, ciclo de krebs e cadeia transportadora de elétrões) para a síntese de ATP, $\Delta\Psi$, ΔpH e pelo Shunt das Pentoses para a síntese de NADPH fundamental para a defesa antioxidante da célula, participando na regeneração do glutatião e também produção de ribose 5-fosfato importante para a síntese de nucleótidos e regeneração celular. Quando as necessidades energéticas já se encontram preenchidas são ativadas vias metabólicas para o armazenamento de glucose. Estas vias incluem a síntese de glicogénio a nível hepático e músculo esquelético (glicogénese), síntese de AG para posterior armazenamento no tecido adiposo na forma de TG quando as reservas de glicogénio já se encontram completamente preenchidas (lipogénese) e também a síntese de aminoácidos essenciais ao *turnover* proteico no músculo esquelético (Voet et al., 2016).

Contudo, quando os níveis de glucose diminuem na corrente sanguínea, as células β pancreáticas diminuem a produção de insulina, e o efeito inibitório sobre as células α pancreáticas diminui permitindo a libertação do glucagon, hormona responsável pelo aumento da glucose na corrente sanguínea. Portanto, para evitar a hipoglicémia são estimuladas pelo glucagon diversas vias metabólicas, representadas esquematicamente na Figura 4b, para assegurar as necessidades energéticas do organismo (Voet et al., 2016).

Esta hormona é responsável por promover a hidrólise do glicogénio armazenado para a obtenção de glucose (glicogenólise hepática). Quando as reservas de glicogénio hepático esgotam, o glucagon é responsável por estimular a obtenção de glucose a partir de produtos não glucídicos, nomeadamente lactato, alanina e glicerol (gluconeogénese). Recorre ainda à mobilização de AG das reservas no tecido adiposo (lipólise) para, através da β oxidação, originar Acetil-CoA que, posteriormente, integrará o ciclo de krebs para a produção de ATP (Voet et al., 2016).

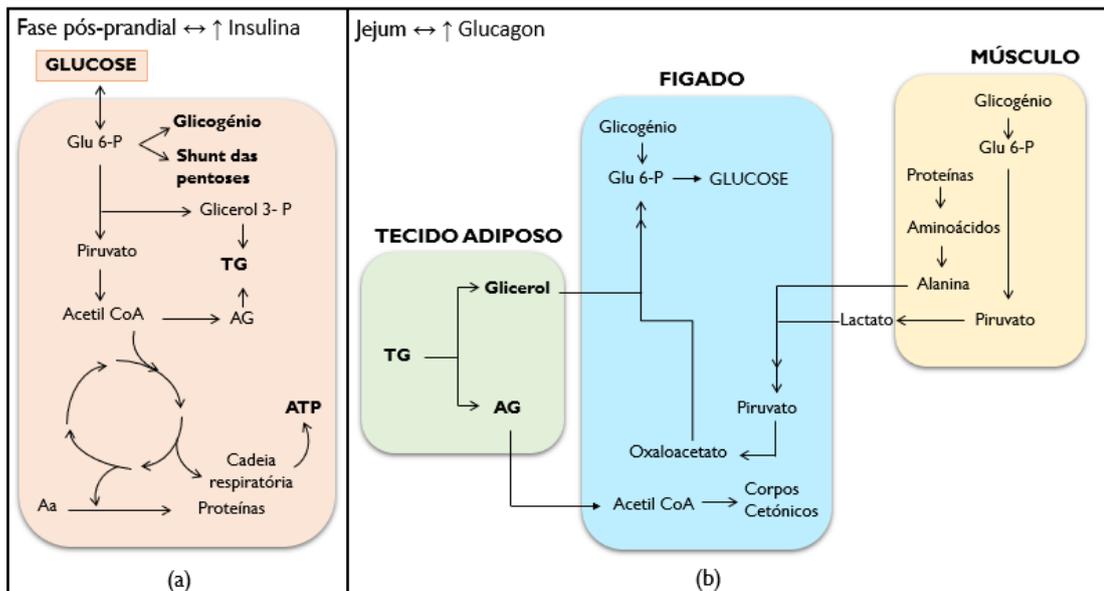


Figura 4. Metabolismo integrado. (a) Após uma refeição e na presença de insulina a glicose entra na célula e integra diversas vias metabólicas, podendo ser usada para síntese de ATP na via glicolítica, e no shunt das pentoses para a síntese de NADPH e ribose 5-fosfato. Em situações de excesso, a glicose pode ser armazenada na forma de glicogênio e na forma triacilgliceróis (TG) ou dar origem a síntese proteica. (b) Em contraste, no jejum ou entre as refeições, os níveis de glicose diminuem e é estimulada a liberação do glucagon. Esta hormona promove a obtenção de glicose a partir do glicogênio armazenado e de outras fontes não glucídicas como o glicerol, alanina e lactato, e ainda através da mobilização de ácidos gordos (AG), para a obtenção de energia.

7. Controlo da diabetes

Dada a complexidade da patologia quer pela sua evolução progressiva ou por estar frequentemente associada a outras patologias como a hipertensão arterial e obesidade, os esquemas terapêuticos para esta patologia são um grande desafio (de Sá *et al.*, 2016).

Geralmente, inicia-se por esquemas não farmacológicos com adoção de planos de exercício físico, restrição calórica, abstenção do consumo de glúcidos e perda de peso. Quando esta não é suficiente para controlar a progressão da doença, é necessário a adoção de terapia farmacológica, que vai desde a mono à politerapia, com administração oral de fármacos e/ou administração de insulina (de Sá *et al.*, 2016; Direção Geral da Saúde, 2015).

Porém, é notória a necessidade de mais e melhores terapêuticas de modo a diminuir a morbilidade e a mortalidade associada à DM2. Apesar de toda a investigação e todo o leque terapêutico disponível, o aparecimento de fases intermédias da doença, nomeadamente a pré-diabetes em que há elevação dos níveis de glicose ainda que inferiores aos que se fazem notar na DM2, associada à alteração da sensibilidade à insulina, aumentam ainda mais a complexidade do tratamento (de Sá *et al.*, 2016).

7.1. Fármacos antidiabéticos

7.1.1. Insulinosensibilizadores

7.1.1.1. Biguanidas – Metformina

A metformina, incluída no grupo dos fármacos insulinosensibilizadores, aumenta a sensibilidade à glucose ao nível dos tecidos periféricos, permitindo o controlo da glicémia basal e pós-prandial. Ao nível do fígado, inibe a gluconeogénese e a glicogénólise, diminuindo a produção de glucose; ao nível do músculo, aumenta a sensibilidade à insulina, levando a um aumento da sua captação e utilização a nível periférico; ao nível do intestino retarda a absorção de glucose (American Diabetes Association, 2019b).

A metformina ainda atua através da estimulação da glicogénese (por atuação na glicogénio-sintetase), aumenta a capacidade de transporte dos GLUT, melhora o perfil lipídico dos doentes e a perda ponderal. Está indicado no tratamento de doentes com DM2 com elevado índice de massa corporal, para os quais um tratamento não farmacológico não é suficiente para regular a glicémia (Meneses *et al.*, 2015; Yaribeygi, Atkin, *et al.*, 2019).

7.1.1.2. Tiazolidinedionas – Rosiglitazona Pioglitazona

As tiazolidinodionas exercem a sua ação ao nível do recetor nuclear PPAR- γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma*). Os recetores PPAR são um classe de recetores nucleares que, por ação na região promotora de diferentes genes, modulam a sua expressão (Meneses *et al.*, 2015; Yaribeygi, Atkin, *et al.*, 2019).

Ainda que não totalmente esclarecido, estes fármacos modulam a sensibilidade à insulina essencialmente através da ação no metabolismo dos ácidos gordos.

Pela transcrição de diferentes genes há estimulação do armazenamento dos AG circulantes no tecido adiposo impedido que estes se acumulem nos tecidos periféricos, onde potenciariam o desenvolvimento de IR essencialmente ao nível do fígado e músculo. Por outro lado, diminuindo a sua circulação na corrente sanguínea destes AG, as células ficam restritas à utilização da glucose como substrato metabólico, conduzindo à diminuição da sua concentração na corrente sanguínea.

7.1.2. Insulinosecretores

7.1.2.1. Sulfonilureias – Gliclazida, Glipizida, Glibenclamida e Glimepirida

Estes fármacos exercem a sua ação farmacológica através do fecho dos canais de potássio sensíveis ao ATP. Com o encerramento deste, é interrompido o fluxo de potássio levando à despolarização da célula, com consequente abertura dos canais de cálcio sensíveis à voltagem, que, por sua vez, potenciam a exocitose dos grânulos de insulina (Figura 2). Assim, verifica-se um aumento da captação de glucose na célula e diminuição da gluconeogénese.

Como se trata de um grupo que estimula a secreção de insulina, um dos seus principais efeitos indesejáveis é a hipoglicémia e o aumento de peso. Portanto, a sua administração deverá ser cuidadosamente monitorizada com recurso a biomarcadores, nomeadamente à medição da glicémia, e a concentração de fármaco no organismo (Meneses *et al.*, 2015; Yaribeygi, Atkin, *et al.*, 2019).

7.1.2.2. Meglitinidas – Nateglinida

As meglitinidas são, tal como as sulfonilureias, fármacos insulinosecretoras que exercem a sua ação através do encerramento dos canais de potássio dependentes de ATP (Meneses *et al.*, 2015; Yaribeygi, Atkin, *et al.*, 2019).

7.1.3. Incretinas

As incretinas são hormonas que, em resposta à ingestão de alimentos, são secretadas ao nível do trato gastrointestinal. Aqui inserem-se duas hormonas: o Peptídeo Inibidor Gástrico (GIP) e o Peptídeo I semelhante ao glucagon (GLP-1) com capacidade de exercer ação em diversos órgãos, nomeadamente ao nível do pâncreas, estimulando a secreção de insulina.

Contudo, as incretinas têm um tempo de semi-vida curto uma vez que são facilmente metabolizadas e inativadas por uma enzima, a dipeptidil peptidase-4 (DPP-4), pela clivagem da região N-terminal, impedindo a sua ação insulinomodeladora (Yaribeygi, Atkin, *et al.*, 2019).

Deste modo, dada a sua ação na homeostase da glucose, apresentam-se como alvos farmacológicos para o controlo da diabetes onde se incluem os agonistas do GLP-1 que mimetizam a ação das incretinas endógenas (Exanatide e Liraglutide), favorecendo a secreção de insulina e os inibidores da DPP-4 (Sitagliptina, Saxagliptina e Vildagliptina) que impedem a degradação das incretinas de modo a que estas permaneçam por maiores períodos de tempo na circulação sanguínea e sejam capazes de modular a secreção da insulina na fase pós-prandial (Meneses *et al.*, 2015; Yaribeygi, Atkin, *et al.*, 2019).

7.1.4. Inibidores da α -glucosidase – Acarbose

Os glúcidos são os principais nutrientes da alimentação da população ocidental. Estes são complexos e originam monossacarídeos, por ação enzimática, como é exemplo a β -galactosidase, a α -amilase e a α -glucosidase. Deste modo, através da inibição enzimática a nível intestinal, é possível modular a absorção de monossacáridos, como a glucose. Pelo seu mecanismo de ação deverão ser administrados antes das refeições. Contudo, por aumentarem a permanência dos glúcidos a nível intestinal, estes ficam sujeitos à ação fermentativa das bactérias da flora intestinal originam flatulência e desconforto abdominal como principais efeitos adversos (Meneses *et al.*, 2015; Yaribeygi, Atkin, *et al.*, 2019).

7.1.5. Inibidores do co-transportador de sódio-glucose

Os transportadores SGLT-2 são responsáveis pela reabsorção, a nível dos túbulos proximais, da grande maioria da glucose filtrada. Estes fármacos atuam através do boqueio de uma proteína a nível renal, a SGLT2, sendo considerado um inibidor potente, seletivo e reversível. Esta abordagem terapêutica melhora os níveis de glicémia em jejum e pós-prandial por diminuição da reabsorção da glucose a nível renal, levando à glicosúria, sendo que esta está dependente da concentração de glucose na corrente sanguínea e da taxa de filtração glomerular (Meneses *et al.*, 2015; Yaribeygi, Atkin, *et al.*, 2019).

7.1.6. Insulina

A administração de insulina tem como objetivo mimetizar a ação da hormona endógena que, numa situação de DM não é naturalmente produzida pelo organismo em quantidade suficiente face ao aumento da concentração de glucose na corrente sanguínea.

Para controlar a glicémia, existem no mercado diversos tipos de insulina com diferentes perfis farmacocinéticos disponíveis em cartuxo ou em caneta pré-cheia.

São classificadas com base no seu pico máximo, tempo e duração de ação em insulina de ação ultra-rápida/rápida, ação intermédia, ação lenta/ultra-lenta ou pré-mistura onde no mesmo cartuxo/caneta se encontra uma mistura de insulinas com diferentes tempos de ação. A insulina ultra-rápida/rápida deve ser administrada pelo menos 4 vezes por dia, ou seja, às refeições. Esta pode ser administrada imediatamente antes ou depois das refeições mediante a resposta do organismo do doente à ingestão de alimentos, controlando assim a glicémia pós-prandial face à quantidade de glúcidos ingeridos. No caso das insulinas de ação lenta/ultra-

lenta, responsáveis pela manutenção dos níveis basais de insulina ao longo do dia, devem ser administradas 1 a 2 vezes por dia em função das características individuais do doente (Meneses *et al.*, 2015).

7.2. Procedimento terapêutico

Segundo a Norma da DGS, o tratamento farmacológico na DM2 inicia-se com a administração de Metformina, sendo assim o fármaco de primeira linha quando as medidas não farmacológicas não se mostram suficientemente eficazes para o controlo da glicémia. Contudo, o seu uso deve ser evitado em situações de insuficiência renal, onde se deverá optar pela administração de uma sulfonilureia, sintomas gastrointestinais marcados, ou situações de hiperglicemias marcadas, de 300-350 mg/dL, com HbA1c >10%, preferindo a insulino terapia (Direção Geral da Saúde, 2015).

A terapia dupla será opção se, ao fim de 3 meses, as medidas não farmacológicas associadas à monoterapia não se mostrarem eficazes para induzirem a homeostase da glucose. Assim pode associar-se um segundo antidiabético oral, preferencialmente uma sulfonilureia se HbA1c < 9%, salvo exceção de doentes com mais de 75 anos com diversas comorbilidades e em hipoglicémias marcadas (<70 mg/dL) poderá ser usado como alternativa um inibidor da α -glucosidade ou um inibidor da DPP-4. Em situações de hiperglicémia marcada (300-350 mg/dL) ou HbA1c elevada (>10%) deve ser iniciada terapêutica com insulina (Direção Geral da Saúde, 2015).

A terapia com um terceiro antidiabético é usada como opção quando, ao fim de 3-6 meses, não é ainda possível o controlo da glicémia. A escolha do terceiro agente terapêutico é feita mediante o objetivo a atingir, isto é, se for necessária uma redução da HbA1c inferior a 1%, associa-se um antidiabético oral, se a redução pretendida da HbA1c for superior a 1% deve associar-se a insulina (Direção Geral da Saúde, 2015).

Dado o quadro de insulinopenia verificado na DMI, devido à destruição autoimune das células β pancreáticas, o seu esquema terapêutico consiste na administração subcutânea de insulina que mimetize a produção endógena desta hormona (Direção Geral da Saúde, 2015).

8. Controlo da glicémia

8.1. Avaliação da Glicémia

A monitorização dos níveis de glucose na corrente sanguínea é um procedimento de rotina no tratamento da DM dado que permite ao doente averiguar tanto o controlo glicémico em jejum como em resposta à ingestão de alimentos permitindo o cálculo correto das unidades de insulina a administrar (American Diabetes Association, 2019a; Kovatchev, 2017).

Esta avaliação pode ser realizada de forma manual e esporádica através da colheita de uma pequena gota de sangue capilar por picada com lanceta e posterior avaliação com recurso a uma tira teste e glicosímetro, ou através de medidores automáticos que fazem a monitorização da glucose em intervalos de tempo específicos através de um sensor acoplado ao doente, evitando a colheita de sangue (Kovatchev, 2017).

8.2. Hemoglobina Glicada HbA1c

A avaliação da hemoglobina glicada reflete o controlo médio dos níveis de glicémia durante o período de vida do eritrócito, ou seja, cerca de 120 dias, sendo que a quantidade de HbA1c será tanto maior quanto maior o contacto do eritrócito com a glucose. É um teste bioquímico útil em situações de alteração do esquema terapêutico mas os resultados podem apresentar valores incorretos resultantes, por exemplo, de situações de alteração da vida média do eritrócito (American Diabetes Association, 2019a).

Para a maioria da população o valor alvo situa-se nos 7%. Contudo, estes valores devem ser individualizados e corretamente determinados para cada doente, tendo em vista a idade, comorbilidades e risco de hipoglicémia (Kovatchev, 2017).

8.3. Prova de tolerância à glucose

A prova de tolerância à glucose permite verificar o modo como o organismo do doente reage ao aumento dos níveis de glucose na corrente sanguínea, sendo utilizada principalmente no diagnóstico da diabetes gestacional às 24 e 28 semanas de gestação.

O procedimento resume-se à administração de uma solução oral com 75 g de glucose e consequente determinação da glicémia no tempo zero, ao fim de uma e duas horas de modo a acompanhar a evolução do metabolismo glucídico do doente (American Diabetes Association, 2019a).

8.4. Cetonúria e Cetonémia

Os corpos cetônicos surgem em consequência do metabolismo de outros substratos metabólicos, nomeadamente lípidos e proteínas, quando a glucose não é utilizada para a produção de energia. Em consequência deste metabolismo há aumento das concentrações plasmáticas de ácidos gordos livres (AGL) e glicerol provenientes do metabolismo lipídico, e de alanina proveniente do metabolismo proteico. O glicerol e a alanina são usados pelo fígado na gluconeogénese, que se encontra estimulada pelo aumento dos níveis de glucagon em resposta ao défice energético provocado pela incapacidade de utilizar a glucose. Adicionalmente, o aumento dos níveis de glucagon estimulam a conversão dos AGL em corpos cetónicos a nível mitocondrial. Em consequência, a elevação dos níveis destes compostos traduzem-se, no doente com DM, na falta de controlo da doença pela incapacidade de metabolizar a glucose.

Em situações de cetonémia/cetonúria positivas e glicémia elevada, o doente deverá ser colocado sob vigilância de modo a evitar o desenvolvimento do quadro clínico de Cetoacidose Diabética potencialmente fatal (American Diabetes Association, 2019a).

Em resumo, a diabetes é uma doença metabólica crónica associada à hiperglicémia em consequência das diversas alterações que incluem tanto a modificação da secreção da insulina como a resistência à insulina.

Estudos recentes indicam que a mitocôndria, organelo chave no metabolismo celular, detém um contributo bastante elevado na fisiopatologia desta doença metabólica, influenciando negativamente a homeostase da glucose em situação de disfunção, tal como será abordado no capítulo seguinte.

9. Mitocôndria

As mitocôndrias são organelos citoplasmáticos possuidores de dupla membrana, membrana externa e membrana interna, esta última constituída por numerosas dobras, frequentemente denominadas de cristas mitocondriais, que separam o espaço intramembranar da matriz mitocondrial. Desta faz ainda parte um DNA circular com capacidade autorreplicativa que serve de base para a síntese proteica, fundamental aos processos de respiração celular e às vias metabólicas, tais como as subunidades dos complexos da cadeia respiratória (Yaribeygi *et al.*, 2019).

Este organelo é responsável por executar etapas bioquímicas cruciais para a homeostase celular, tendo influência tanto a nível da sobrevivência como morte celular, geração de espécies reativas de oxigénio (ROS), bem como manutenção da homeostase do cálcio (Yaribeygi *et al.*, 2019).

Nos seres eucariotas, através do metabolismo oxidativo de diversos substratos, são capazes de gerar energia na forma de ATP usando duas etapas principais: oxidação de NADH ou FADH₂ da glicólise e da β -oxidação, e a etapa da fosforilação oxidativa que, através da cadeia respiratória, gera grandes quantidades de ATP. Todas estas etapas são reguladas tanto por fatores celulares (DNA celular) importados para a mitocôndria, que incluem enzimas do ciclo de krebs e β oxidação, como por fatores mitocondriais (DNA mitocondrial) que incluem proteínas necessárias à replicação, transcrição e tradução (Chow *et al.*, 2017).

Porém, de todas, a função mitocondrial com maior notoriedade é, de facto, a produção de ATP (Bhatti *et al.*, 2017).

9.1. Cadeia Respiratória

A produção de energia é conseguida, essencialmente, através da fosforilação oxidativa, numa série de reações enzimáticas conhecidas como cadeia de transporte de eletrões ou cadeia respiratória mitocondrial (Karaa & Goldstein, 2015). É composta por cinco complexos proteicos diferentes: NADH-ubiquinona oxidoreductase (complexo I), succinato ubiquinona oxidoreductase (complexo II), ubiquinona citocromo c oxidoreductase (complexo III), Citocromo C oxidase (complexo IV) e ATP sintase (complexo V) localizados na membrana interna da mitocôndria. Além destes é ainda constituída para dois transportadores de eletrões móveis: Coenzima Q e Citocromo C responsáveis pela transferência de eletrões entre os complexos da cadeia respiratória (Yaribeygi *et al.*, 2019).

A Figura 5 ilustra a síntese de ATP. Este mecanismo inicia-se com a transferência de eletrões do NADH e FADH₂, gerados nas vias metabólicas, para os complexos I e II, respetivamente. Os eletrões são transferidos dos complexos I e II para o complexo III, via Coenzima Q. Posteriormente, através de um segundo transportador, o Citocromo C, são transferidos do complexo III para o IV. O complexo IV é responsável pela transferência dos eletrões provenientes do Citocromo C para o oxigénio molecular levando à produção de água (Yaribeygi, Atkin, *et al.*, 2019). A energia gerada através do fluxo de eletrões pelos complexos mitocondriais é usada para bombeamento de protões, contra o gradiente de concentração, através dos complexos I, III e IV da matriz para o espaço intramembranar, criando o gradiente

eletroquímico. Com o aumento da concentração de prótons no espaço intramembranar, estes retornam à matriz por difusão através do complexo V, promovendo a conversão do ADP a ATP com consumo do gradiente gerado (Bhatti *et al.*, 2017; Chow *et al.*, 2017).

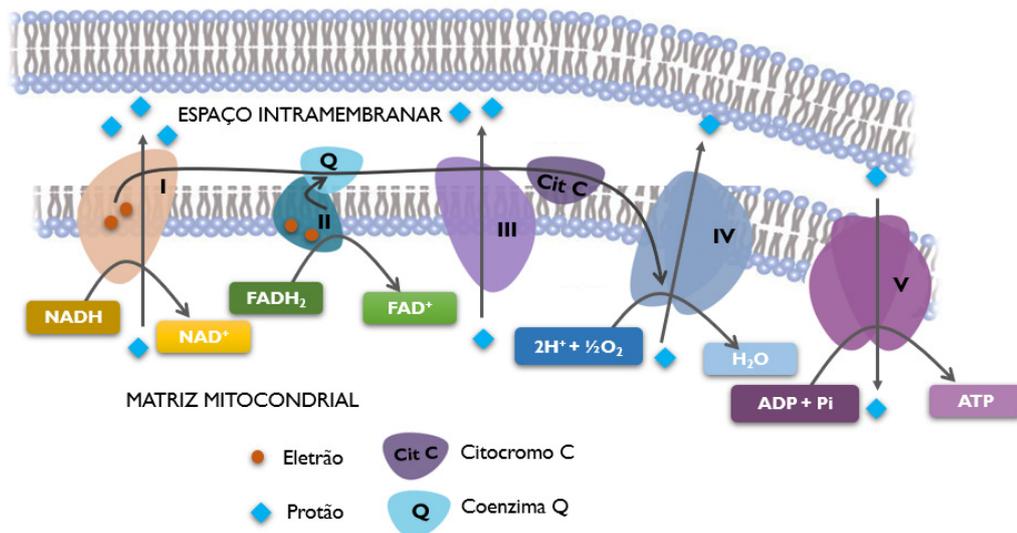


Figura 5. Cadeia respiratória mitocondrial. Inicia-se pela cedência de eletrões do NADH e FADH₂ no complexo I e II, respetivamente. Daqui são transferidos para o complexo III via Coenzima Q e, seguidamente seguem para o Complexo IV via Citocromo C com produção de água. Os complexos I, III e IV ao receberem energia gerada pelo fluxo de eletrões, bombeiam para o espaço intramembranar os prótons presentes na matriz. Com o aumento da concentração de prótons, estes retornam à matriz através do complexo V, onde se dá a produção de ATP.

É da cadeia respiratória mitocondrial que advém grande parte das ROS, essencialmente ao nível dos complexos I e III, já que o fluxo de eletrões é um processo imperfeito onde 0,4 a 4% do oxigénio consumido é reduzido de forma incompleta. Daqui resulta a geração de iões superóxido (O₂^{•-}) pela captação, pelo oxigénio molecular, dos eletrões que escapam na cadeia respiratória (Bhatti *et al.*, 2017). Como se trata de uma espécie eletricamente carregada, não possui a capacidade de atravessar livremente as membranas. Portanto, de modo a que tal seja possível, este é convertido em peróxido de hidrogénio através da ação da Superóxido Dismutase, tornando-se substancialmente menos reativo e, sendo isento de carga elétrica, consegue atravessar livremente a membrana e ser convertido no radical hidroxilo (OH^{•-}) altamente reativo (Chow *et al.*, 2017; Gerber & Rutter, 2017).

As células dispõem de várias estratégias para fazer frente ao dano oxidativo induzido pelas ROS, seja pela diminuição direta da geração de ROS ou pela presença de agentes antioxidantes de carácter enzimático onde se inclui a ação da superóxido dismutase, a catalase, a glutatona redutase e a peroxidase, bem como de carácter não enzimático, tais como a ação das vitaminas E e C, a glutatona, carotenoides e flavonóides (Bhatti *et al.*, 2017).

Em situação fisiológica a produção de ROS está confinada à mitocôndria para proteger o restante conteúdo celular, prevenindo o dano oxidativo generalizado. Mas, quando a capacidade antioxidante é ultrapassada, surge o dano oxidativo com alteração do conteúdo proteico, lipídico e ao nível dos ácidos nucleicos, prejudicando o normal funcionamento da célula associado à disfunção mitocondrial e a uma ampla gama de situações patológicas, tais como o síndrome metabólico e aceleração do envelhecimento (Bhatti *et al.*, 2017).

10. Disfunção mitocondrial

A disfunção mitocondrial não possui uma única definição, já que engloba diversas situações anormais que incluem a diminuição da biogênese mitocondrial, diminuição em número, alteração da atividade enzimática e oxidação de substratos, bem como a acumulação de ROS na célula (Montgomery & Turner, 2014).

Em resultado do metabolismo aeróbio e da sua elevada taxa metabólica existe, inevitavelmente, a produção de grandes quantidades de ROS. É hoje sabido que o aumento dos níveis de glucose na corrente sanguínea, quadro clínico comum na DM, aumentam a produção de ROS que, conseqüentemente, poderão levar a alterações morfológicas ao nível da mitocôndria (Bhatti *et al.*, 2017). Contudo, ainda não se encontra totalmente esclarecido se a disfunção mitocondrial é a causa ou é a consequência da doença (Sivitz & Yorek, 2009).

As alterações mitocondriais poderão estar na gênese de múltiplas patologias associadas a uma elevada heterogeneidade clínica, bioquímica e genética. Atualmente, associadas a estes quadros clínicos, estão caracterizadas mais de 250 alterações codificadas em dois genomas: o genoma nuclear e o genoma mitocondrial. Estas alterações associam-se, frequentemente, a variações na secreção intracelular ou extracelular de hormonas, sendo a DM um dos exemplos mais explorados (Chow *et al.*, 2017).

Atualmente, o papel desempenhado pelas mitocôndrias no metabolismo energético é globalmente reconhecido. Todavia, estudos recentes evidenciam que estas possuem um papel crítico que não se restringe apenas à produção de energia, estando envolvidas em todo o funcionamento celular (Guzman-Villanueva & Weissig, 2016). Assim, é fácil compreender o porquê de a mitocôndria poder estar, cada vez mais, associada ao desenvolvimento de diversas patologias, nomeadamente alterações metabólicas, diabetes, alzheimer, entre outras.

As alterações do funcionamento mitocondrial poderão ocorrer de várias formas mas, são apontadas, essencialmente, três como as principais responsáveis. Estas alterações relacionam-se com a acumulação lipídica, com alterações na secreção da insulina ou, até

mesmo, com a alteração na população mitocondrial - em número e função e, todas estas associadas à hiperprodução de ROS. No entanto, a relação causal entre a disfunção mitocondrial e a IR ainda é controversa (Sivitz & Yorek, 2009; Montgomery & Turner, 2014).

10.1. Acumulação lipídica e alteração da via de sinalização da insulina

É comum a associação entre a alteração do metabolismo da glucose e o desenvolvimento de IR, mas atualmente defende-se que não será causa única, estando a acumulação lipídica como uma das possíveis causas (Jana *et al.*, 2018).

Em situação de IR, a entrada de glucose para a célula está condicionada portanto, esta tem que recorrer a outros substratos para a obtenção de energia, nomeadamente a utilização de AG, apesar dos níveis elevados de glucose na corrente sanguínea (Rovira-Llopis *et al.*, 2017).

Numa fase inicial, o aumento considerável dos níveis de glucose na corrente sanguínea leva à hiperprodução de ROS. Esta, associadas à baixa capacidade antioxidante da célula, poderá originar danos oxidativos na mitocôndria, comprometendo as vias metabólicas a ela associadas (Bhatti *et al.*, 2017). Ao estar diminuída a resposta celular à insulina e a capacidade oxidativa mitocondrial, haverá, naturalmente, uma diminuição da oxidação dos substratos metabólicos. Assim, a redução da capacidade oxidativa mitocondrial origina a acumulação de substratos metabólicos, nomeadamente a acumulação lipídica, particularmente AGL, Diacilgliceróis (DAG) e Ceramidas (CER) (Montgomery & Turner, 2014; Jana *et al.*, 2018).

O recetor de insulina, além de ser fosforilado ao nível dos recetores de tirosina, poderá ser fosforilado nos resíduos serina. Esta fosforilação incorreta culmina na alteração dos mecanismos de sinalização intracelular com diminuição da capacidade da célula para responder à presença de insulina e glucose na corrente sanguínea (Yaribeygi *et al.*, 2018).

Como esquematizado na Figura 6, a acumulação destes metabolitos, nomeadamente os DAG, têm a capacidade de ativar a proteína cinase C (PKC) que, ao ser translocada para a membrana, tem a possibilidade de alterar a via de sinalização da insulina uma vez que potencia a fosforilação ao nível dos resíduos de serina do IRS-1, bloqueando a sua ação tirosina cinase e, conseqüentemente, o normal funcionamento do recetor (Sivitz & Yorek, 2009; Montgomery & Turner, 2014). É interrompido então a translocação para a membrana celular dos recetores GLUT-4 originando uma captação deficiente da glucose e, conseqüentemente, um quadro clínico de hiperglicémia e IR (Montgomery & Turner, 2014; Jana *et al.*, 2018;). Já as CER atuam por inibição da fosforilação da proteína AKT impedindo de igual modo a translocação dos

recetores GLUT-4 para a membrana das células. São ainda capazes de ativar a PKC que através de fosforilações sucessivas leva à ativação do NF-kB (*Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Consequentemente, o NF-kB conduz à ativação de vias pró-inflamatórias e de regulação da sobrevivência, ativação e diferenciação de células imunes, nomeadamente Células T, podendo estar envolvido na componente autoimune da Diabetes (Liu *et al.*, 2017; Świderska *et al.*, 2018). É ainda capaz de ativar cinases com atividade serino-treonina, como JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), que apresentam capacidade para interromper a via de sinalização da insulina através da incorreta fosforilação do recetor da insulina (Świderska *et al.*, 2018).

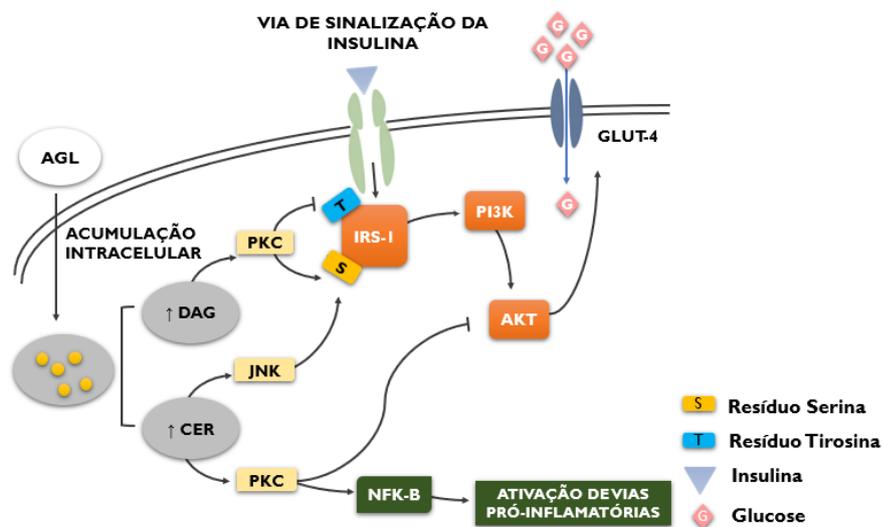


Figura 6. Disfunção mitocondrial por acumulação lipídica. O aumento de ácidos gordos livres (AGL) é acompanhado pelo aumento dos níveis de Diacilgliceróis (DAG) e Ceramidas (CER) capazes de alterar a via de sinalização da insulina. Esta é diretamente inibida por ação dos DAG que, por ativação da PKC potenciam a fosforilação incorreta do IRS-I, ao nível do resíduo de Serina. Através da PKC, as CER inativam a Akt e, através da ativação da via JNK, potenciam a fosforilação incorreta do IRS-I. Assim, há inibição da translocação dos GLUT-4 para a membrana celular impedindo a correta captação de glucose da corrente sanguínea. As CER são ainda capazes de, através da PKC, ativar a via NFK-B ativando vias pró-inflamatórias.

Assim, uma alteração mitocondrial de carácter hereditário ou adquirido, aliado à acumulação lipídica, poderá ser um mecanismo considerável para a relação entre o aumento dos AGL, a sua acumulação em tecidos não lipídicos e a IR na diabetes (Yaribeygi *et al*, 2018).

10.2. Alteração da dinâmica mitocondrial

As mitocôndrias não são, de modo algum, organelos estáticos. Através do seu elevado grau de plasticidade, têm a capacidade de sofrer alterações tendo em vista as necessidades energéticas da célula (Montgomery & Turner, 2014; Rovira-Llopis *et al.*, 2017).

A dinâmica mitocondrial parte do equilíbrio fisiológico entre eventos de fissão e fusão, regulação da via de morte celular, bem com remoção de mitocôndrias danificadas através da mitofagia ou produção de novas mitocôndrias através da biogénese (Bhatti *et al.*, 2017).

Deste modo, a regulação da dinâmica mitocondrial trata-se de um processo altamente complexo e regulado. Alterações neste poderão conduzir ao aumento da produção de ROS, disfunção mitocondrial e alterações metabólicas, potenciando, eventualmente, o aparecimento de doenças relacionadas com a mitocôndria, como a IR e a DM2 (Rovira-Llopis *et al.*, 2017).

10.2.1. Fissão e Fusão

Os processos de fusão e fissão mitocondrial são antagónicos, portanto estão presentes em diferentes fases do ciclo celular de modo a corresponder às necessidades bioenergéticas da célula. Têm como objetivo a conservação da função mitocondrial a nível celular, através da manutenção da função respiratória, apoptose, sobrevivência celular ou homeostase do cálcio (Rovira-Llopis *et al.*, 2017).

A fusão, representada na Figura 7a, é ativada em situações de carência energética (jejum prolongado ou situações de stress) e é controlada por três GTPases, nomeadamente a mitofusina 1 (MFN1) e mitofusina 2 (MFN2), proteínas integrais da membrana externa da mitocôndria que medeiam a fusão desta membrana, e a Atrofia Ótica 1 (OPA1), que medeia a fusão da membrana interna. Para que ocorra a fusão é necessária a aproximação de duas mitocôndrias vizinhas. Após estabelecerem contacto, a MFN1 e a MFN2 das duas mitocôndrias dimerizam e dá-se a fusão da membrana externa da mitocôndria. Após esta etapa, ao nível da membrana interna das duas mitocôndrias, dá-se a dimerização da OPA1 com fusão da membrana interna, formando-se assim uma mitocôndria de maiores dimensões, com capacidade metabólica superior, de modo a garantir e manter a homogeneidade tanto a nível genético como a nível bioquímico. Tal evento permite a diminuição da produção de ROS e pequenas mutações ao nível do DNA mitocondrial através da fusão com mitocôndrias “saudáveis” (Fujimaki & Kuwabara, 2017; Rovira-Llopis *et al.*, 2017).

De modo antagónico, a fissão, representada na Figura 7b, ocorre em situações de grande aporte nutricional (fase pós-prandial, situações de obesidade e DM2) e é controlada por duas

proteínas que incluem a Proteína Relacionada com a Dinamina (DRP1) e a Proteína de Fissão (FIS 1) (Rovira-Llopis *et al.*, 2017). A proteína DRP1 é uma GTPase que se localiza no citoplasma. Quando se dá início ao processo de fissão mitocondrial, esta GTPase é recrutada para um local específico da membrana externa da mitocôndria pela FIS 1 de modo a promover a divisão mitocondrial. Para além de ocorrer em situações de elevada disponibilidade de glúcidos, a fissão é também estimulada quando é detetada alguma anomalia a nível mitocondrial. Assim, através da divisão de uma mitocôndria de maiores dimensões é possível a sua eliminação através da mitofagia, tal como será discutido na secção 10.2.3 (Hesselink *et al.*, 2016).

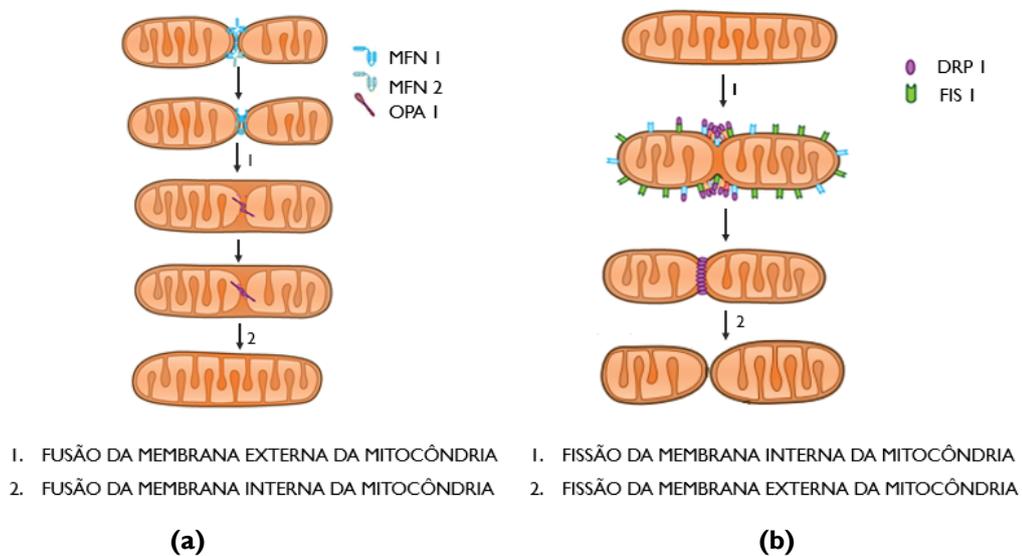


Figura 7. Fusão e Fissão mitocondrial. (a) Mediante um estímulo, dá-se o primeiro contacto entre duas mitocôndrias e, as proteínas presentes na membrana externa, a Mitofusina tipo 1 e 2 (MFN-1 e MFN-2) dimerizam e medeiam a fusão desta membrana. A fusão da membrana interna dá-se pela dimerização da atrofina Tipo 1 (OPA1); (b) Mediante um estímulo a proteína citoplasmática relacionada com a dinamina (DRP1) é recrutada para a membrana externa da mitocôndria pela FIS1 e por constrição levam à divisão da membrana interna e externa da mitocôndria (Adaptado de Pernas & Scorrano, 2016).

Vários estudos apontam para a influência dos processos de fusão e fissão na fisiopatologia da DM uma vez que foi demonstrada uma sobexpressão de proteínas envolvidas na fusão e uma superexpressão das proteínas envolvidas na fissão mitocondrial. Assim, um elevado aporte nutricional poderá provocar um desequilíbrio no balanço fusão/fissão mitocondrial que se traduz num incorreto controlo de qualidade da mitocôndria originando a superprodução de ROS, produção insuficiente de ATP, alterando a capacidade metabólica da célula (Hesselink *et al.*, 2016).

10.2.2. Biogénese

A biogénese mitocondrial é um processo metabólico de elevada complexidade e fortemente regulado. Esta depende tanto de fatores mitocondriais como nucleares e do sincronismo de ambos tal como acontece, por exemplo, na formação dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial (Montgomery & Turner, 2014).

A geração de novas mitocôndrias, a biogénese mitocondrial, é induzida por diversos estímulos que incluem estímulos fisiológicos, ambientais e farmacológicos, tais como o exercício físico, restrição calórica, termogénese e contração muscular onde há essencialmente alterações nas razões AMP/ATP e NAD^+/NADH (Bhatti et al., 2017; Fujimaki & Kuwabara, 2017).

Face a um destes estímulos, nomeadamente baixos níveis energéticos, os níveis de AMP e NAD^+ aumentam levando à ativação de numerosas proteínas, incluindo a proteína cinase do AMP (AMPK) e a SIRT1, respetivamente (Figura 8). Por sua vez, o AMPK e a SIRT1, interagem a nível nuclear com um importante regulador da biogénese mitocondrial, o PGC-1 α (*Peroxisome Proliferator-activated receptor Gamma Coactivator-1 α*), ativando-o. O PGC-1 α é uma proteína que tem influência no controlo de diversos processos metabólicos que vão desde a formação de novas mitocôndrias, ao controlo da β -oxidação mitocondrial e também ao controlo da resposta celular ao stress oxidativo. A sua ativação tem a capacidade de modular a transcrição do NRF-1/2 (*Nuclear Respiratory Factor 1/2*) e este, por sua vez, modular positivamente a transcrição de genes nucleares responsáveis por codificar proteínas mitocondriais e também a transcrição do Fator de Transcrição Mitocondrial A (Tfam). Estes elementos recém transcritos são reunidos e importados para a mitocôndria. Na mitocôndria, o Tfam regula a expressão de diversos genes ao nível do DNA mitocondrial. As proteínas produzidas, nucleares e mitocondriais, são reunidas dando origem aos complexos da cadeia respiratória mitocondrial modulando a fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, a produção de ATP. Deste modo a ação sincronizada dos dois genomas (nuclear e mitocondrial) permitem o aumento da população deste organelo de modo a corresponder às necessidades bioenergéticas da célula (Bhatti et al., 2017).

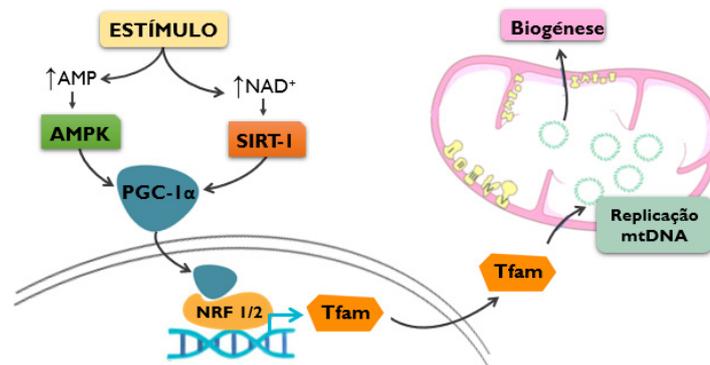


Figura 8. Biogênese mitocondrial. A biogênese mitocondrial inicia-se com um estímulo traduzido na regulação da transcrição de diferentes genes, nomeadamente o NRF-1/2 via ativação PGC-1 α . Tal resulta na formação do fator mitocondrial, o Tfam, que ao migrar para a mitocôndria potencia a transcrição de diferentes genes que culminam na formação de novas mitocôndrias (Bhatti *et al.*, 2017).

Vários estudos demonstram a existência de uma forte relação entre as alterações na biogênese mitocondrial e a DM, já que, muitas vezes associada à DM2 temos um excesso nutricional. Tal reflete-se na diminuição da relação NAD⁺/NADH que, por sua vez, se reflete na redução da expressão da SIRT1 e, conseqüentemente, redução da expressão do PGC-1 α e dos seus genes-alvo, condicionando o controlo do funcionamento mitocondrial (Rovira-Llopis *et al.*, 2017). Desta alteração resulta a uma redução da capacidade energética da célula com diminuição da produção de ATP e aumento da produção de ROS a partir da cadeia de transporte de eletrões. Conseqüentemente, irá condicionar a via metabólica da insulina com captação insuficiente de glucose nas células conduzindo ao desenvolvimento de IR e, conseqüentemente, DM2. Assim, a ativação da biogênese mitocondrial por via farmacológica poderá ser benéfica na prevenção e/ou tratamento da DM2 (Sivitz & Yorek, 2009; Wada & Nakatsuka, 2016).

10.2.3. Mitofagia

Na célula, quando é detetado o funcionamento anómalo de algum dos seus organelos, estes são eliminados seletivamente por um mecanismo denominado por Autofagia através da incorporação destes elementos em autofagossomas que, posteriormente, se fundem com lisossomas permitindo o seu catabolismo (Fujimaki & Kuwabara, 2017; Rovira-Llopis *et al.*, 2017). Quando o funcionamento aberrante se centra na mitocôndria esta é seletivamente eliminada, denominando-se este mecanismo de Mitofagia. Este evento catabólico poderá ser desencadeado por alterações do estado metabólico e redox da célula, bem como por oscilações na disponibilidade de alimentos (Fujimaki & Kuwabara, 2017).

A Mitofagia é um mecanismo deveras importante já que, através da eliminação de mitocôndrias com funcionamento aberrante é possível travar a propagação deste defeito (Rovira-Llopis *et al.*, 2017).

O processo de mitofagia envolve essencialmente duas proteínas: a PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) e a PARKIN. A PINK1 é uma serina/treonina cinase como função sinalizadora constituída por três porções que incluem a região N-Terminal MTS (*Mitochondrial Targeting Sequence*), a região helicoidal transmembranar (TM) e ainda a região com atividade cinase (Figura 9). A proteína PARKIN é uma ubiquitina-ligase citosólica que tem a sua atividade reprimida pela PINK1 (Eiyama & Okamoto, 2015).

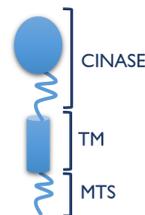


Figura 9. Estrutura da proteína PINK1. A PINK trata-se de uma proteína cinase associada à mitocôndria com atividade serina/treonina constituída por três regiões funcionais: região N-Terminal MTS, a região transmembranar helicoidal e por fim, a região com atividade cinase (Eiyama & Okamoto, 2015).

Quando não é detetada qualquer situação anómala, **Figura 10a**, a porção MTS da PINK1 é translocada através das membranas externa e interna e posteriormente clivada na mitocôndria por uma peptidase, a MPP na matriz mitocondrial. Seguidamente a porção transmembranar é degradada ao nível da membrana interna por uma protéase, a PARL. Por fim, a porção com atividade cinase liberta-se da mitocôndria e é degradada pelo proteossoma no citoplasma. Consequentemente a PARKIN não sofrerá ativação pela PINK1, continuando no seu estado inativo no citoplasma. Esta etapa permite que os níveis de PINK1 se mantenham baixos em estados de elevado potencial de membrana ($\Delta\Psi$) de modo a que seja evitada a degradação de mitocôndrias perfeitamente saudáveis (Montgomery & Turner, 2014; Eiyama & Okamoto, 2015).

Contudo, quando é detetada qualquer situação anómala na mitocôndria, geralmente traduzida na diminuição do $\Delta\Psi$, **Figura 10b**, a PINK1 não é translocada e, consequentemente não é clivada pela ação da MPP e PARL, acumulando na membrana externa da mitocôndria. Aqui sofre ativação através da dimerização com outra proteína PINK1 e posterior fosforilação. Esta ativação leva ao recrutamento da PARKIN e da ubiquitina que ao interagirem com a PINK1, tornam-se ativas por fosforilação. Em consequência da sua ativação, a PARKIN e a ubiquitina interagem de modo a potenciar a completa e eficiente ubiquitinação para posterior catabolismo da mitocôndria ao nível do proteossoma (Montgomery & Turner, 2014). De igual

modo, a PARKIN conduz à degradação de diversas proteínas mitocondriais, nomeadamente as proteínas de fusão, a MFN1 e MFN2, evitando a fusão mitocondrial, facilitando o processo de mitofagia e impedindo a propagação do defeito deste organelo (Eiyama & Okamoto, 2015; Fujimaki & Kuwabara, 2017).

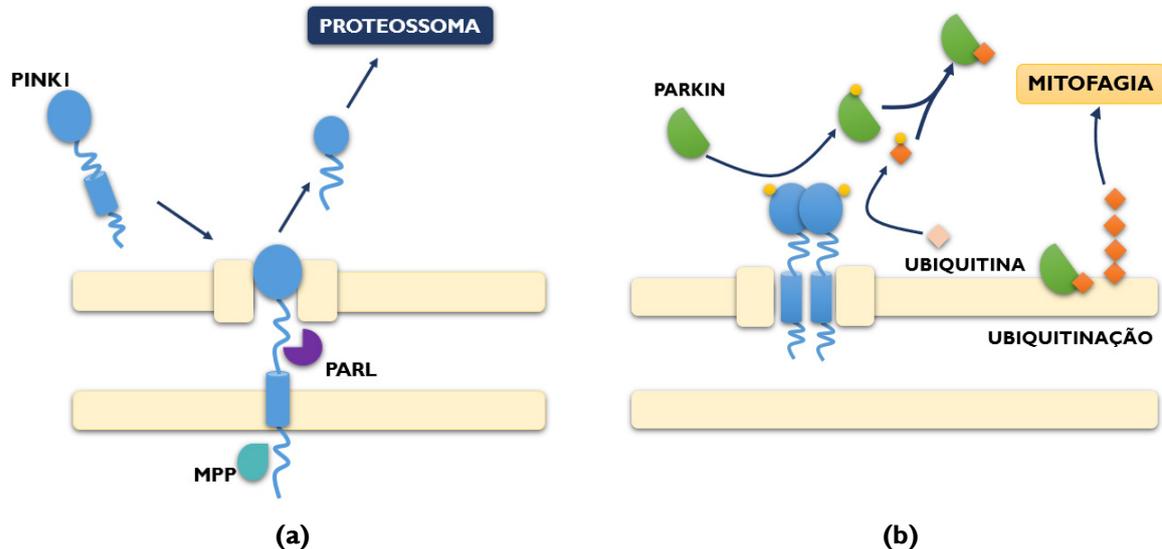


Figura 10. Mitofagia. (a) Na mitocôndria saudável a proteína PINK1 é translocada e as regiões MTS e TM são clivadas. A MTS sofre clivagem por uma protéase presente da matriz, a MPP e a região transmembranar por outra protéase da membrana interna, a PARL. Finalmente a região com atividade cinase é degradada no proteossoma; (b) Na mitocôndria disfuncional a PINK1 acumula na membrana externa onde é ativada por dimerização com outra proteína e por fosforilação onde ganha capacidade para ativar a proteína PARKIN. Por sua vez, esta proteína ativada interage com a ubiquitina, estimulando a ubiquitinação para posterior degradação no proteossoma (Montgomery & Turner, 2014)

Tal como nas situações anteriores, também a mitofagia parece estar implicada na etiologia da DM2. Estudos apontam que a expressão da PINK1 é substancialmente inferior no músculo esquelético de doentes com DM2. Assim, por analogia com o mecanismo fisiológico, tal alteração reflete-se na acumulação de mitocôndrias com funcionamento aberrante, baixa capacidade metabólica e sobreprodução de ROS, agravando ainda mais a DM2 bem como as complicações associadas a esta patologia (Fujimaki & Kuwabara, 2017).

10.2.4. Plasticidade Mitocondrial

De modo a adaptar-se às necessidades energéticas e à disponibilidade de substrato, a mitocôndria tem a capacidade de alterar o substrato metabólico mediante as suas necessidades, oscilando por isso entre o metabolismo oxidativo de AG e glicose.

Para que seja possível a síntese de ATP a partir dos AG estes necessitam de ser ativados. A reação de ativação dá-se em duas etapas que originam moléculas de Acil-Coenzima A (Acil-CoA) sob ação da Acil-CoA sintetase (Figura 11). Numa primeira etapa, é transferida uma unidade de AMP proveniente de uma molécula de ATP para o AG, resultando na formação de Acil-AMP e uma molécula de pirofosfato (PPi) que, posteriormente, sofre hidrólise originando dois ortofosfatos (Pi). Numa segunda etapa, o Acil-AMP reage com uma molécula de CoA formando o Acil-CoA e libertando o AMP. Uma vez ativado o AG (na forma de Acil-CoA), este é transportado para a mitocôndria através de um translocador presente na membrana externa deste organelo. No caso dos AG de cadeia curta o seu transporte para a matriz mitocondrial é direto, mas, no caso dos AG de cadeia longa é necessário o transporte associado à carnitina (Voet *et al.*, 2016).

A membrana interna da mitocôndria é impermeável à generalidade das moléculas. Para que seja possível a utilização dos AG, estes têm de ser transportados. Para tal, no caso dos AG de cadeia longa, o Acil-CoA, por ação da Carnitina Aciltransferase I (CrATI) reage com a carnitina para formar a Acil-Carnitina. Esta molécula é translocada para a matriz onde, por ação da Carnitina Aciltransferase II (CrATII), se liberta da carnitina originando novamente o Acil-CoA. A carnitina regressa ao espaço intramembranar onde será posteriormente utilizada (Voet *et al.*, 2016).

Já na matriz mitocondrial, o Acil-CoA entra na β oxidação, num ciclo de reações que originam o Acetil-CoA que será incorporado no ciclo de krebs para gerar ATP. A cada ciclo é também produzida uma molécula de NADH e de FADH₂ posteriormente usadas pela cadeia de transporte de eletrões para gerar ATP (Voet *et al.*, 2016).

Como demonstrado na Figura 11, a flexibilidade metabólica a nível celular pode ser vista como uma competição entre o Acetil-CoA resultante da glicólise ou da β -oxidação para iniciar o ciclo de krebs (Hesselink *et al.*, 2016).

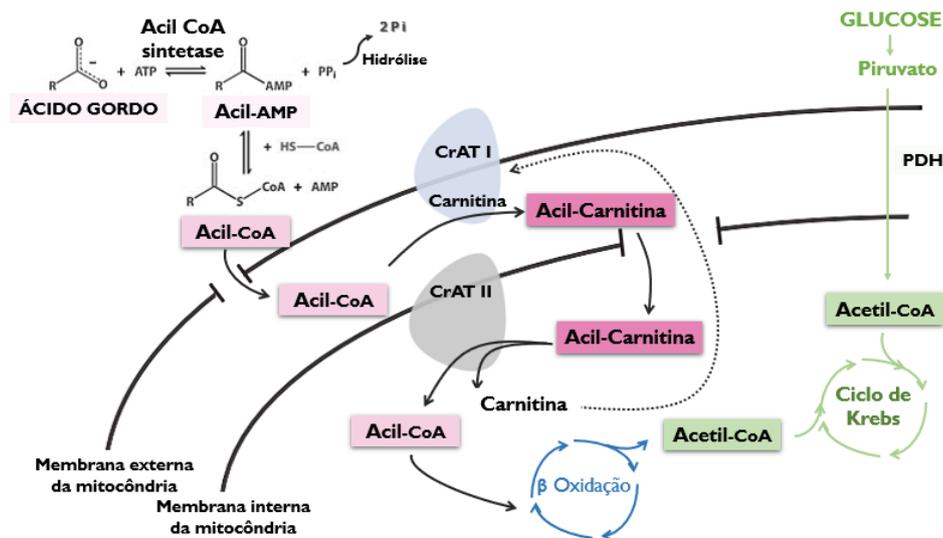


Figura II. Flexibilidade mitocondrial. De modo a utilizar dos ácidos gordos (AG) para obtenção de energia estes têm de ser previamente ativados no citoplasma através da formação de Acil-coenzima A (Acil-CoA) sob ação da Acil-CoA sintetase. Já na sua forma ativa, o Acil-CoA é translocado para a mitocôndria, mas como não consegue transpor a membrana interna é convertida no espaço intermembranar a Acil-Carnitina pela carnitina Aciltransferase I (CrATI). A Acil-Carnitina é translocada para a matriz mitocondrial onde é convertida a Acil-CoA pela carnitina Aciltransferase II (CrATII). A carnitina volta para o espaço intermembranar para posterior utilização. O Acil CoA entra na β oxidação, originando Acetil-Coenzima A (Acetil-CoA) posteriormente usado no ciclo de krebs para a produção de ATP.

A inflexibilidade mitocondrial tem sido frequentemente associada a quadros clínicos de DM, onde se verifica, por exemplo, incapacidade em usar AG em situações de jejum ao invés da utilização da glucose (Hesselink *et al.*, 2016).

Foi demonstrado que, em situações de insulinoresistência, a quantidade de carnitina livre é reduzida, bem como a atividade da CrATI. Este poderá ser o mecanismo subjacente à inflexibilidade mitocondrial uma vez que, pela incapacidade de converter o Acil-CoA a Acilcarnitina, o Acil-CoA iria acumular na célula e não é capaz de atingir a matriz mitocondrial onde se processaria a β oxidação comprometendo síntese de ATP, sendo usado para a síntese de corpos cetônicos (Figura 4). A acumulação do Acil-CoA irá também impedir o transporte do piruvato para a matriz mitocondrial e a ação da piruvato desidrogenase, comprometendo igualmente a síntese de ATP (Hesselink *et al.*, 2016).

Assim a manipulação da atividade da CrAT poderá ser uma abordagem plausível para melhorar a inflexibilidade mitocondrial uma vez que, mitocôndrias com elevada atividade desta enzima, conduzem ao aumento da conversão do Acil-CoA a Acilcarnitina, permitindo uma melhoria significativa na oscilação entre a utilização dos diversos substratos metabólicos disponíveis bem como melhorias na tolerância à glucose (Hesselink *et al.*, 2016).

I I. Abordagens terapêuticas

Ainda que seja necessário esclarecer os mecanismos pelos quais a dinâmica mitocondrial se relaciona com a DM, é notório o interesse da comunidade científica em direcionar as abordagens terapêuticas para a mitocôndria de modo a normalizar tanto o funcionamento das células β pancreáticas como a ação da insulina nas células alvo, a fim de conduzir ao correto controlo dos níveis de glucose na corrente sanguínea (Yaribeygi *et al.*, 2019). Estas abordagens terapêuticas vão ao encontro da generalidade das anomalias detetadas, nomeadamente na dinâmica mitocondrial, via de sinalização da insulina e acumulação lipídica (Rovira-Llopis *et al.*, 2017).

II.1. Abordagem Farmacológica

São vários os estudos que demonstram que tanto as abordagens não farmacológicas onde se inclui a prática de exercício físico associada à restrição calórica como as farmacológicas que englobam a terapia convencional associada ao resveratrol e outros antioxidantes com alvo mitocondrial, possuem a capacidade de modular a sensibilidade à insulina e também a função mitocondrial (Rovira-Llopis *et al.*, 2017).

Para além das novas abordagens terapêuticas em estudo, existem evidências científicas que demonstram que os fármacos da terapêutica convencional também têm influência na atividade mitocondrial. A metformina, geralmente o fármaco de primeira linha na DM2, apresenta benefícios não só na regulação dos níveis de glucose na corrente sanguínea com também na função mitocondrial, nomeadamente ao nível da cadeia respiratória. Estudos apontam que este fármaco parece atenuar a produção de ROS ao nível do Complexo I da cadeia transportadora de eletrões, reduzindo o *stress* oxidativo celular. Adicionalmente verificou-se uma redução na translocação da PKC para a membrana celular, melhorando por isso a via de sinalização da insulina e verificou-se, de igual modo, o aumento da razão AMP/ATP, ponto-chave na estimulação da biogénese mitocondrial. As incretinas demonstraram a sua eficácia terapêutica não só na sua forma clássica, mas também na sua ação a nível mitocondrial. Estes fármacos demonstraram possuir ação antioxidante e anti-inflamatória, capacidade de influenciar a via de sinalização NF- κ B e JNK, translocação da PKC e também capacidade de modular positivamente a atividade enzimática, nomeadamente ao nível da superóxido dismutase, piruvato desidrogenase e citocromo C oxidase (Teodoro *et al.*, 2019; Yaribeygi, Atkin, *et al.*, 2019).

11.2. Abordagem Não Farmacológica – Exercício Físico e Restrição Calórica

É notória a relação da DM2 com a redução da atividade física e aumento progressivo do sedentarismo. São vários os estudos que relacionam a melhoria da função mitocondrial com a prática de exercício físico. Assim, a prática de exercício físico regular tem a capacidade de melhorar a qualidade de vida do doente, reduzir a incidência de doenças metabólicas, onde se insere a DM2, e melhorar a sensibilidade à insulina (Teodoro *et al.*, 2019).

Durante a prática de atividade física, verifica-se, naturalmente, o aumento do consumo de oxigênio maioritariamente usado ao nível da mitocôndria para a produção de energia. Consequentemente, associado ao aumento das necessidades energéticas da célula, verifica-se o aumento da geração de ROS. Contudo, a prática recorrente de exercício físico tem a capacidade de modular positivamente a capacidade antioxidante da célula através do aumento da atividade de diversas enzimas chave no combate às ROS, nomeadamente a superóxido dismutase e a glutatona peroxidase (Teodoro *et al.*, 2019).

Pensa-se que a relação entre a atividade física e a DM2 está centrada sobretudo ao nível do complexo PGC-1 α e SIRT1. Associado aos baixos níveis energéticos na célula verifica-se o aumento do AMP / ATP e a ativação da AMPK, que por uma sequência de processos estimulam a biogénese mitocondrial (Bhatti *et al.*, 2017).

Para além dos benefícios enumerados anteriormente, a prática frequente de exercício físico demonstrou influenciar o balanço fusão/fissão mitocondrial. Após a prática de exercício, ficou demonstrado o aumento da expressão das proteínas MFN1, MFN2 e OPA1, sugerindo ao aumento da fusão mitocondrial. Em oposição, a FIS1 e a DRP1 encontram-se diminuídas, demonstrando a influência na fissão mitocondrial. A prática de exercício físico é ainda capaz de aumentar a expressão da PINK1/PARKIN, levando a concluir que o exercício físico se relaciona com a mitofagia (Fujimaki & Kuwabara, 2017).

Associada à prática de exercício físico, a restrição calórica parece desencadear melhorias significativas no quadro clínico da DM2 (Figura 12). A razão pela qual se verificam tais melhorias ainda não se encontra perfeitamente esclarecida mas centra-se na redução da superprodução de ROS e dano oxidativo bem como a ativação da SIRT1 (Montgomery & Turner, 2014; Bhatti *et al.*, 2017).

Inicialmente, o excesso nutricional leva a um grande aumento dos níveis de ATP que não correspondem às necessidades energéticas da célula. Consequentemente, através de mecanismos de *feedback* negativo há diminuição da velocidade do fluxo de eletrões originando

fuga destes essencialmente ao nível dos complexos I e III, potenciando a produção de ROS. Com a restrição calórica há, naturalmente, redução da disponibilidade do substrato metabólico levando a que todo o ATP produzido seja utilizado para fazer face às necessidades bioenergéticas da célula diminuindo a fuga de elétrões na cadeia respiratória e, conseqüentemente, reduzir a superprodução de ROS (Kwak & Park, 2016).

Como esquematizado na Figura 12, ativação da SIRT1 dá-se com base no aumento da relação $NAD^+/NADH$ em consequência da restrição calórica, onde vai estimular a biogénese mitocondrial e controlar diversas vias metabólicas, nomeadamente o metabolismo da glucose e lípidos (Montgomery & Turner, 2014; Rovira-Llopis *et al.*, 2017).

Frequentemente, a referência ao papel da SIRT1 vem relacionada com a ação conjunta do resveratrol, um ativador da SIRT1 que tem demonstrado o seu contributo nas terapias inovadoras direcionadas para a mitocôndria. Este composto para além das suas propriedades antioxidantes, revelou o seu interesse através da estimulação da biogénese mitocondrial (Montgomery & Turner, 2014; Bhatti *et al.*, 2017).

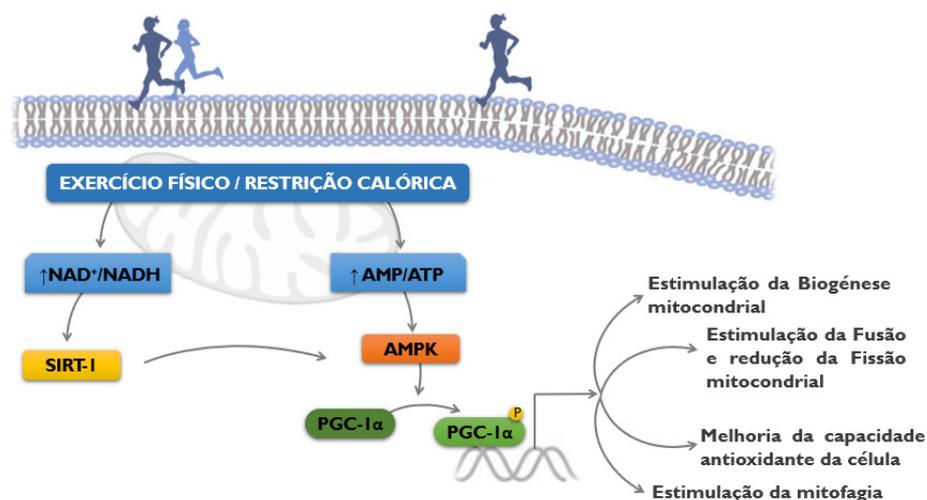


Figura 12. Influência do exercício físico e restrição calórica na disfunção mitocondrial. Através da prática de exercício físico associada à restrição calórica verifica-se a melhoria de diversos parâmetros mitocondriais e celulares, nomeadamente, a biogénese, fusão, mitofagia e capacidade antioxidante. Pelo aumento dos níveis de NAD^+ há ativação da SIRT-1 que, por sua vez ativa a proteína AMPK, igualmente ativa pela elevação dos níveis de AMP. Após a ativação da AMPK há estimulação da transcrição de diferentes genes, nomeadamente o PGC-1 α que potencia a modulação de vários parâmetros mitocondriais, melhorando a sua função.

12. Conclusão

Quando não é possível controlar de forma correta o funcionamento mitocondrial, surge facilmente a sua disfunção, a qual está relacionada com o desenvolvimento de diversas patologias onde se inclui a DM.

A fisiopatologia da DM é bastante complexa e, apesar dos recentes avanços científicos, os seus mecanismos não se encontram perfeitamente elucidados. Contudo, dada a elevada taxa de ocorrência e a severidade associada carecem de especial atenção e constante investigação por parte da comunidade científica.

No presente trabalho foi realizada uma revisão global da fisiopatologia da DM, dando especial destaque às recentes descobertas, em particular, a possível relação desta patologia com a disfunção mitocondrial.

Particularmente, este trabalho mostrou que esta disfunção pode ser explicada por diversos mecanismos, nomeadamente a acumulação lipídica e a alteração da via de sinalização da insulina, alteração da dinâmica mitocondrial onde se incluem os eventos de fissão e fusão, biogénese, mitofagia e plasticidade mitocondrial. Estes mecanismos, de uma forma global relacionam-se pela hiperprodução de ROS, sendo, portanto, o possível elo de ligação entre a disfunção mitocondrial e a DM.

Foram ainda exploradas algumas das abordagens terapêuticas em estudo direcionadas para a mitocôndria de modo a atuar tanto na prevenção como no tratamento desta patologia de enorme destaque na sociedade atual.

É de todo o interesse que trabalhos futuros procurem aliar o conhecimento das alterações estruturais/funcionais da mitocôndria de cada doente, compreendidas através da epigenética e, eventualmente, biomarcadores individuais com a sua aplicação na prática clínica. Tal relação tornaria possível a adoção de medidas preventivas ou de tratamento direcionadas para o doente, evitando as abordagens clínicas convencionais, a fim de diminuir a ocorrência da síndrome metabólica e, nomeadamente da DM, patologia tão preponderante na sociedade atual.

13. Bibliografia

- American Diabetes Association. (2019a). Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes - 2019. *Diabetes Care*, 42(1), 61–70.
- American Diabetes Association. (2019b). Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes - 2019. *Diabetes Care*, 42(1), 90–102.
- Bhatti, J. S., Bhatti, G. K., & Reddy, P. H. (2017). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders — A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1863(5), 1066–1077.
- Chow, J., Rahman, J., Achermann, J. C., Dattani, M. T., & Rahman, S. (2017). Mitochondrial disease and endocrine dysfunction. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(2), 92–104.
- de Sá, A. B., Oliveira, C., Carvalho, D., Raposo, J., Polónia, J., da Silva, J. A., ... Cernadas, R. (2016). A Diabetes Mellitus em Portugal: Relevância da Terapêutica Farmacológica Adequada. *Revista Portuguesa De Farmacoterapia*, 8(1), 44–53.
- Direção Geral da Saúde - DGS (2011). Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus, (Norma 002/2011 de 14/01/2011).
- Direção Geral da Saúde - DGS (2015). Abordagem Terapêutica Farmacológica na Diabetes tipo 2, (Norma nº 052/2011 de 27/12/2011 atualizada a 27/04/2015;).
- Eiyama, A., & Okamoto, K. (2015). PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 33, 95–101.
- Fujimaki, S., & Kuwabara, T. (2017). Diabetes-Induced Dysfunction of Mitochondria and Stem Cells in Skeletal Muscle and the Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2147.
- Gerber, P. A., & Rutter, G. A. (2017). The Role of Oxidative Stress and Hypoxia in Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Antioxidants & Redox Signaling*, 26(10), 501–518.
- Guzman-Villanueva, D., & Weissig, V. (2016). Mitochondria-Targeted Agents: Mitochondriotropics, Mitochondriotoxics, and Mitocans. In *Handbook of experimental pharmacology* pp. 423–438.
- Haeusler, R. A., McGraw, T. E., & Accili, D. (2018). Metabolic Signalling: Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*,

19(1), 31–44.

- Hesselink, M. K. C., Schrauwen-Hinderling, V., & Schrauwen, P. (2016). Skeletal muscle mitochondria as a target to prevent or treat type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews. Endocrinology*, 12(11), 633–645.
- Hosseini Khorami, S. A., Movahedi, A., Khaza'ai, H., & Abdul Mutalib, M. (2015). PI3K/AKT pathway in modulating glucose homeostasis and its alteration in Diabetes. *Annals of Medical and Biomedical Sciences*, 1, 46–55.
- Jana, B. A., Chintamaneni, P. K., Krishnamurthy, P. T., Wadhvani, A., & Mohankumar, S. K. (2018). Cytosolic lipid excess-induced mitochondrial dysfunction is the cause or effect of high fat diet-induced skeletal muscle insulin resistance: a molecular insight. *Molecular Biology Reports*, 46(1), 957–963.
- Karaa, A., & Goldstein, A. (2015). The spectrum of clinical presentation, diagnosis, and management of mitochondrial forms of diabetes. *Pediatric Diabetes*, 16(1), 1–9.
- Kovatchev, B. P. (2017). Metrics for glycaemic control - from HbA1c to continuous glucose monitoring. *Nature Reviews. Endocrinology*, 13(7), 425–436.
- Kwak, S. H., & Park, K. S. (2016). Role of mitochondrial DNA variation in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 21(6), 1151–1167.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S.-C. (2017). NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2, e-17023.
- Meneses, M. J., Silva, B. M., Sousa, M., Sa, R., Oliveira, P. F., & Alves, M. G. (2015). Antidiabetic Drugs: Mechanisms of Action and Potential Outcomes on Cellular Metabolism. *Current Pharmaceutical Design*, 21(25), 3606–3620.
- Montgomery, M. K., & Turner, N. (2014). Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. *Endocrine Connections*, 4(1), 1–15.
- Mueckler, M., & Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2–3), 121–138.
- Pernas, L., & Scorrano, L. (2016). Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annual Review of Physiology*, 78(1), 505–531.
- Roglic, G. (2014). Global report on diabetes. *World Health Organization*, 58(12), 1–88.

- Rovira-Llopis, S., Bañuls, C., Diaz-Morales, N., Hernandez-Mijares, A., Rocha, M., & Victor, V. M. (2017). Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications. *Redox Biology, 11*, 637–645.
- Sivitz, W. I., & Yorek, M. A. (2009). Mitochondrial Dysfunction in Diabetes: From Molecular Mechanisms to Functional Significance and Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling, 12*(4), 537–577.
- Świdarska, E., Strycharz, J., Wróblewski, A., Szemraj, J., Drzewoski, J., & Śliwińska, A. (2018). Role of PI3K/AKT Pathway in Insulin-Mediated Glucose Uptake. In *Glucose Transport*. [Online First], IntechOpen.
- Teodoro, J. S., Nunes, S., Rolo, A. P., Reis, F., & Palmeira, C. M. (2019). Therapeutic Options Targeting Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction and Inflammation to Hinder the Progression of Vascular Complications of Diabetes. *Frontiers in Physiology, 9*, 1857.
- Vakilian, M., Tahamtani, Y., & Ghaedi, K. (2019). A review on insulin trafficking and exocytosis. *Gene, 706*, 52–61.
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2016). *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level* (5th ed., pp. 442–801). John Wiley & Sons.
- Wada, J., & Nakatsuka, A. (2016). Mitochondrial Dynamics and Mitochondrial Dysfunction in Diabetes. *Acta Medica Okayama, 70*(3), 151–158.
- Wu, M.-Y., Yiang, G.-T., Lai, T.-T., & Li, C.-J. (2018). The Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction during the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018*, e-3420187.
- Yaribeygi, H., Atkin, S. L., & Sahebkar, A. (2019). Mitochondrial dysfunction in diabetes and the regulatory roles of antidiabetic agents on the mitochondrial function. *Journal of Cellular Physiology, 234*(6), 8402–8410.
- Yaribeygi, H., Farrokhi, F. R., Butler, A. E., & Sahebkar, A. (2019). Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *Journal of Cellular Physiology, 234*(6), 8152–8161.