



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Margarida Gonçalves Pargana

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Advanced Therapies in Type 1 Diabetes: Cell Reprogramming” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Fernanda Castelo, Dr. Bruno Carrilho e do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Margarida Gonçalves Pargana

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Advanced Therapies in Type I Diabetes: Cell Reprogramming” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Fernanda Castelo, Dr. Bruno Carrilho e do Professor Doutor Luís Pereira de Almeida e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2021

Eu, Margarida Gonçalves Pargana, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2016239096, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Advanced Therapies in Type I Diabetes: Cell Reprogramming” 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, 24 de setembro de 2021.

Margarida Gonçalves Pargana

(Margarida Gonçalves Pargana)

Agradecimentos

Com esta tese, culmina uma etapa de 5 anos que enriquecem o meu saber e me deixam de coração cheio. Agradeço a forma como Coimbra e a Faculdade de Farmácia me receberam, proporcionando-me anos repletos de conhecimento, desafio, conquista e alegria.

Agradeço, em primeiro lugar, ao Professor Doutor Luís Pereira de Almeida pelo apoio prestado enquanto orientador, o que me permitiu desenvolver este tema inovador e com enorme potencial, e também por toda a atenção e tempo que dedicou com esta monografia. Um agradecimento a todos os professores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por terem contribuído para a minha formação e futura carreira.

Agradeço aos orientadores de estágio, à Dra. Fernanda Castelo e ao Dr. Bruno Carrilho, bem como às equipas da Farmácia Fátima e dos Laboratórios Vitória. Foram sempre prestáveis comigo, ensinando-me as responsabilidades inerentes a cada uma destas profissões e assim, ajudando-me na escolha do que acredito ser a minha vocação profissional.

Do ponto de vista pessoal, não poderia deixar de agradecer à minha família. Em especial aos meus pais, por me proporcionarem a oportunidade de realizar este mestrado, aos meus avós, por serem incansáveis, à minha madrinha, pelo tempo que dedicou a rever a linguística desta tese, e ao meu namorado, que me apoia nos melhores e piores momentos.

Por fim, gostaria de agradecer à minha família de praxe, pois devo-lhes os melhores momentos que Coimbra me proporcionou. Levo comigo as memórias dos momentos festivos, dos jantares, serenatas e cortejos, mas também dos dias de estudo que partilhámos.

Muito fica por dizer, pois direta ou indiretamente muitos contribuíram para as decisões que me trouxeram aqui, ao final deste mestrado. Termino-o com uma sensação de alegria, dever cumprido e ambição, esperando chegar sempre tão longe quanto me for possível.

A todos os que por mim passaram e deixaram um pouco de si,
um imenso obrigada!

Índice

Parte I – Relatório do Estágio em Farmácia Comunitária

Abreviaturas	7
1. Introdução	8
2. Análise SWOT – Farmácia Fátima	9
2.1. Pontos Fortes.....	9
2.1.1. Adequação do curso à profissão.....	9
2.1.2. Integração da aprendizagem teórica.....	9
2.1.3. Número de horas de estágio.....	9
2.1.4. Equipa e proximidade com utentes.....	10
2.1.5. Preparação de medicação para os lares.....	10
2.1.6. Presença nas redes sociais.....	10
2.2. Pontos Fracos.....	10
2.2.1. Preparação de poucos manipulados.....	10
2.3. Oportunidades.....	11
2.3.1. Formações <i>online</i> e presenciais.....	11
2.3.2. Venda de suplementos alimentares.....	11
2.3.3. Instalação de máquina de preparação individual da medicação (TiMed®).....	11
2.3.4. Consultas de nutrição e dietética.....	11
2.4. Ameaças.....	12
2.4.1. Desvalorização do acompanhamento farmacêutico.....	12
2.4.2. Menos casos de indicação.....	12
2.4.3. Menos peregrinos e turistas.....	12
3. Casos Práticos	13
3.1. Revisão da Medicação numa doente idosa polimedicada.....	13
3.2. Seguimento Farmacêutico na Terapia da Fertilidade.....	15
3.3. Acompanhamento Farmacoterapêutico num Caso de Candidíase.....	17
Conclusão	18
Bibliografia	19
Anexo	22

Parte II – Relatório do Estágio em Indústria Farmacêutica

Abreviaturas	26
1. Introdução	27
2. Análise SWOT – Laboratórios Vitória	28
2.1. Pontos Fortes.....	28
2.1.1. Integração da aprendizagem teórica.....	28
2.1.2. Controlo de Qualidade por etapas.....	28
2.1.3. Análise de materiais de embalagem.....	29
2.1.4. Análise de matérias-primas.....	30
2.1.5. Análises microbiológicas.....	30
2.1.6. Verificação das balanças e dos aparelhos de ponto de fusão.....	31

2.1.7. Visita ao departamento de produção.....	32
2.1.8. Equipa diversa.....	33
2.2. Pontos Fracos.....	33
2.2.1. Número de horas de estágio.....	33
2.2.2. Adequação do curso.....	33
2.3. Oportunidades.....	34
2.3.1. Análise de produtos para vátios países e para terceiros.....	34
2.4. Ameaças.....	34
2.4.1. Reduzida percentagem de farmacêuticos na área.....	34
3. Casos Práticos.....	34
3.1. Importância da calibração da temperatura no aquecimento em banho.....	34
3.2. Fatores associados à variabilidade na determinação de pontos de fusão...	35
4. Conclusão.....	36
5. Bibliografia.....	37

Parte III – Monografia: “Advanced Therapies in Type I Diabetes: Cell Reprogramming”
--

Resumo.....	39
Abstract.....	41
Abbreviations.....	42
1. Introduction.....	43
2. Diabetes Mellitus Diagnosis.....	43
3. The Pancreas.....	46
3.1. Exocrine Pancreas Regeneration.....	48
3.2. Endocrine Pancreas Regeneration.....	49
3.3. The Beta Cell.....	49
3.3.1. Beta Cell Differentiation during the Pancreas Development.....	52
3.3.2. Beta Cells` unique set of Functions.....	53
3.3.3. Beta Cell Regeneration.....	54
4. Advanced Therapies in Type I Diabetes.....	56
4.1. How to produce Beta Cells.....	57
4.1.1. Differentiating pluripotent Stem Cells.....	57
4.1.2. Reprogramming Somatic Cells.....	60
4.2. Transplantation Sites.....	61
5. How to keep Cells Alive.....	62
5.1. Immunosuppressive Therapy.....	63
5.2. Inducing Immune Tolerance.....	63
5.3. Using Support Systems.....	64
6. Conclusion.....	66
7. References.....	67

Parte I

Relatório do Estágio em Farmácia Comunitária



farmácia fátima

Farmácia Fátima

Fernanda Isabel R. Salsa Castelo, Unipessoal Lda.

Orientadora: Dra. Fernanda Isabel Castelo

Abreviaturas

A	ARA	Antagonista dos recetores da angiotensina
D	DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crónica
E	ECA	Inibidor das enzimas de conversão da angiotensina
F	FSH	Hormona foliculoestimulante
G	GnRH	Hormona de libertação da gonadotrofina
H	Hb	Hemoglobina
I	ICC	insuficiência cardíaca crónica estável
L	LH	Hormona luteinizante
O	OTC	Produtos de venda livre (do inglês “ <i>over the counter</i> ”)
R	r-hCG	Gonadotropina coriónica humana recombinante
T	TRA	Técnica de reprodução medicamente assistida
	THS	Terapia hormonal de substituição

I. Introdução

A farmácia comunitária é a área do setor farmacêutico mais reconhecida pela sociedade. Esta é o primeiro recurso no qual a população se apoia, tendo o seu valor aumentado com a atual pandemia. A COVID-19 veio dificultar a marcação de consultas médicas, tornando o papel da farmácia comunitária ainda mais relevante. Ela é percebida por toda a população como um local acessível, que fornece conselhos de saúde e/ou trata patologias mais simples.

O farmacêutico comunitário promove a utilização racional do medicamento ao disponibilizar um atendimento personalizado e serviços que respondem às necessidades que surgem. Considero que este profissional de saúde tem de estar em constante aprendizagem, de modo a manter-se atualizado. Deve não só estar a par dos novos produtos, como também conhecer os sintomas indicativos de certas patologias e em que situações estas têm de ser vistas por um médico, bem como conhecer os efeitos adversos mais comuns dos medicamentos, as interações medicamentosas, etc. Alguns destes conhecimentos vão sendo transmitidos através de formações e de visitas por parte de representantes de diversas marcas. Ao estar atualizado, o farmacêutico consegue responder com maior confiança às inúmeras questões que surgem por parte dos utentes. Além das aptidões teóricas e científicas, são ainda necessárias qualidades interpessoais, visto que o que destaca uma farmácia é a proximidade criada entre o utente e o farmacêutico.

Sendo assim, faz todo o sentido que este estágio esteja incluído na finalização do plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, de modo a aplicar num ambiente real todos os conhecimentos teóricos que foram adquiridos. Neste âmbito, pude contactar com uma das saídas profissionais que recebe mais recém-licenciados em Ciências Farmacêuticas, pude aprender como é o seu funcionamento diário, com os seus respetivos desafios. Adicionalmente, procurei também eu partilhar ideias e materiais úteis neste contexto, que me foram dados ao longo destes 5 anos.

Comecei assim por estagiar na Farmácia Fátima entre os dias 13 de janeiro e 30 de abril. O estágio foi orientado pela Dra. Fernanda Isabel Castelo, diretora técnica da farmácia, e coorientado pelas Dra. Carla Teixeira e Dra. Rita Silva. Neste relatório, começo por explanar, na forma de uma análise SWOT, algumas atividades que desenvolvi ao longo do estágio e classifico toda a minha experiência em pontos positivos e pontos passíveis de serem melhorados. De seguida, apresento alguns casos práticos, que englobam situações de maior interesse que surgiram ao balcão durante o estágio. Procurei analisar as situações referidas e

ajudar a melhorar o outcome clínico, referindo ajustes potencialmente benéficos na terapêutica farmacológica, bem como medidas não farmacológicas.

2. Análise SWOT – Farmácia Fátima

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Adequação do curso à profissão

Ao longo do curso, foram várias as cadeiras que nos prepararam para a farmácia comunitária, começando pelas bases teóricas (farmacologias e farmacoterapia) e prosseguindo para um contexto mais prático (farmácia clínica e indicação farmacêutica). Como tal, o curso está seguramente adaptado a esta saída profissional, fornecendo aos alunos não só conhecimentos, mas também ferramentas a utilizar mais tarde. Deve denotar-se que, estando a área farmacêutica em constante evolução, cabe-nos enquanto futuros profissionais mantermo-nos atualizados após a conclusão do curso.

2.1.2. Integração da aprendizagem teórica

Durante o decurso do estágio, foi possível aplicar vários conhecimentos teóricos. No atendimento ao balcão, devemos analisar a medicação da receita e do histórico do utente. Devemos rapidamente verificar se não existe nenhuma interação medicamentosa ou algum efeito adverso sentido pelo utente, por exemplo. Além do mais, cabe-nos a nós indicar os produtos mais adequados nos casos de indicação farmacêutica, assim como fazer as perguntas certas e saber ouvir o utente, de modo que a terapêutica seja efetiva e segura.

2.1.3. Número de horas de estágio

Considerarei que o número de horas de estágio foi suficiente. Como já tinha tido uma experiência anterior nesta área, pude começar logo pelo atendimento ao balcão. Pude aprender aquela que considero a tarefa mais desafiante da farmácia comunitária por etapas: primeiro observei, depois atendi com supervisão e, por fim, comecei a atender sozinha, podendo sempre esclarecer qualquer dúvida que fosse surgindo. Desta forma, pude ganhar confiança no meu atendimento, sentindo-me apta para o fazer autonomamente. Pude também desenvolver outras tarefas descritas abaixo, o que me permitiu compreender o modo de organização da farmácia e aplicar vários conhecimentos.

2.1.4. Equipa e proximidade com utentes

A farmácia tem uma equipa simpática, conhecedora e estável, o que permite criar maior proximidade entre o utente e o farmacêutico, um fator que leva os utentes fidelizados a continuarem a optar por esta farmácia. A diferenciação é importante, considerando o reduzido número de habitantes por farmácia que existe em Fátima. Este relacionamento permite também conhecer melhor o utente e a sua condição de saúde, tornando o atendimento mais personalizado e enriquecedor, enquanto estudante de Ciências Farmacêuticas.

2.1.5. Preparação da medicação para os lares

Durante o meu percurso, pude também preparar os pedidos de medicação para os lares. Esta atividade permitiu-me familiarizar-me com o programa Sifarma[®], o que me ajudou muito, mais tarde, no atendimento ao balcão. Pude ainda aproveitar este momento mais pausado para aprender a interpretar a receita, tentando compreender em cada utente quais as patologias a tratar e a ausência/presença de interações.

2.1.6. Presença nas redes sociais

O impacto da tecnologia tem vindo a aumentar e a pandemia tornou a comunicação à distância um ponto fulcral para a subsistência das farmácias. A presença nas redes sociais, através da publicação de campanhas e das vendas *online* com entrega ao domicílio, permite chamar novos utentes e manter os utentes já fidelizados informados. Ao longo do estágio, realizaram-se várias campanhas promocionais com conselheiras *online* que, através de uma videochamada, aconselharam os produtos mais adequados da sua marca.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Preparação de poucos manipulados

Visto que na Farmácia Fátima não seria rentável produzir os manipulados complexos e diversos que são por vezes requisitados, optou-se por os encomendar a terceiros quando estes são pedidos. Isto fez com que raramente tivesse a oportunidade de preparar manipulados, área de atuação que considero relevante e de destaque nas farmácias.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Formações *online* e presenciais

Com o aparecimento constante de novos produtos, podendo estes ser cosméticos, produtos de venda livre ("*over the counter*" ou OTCs) ou medicamentos, o farmacêutico tem de se manter em constante atualização. Para isso, existem formações dadas pelos laboratórios e marcas, tanto presenciais como *online*. Graças a elas, torna-se possível dar o melhor aconselhamento ao utente, conhecendo as várias alternativas existentes e qual a mais adequada consoante o caso. Ao longo dos 4 meses de estágio, tive a oportunidade de assistir a algumas formações, que considerei muito uteis para a minha formação.

2.3.2. Venda de suplementos alimentares

Existe na farmácia uma ampla gama de suplementos alimentares, que permitem aos farmacêuticos aconselhar um produto natural numa situação menos grave. Atuando preventivamente com suplementos e medidas não farmacológicas, é possível, por vezes, reverter o estado patológico antes de ser necessário recorrer à medicação. Ao longo do estágio, pude observar o aconselhamento de suplementos alimentares e, mais tarde, fazê-lo eu mesma, aplicando o que aprendi na faculdade, bem como no estágio.

2.3.3. Instalação de máquina de preparação individual da medicação (TiMed[®])

Recentemente foi instalada, na Farmácia Fátima, uma máquina que embala a medicação por dias e horas da marca TiMed[®]. A preparação individual da medicação destina-se a ser utilizada para ajudar qualquer utente polimedicado, tendo como maior vantagem a redução nos erros de medicação. Esta instalação veio responder a uma necessidade apresentada por parte dos lares, no entanto, é também um serviço feito aos utentes da farmácia que assim o desejem. Desta forma, foi-me possível observar o funcionamento deste equipamento, o que poderá vir a ser útil no meu percurso profissional.

2.3.4. Consultas de nutrição e dietética

Na Farmácia Fátima, existe um serviço de nutrição, com a realização de consultas de nutrição semanalmente. A visita da nutricionista da "Bom Plano" permite realizar planos alimentares (perda/ganho de peso, vegetarianismo, entre outras) e, se adequado, aconselhar produtos de emagrecimento. Antes de aconselhar quaisquer produtos, a nutricionista faz um questionário de modo a conhecer os problemas de saúde, a medicação e a alimentação do utente. Só assim se consegue garantir não só que estes produtos são seguros, mas também

que irão ajudar na perda de peso, quando a dieta é cumprida e há prática regular de exercício físico.

2.4. Ameaças

2.4.1. Desvalorização do acompanhamento farmacêutico

A consulta farmacêutica é recente e a maioria do público em geral ainda a desconhece. Existem poucas farmácias a realizar este tipo de serviço em Portugal, visto que a população ainda não está recetiva a pagar por um serviço farmacêutico, até agora sempre gratuito. Acho importante existir um maior esclarecimento da sociedade, no sentido de informar quais os objetivos e a importância da consulta farmacêutica, de modo que esta venha a ser mais aceite no futuro. Acredito que este ponto poderá tornar-se numa oportunidade, não só será uma ação que diferencia as farmácias, mas também irá contribuir para a maior valorização da função do farmacêutico.

2.4.2. Menos casos de indicação farmacêutica

Devido à pandemia, os problemas mais comuns tratados através da indicação farmacêutica foram quase inexistentes. Patologias, como a constipação, a gripe e a pediculose, estão claramente associadas ao contacto nas escolas e nos locais de trabalho. Assim, é de esperar que, com o teletrabalho e a telescola, a venda deste tipo de OTCs tenha diminuído. Infelizmente, isto veio dificultar a aplicação, no contexto real, de alguns conhecimentos adquiridos ao longo do curso.

2.4.3. Menos peregrinos e turistas

Sendo Fátima uma cidade turística, a pandemia veio afetar o comércio da cidade e o mesmo se verifica na farmácia que, em anos anteriores, era visitada por muitos turistas e peregrinos. Isto veio reduzir o número de clientes e de vendas, bem como a variedade de casos a dar resposta no atendimento ao balcão. Deste modo, nos primeiros meses, não pude observar atendimentos diversos. Deve ainda considerar-se que a crise económica causada pela pandemia leva alguns utentes a passarem a comprar apenas bens essenciais. Visto que as compras diretas aos laboratórios são realizadas anualmente, tornou-se mais difícil prever as quantidades necessárias para o ano seguinte. Esta imprevisibilidade causou acumulação de stock, por exemplo, nos protetores solares.

3. Casos Práticos

3.1. Revisão da Medicação numa doente idosa polimedicada

A senhora MV dirige-se à farmácia para levantar uma receita com a medicação habitual. Em conversa com a farmacêutica, a utente de 72 anos demonstra alguma dificuldade em compreender a sua medicação. No sentido de auxiliar na compreensão, melhorando assim a adesão à terapêutica, a farmacêutica decidiu proceder à revisão da medicação da utente.

Segundo a “*Guidelines for pharmacists performing clinical interventions*”, elaborada pela “*Pharmaceutical Society of Australia*”, esta intervenção classifica-se simultaneamente como C (“*compliance*”) e E (“*education or information*”). Sendo assim, com esta intervenção temos como objetivo corrigir problemas de adesão e promover a educação da utente relativamente às suas patologias e medicação²⁸.

História Clínica:

- Hipertensão desde 2015 (“há 5 ou 6 anos”);
- Patologia cardíaca (desconhecida pela utente), sendo seguida pelo cardiologista;
- Glaucoma desde 2010 (“há mais ou menos 10 anos”);
- Dor associada a câibras nos braços;
- Dificuldade respiratória, não identificada pela utente (“há algum tempo”), possivelmente asma brônquica;
- Rinite alérgica, não referida pela utente;
- Operada às cataratas;
- Alérgica ao medicamento Dolocalm[®], foi internada de urgência em 2020 por ter tomado esta medicação.

Hábitos de vida:

- Reformada, dá passeios a pé;
- Pesa cerca de 80 Kg, sendo que perdeu 4 Kg recentemente.

Perfil farmacoterapêutico (consultado no registo de vendas da farmácia):

- Valsartan 80 mg comprimidos (comp.) (I.0.0): toma há pouco tempo, costumava tomar ramipril, não sabe porque motivo houve esta alteração; sendo o ramipril um inibidor das enzimas de conversão da angiotensina (ECA), este pode ter causado tosse seca, um efeito adverso comum neste grupo farmacológico; em alternativa aos ECA, prescreve-se frequentemente um antagonista dos recetores da angiotensina (ARA)²⁵.

- Concor IC[®] (bisoprolol) 2,5 mg comp. (1.0.0): toma há algum tempo; este está indicado no tratamento da insuficiência cardíaca crónica estável (ICC), em associação com um ECA e um diurético; tendo a utente uma dificuldade respiratória a dose inicial deve ser o mais baixa possível e o seu uso deve ser constantemente monitorizado¹⁵.
- Ganfort[®] (bimatropost + timolol) 0,3/5 mg/mL colírio (1 id. ao deitar): estes fármacos reduzem a pressão intraocular atuando por dois mecanismos de ação complementares, estando indicados no tratamento do glaucoma; o bimatropost aumenta a drenagem do humor aquoso e o timolol reduz a produção de humor aquoso⁴.
- Seretaid Diskus[®] (salmeterol + propionato de fluticasona) 50/250 mcg/dose inalador (1 id.): toma apenas 1 vez por dia, no entanto, o médico prescreveu o inalador 2 vezes por dia; a utente diz não sentir pieira nem ter sofrido crises recentemente, refere apenas falta de ar; este fármaco tem um agonista beta2 de longa duração de ação (salmeterol) e um corticosteróide (fluticasona), que atua como anti-inflamatório glucocorticóide; os dois fármacos potenciam a ação um do outro: o glucocorticóide aumenta o número de recetores para que os agonistas beta2 atuem e, por sua vez, estes agonistas aumentam a translocação de recetores glucocorticóides ao núcleo³; esta associação está indicada no tratamento regular da asma e no tratamento sintomático da doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC)²³.
- Cetirizina 10 mg comp. rev. (1 id.): anti-histamínico seletivo dos recetores H1 periféricos, indicado no alívio sintomático da rinite alérgica; na dose recomendada pode causar apenas efeitos adversos menores; apesar de ser seletivo, pode ainda causar, com frequência rara, atividade anticolinérgica¹³.
- Fluimucil[®] (acetilcisteína) 600 mg comp. efervescentes: toma quando tem tosse; é um aminoácido sulfurado que atua como adjuvante mucolítico, utilizado nas infeções respiratórias em que existe hipersecreção brônquica; a dose máxima diária recomendada é de 600 mg¹⁹.
- Ben-U-Ron[®] (paracetamol) 1000 mg comp.: toma para as dores na anca, refere que estas melhoraram recentemente e que poderá ser por ter perdido peso; este analgésico e antipirético está indicado no tratamento da febre, com duração inferior a 3 dias, e na dor ligeira a moderada; a dose máxima diária recomendada é de 4000 mg; sendo metabolizado pelo fígado, doses excessivas podem causar toxicidade hepática: os doentes devem ser advertidos visto que este fármaco é muitas vezes percecionado como sendo inócuo¹².

- Pregabalina 75 mg cápsula: deixou de tomar há 2 meses por iniciativa própria, não justificou o motivo da suspensão da terapêutica quando questionada; este medicamento está indicado no tratamento da dor neuropática e na perturbação de ansiedade generalizada ²².
- Tramadol + Paracetamol 37,5/325 mg comprimidos revestidos (comp. rev.): deixou de tomar há cerca de 1 ano, por indicação do cardiologista; este medicamento deve ser utilizado durante o menor tempo possível e apenas se for estritamente necessário; tem um efeito analgésico e antitússico; os efeitos adversos mais comuns são as tonturas, a sonolência e as náuseas; tal como com os opióides, surgem sintomas de abstinência, sendo recomendado um desmame antes de interromper uma terapêutica prolongada²⁴.
- Edarclor[®] (azilsartan + clorotalidona) 40/12,5 mg comp. rev.: deixou de tomar há cerca de 1 ano também; esta associação está indicada para o tratamento da hipertensão, quando a monoterapia com azilsartan não é eficaz; não é recomendado em doentes com compromisso renal grave e o uso concomitante de ECAs, ARAs ou aliscereno aumenta o risco de hipotensão¹⁸.

Após realizar a recolha dos dados, foi feita uma revisão da medicação seguindo a metodologia dos 7 passos (Tabela 1, em Anexo)¹¹.

Após realizada a análise dos 7 passos, concluiu-se que as intervenções a realizar seriam as seguintes:

- Educar a utente quanto ao risco de uso da carbocisteína e referir o Grintuss[®] enquanto alternativa mais segura¹⁰.
- Procurar saber junto do médico cardiologista se a utente deve ou não continuar a terapêutica com pregabalina, tendo em conta que continua a queixar-se de câibras e dores no pulso e no braço.
- Advertir o médico de que a utente deve monitorizar o potássio recorrentemente, de modo a evitar que ocorra uma hipernatremia ou uma hiponatremia.

3.2. Seguimento Farmacêutico na terapia de fertilidade

A medicação que é dada para aumentar a fertilidade feminina consiste em hormonas administradas por via injetável. Existem diferentes formulações que devem ser administradas consoante o caso e na dose adequada à paciente. O Menopur[®] consiste em menotropina, com atividade da hormona foliculoestimulante (FSH) e também da hormona luteinizante (LH). Estas duas hormonas induzem o crescimento e o desenvolvimento dos folículos no ovário, sendo

utilizada em mulheres com anovulação, ou que serão submetidas a uma técnica de reprodução medicamente assistida (TRA)²¹. O Puregon[®] pode ser utilizado concomitantemente com o Menopur[®] e contém apenas FSH recombinante. Estas hormonas recombinantes mimetizam o pico hormonal que antecede a ovulação no ciclo menstrual feminino, podendo levar à libertação de mais do que um óvulo⁸.

Além destas formulações, existe também o Orgalutran[®], contendo ganirelix, um potente antagonista da hormona de libertação da gonadotrofina (GnRH). Este antagonista liga-se reversivelmente aos recetores da hipófise, prevenindo o pico prematuro da LH, em mulheres submetidas a TRA⁶. Por último, utiliza-se o Ovitrelle[®], que tem a gonadotropina coriónica humana recombinante (r-hCG). Atua como substituto do pico de LH, induzindo a maturação final dos folículos, bem como a sua rutura (ovulação), e antecipando a luteinização⁷.

Estando a farmácia localizada na proximidade de uma clínica em que exerce um médico especialista na área da fertilidade, surgem ao balcão casos de mulheres com problemas de fertilidade. Estas formulações exigem uma preparação antes da sua administração, sendo esta preparação complexa. Assim, é crucial que a sua utilização seja explicada à utente, de modo a existir uma correta adesão à terapêutica. Neste sentido, redigi documentos explanatórios do modo de preparação e administração destes injetáveis, baseados no folheto informativo. Esta medicação é injetável, o que torna a sua adesão mais difícil. Além disso, pode ser necessária uma preparação pela utente, que contém bastantes passos, não sendo um procedimento intuitivo para quem nunca administrou este tipo de medicação. Sendo o folheto informativo muito extenso, este documento dado à utente, com a devida explicação no momento da dispensa, torna mais fácil a sua compreensão e posterior utilização^{5,6,7,8,21}.

Além de fornecer o documento e explicar o procedimento com o medicamento no balcão, foi feito um acompanhamento por contacto telefónico. Após 2 dias, contactei uma das utentes, perguntando-lhe se tinha tido alguma dificuldade na preparação e/ou na administração, e procurando dar alternativas. Como exemplo, uma das utentes a utilizar Menopur[®] e Puregon[®], regressou à farmácia para adquirir o Orgalutran[®], bem como o Puregon[®] numa concentração mais reduzida. Após questionar se tudo estava a correr bem, a mesma queixou-se que tinha de levar mais uma injeção e que já tinha nódoas negras no abdómen. Numa tentativa de melhorar esta situação, indiquei-lhe que passasse a administrar o Menopur[®] na coxa, em alternativa ao abdómen.

3.3. Acompanhamento Farmacoterapêutico num caso de candidíase

A senhora CT, de 47 anos, dirige-se à farmácia solicitando que fosse dispensada uma receita contendo Clavamox DT[®] (12 em 12 horas durante 8 dias), Ibuprofeno 600 mg (12 em 12 horas durante 5 dias) e Clonix[®] 300 mg (SOS), com as posologias prescritas entre parênteses. Após questionar o motivo da receita, esta referiu ter feito uma extração dentária.

O Clavamox DT[®] contém 875 mg de amoxicilina, uma penicilina (β -lactâmico), e 125 mg de ácido clavulânico, um inibidor das enzimas β -lactamases, comuns em microorganismos resistentes aos antibióticos. As duas moléculas têm mecanismos de ação que causam uma interação de sinergismo, sendo que o ácido clavulânico isoladamente não tem propriedades antibióticas¹⁴. O Ibuprofeno é um anti-inflamatório não-esteróide (AINE) que nesta concentração atua como analgésico, antipirético e anti-inflamatório. Para uma dor ligeira a moderada a posologia de 400 a 600 mg com uma frequência de 3 vezes por dia é o suficiente. A dose total diária administrada neste caso é de 1200 mg por dia, o que está longe de ultrapassar as 2400 mg, que é a dose máxima diária recomendada²⁰. O Clonix[®] contém 300 mg de clonixina, um AINE com potente ação analgésica².

A utente não tem patologias nem alergias, nomeadamente não tem alergias à penicilina, nem aos derivados da mesma. Toma apenas Dermestril[®] 50 mcg/dia (adesivo substituído 1 vez por semana), trocando o adesivo com a frequência correta e aplicando-o corretamente. Este transdérmico é utilizado como terapia hormonal de substituição (THS). Compensa a redução da produção de estrogénios, previne a osteoporose e reduz o risco de fraturas¹⁷.

Passados 5 dias, a mesma utente regressou à farmácia, com queixas de lábios vermelhos, “boqueiras” (lábios gretados) e muita sensibilidade na mucosa oral. Estes sintomas são característicos de uma candidíase bucofaríngea, um efeito adverso frequente do Clavamox DT[®], que em uso prolongado tem como advertência o crescimento acentuado de microorganismos não suscetíveis. Este antibiótico atua apenas contra bactérias, eliminando tanto as patogénicas como as da nossa flora, para evitar uma infeção bacteriológica. Em contrapartida, ao eliminarmos as bactérias, podemos vir a permitir que os fungos cresçam e causem infeção. Neste caso, a *Candida albicans* causou uma candidíase bucofaríngea³⁰.

Tendo em conta estes sintomas, foi feita uma indicação farmacêutica e cedeu-se o Daktarin[®] gel (1 colher 4 vezes por dia, devendo a sua administração ser prolongada por uma semana após desaparecimento dos sintomas) e o Zir-fos[®]. O Daktarin[®] gel contém 20 mg de miconazol por grama de gel. O miconazol é um antifúngico que atua inibindo a biossíntese do ergosterol e alterando a composição lipídica da membrana dos fungos¹⁶. O Zir-fos[®] é um

simbiótico associado a vitaminas do complexo B. Este contém como probiótico o *Bifidobacterium longum* BB536 e como prebiótico os frutooligossacarídeos (FOS). Os FOS são um hidrato de carbono não digerível, que estimula o crescimento e a atividade dos probióticos referidos. Este simbiótico vai ajudar a restabelecer a flora bacteriana, de modo que esta seja mais saudável e variada. Uma flora equilibrada reduz a probabilidade de surgir uma infeção, como vimos neste caso^{1,30}. A situação referida ficou controlada ao fim de 2 dias, com uma melhoria significativa dos sintomas.

Este caso prático foi analisado seguindo a metodologia do acompanhamento farmacoterapêutico (Tabela 2, em Anexo). Esta metodologia passa por uma primeira fase em que o farmacêutico reúne a informação dada pelo utente e avalia a efetividade e a segurança da terapêutica. Após esta análise, o farmacêutico procura uma solução e caso esta não seja simples, deve sugerir as intervenções a realizar ao médico.

Conclusão

Ao longo do estágio em farmácia comunitária na Farmácia Fátima, pude aprender todos os dias e criar laços de amizade com as funcionárias da farmácia, que me acolheram e prepararam para a função de farmacêutica comunitária. Acompanharam-me ao longo dos 4 meses e mostraram-me todo o potencial da área comunitária. As formações que realizei foram para mim do maior valor, pois permitiram-me compreender melhor as funções dos OTC e dos cosméticos, e saber como ajudar da melhor forma os utentes.

Agradeço a toda a equipa o tempo e a paciência disponibilizados, pois graças a eles sinto-me confiante para um dia começar a minha carreira, que poderá vir a ser na farmácia comunitária. Motivaram-me a saber mais, deram-me muitos conselhos e auxiliaram-me na realização deste mesmo relatório.

Bibliografia

1. Amenta M, Cascio MT, Di Fiore P, Venturini I. Diet and chronic constipation. Benefits of oral supplementation with symbiotic zir fos (Bifidobacterium longum WII + FOS Actilight). *Acta Biomed.* 2006 Dec;77(3):157-62. PMID: 17312986.
2. Bustamante D, Miranda HF, Pelissier T, Paeile C. Analgesic action of clonixin, nifedipine and morphine using the formalin test. *Gen Pharmacol.* 1989;20(3):319-22. doi: 10.1016/0306-3623(89)90266-8. PMID: 2744398.
3. CAZZOLA, M.; HANANIA, N. A. - The role of combination therapy with corticosteroids and long-acting β_2 . *1:4* (2006) 1–10.
4. EMA - Anexo I - **Resumo das Características do Medicamento - Ganfort.** (2006) [Acedido a 24 de março de 2021]. Disponível na internet: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ganfort-epar-product-information_pt.pdf
5. EMA - Anexo I - **Resumo das Características do Medicamento - Gonal.** (2010) [Acedido a 23 de março de 2021]. Disponível na internet: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/gonal-f-epar-product-information_pt.pdf
6. EMA - Anexo I - **Resumo das Características do Medicamento - Orgalutran.** (2010) [Acedido a 23 de março de 2021]. Disponível na internet: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/orgalutran-epar-product-information_pt.pdf
7. EMA - Anexo I - **Resumo das Características do Medicamento - Ovitrelle.** (2006) [Acedido a 23 de março de 2021]. Disponível na internet: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ovitrelle-epar-product-information_pt.pdf
8. EMA - Anexo I - **Resumo das Características do Medicamento - Puregon.** (2006) [Acedido a 23 de março de 2021]. Disponível na internet: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/puregon-epar-product-information_pt.pdf
9. FICK, Donna M. *et al.* - American Geriatrics Society 2019 Updated AGS Beers Criteria® for Potentially Inappropriate Medication Use in Older Adults. **Journal of the American Geriatrics Society.** . ISSN 15325415. 67:4 (2019) 674–694. doi: 10.1111/jgs.15767.
10. **Grintuss®** [2021 © ABOCA P.I. 01704430519] [Acedido a 27 de março de 2021]. Disponível na internet: <https://www.grintuss.pt/grintuss/grintuss-adult-xarope/>.
11. HURDING, Simon *et al.* - (Polypharmacy Guidance. 2015) 65.
12. INFARMED - **Resumo das características do Medicamento: Ben-u-ron.** (2020).

[Acedido a 24 de março de 2021]. Disponível na internet: <http://www.benefarmaceutica.pt/ben-u-ron-l-g-comprimidos/>

13. INFARMED - **Resumo das características do Medicamento: Cetirizina.** (2018). [Acedido a 24 de março de 2021]. Disponível na internet: https://www.jaba-recordati.pt/uploads/ficheiros_produtos/rcm-cetirizina-comprimidos-01-2018.pdf

14. INFARMED - **Resumo das características do Medicamento: Clavamox DT.** (2018). [Acedido a 22 de março de 2021]. Disponível na internet: <https://bial.com/media/2750/clavamox-dt.pdf>

15. INFARMED - **Resumo das características do Medicamento: Concor IC.** (2020). [Acedido a 24 de março de 2021]. Disponível na internet: <https://medikamio.com/pt-pt/medicamentos/concor-ic/pil>

16. INFARMED - **Resumo das características do Medicamento: Daktarin.** (2016). [Acedido a 22 de março de 2021]. Disponível na internet: <https://farmacia24.eu/content/MNSRM/2688885.pdf>

17. INFARMED - **Resumo das características do Medicamento: Dermestril.** (2020). [Acedido a 22 de março de 2021]. Disponível na internet: <https://docplayer.com.br/24702085-Resumo-das-caracteristicas-do-medicamento.html>

18. INFARMED - **Resumo das características do Medicamento: Edarclor.** (2015). [Acedido a 24 de março de 2021]. Disponível na internet: <https://myhealthbox.eu/pt/view/1866366/9bdeaffb6b14f8df8be2638dbc22816/leaflet>

19. INFARMED - **Resumo das características do Medicamento: Fluimucil.** (2006). [Acedido a 24 de março de 2021]. Disponível na internet: http://www.farmaciadocanico.pt/fotos/produtos/fluimucil_4_sol_oral_1314798073.pdf

20. INFARMED - **Resumo das características do Medicamento: Ibuprofeno.** (2008). [Acedido a 22 de março de 2021]. Disponível na internet: [https://www.grupoazevedos.com/content/files/Ibuprofeno_AZ_600mg_\(aprov_04-13\).pdf](https://www.grupoazevedos.com/content/files/Ibuprofeno_AZ_600mg_(aprov_04-13).pdf)

21. INFARMED - **Resumo das características do Medicamento: Menopur.** (2019). [Acedido a 22 de março de 2021]. Disponível na internet: <https://medikamio.com/pt-pt/medicamentos/menopur/pil>

22. INFARMED - **Resumo das características do Medicamento: Pregabalina.** (2017).

[Acedido a 24 de março de 2021]. Disponível na internet: https://www.jaba-recordati.pt/uploads/ficheiros_produtos/RCM-Pregabalina-75-mg-tratamento-de-epilepsia-dor-neuropatica-e-ansiedade-aprovado-17.07.2017.pdf

23. INFARMED - **Resumo das características do Medicamento: Seretaide Diskus**. (2018). [Acedido a 24 de março de 2021]. Disponível na internet: https://gskpro.com/content/dam/global/hcpportal/pt_PT/PDF/seretaide_diskus_rcm_ws191_05_2018.pdf

24. INFARMED - **Resumo das características do Medicamento: Tramadol + Paracetamol**. (2013). [Acedido a 24 de março de 2021]. Disponível na internet: http://newsletter.bluepharma.net/_repository/files/rcm/5490867.pdf

25. INFARMED - **Resumo das características do Medicamento: Diovan**. (2013). [Acedido a 24 de março de 2021]. Disponível na internet: <https://medikamio.com/pt-pt/medicamentos/diovan/pil>

26. PAZAN, Farhad; WEISS, Christel; WEHLING, Martin - The EURO-FORTA (Fit FOR The Aged) List: International Consensus Validation of a Clinical Tool for Improved Drug Treatment in Older People. **Drugs and Aging**. . ISSN 11791969. 35:1 (2018) 61–71. doi: 10.1007/s40266-017-0514-2.

27. PERAZELLA, Mark A. - Drug-induced hyperkalemia: Old culprits and new offenders. **American Journal of Medicine**. . ISSN 00029343. 109:4 (2000) 307–314. doi: 10.1016/S0002-9343(00)00496-4.

28. PHARMACEUTICAL SOCIETY OF AUSTRALIA - **Guidelines for pharmacists performing clinical interventions**. ISBN 9780908185146.

29. RENOM-GUITERAS, Anna; MEYER, Gabriele; THÜRMAN, Petra A. - The EU(7)-PIM list: A list of potentially inappropriate medications for older people consented by experts from seven European countries. **European Journal of Clinical Pharmacology**. . ISSN 14321041. 71:7 (2015) 861–875. doi: 10.1007/s00228-015-1860-9.

30. SHENOY, Adele; GOTTLIEB, Alice - Probiotics for oral and vulvovaginal candidiasis: A review. **Dermatologic Therapy**. . ISSN 15298019. 32:4 (2019) 1–13. doi: 10.1111/dth.12970.

31. TELES, Miguel Oliva; FONSECA, Margarida R. - Simplificação Terapêutica em Idosos Internados numa Enfermaria de Medicina Interna: Aplicação dos Critérios STOPP/START. **Medicina interna**. . ISSN 0025-7869. 27:2 (2020) 37–46. doi: 10.24950/O/290/19/2/2020.

Anexo

Tabela I – Revisão da Medicação, seguindo a metodologia dos 7 passos¹¹.

1) Objetivos	<ul style="list-style-type: none"> • Controlo da dificuldade respiratória. • Controlo do glaucoma. • Controlo da hipertensão. • Controlo da patologia cardíaca. • Controlo da dor. • Controlo sintomático da rinite alérgica. 	
Necessidade	2) Fármacos essenciais	<ul style="list-style-type: none"> • Salmeterol + propionato de fluticasona para a dificuldade respiratória. • Bimatropost + timolol para o glaucoma. • Valsartan para a hipertensão. • Bisoprolol para a patologia cardíaca. • Pregabalina para o controlo da dor. • Cetirizina para a rinite alérgica.
	3) Fármacos desnecessários	<ul style="list-style-type: none"> • Acetilcisteína: contraindicada na asma. • Controlo da dor: paracetamol poderia não ser necessário se a utente não tivesse interrompido a pregabalina.
4) Efetividade	<ul style="list-style-type: none"> • A utente não se queixa de dificuldade respiratória, refere apenas tosse, que também pode estar relacionada com a rinite alérgica, o que significaria que a cetirizina não estava a ser eficaz. • Deixou de tomar a pregabalina e refere sentir câibras nas mãos e nas pernas, bem como dores na anca; a necessidade da pregabalina deveria ser revista com o médico. 	
5) Segurança	Interações	<ul style="list-style-type: none"> • Bisoprolol e inalador: embora o bisoprolol seja cardiosseletivo, pode induzir alguma broncoconstrição, com risco aumentado de broncoespasmo. • Bisoprolol e asma: este fármaco pode causar um broncoespasmo e consequentemente uma crise asmática. • Acetilcisteína e asma: os asmáticos são referidos nas advertências deste fármaco, visto que ele aumenta o volume das secreções pulmonares, podendo haver dificuldade por parte destes doentes em expulsar as mesmas; há risco aumentado de broncoespasmo.
	Critérios Beers PIM list	Nenhum dos fármacos identificados é desaconselhado por ambos os critérios, no caso clínico apresentado ^{9,29} .
	Critérios STOPP/START	Não existe informação suficiente, poderão aplicar-se alguns critérios START como os A4 (precisaríamos de saber se o valor da tensão costuma estar acima dos 160 mmHg e/ou 40 mmHg, para a sistólica e diastólica, respetivamente), A6/7 (precisaríamos de conhecer a patologia cardíaca) e E3/4/5 (precisávamos de ter os dados de uma densiometria óssea) ³¹ .
	Critérios EURO-FORTA	<ul style="list-style-type: none"> • Classificação A*¹: paracetamol, bisoprolol. • Classificação C*²: acetilcisteína, pregabalina²⁶.

	Monitorização	<ul style="list-style-type: none"> • Tendo a doente uma dificuldade respiratória o uso de bisoprolol deve ser constantemente monitorizado, especialmente no início do tratamento, ao titular a dose ou ao suspender a terapêutica. • O valsartan, o timolol e o bisoprolol aumentam os valores séricos do potássio, enquanto o salmeterol os pode diminuir; recomenda-se a monitorização dos valores séricos de potássio por estes motivos²⁷.
	6) Custo - efetividade	Esta avaliação aplica-se mais à farmácia hospitalar. Nenhuma medicação identificada deveria ser substituída por ser desnecessariamente dispendiosa.
	7) Adesão	Deixou de tomar a pregabalina por receio dos efeitos adversos e devido à indicação do cardiologista de “usar apenas paracetamol quando tem dores”.

*1: medicação indispensável, com uma relação benefício-risco claramente favorável nos idosos.

*2: relação benefício-risco questionável nos idosos, medicação a evitar quando o doente toma muita medicação, quando há ausência de benefício ou quando se verifica um aumento dos efeitos adversos; devem explorar-se alternativas (ex.: substituir a acetilcisteína por um mucolítico natural, como o Grintuss[®], que contém mel e extratos de plantas ricas em polissacáridos, compostos naturais que vão criar uma barreira protetora sobre a mucosa respiratória, impedindo a ativação de recetores por agentes irritantes¹⁰).

Tabela 2 – Acompanhamento Farmacoterapêutico do Caso Prático 3 relativo a uma candidíase bucofaríngea, causada pelo uso prolongado de um antibiótico (amoxicilina e ácido clavulâmico).

Mulher, 47 anos						
Condição		Tratamento		E*	S*	
Aprox 15/01/2020	Terapêutica hormonal de substituição	Derместril® 50 mcg/dia	Troca o adesivo 1 vez por semana	S	S	
14/01/2021	Prevenção da infecção	Clavamox DT® 875+125 mg	12 em 12 horas Durante 8 dias	S	N	Inseguro por (a).
14/01/2021	Tratamento da dor	Clonix® 300 mg	SOS	S	S	
		Ibuprofeno 600 mg	12 em 12 horas Durante 5 dias	S	S	
19/01/2021	Candidíase Bucofaríngea (a)	Daktarin® gel 20 mg	1 colher 4 vezes por dia Durante 5 dias	S	S	
		Zir-Fos® 3 g	1 saqueta por dia Durante 30 dias	S	S	

Legenda: E* – Efetivo; S* – Seguro; S – Sim; N – Não

Parte II

Relatório do Estágio em Indústria Farmacêutica



Laboratórios Vitória

LABORATÓRIOS VITÓRIA S.A.

Orientador: Dr. Bruno Carrilho

Abreviaturas

C	CQ	Controlo de Qualidade
F	FI	Folheto informativo
I	IPC	Controlo em Processo, do inglês “ <i>In Process Control</i> ”
M	ME	Material de embalagem
	MP	Matéria-prima
P	PF	Produto final
	PG	Produto a granel
	PVC	Policloreto de vinilo
R	RF	Fator de retenção, do inglês “ <i>Retention Factor</i> ”
T	TLC	Cromatografia de camada fina, do inglês “ <i>Thin Layer Chromatography</i> ”

I. Introdução

O mestre em Ciências Farmacêuticas fica habilitado a exercer funções em diversas áreas: indústria farmacêutica, química e alimentar, farmácia hospitalar, análises clínicas, assuntos regulamentares, etc. Findado o meu estágio em farmácia comunitária, optei por conhecer melhor uma área de grande interesse meu, a indústria farmacêutica. Estagiei nos Laboratórios Vitória, S.A., na Amadora, que pertencem ao Grupo FAES FARMA, sediado em Espanha.

O estágio decorreu durante cerca de 3 meses, de 3 de maio a 20 de julho, no Departamento de Controlo de Qualidade (CQ), tendo ainda visitado o setor de produção. Nesta indústria, são sintetizadas soluções orais e injetáveis de pequeno volume, supositórios, óvulos, pomadas, géis e cremes.

Pude acompanhar o trabalho dos analistas, rever e validar folhas de cálculo, entre outras atividades. Considerei muito gratificante ter-me sido dada a função de realizar a verificação das balanças e dos aparelhos que determinam os pontos de fusão. Ao longo destes meses, procurei aplicar os conhecimentos teóricos da minha formação e aprofundar as minhas aptidões técnico-científicas.

O estágio foi orientado pelo Dr. Bruno Carrilho, revisor técnico do CQ e ex-aluno da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Este relatório de estágio está estruturado na forma de uma análise SWOT, na qual evidencio pontos fortes, fracos, oportunidades e ameaças, relacionados com o curso e com a minha experiência ao longo do estágio. De seguida, apresento dois casos práticos, que abordam a resolução de não conformidades, através da procura do erro na execução.

Este relatório terminará com uma reflexão sobre esta experiência, que foi para mim extremamente enriquecedora, pois pude compreender como é trabalhar nesta área da indústria farmacêutica. Acredito que só experimentando várias áreas profissionais podemos estar preparados para a escolha de uma carreira farmacêutica, e estou grata por ao longo do curso ter conseguido fazer isso mesmo. Na minha opinião, o conhecimento teórico prepara-nos para o prático, mas não é suficiente por si só, e não nos permite perceber qual é a nossa vocação.

2. Análise SWOT – Laboratórios Vitória

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Integração da aprendizagem teórica

Neste estágio no CQ, pude aplicar conhecimentos teóricos de algumas cadeiras relacionadas com a indústria farmacêutica (tecnologia farmacêutica, métodos instrumentais de análise, microbiologia, dentro de outros). Nesta área, existe uma grande diversidade de produtos a analisar e de técnicas a executar. Alguns exemplos de ensaios que executei foram: a gramagem de cartonagens, de folhetos informativos (FI) e de películas de policloreto de vinilo (PVC), o poder rotatório específico para identificação individual de MPs, o desenvolvimento de placas de cromatografia de camada fina (TLC) para identificar determinadas MPs, etc. Senti-me confiante nos conhecimentos teóricos que tinha de bagagem, e pude enriquecê-los ainda mais num ambiente prático e desafiante, tendo desenvolvido as minhas capacidades em laboratório e o meu espírito crítico. A execução de muitas das técnicas estudadas na faculdade e utilizadas diariamente num laboratório de CQ (ex.: reação Karl-Fisher, perda por secagem, cinzas, determinação do pH, ...) contribuiu para o enriquecimento dos meus conhecimentos teóricos. Valorizo muito este ponto forte, pois graças à execução de variadas técnicas termino este estágio mais apta a desenvolver a profissão de analista.

2.1.2. Controlo de Qualidade por etapas

O meu estágio dividiu-se por etapas, tendo em conta as diferentes funções em que se reparte a equipa do CQ. Comecei por conhecer a equipa e o espaço, e depois iniciei o meu estágio nos ME, seguidos de MP, microbiologia, PG e PF. Também auxiliei na execução de algum trabalho administrativo, como, por exemplo, a organização da sala de arquivo e a revisão de folhas de cálculo em Excel.

Por fim, pude executar a verificação anual dos aparelhos do ponto de fusão e a verificação semanal de todas as balanças, interpretando antes as novas informações contempladas na farmacopeia⁵. Pude desta forma compreender os desafios do dia-a-dia de um analista, que antes de duvidar da qualidade do produto ou do funcionamento do equipamento, deve primeiro rever o seu trabalho, de modo a concluir como pode melhorar a sua performance pessoal.

2.1.3. Análise de materiais de embalagem

O meu percurso neste estágio começou pelos materiais de embalagem, que se subdividem em primários (ex.: ampolas de vidro, alvéolos, bisnagas de alumínio e películas de PVC), que contactam diretamente com o medicamento, secundários (ex.: cartonagens, FI, rótulos e etiquetas) e terciários (caixas de cartão canelado), que inclui todo o material que agrupa o produto para expedição. A qualidade do ME é essencial à qualidade do produto final, visto que um material de embalagem defeituoso pode pôr em causa a sua estabilidade, qualidade e segurança. Os defeitos são classificados em críticos (quando invalidam a utilização do material ou causam problemas de segurança), maiores (quando dificultam a utilização do material ou reduzem a sua qualidade) e menores (quando não dificultam consideravelmente a sua utilização)⁴.

A título exemplificativo, passo a referir algumas especificações e ensaios referidos no procedimento técnico das bisnagas de alumínio: características (impressa por fora, revestida de verniz por fora e com uma junta de látex na extremidade aberta, para selar), texto e cor de impressão (avaliados através de um software que compara a digitalização do produto com o padrão, notificando todas as divergências), dimensões, massa média (pesam-se 10 bisnagas sem tampa e verifica-se se o peso médio está dentro dos limites de conformidade), indicador ótico (para máquina de embalagem saber em que posição deve fechar a bisnaga), adaptação à tampa (verificar se as tampas enroscam e perfuram a embalagem), aderência da tinta e do verniz, e porosidade do verniz (para que o alumínio não oxide o produto, é importante que o verniz sele por completo o interior da bisnaga)⁴.

Após concluir os ensaios, guardam-se amostras do lote na amostrateca, um espaço dedicado ao armazenamento de todos os produtos analisados pelo Controlo de Qualidade. Estas amostras têm de ser suficientes para repetir a análise 2 vezes, caso venha a ser necessário. Todas as entradas na amostrateca são registadas, com o nome do analista, a data, a hora e a identificação do produto⁴.

Nestas primeiras semanas, pude compreender a importância de analisar todos os materiais de embalagem, por exemplo, a relevância de testar a porosidade do verniz das bisnagas para garantir a estabilidade do produto. Compreendi que todas as técnicas realizadas têm de ser acompanhadas pelo respetivo procedimento técnico, que explica todos os procedimentos executados, de modo a evitar erros analíticos. Pude também aprender como se organiza e funciona o laboratório de Controlo de Qualidade, quais os registos necessários e como é o dia-a-dia de um analista.

2.1.4. Análise de matérias-primas

Antes de serem utilizadas pela produção, todas as matérias-primas são analisadas: princípios ativos, excipientes e águas. A água é o excipiente mais utilizado, estando sujeita a múltiplas análises microbiológicas e físico-químicas. Existem águas purificadas (para produtos não obrigatoriamente estéreis) e águas para injetáveis (para produtos estéreis), tendo estas diferentes limites de aceitação⁴.

Como exemplo, a análise de identificação da massa estearínica, um excipiente usado na preparação de supositórios, consiste na preparação de 4 placas TLC. Na identificação A, a placa apresenta no final várias manchas com fatores de retenção (RF) específicos para os triglicéridos, diglicéridos e monoglicéridos presentes. Já na identificação B queremos confirmar a ausência de lecitina de soja e de éter cetostearílico de macrogol, utilizando para isso duas placas distintas com padrões de cada uma dessas substâncias. Caso a amostra não tenha manchas com RFs nem um aspeto igual ao dos padrões, então a ausência é confirmada⁴.

Pude também analisar duas substâncias aromáticas, o aroma de morango silvestre e o óleo essencial de alfazema, sendo que ambos necessitam da análise do poder rotatório. Determina-se utilizando um polarímetro, que mede o ângulo de rotação de substâncias opticamente ativas. O resultado dado pelo aparelho pode ser positivo (luz roda no sentido do relógio) ou negativo (luz roda no sentido inverso), e é influenciado pela temperatura, pela concentração, pelo comprimento de onda da luz incidente e pelo comprimento da célula que contém a amostra. Normalmente, usam-se células com 1 decímetro de comprimento e, no caso das substâncias líquidas, o zero é feito com a célula vazia e seca⁴.

O tempo que passei nas matérias-primas permitiu-me recordar e aprofundar inúmeras técnicas que tinha abordado ao longo da minha formação e, assim, aprofundar conhecimentos teórico-práticos importantíssimos para esta função.

2.1.5. Análises microbiológicas

Durante uma semana, observei as funções desenvolvidas no espaço da microbiologia, que está segregado do da físico-química, reduzindo o risco de contaminação dos produtos a analisar. Analisam-se produtos estéreis e produtos não obrigatoriamente estéreis, incluindo as MP (que incluem as águas), monitorizações ambientais e PG ou semiacabado. As monitorizações ambientais consistem na análise a ar, superfícies, fardamento, vapor limpo, etc. Esta permite verificar se durante o processo de preparação dos produtos não há um risco elevado de contaminação associado a uma das salas ou a algum equipamento utilizado⁴.

Pode auxiliar na realização do doseamento biológico do sulfato de neomicina, presente no Positon[®]. Este ensaio permite calcular o título do sulfato de neomicina, que indica a efetividade do produto em tratar infecções de pele. Para realizar este ensaio, deve começar-se por preparar um inóculo contendo *Bacillus subtilis*, promovendo o seu crescimento até se obter uma suspensão com a concentração desejada de esporos por mililitro. Esta suspensão é adicionada ao meio para antibióticos, preparado segundo a USP. Funde-se o meio, deixa-se arrefecer antes de o inocular com 1 mL da suspensão e verte-se para placas previamente tratadas com UV. Colocam-se cilindros de inox sobre a gelose e, dentro deles, transfere-se uma solução de sulfato de neomicina padrão ou uma solução preparada a partir do Positon[®]. A inserção de amostra/padrão não é aleatória, segue uma grelha orientadora que indica qual a solução a adicionar em cada cilindro. Após a incubação da placa, medem-se os halos de inibição do crescimento, com o auxílio de uma craveira, e registam-se os resultados⁴.

As análises microbiológicas são de extrema importância para qualquer produto farmacêutico, visto que afetam diretamente a segurança do consumidor. Ao longo desta semana, pude denotar as diferenças que existem relativamente ao setor da físico-química, devendo-se elas ao tipo de análises realizadas. Existe na microbiologia um maior cuidado no vestuário e no manuseamento do produto para garantir que qualquer microrganismo encontrado não provenha de contaminação externa. Pude, assim, ficar a conhecer as análises realizadas pelo setor da microbiologia e como elas controlam a qualidade em diversas fases (ME, MP, PG, PF e monitorizações ambientais), à semelhança do setor de físico-química.

2.1.6. Verificação das balanças e dos aparelhos de ponto de fusão

Numa fase final do estágio, auxiliei na verificação anual dos aparelhos de ponto de fusão e na verificação semanal das balanças, de modo a atualizar os respetivos procedimentos de acordo com a 10.^a Edição da Farmacopeia Europeia⁵.

Para o ponto de fusão, utilizaram-se 6 padrões: benzofenona, vanilina, ácido benzóico, sacarina, cafeína e nitrato de potássio⁴. Para determinar o ponto de fusão, deve primeiro verificar-se se o pó requer alguma preparação antes de ser utilizado, como a pulverização ou a secagem em estufa. Importa também garantir que todos os capilares são enchidos à mesma altura e que o pó é compactado de igual forma para os 3 capilares (por exemplo, deixando cair os 3 capilares por um tubo de vidro com 1 metro de comprimento), visto que o grau de compactação afeta a duração da fusão dos compostos. A temperatura inicial, antes de iniciar a rampa de aquecimento, deve ser programada 10 °C abaixo do ponto de fusão esperado, e o aquecimento pode ocorrer a uma taxa de 1 °C por minuto (método farmacopeia) ou, mais

lentamente, a 0,2 °C por minuto (método termodinâmico)⁵. Diferentes velocidades de aquecimento traduzem-se em diferentes temperaturas expectáveis para o ponto de fusão dos compostos, sendo que o método termodinâmico apresenta valores cerca de 1 °C abaixo dos do método farmacopeia, visto que existe mais tempo para que o calor se distribua pelo pó. Este processo de verificação permitiu-me desenvolver um caso prático, explanado no ponto 3.2.

Simultaneamente, realizei também a verificação semanal das balanças, que consiste nos testes de repetibilidade e exatidão. Para o teste de repetibilidade, deve pesar-se o mesmo peso 10 vezes consecutivas, deixando a balança estabilizar e tarando a balança, se necessário. Este peso deve ter um peso inferior a 5 % da carga máxima da balança. O teste de repetibilidade permite determinar o peso mínimo (**pm**) da balança, calculado a partir do desvio padrão (**s**) obtido com as 10 pesagens da seguinte forma: $pm = \frac{2*s}{0,10} * 100$. Para o teste de exatidão, utiliza-se um peso com uma carga entre 5 % e 100 % da capacidade da balança e calcula-se a incerteza entre o valor obtido experimentalmente e o valor certificado, que não pode ser superior a 0,05 %⁵.

Tornou-se numa oportunidade para aprofundar os meus conhecimentos relativos às técnicas e aos aparelhos envolvidos nas verificações. Esta tarefa mostrou ser desafiante, sendo a procura da justificação para os pontos de fusão não conformes uma constante num trabalho contínuo de “investigação”. Através de várias tentativas, algumas delas com diferentes alterações de procedimento, por exemplo, no modo de compactação do pó no capilar, obtive, por fim, valores conformes, tendo assim conseguido concluir a verificação dos equipamentos.

2.1.7. Visita ao Departamento de Produção

A visita ao Departamento de Produção permitiu integrar os conhecimentos e as práticas do Controlo de Qualidade, permitindo compreender todo o processo de produção e a importância da análise do produto nas suas diferentes fases: antes da produção (ME e MPs), durante a produção (PG) e após a produção (PF). Nas várias salas de produção, existem mecanismos automáticos das próprias máquinas, que verificam a conformidade dos produtos e das embalagens, um por um. Além desta análise automática, é também feito o Controlo em Processo (IPC, do inglês “*In Process Control*”). O IPC articula-se com o trabalho realizado no Controlo de Qualidade, detetando as possíveis falhas de um lote mais cedo, de modo a não desperdiçar produto que possa estar a ser produzido com algum defeito. Existem algumas análises críticas que bloqueiam o processo de fabrico, sendo que este apenas pode ser continuado assim que o IPC analise e não detete qualquer não conformidade.

2.1.8. Equipa diversa

Ao trabalhar com vários técnicos, pude aprender como trabalhar em equipa e como lidar com diferentes personalidades. No CQ, é essencial saber trabalhar em equipa, ouvindo o outro, colaborando e respondendo às questões colocadas. Diferentes técnicos traduziram-se na necessidade de me adaptar a diferentes formas de interagir enquanto estagiária. Posso dizer que todos os funcionários me acolheram e ensinaram, aceitando o meu erro como algo natural e incitando-me a continuar a desenvolver as minhas aptidões no laboratório. Graças a esta oportunidade, sinto-me mais apta para futuramente desenvolver esta função, ou outra semelhante, numa indústria farmacêutica.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Número de horas de estágio

Considerei que o número de horas foi suficiente para ficar a conhecer o CQ. No entanto, muitas outras áreas da indústria ficaram em falta (por exemplo: garantia de qualidade, produção e assuntos regulamentares). Caso o estágio abordasse todas as áreas, seria apenas observacional, não teria tempo suficiente para desempenhar tarefas. Tendo em conta o tempo disponível, a seleção de uma área foi a melhor forma de o aproveitar, ficou, no entanto, o interesse por conhecer melhor outras áreas da indústria farmacêutica.

2.2.2. Adequação do curso

Dentro das tarefas que observei e executei, a maioria era do meu conhecimento, visto que estão contempladas nas aulas prático-laboratoriais de diversas cadeiras. No entanto, senti que me faltava algum à vontade no laboratório, o que no início me dificultou na realização de tarefas. Deveríamos ter alguma independência nas aulas laboratoriais, onde chegamos e temos na bancada todo o material necessário. Isto acelera as aulas, em que o tempo é reduzido, mas por outro lado limita-nos quando estamos no início da atividade profissional. Senti que não tinha a automaticidade de compreender os materiais necessários e de os ir procurar. No entanto, com a prática, este problema acabou por se remediar e fui desenvolvendo esse espírito crítico que me faltava.

Senti também um lapso de conhecimentos relativos aos programas informáticos acoplados aos aparelhos utilizados no laboratório, nomeadamente nos HPLC. Sendo esta uma ferramenta usada quase diariamente pelos analistas, torna-se relevante compreender o seu funcionamento, quer se exerça a função de analista ou de revisor técnico.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Análise de produtos para vários países e para terceiros

Os Laboratórios Vitória, S.A. analisam vários medicamentos e materiais por subcontratação. Isto permitiu-me contactar com uma maior diversidade de produtos de diferentes laboratórios e para diferentes países. Considero isto uma vantagem, pois uma maior diversidade traz uma maior variedade, tanto de produtos como de análises a realizar.

2.4. Ameaças

2.4.1. Reduzida percentagem de farmacêuticos na área

Pude constatar que muitas das funções são realizadas por outros profissionais (técnicos com cursos profissionais, bioquímicos, químicos, etc.), estando a função farmacêutica mais presente nas funções de chefia. Para um farmacêutico chegar a um cargo mais alto, tem primeiro de passar pela função de analista que, sendo ocupada por outros cursos, reduz a nossa empregabilidade na indústria farmacêutica. Tendo os farmacêuticos um amplo leque de conhecimentos, compreendem não só as técnicas que executam, mas também o motivo de aquele produto ter de ser controlado por aqueles parâmetros, quais as funções dos excipientes e para que são usados os diversos produtos farmacêuticos. Assim, penso que o farmacêutico tem uma visão diferente, tendo sido vantajoso o estágio ser também acompanhado por um farmacêutico a exercer a função de analista.

3. Caso Prático

3.1. Importância da calibração da temperatura no aquecimento em banho

Uma das matérias-primas analisadas foi o Arlacel (PEG-100), contendo monoestearatos de glicerilo e estearato de macrogol. Ao consultar o procedimento técnico (documento que explana ensaios a realizar e critérios de aceitação para determinada matéria-prima) vemos que um dos ensaios que indica a sua conformidade, ou não conformidade, é o índice de saponificação. Este corresponde aos miligramas de hidróxido de potássio necessários para neutralizar os ácidos livres e saponificar os ésteres, por grama de substância. Coloca-se a amostra num erlenmeyer esmerilado, com hidróxido de potássio, adapta-se um condensador de refluxo e aquece-se a 100 °C durante 30 minutos. Após decorrido este tempo, titula-se imediatamente com ácido clorídrico na presença de fenolftaleína, realizando-se também o ensaio em branco.⁵

A reação que ocorre pode ser esquematizada da seguinte forma:

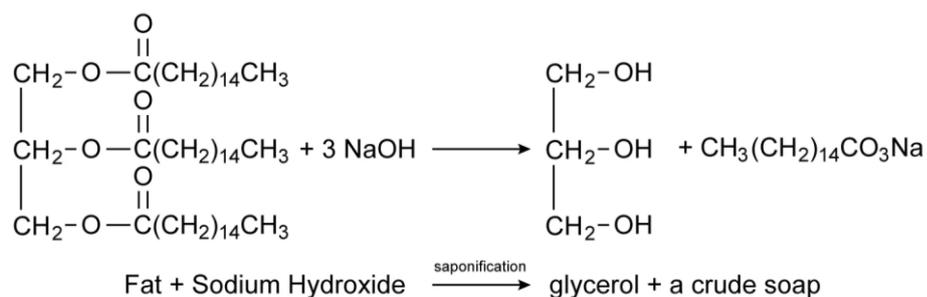


Figura 1 – Reação de saponificação. (Adaptado de 6).

Ao analisar esta reação, podemos concluir que quanto mais triglicéridos a amostra tem, mais hidroxilos presentes na base são gastos, logo, menos ácido é necessário adicionar para acidificar a solução (fenolftaleína passa de rosa a incolor). No entanto, as primeiras amostras tituladas estavam a gastar volumes demasiado altos, o que poderia significar que as amostras tinham valores de triglicéridos muito baixos. Antes de considerar a substância como não conforme deve considerar-se que o erro é analítico, podendo este dever-se ao analista, ao equipamento ou a algum reagente mal conservado. Deve analisar-se o que foi feito e investigar quais os possíveis problemas a corrigir.

Sendo a reação de saponificação muito dependente da temperatura, considerou-se que o erro poderia vir do banho, visto que se utilizou um aparelho sem controlo rigoroso da temperatura. Assim, analisaram-se novamente todas as amostras da substância, agora utilizando um banho de temperatura calibrada. Desta vez, os resultados encontravam-se dentro dos valores esperados e concluiu-se que o equipamento havia sido mal selecionado pelo analista, e que o Arlcel estava conforme e podia ser utilizado pelo fabrico.

3.2. Fatores associados à variabilidade na determinação de pontos de fusão

Durante a verificação dos aparelhos de ponto de fusão, foi evidente que tanto o modo de preparação do pó como a forma como se enchem os capilares são fatores que causam variabilidade. Foram realizadas várias tentativas de ensaios até se chegar a valores conformes para todos os padrões, de modo a encontrar o procedimento mais adequado para cada um deles. Uma das conclusões retiradas foi que o nitrato de potássio necessita de preparação antes da sua utilização, apesar do certificado do fabricante não o indicar. Tendo o nitrato de potássio uma granulometria maior que a dos outros padrões, a distribuição de calor é morosa. Assim, é necessário pulverizá-lo e secá-lo num exsiccador, de modo a reduzir o pó a um grão

mais fino, obtendo assim valores mais próximos do ponto de fusão esperado. Pude também constatar que o excesso de compactação pode comprometer esta análise, pois causa formação de bolhas de ar no pó contido no capilar, o que dificulta o funcionamento dos aparelhos automáticos, que detetam o ponto de fusão por transmissão de luz.

4. Conclusão

Findados estes 3 meses de estágio, concluo que a saída profissional da indústria farmacêutica é a minha carreira de eleição. Denoto que toda a equipa me proporcionou o melhor acompanhamento e que também eu me esforcei por aprender e ajudar o melhor que pude. Esta experiência ultrapassou, em muito, as minhas expectativas, tendo culminado com uma proposta de emprego que me permitirá começar a minha carreira na área farmacêutica que me faz sentir mais concretizada. No CQ, existe um crescimento profissional constante, com novos desafios que surgem todos os dias. O nosso sentido crítico é posto à prova constantemente, tornando as atividades realizadas intelectualmente estimulantes.

Na minha opinião, estes estágios nas diferentes áreas deveriam ser uma oportunidade para todos os alunos. Senti alguma dificuldade em conseguir empresas disponíveis para realizar alguns dos meus estágios de verão, pelo que acredito que o contacto entre as empresas e a Universidade de Coimbra poderia ser mais abrangente (incluindo mais cidades de residência dos alunos) e mais ativo (tentando encontrar mais empresas de áreas farmacêuticas disponíveis).

Quero desde já agradecer à equipa dos Laboratórios Vitória, pelo excelente acolhimento, e também à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pela oportunidade que me proporcionou. Esta experiência contribuiu muito para encontrar a minha vocação profissional e permitiu-me concluir, com maior certeza, o percurso que desejo seguir após findar o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

5. Bibliografia

1. <https://www.labvitoria.pt/> (Consultado a 03/05/2021)
2. <https://www.labvitoria.pt/pt/products?mt=5> (Consultado a 13/06/2021)
3. <https://www.thoughtco.com/definition-of-saponification-605959> (Consultado a 12/06/2021)
4. Procedimentos técnicos de acordo com a Farmacopeia Europeia [European Pharmacopeia (Ph. Eur.) 10th Edition], consultados no local de estágio.
5. Farmacopeia Europeia [European Pharmacopeia (Ph. Eur.) 10th Edition], consultada no local de estágio.
6. Reação de saponificação - <https://www.thoughtco.com/definition-of-saponification-605959> (Consultado a 12/06/2021).

Parte III

Monografia

“Advanced Therapies in Type I Diabetes: Cell Reprogramming”

1 2 9 0



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Orientador: Professor Doutor Luís Pereira de Almeida

Resumo

A Diabetes *mellitus* é uma doença metabólica que afeta já 415 milhões de pessoas e cuja taxa de incidência é de 3 % por ano. A diabetes tipo I surge normalmente em crianças e causa insulino dependência, tratada através da injeção de insulina exógena. Este tratamento obriga a um controlo rigoroso e ainda não se consegue atingir a precisão que apenas um pâncreas funcional oferece, apesar das inovações que têm vindo a surgir (ex.: bombas de infusão, sensores de glicose, insulinas recombinantes).

Esta monografia aborda a terapia avançada aplicada à diabetes tipo I. Começa por rever de forma breve o pâncreas, o seu funcionamento, formação e regeneração. Espera-se que os recentes avanços na investigação biomédica conduzam a terapias eficazes, em particular no domínio das terapias avançadas. Para termos uma terapia avançada segura e eficaz, temos de garantir que as células criadas mimetizam as funções mais relevantes das células beta. Depois de referir quais as condições necessárias, esta monografia aborda as possíveis técnicas que poderão revolucionar o tratamento da diabetes. A primeira abordagem já realizada em vários doentes baseia-se no transplante de células. No entanto, existem poucos doadores e é necessária uma terapêutica de imunossupressão crónica, para que a rejeição e a autoimunidade característica destes doentes não destruam as células implantadas. Sendo assim, poucos doentes são indicados para este tipo de tratamento.

No entanto, têm havido avanços nas terapias de imunossupressão e outras formas de manter as células funcionais têm vindo a surgir. Se uma alternativa for encontrada, o número de doentes indicados para transplante será maior. Para dar resposta a um número muito superior de doentes diabéticos tratados com terapias avançadas, existem várias etapas a ultrapassar, designadamente: (a) desenvolver uma forma eficaz de gerar células produtoras de insulina; (b) identificar os locais de transplante mais adequados; e (c) assegurar a sobrevivência e funcionalidade das células a longo prazo. As células precisam de ter acesso aos nutrientes e ao oxigénio, mas simultaneamente têm de estar resguardadas do ataque do sistema imunitário. Existem diferentes formas de inibir a autoimunidade, ou, em alternativa, de criar uma barreira física, que impeça o sistema imune de atuar sobre as células transplantadas.

As terapias avançadas estão a evoluir, com ensaios clínicos a decorrer. No entanto, há ainda barreiras de segurança e efetividade a ultrapassar. Uma cura iria beneficiar pacientes com diabetes tipo I e tipo 2, melhorando muito a qualidade de vida de milhões de doentes. Além disso iria reduzir encargos de saúde relacionados com o tratamento da doença e das suas

complicações. Atualmente, este não é um objetivo apenas acadêmico, mas também de saúde pública, com enormes impactos económicos e sociais.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus*; pâncreas; célula beta; terapias avançadas; reprogramação celular; locais de transplante; imunossupressão.

Abstract

Diabetes mellitus is a metabolic disease that affects over 415 million people, with an incidence rate of 3 % per year. Type 1 diabetes (T1D) is usually diagnosed in children and causes insulin dependence, treated with exogenous insulin injections. This form of treatment demands a rigorous control, that cannot achieve the precision that only a functional pancreas is able to; even with all the current emerging innovations (e.g., insulin pumps, glucose sensors, and recombinant insulin).

This work focuses on advanced therapies in type 1 diabetes. It starts by reviewing the pancreas, how it works, forms, and renews itself. To reach a safe and efficient therapy, we must make sure that the cells we generate reproduce the most relevant β -cells' functions. After referring the necessary conditions, this work refers possible methods that may revolutionize diabetes treatment. The first approach, already applied to multiple patients, consists of cell transplantation. However, there are few donors available, and chronic immunosuppression is mandatory, so that rejection and autoimmunity (characteristic of T1D patients) do not destroy transplanted cells. That being said, few diabetes patients are indicated for this type of treatment.

Over the last years immunosuppressive therapies have improved, and other ways to keep cells functioning are under investigation. If an alternative is found, the number of patients indicated for transplantation will increase substantially. To respond to a much larger number of diabetes patients treated with advanced therapies, there are still some steps to overcome: (a) finding a way to efficiently generate insulin-producing cells; (b) identifying the most adequate transplantation sites; and (c) ensuring long-term survival and functionality of the cells. Cells need to have access to nutrients and oxygen, but simultaneously they must be safeguarded from the immune system's attack. There are different ways to inhibit autoimmunity, or alternatively, to create a physical barrier that prevents the immune system from destroying transplanted cells.

Advanced therapies are evolving, with active clinical trials taking place. On the other hand, there are still safety and efficacy barriers to overcome. A cure would benefit both type 1 and type 2 diabetes patients, improving substantially the life quality of millions of patients. Additionally, it would reduce health charges related to treatment and complications of the disease. Nowadays, this is not only an academic goal but also a matter of public health, with significant economic and social impacts.

Key-words: Diabetes *mellitus*; pancreas; beta cells; advanced therapies; cell reprogramming; transplantation sites; immunosuppression.

Abbreviations

A	ATP	Adenosine triphosphate
C	CCK	Cholecystokinin
	ChREBP	Carbohydrate response element binding protein
D	DIRK	Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase
	DM	Diabetes mellitus
	DPP IV	Dipeptidyl peptidase-IV
E	ER	Endoplasmic reticulum
G	GAD	Glutamic acid decarboxylase
	GH	Growth hormone
	GHS	Growth hormone secretagogue
	GIP	Gastric inhibitory polypeptide
	GLP-1	Glucagon-like peptide-1
	GLP-1R	GLP-1 receptor
	GLUT2	Glucose transporter 2
	GSIS	Glucose-stimulated insulin secretion
H	HbA1c	Glycosylated hemoglobin
	hESC	Human embryonic stem cell
	hPSC	Human pluripotent stem cell
I	IA	Islet autoimmunity
	iNOS	Nitric oxide synthase
	iPSC	Induced pluripotent stem cell
N	NGN3	Neurogenin-3
P	PDX-1	Pancreatic and duodenal homeobox 1
	PPx	Partial pancreatectomy
T	T1D	Type 1 diabetes
	T2D	Type 2 diabetes
	TH	Thyroid hormone
	tolDC	Tolerogenic dendritic cell
W	WHO	World Health Organization

I. Introduction

There are over 415 million people worldwide who suffer from diabetes, and the cases are increasing. Type 1 Diabetes (T1D) is usually diagnosed in children between 5 and 7 years, more commonly in males. Its prevalence is 0.1 to 0.5 % and its incidence is 30 to 50 per 100000 people, with an overwhelming increasing rate of 3 % per year. According to the International Diabetes Federation, this increasing number is expected to reach 642 million by 2040. Complications related to diabetes in an extended time cause premature deaths and heighten both social and medical burdens (AFELIK S, ROVIRA M, 2016; VANIKAR AV *et al.*, 2016; ZHOU Q, MELTON D, 2018).

The demand for a new treatment or prevention solution for T1D has not diminished. Hope for diabetes patients lies on a lasting managing approach (eg., automated insulin delivery), or even better on a definitive cure (eg., replacement and/or preservation of β -cells). One possibility would be restoring the pancreas by regenerating new glucose-responsive β -cells. This approach would benefit both T1D patients and Type 2 Diabetes (T2D) patients with a decreased number of these insulin-producing cells. This paper discusses some potential options, also referring to their remaining difficulties in reaching a clinical application (ELLIS C *et al.*, 2017; SKYLER JS 2018; THOMAS *et al.*, 2020; RATHWA N *et al.*, 2020).

2. Diabetes Mellitus Diagnosis

Diabetes mellitus (DM) classifies as a metabolic and idiopathic disease of heterogeneous aetiology, marked by constant hyperglycaemia. T1D is characterized as an autoimmune disorder more common in children, where T-cells attack β -cells present in the pancreatic islets of Langerhans. The first cells to reach the islets are dendritic cells and macrophages. They then present MHC and β -cell peptides to circulating CD4+ T-cells, which produce IL-2 that activates specific CD8+ T-cells. These latter cells recognize β -cell antigens and differentiate into cytotoxic T-cells. Cytotoxic cells are recruited to pancreatic islets, where they produce cytokines that activate more macrophages and T-cells. T-cell infiltration induces inflammation or insulinitis, gradually causing the cells to collapse. Since the cells that produce insulin are damaged, there is a severe decrease in the levels of insulin in the bloodstream and consequently an abnormal increase in glucose values. The only treatment currently available for T1D is the injection of exogenous insulin (HALBAN PA *et al.*, 2001; VANIKAR AV *et al.*, 2016; RANDOLPH LN *et al.*, 2019; THOMAS *et al.*, 2020; RATHWA N *et al.*, 2020).

Some classical symptoms allow identification of T1D patients soon after the pathophysiology settles in, such as polydipsia, sudden weight loss, excessive and constant thirst and hunger, fatigue, and behaviour changes. Soon after the disease is installed complications begin to appear, leading to death if no treatment is initiated (PASQUALI L *et al.*, 2008; THOMAS *et al.*, 2020).

If untreated, diabetes causes many complications (e.g., retinopathy, neuropathy, nephropathy, ketoacidosis, cardiovascular diseases, hypercoagulability) which lead to damage in fine nerves and blood vessels, organ dysfunction, and ultimately organ failure. Retinopathy, neuropathy, and nephropathy, are examples of microvascular diabetes complications. Complications such as these were previously more common, due to the lack of adequate glycaemic control. Technical advances, such as human recombinant insulin, more convenient blood glucose monitoring devices, and insulin pumps made it easier for patients to self-regulate their blood glucose, reducing the risk of hyperglycaemia. Nowadays, the ambition of achieving metabolic control is within reach, since insulin pumps reproduce basal and stimulated insulin release. This existing standard therapy may even compete against new therapeutic interventions, as they continue to be improved, but at present, they still cannot offer an optimal degree of precision (HALBAN PA *et al.*, 2001; PASQUALI L *et al.*, 2008; JOHANNESSON B *et al.*, 2015; VANIKAR AV *et al.*, 2016; SHAPIRO AM *et al.*, 2016; KIEFFER TJ, 2016) (Fig. 1).

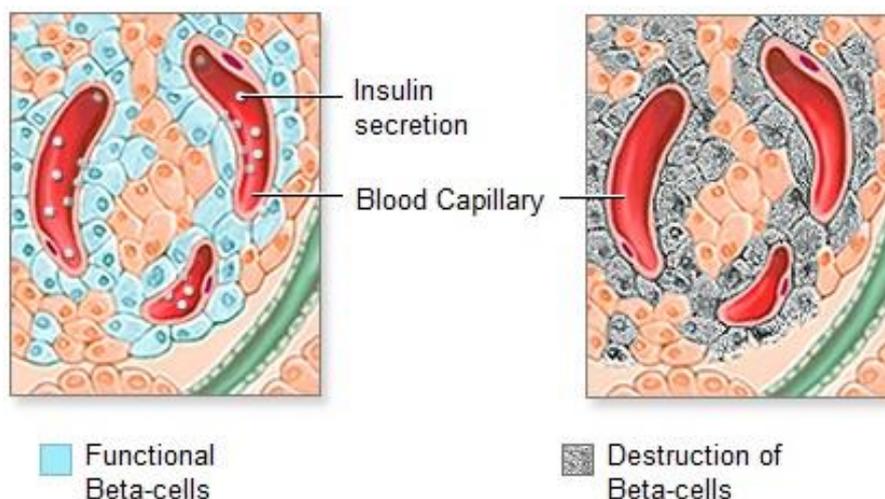


Fig. 1 – Type I Diabetes is an autoimmune disease that causes collapsing of insulin-producing β -cells, present in the pancreatic islets of Langerhans. T cell infiltration causes inflammation that leads to cell destruction. Since β -cells are destroyed, insulin is not secreted into the bloodstream, leading to hyperglycaemia. Injecting exogenous insulin is the only treatment currently available. Nowadays, complications linked to diabetes are less common thanks to human recombinant insulin, new blood glucose monitoring devices, and insulin pumps. These technological improvements made it easier for patients to self-regulate their blood glucose, reducing the risk of hypoglycaemia.

Adapted from <https://medlineplus.gov/ency/article/000305.htm> [Consulted on 2020 December 23]

Most DM patients have T2D, where peripheral organs, such as the liver, fat, and muscle, tend to resist insulin. Factors associated with T2D include genetic predisposition, endoplasmic reticulum (ER) stress, obesity, etc. The treatment options that can be provided (e.g., weight maintenance, exercise, diet, pharmaceuticals) are not sufficient to ensure a major increase in the quality of life due to the complexity of the disease. Such management approaches are only able to ease hyperglycaemia and some symptoms (ZHOU Q, MELTON D, 2018; RATHWA N *et al.*, 2020).

Only 5-10 % of diabetic patients are diagnosed as Type I, which is caused by autoimmunity towards β -cells, as stated above. Although this autoimmunity is not present in T2D, current studies have proved these patients also have a diminished percentage of β -cells, when compared to healthy individuals. Besides T1D and T2D, there are still some other rare forms of diabetes, that can be directly inherited (ZHOU Q, MELTON D, 2018; RATHWA N *et al.*, 2020).

The American Diabetes Association and the World Health Organization (WHO) Expert Committee on DM has classified T1D and determined the diagnostic criteria. The most trustworthy indicator is a low level of serum C-peptide, which is produced and released alongside insulin. The diabetic status is evaluated using blood sugar levels and glycosylated haemoglobin (HbA1c) levels. In addition to these levels, markers of autoimmunity help establishing the diagnosis. These markers include antibodies against β -cells, islet cells, and glutamic acid decarboxylase (GAD), among others. The predisposition to develop T1D has been linked to HLA-DR3/4 and DQ8 genotypes (VANIKAAR AV *et al.*, 2016).

There is a rising incidence of childhood type I diabetes in most countries. These growing cases are believed to be linked to environmental factors, many of which are still unknown. Extracting complex information about multiple known and unknown exposures is a challenging mission, but recognizing factors that trigger autoimmunity is crucial so that children who are genetically predisposed to the disease can be safeguarded from exposure (PASQUALI L *et al.*, 2008; BALAZARD *et al.*, 2016).

During the past few years, infectious agents (like enteroviruses) and nutrition have been hypothesized to be involved in the aetiology of the disease. Other potential triggering factors also include environmental pollutants and seasons of autumn and winter. Respiratory infections in the first year of life, as well as gastrointestinal illnesses at some precise moments, were associated with a higher risk of seroconversion to islet autoimmunity (IA). On the other hand, fewer early infections and lack of parasites have also been hypothesized to be the cause

of autoimmune T1D. Lately, a line of thought led scientists to search for a connection between bacterial composition and T1D, through the investigation of the gut microbiome (BALAZARD *et al.*, 2016; RATHWA N *et al.*, 2020).

3. The Pancreas

Two distinguishable units constitute the pancreas, the exocrine pancreas, and the endocrine pancreas. The exocrine acinar cells synthesize multiple digestive enzymes, which flow through the pancreatic ducts into the small intestine, allowing nutrients to be absorbed. The tubular cells, which form the ductal tree, allow the neutralization of the gastric acid, due to the secretion of a fluid containing bicarbonate. As a result, digestive enzymes are more effective since they function at their optimum pH. Only 5 % of the total pancreatic mass is made of endocrine islets, of which 1 to 2 % consist of Islets of Langerhans, dispersed in the pancreatic tissue. These cells are surrounded by the acinar matrix (Fig. 2); which histologically was initially suggestive that different cells that make up the islet would derive from a common progenitor cell. Lineage tracing proved this is a wrong guess since each islet has a polyclonal origin (AFELIK S, ROVIRA M, 2016; KIEFFER TJ, 2016; ZHOU Q, MELTON D, 2018).

Islets of Langerhans contain 5 predominant types of cells, each one producing a vital hormone. Namely, β -cells, α -cells, δ -cells, PP cells, and ϵ -cells, produce respectively insulin, glucagon, somatostatin, pancreatic polypeptide, and ghrelin (Fig. 2). Each vital hormone has a specific function, for example glucagon increases glycemia, ghrelin is produced when the stomach is empty or when someone feels hungry, while the pancreatic polypeptide is responsible for balancing the food intake. Hormones are released into the blood circulation and normalize glucose and nutrients metabolism. The β -cells (60 % of the islet mass) form a central core enveloped by the other cell types (AFELIK S, ROVIRA M, 2016; ZHOU Q, MELTON D, 2018; RANDOLPH LN *et al.*, 2019; RATHWA N *et al.*, 2020).

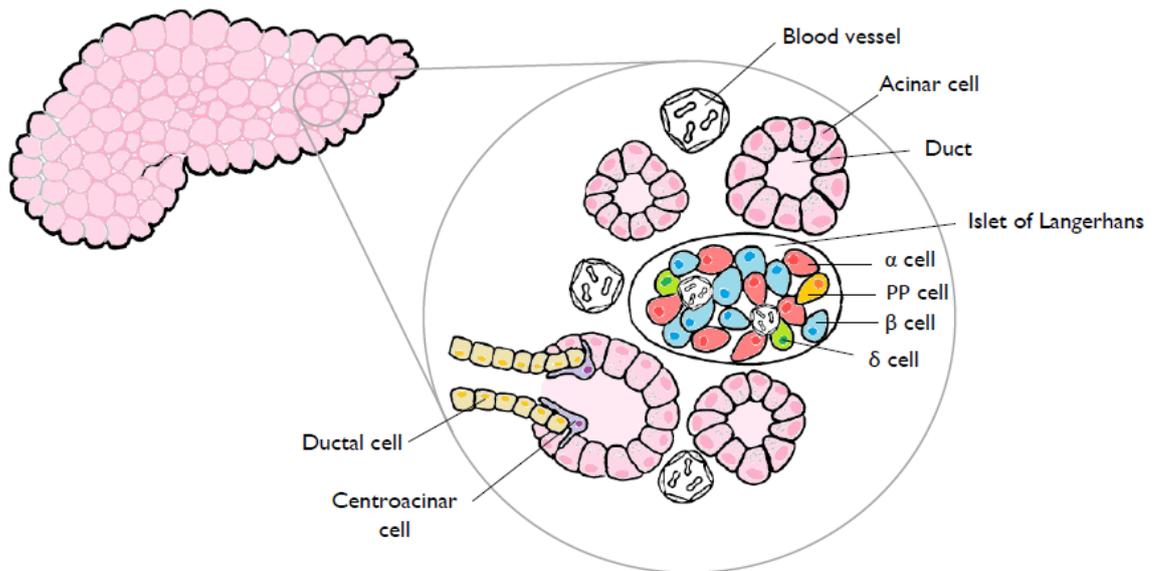


Fig. 2 –The pancreas has exocrine cells (acinar, ductal and centroacinar cells), which produce and secrete digestive enzymes, and endocrine cells. There is only a small percentage of Islet of Langerhans cells, surrounded by the acinar matrix. Islets have 5 main types of cells, namely, β -cells (which produce insulin), α -cells (glucagon), δ -cells (somatostatin), PP cells (pancreatic polypeptide), and ϵ -cells (ghrelin). Adapted from ELLIS C, *et al.*, 2017.

Biosynthesis of insulin involves three sequential steps. The insulin gene is first transcribed and translated into the preproinsulin protein, which becomes proinsulin once the N-terminal is removed. Proinsulin is encapsulated in secretory granules, as it leaves the Golgi apparatus. Proinsulin then forms insulin by deletion of C-peptide, inside the secretory granules. This means the C-peptide may be used as a marker of how much insulin a cell produces since it is formed and released together with insulin. This step happens when the intragranular space is acidic and has a high concentration of calcium, in the presence of two endoproteases (PC1/PC3, PC2) and one exopeptidase (carboxypeptidase-H). Rapid kinetics regulates exocytosis of insulin and C-peptide-containing secretory granules, through specialized events (Fig. 3) (HALBAN PA *et al.*, 2001; RANDOLPH LN *et al.*, 2019).

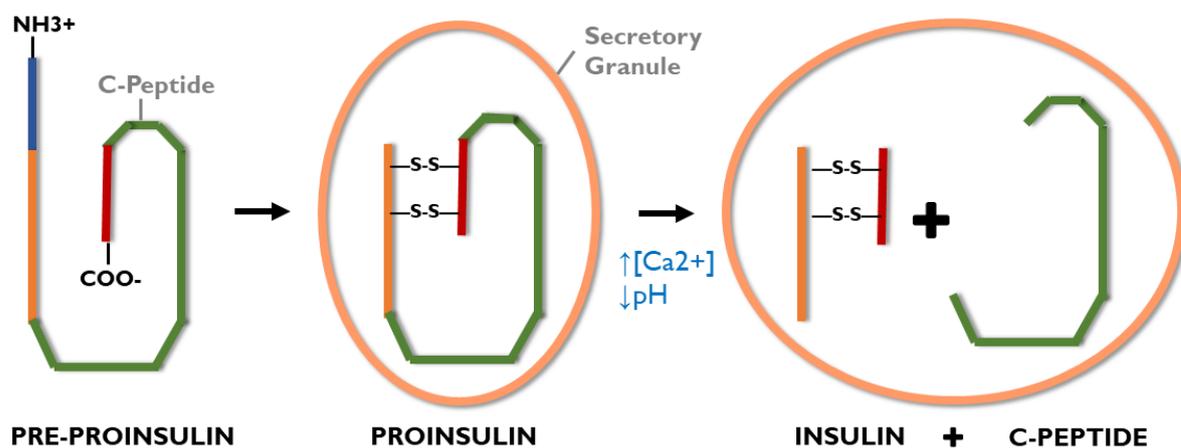


Fig. 3 – The insulin gene is translated into the preproinsulin protein, which suffers a transformation. First, the N-terminal of preproinsulin is removed, and proinsulin is formed. This proinsulin is encapsulated inside a secretory granule, where it forms insulin and C-peptide. The C-peptide may be used as a marker of insulin production since it is released together with insulin. For this deletion to occur, the intragranular space must be acidic and have a high concentration of calcium. This reaction relies on the presence of two endoproteases (PC1/PC3, PC2) and one exopeptidase (carboxypeptidase-H). Specialized β -cell events allow for quick kinetics to regulate exocytosis of insulin and C-peptide.

The regenerative potential of the exocrine pancreas and the endocrine pancreas is different. Since endocrine islets have a narrower capacity, it is more challenging to regain their function after an endocrine disease. Therefore, appreciable β -cell loss leads to non-reversible diabetes. On the other hand, exocrine diseases, like acute pancreatitis, recover fully and swiftly, due to their intrinsic high regeneration capability. It is also important to take into account that both endocrine and exocrine diseases are connected, as chronic patients with one of them tend to evolve to the other (ELLIS C *et al.*, 2017; ZHOU Q, MELTON D, 2018).

3.1. Exocrine Pancreas Regeneration

Rodent models have shown recovery of both architecture and function of the pancreas within some weeks after acute pancreatitis. Nonetheless, it is uncertain whether the same spontaneous recovery we see in animals also happens in humans since this process has dissimilarities between different animal models. There are two main models about what may occur after pancreatitis. The first and most accepted one, says that new acinar cells come from pre-existing ones. The second one claims that duct-like acinar cells, formed through duct metaplasia, “redifferentiate” and form acinar cells again. Mechanisms that control regeneration are not clear and may vary according to the pathological state (ELLIS C *et al.*, 2017; ZHOU Q, MELTON D, 2018).

3.2. Endocrine Pancreas Regeneration

Most studies have focused on endocrine islets, concluding that tissue growth is lost in adult humans. There is however the suggestion of tissue growth in children, following partial pancreatectomy. Moreover, in different rodent models during pregnancy, obesity, or in the case of insulin resistance, there was noticeable islet hyperplasia, hence a β -cell mass growth. Having noticed this, it is crucial to understand where β -cells come from, using β -cell-specific drivers. While mice models, whose genetic lineage was traced, revealed the replication of pre-existing β -cells, histological analyses in humans found only a few replicating cells (ZHOU Q, MELTON D, 2018).

The histological observation of single or small islets nested in human pancreatic ducts led to the conjecture that the human pancreas may have pancreatic progenitor cells. Centroacinar cells, for example, regulate the development of the pancreas and help regenerate this organ in animal models (mice and zebrafish). Despite this theory, a study using exocrine, acinar-specific, and duct-specific drivers to trace genetic lineage pointed out no significant contribution from the exocrine to the endocrine compartment (ELLIS C *et al.*, 2017; ZHOU Q, MELTON D, 2018).

In a distinct mouse model, where more than 99 % of β -cells were ablated using a toxin, lineage tracing indicated a divergent response. Recovery of β -cell mass was verified, as a result of α -cells and δ -cells conversion. Whether this also happens in humans remains unknown. The lack of evidence could be explained by the immediate destruction of converted cells by autoimmunity in a T1D patient (ZHOU Q, MELTON D, 2018).

3.3. The Beta Cell

Insulin production by β -cells is stimulated by nutrients, hormones, and nervous stimuli. These cells can be seen as master regulators of metabolism homeostasis. The main modulator is glucose; β -cells can sense its concentration in the bloodstream since they have a glucose transporter 2 (GLUT2) transporter. Glucose leads to the activation of the transcription factor carbohydrate response element-binding protein (ChREBP), which normally induces glycolysis and β -cell proliferation, after glucose intake. On the other way around, neighbouring cells respond to the β -cells` autocrine and paracrine signalling (JOHNSON JD, 2016; RATHWA N *et al.*, 2020).

The β -cell mass, given by the weight of the total β -cells in the pancreas, is constantly regulated. It increases when these cells replicate or go through hypertrophy, and it decreases when cells die or atrophy. Exercise influences β -cell mass, having a protective effect. Physical activity reduces pro-inflammatory cytokines, as well as nitric oxide synthase (iNOS) activity, downregulating multiple pro-apoptotic factors (Fig. 4). The β -cell mass` function may be determined using insulin secretion, but this concept is difficult to quantify. Alternatively, we may evaluate function using glucose-stimulated insulin secretion (GSIS), always considering the strength of the stimulus and the time the cells took to respond (WEIR GC *et al.*, 2013; RATHWA N *et al.*, 2020).

Glucose concentration is normally between the thin range of 65 to 150 mg/dL. If β -cells are exposed to even light hyperglycaemia, changes in function occur, with GSIS loss. This secretory defect linked to glucotoxicity was demonstrated in several studies using animals and humans. Lipotoxicity and glucolipotoxicity, on the other hand, are only supported by in vitro experiments, which evince the same consequence when the concentration of free fatty acids increases (Fig. 4). The loss of function in β -cells may be reversible since a GSIS recovery was noticed in T2D models. Obtaining euglycemia with the correct treatment may be the solution to restore the normal phenotype of insulin-producing cells (WEIR GC *et al.*, 2013).

Surprisingly, differentiation is not a one-way process. When mature β -cells go through specific conditions, they can revert to a precursor-like state, losing some of their characteristics. This phenotypic reconfiguration process is designated as dedifferentiation (Fig. 4). It may contribute to cell function loss in diabetes, in addition to cell death. Loss of β -cell mass due to glucotoxicity is caused by shifts in gene expression. This causes serious dysfunction in insulin secretion, worsening glucose levels dysregulation (WEIR GC *et al.*, 2013; BENSELLAM M *et al.*, 2018).

It is known that glucotoxicity has a significant role in dedifferentiation. However, the exact mechanism that takes place is still unclear. Inflammation, oxidative stress, ER stress, and hypoxia are some of the molecular mechanisms involved (Fig. 4). There is speculation that β -cell dedifferentiation might be an adaptive mechanism to prevent cell death under stress conditions (BENSELLAM M *et al.*, 2018).

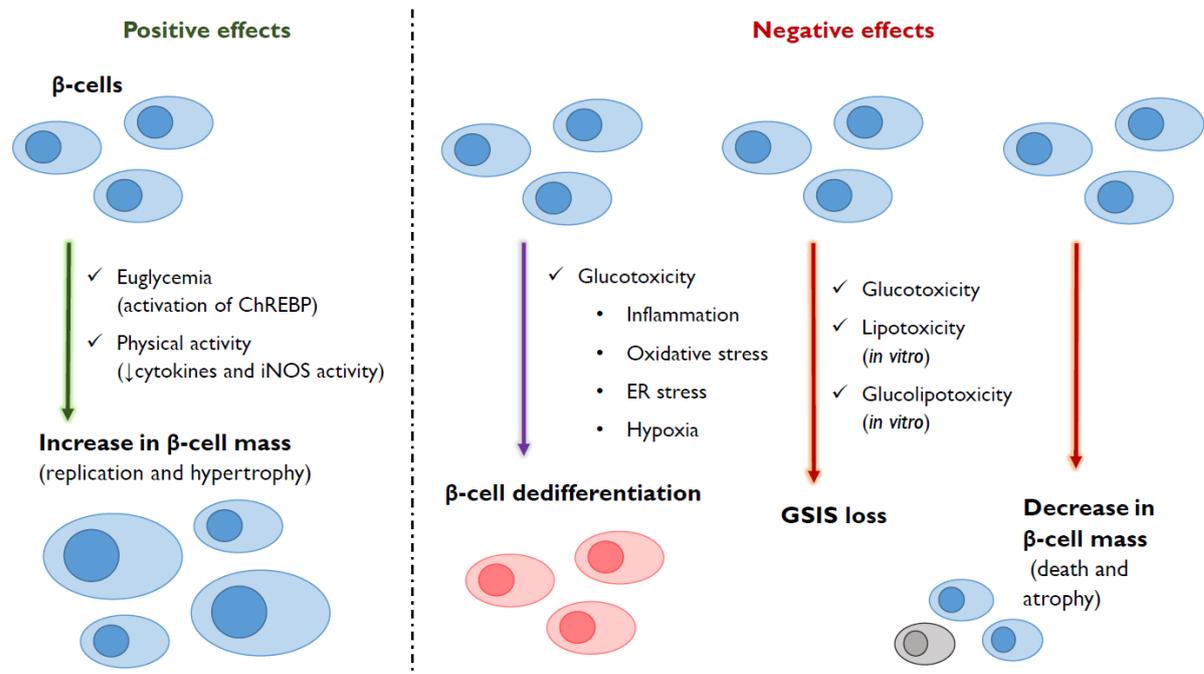


Fig. 4 – The total weight of β -cells is called β -cell mass. Its value is not static, it may increase (replication or hypertrophy of cells) or decrease (cell death or atrophy), in response to various stimuli. As an example, glucose activates a transcription factor named carbohydrate response element-binding protein (ChREBP), which causes glycolysis and β -cell proliferation (positive effect). Determining glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) is an easier way to evaluate the function of β -cells, and glucotoxicity is known to diminish its value (negative effect). Besides this, β -cells may also revert to a precursor-like state (dedifferentiate) under certain conditions (negative effect). The exact mechanism by which this takes place remains unknown, however, inflammation oxidative stress, endoplasmatic reticulum (ER) stress, and hypoxia are involved.

The β -cell mass maintenance involves a combination of multiple factors that may lead to different results: transdifferentiation of other endocrine cells to form new β -cells, neogenesis starting from ductal and extra-islet precursor cells that suffer differentiation, replication of existing β -cells, and apoptosis. This dynamic control maintains glucose levels within its physiological range. Studies using diabetic animal models found progenitor cell markers in dedifferentiated islets. Besides this, α -cell markers were identified in both animals and humans who had diabetes, indicating a possible α -cell to β -cell transdifferentiation. There is evidence of replication of β -cells that already exist, to tackle cell ablation or high physiological demand (for example in obesity cases, marked by insulin resistance) (HALBAN PA *et al.*, 2001). Other β -cell sources are still contestable. Although pancreatic duct and acinar cells have demonstrated the ability to dedifferentiate into a progenitor-like state, its β -cell restoring capability has not been confirmed (HALBAN PA *et al.*, 2001; AFELIK S, ROVIRA M, 2016; BENSELLAM M *et al.*, 2018; RATHWA N *et al.*, 2020).

Although β -cells look identical in an adult, they are actually heterogeneous regarding size, secretion, and gene expression. These differences may vary throughout the β -cells' life. Some phenotypic changes and ageing markers are already used to identify distinct stages. As an example, a brand new β -cell has a different phenotype when compared to a β -cell that was created from self-duplication. Another differing group was identified, consisting of less active islets with reduced blood flow. These can be referred to as "sleeping islets", as they become active when the demand for secretion increases after a partial pancreatectomy (PPx). In theory, we could stimulate their differentiation into mature cells, but the evidence they even exist is limited to *in vitro* data (WEIR GC *et al.*, 2013; JOHNSON JD, 2016).

3.3.1. Beta Cell Differentiation during the Pancreas Development

The differentiation of β -cells, which originate from embryonic stem cells, gives them distinctive functional and morphological characteristics. This process requires specific effectors and gene clusters, whose activation or repression is meticulously coordinated, according to time. Adjacent cells are the ones that regulate this process during embryogenesis. Around the 12th week, the pancreas differentiation segregates cells into endocrine or exocrine ones, and by the 20th week, the full maturation of the pancreas takes place. However, its full functionality is only achieved in infants with an age of approximately 6 months. Perinatal malnutrition increases the risk of developing T2D since β -cells become incapable of responding to the age-related increasing demand (BENSELLAM M *et al.*, 2018; RATHWA N *et al.*, 2020).

The first step of the pancreas development is the transformation of the endoderm germ layer into the definitive endoderm, characterized by the expression of SOX17 and FOXA2 genes. The definitive endoderm is not only the precursor of the pancreas' tissue, but also of the liver, the intestine, and the stomach. This common early progenitor makes these other tissues potential candidates for reprogramming techniques. In the second step, the definitive endoderm goes through a primitive gut tube and a posterior foregut stage. After these stages, occurs the differentiation into the pancreatic endoderm, resulting from the expression of PDX1, NKX6.1, SOX9, and PTF1A. Since all pancreatic cells derive from progenitors positive to PDX1, its expression is considered essential. In the third step, cells differentiate into either exocrine or endocrine pancreatic cells. Exocrine pancreatic cells split into duct cells, which retain SOX9 expression, or acinar cells, which retain PTF1A. Endocrine cells sustain PDX1 and NKX6.1 expression and express in addition NGN3 and NEUROD1. Notch signalling is an important differentiator between endocrine and exocrine cells, it has a

bimodal role since it is activated in the exocrine development and inhibited in the endocrine one. Finally, in the fourth step, endocrine cells gain their specificity and organize themselves into islet clusters (Fig. 5) (RANDOLPH LN *et al.*, 2019).

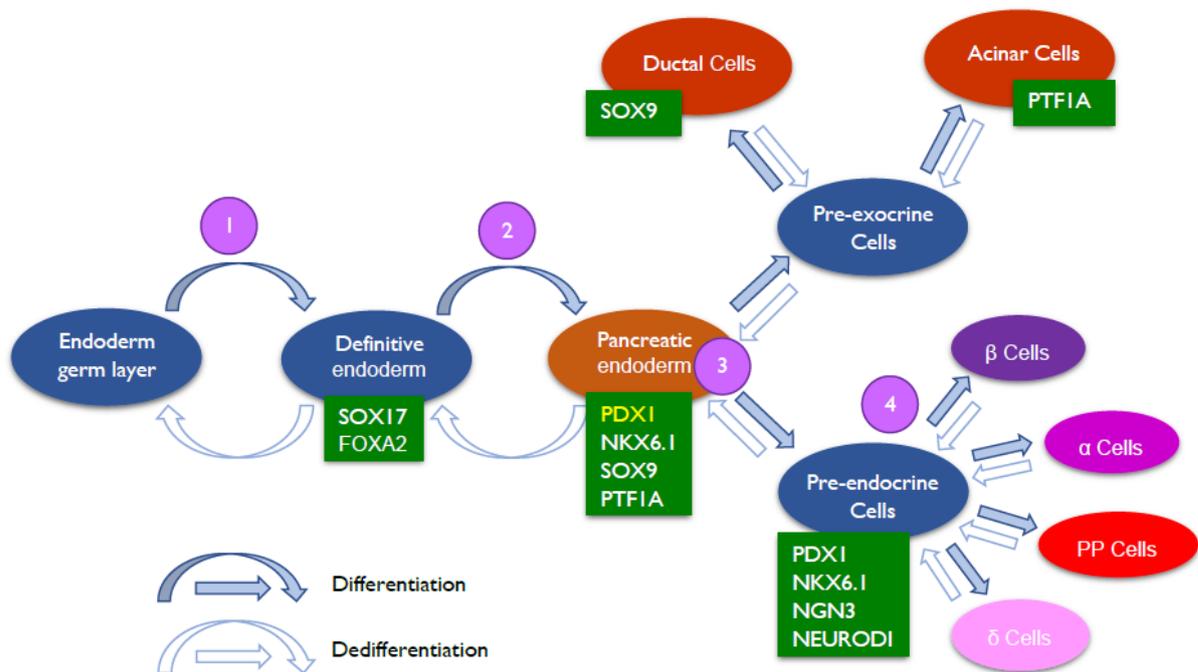


Fig. 5 – The pancreas development can be explained in 4 steps. **1st**) The endoderm germ layer differentiates into the definitive endoderm, expressing SOX17 and FOXA2. The definitive endoderm is the common early progenitor of the liver, the intestine, and the stomach, making these tissues potential candidates for reprogramming techniques. **2nd**) Definitive endoderm then differentiates into the pancreatic endoderm, with the expression of PDX1, NKX6.1, SOX9, and PTF1A. The expression of PDX1 is considered essential, since all pancreatic cells derive from progenitors that express this gene. **3rd**) Cells segregate into exocrine or endocrine pancreatic cells. Exocrine pancreatic cells form duct cells (expressing SOX9), or acinar cells (expressing PTF1A). On the other hand, endocrine cells express PDX1, NKX6.1, NGN3, and NEURODI. **4th**) Endocrine cells become more specific, while they form islet clusters. Adapted from BENSELLAM *et al.*, 2018.

3.3.2. Beta Cells` unique set of Functions

While each function of the β -cells is not unique, its combination is one of a kind. These cells regulate transcription and translation, have a stimulus-secretion coupling mechanism (that responds to concentration shifts of different metabolites), can regulate their secretory pathway and respond to neuronal signals (to control both cell function and secretion). Many endocrine cells have the function of regulating their secretion, but fail on the stimulus-secretion mechanism. On the other hand, liver cells are also capable of endocytosing glucose in an indefinite way, and to phosphorylate it using glucokinase, responding to small glucose changes, but they lack the secretory pathway regulation. For our insulin-producing cells to secrete the right amount of insulin at the right moment, we must create cells with some of

the same controlling mechanisms present in β -cells (HALBAN PA *et al.*, 2001; KIEFFER TJ, 2016).

Another characteristic is the low activity of lactate dehydrogenase and monocarboxylate pyruvate/lactate transporter, combined with increased activity of pyruvate carboxylase. This means that these cells have a reduced lactate output, which is directed to the mitochondria to produce higher amounts of adenosine triphosphate (ATP). Since intracellular ATP is a stimulus that controls insulin secretion, this control in enzymes' activity is quite relevant. Also, during insulin production, many specific events must happen for proinsulin to enter nascent granules in the Golgi apparatus. Having said this, expressing insulin in combination with enzymes PCI, PC2, and carboxypeptidase-H is not enough for insulin to be secreted (HALBAN PA *et al.*, 2001).

3.3.3. Beta Cell Regeneration

For cell-based therapies to become effective, finding safe β -cell regenerative pathways could be the answer. There are multiple theories suggesting how to induce β -cell proliferation. For example, the expansion of existing β -cells and the transdifferentiation of pancreatic cells with some plasticity (islet, acinar and ductal). Effective approaches need to target crucial transcription factors, such as the pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX-1), Neurogenin-3 (NGN3), and MAFA (Fig. 6). Studies in rodents have already identified some relevant molecules that may serve this purpose (JOHNOSON JD, 2016; RATHWA N *et al.*, 2020).

Some hormones influence β -cell differentiation and growth, functioning as β -cell mass regulators. For instance, insulin, glucagon, glucagon-like peptide-1 (GLP-1), gastric inhibitory polypeptide or glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP), gastrin, cholecystokinin (CCK), prolactin, and growth hormone (GH). Of all these hormones, incretins GLP-1 and GIP, also known as the gut hormones, are of utmost importance. They stimulate insulin secretion, as well as its production, and delay gastric emptying. This incretin effect is regulated by nutrient ingestion. When GLP-1 receptors present in β -cells are activated, they increase the expression of PDX-1. This means that this hormone reduces β -cell apoptosis and increases β -cell proliferation (Fig. 6). One more point to take into consideration when generating β -like cells is the presence of the GLP-1 receptor (HALBAN PA *et al.*, 2001; RATHWA N *et al.*, 2020).

Furthermore, a T1D rodent model revealed that ligand-bound thyroid hormone (TH) receptor facilitates the conversion of acinar cells to β -cells. This cell reprogramming results from

stimulation of the expression of NGN3, PDX-1 and MAFA. Additionally, after partial pancreatectomy (PPx), β -cells` proliferation is reinforced by the presence of parathyroid hormone-related protein inside these cells. Another potential receptor to address is the growth hormone secretagogue (GHS) receptor. Ghrelin is a ligand of this receptor, contributing for its activity; that includes reducing blood glucose levels by stimulating both β -cell regeneration and insulin secretion (Fig. 6) (RATHWA N *et al.*, 2020).

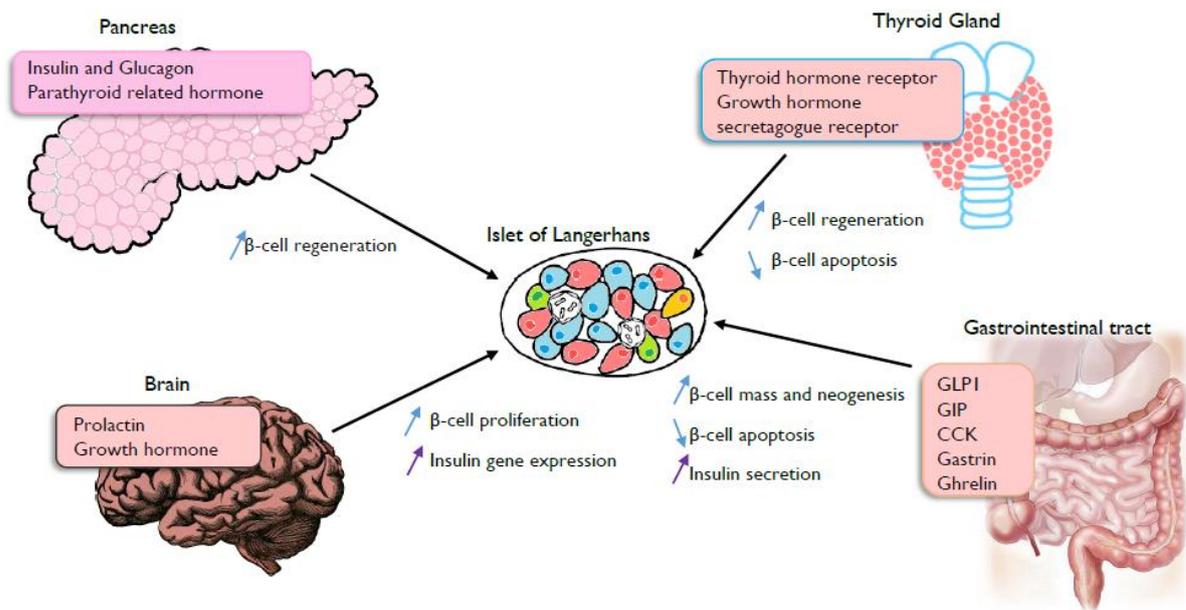


Fig. 6 – The effectiveness of cell-based therapies relies on the stimulation of β -cell regenerative pathways. Some hormones act that have an influence on β -cell differentiation and growth, functioning as β -cell mass regulators: prolactin and growth hormone increase both β -cell proliferation, and insulin gene expression; gut hormones (e.g., GLP-1, GIP) increase β -cell mass and neogenesis, decrease β -cell apoptosis and stimulate insulin secretion; and insulin, glucagon, parathyroid-related hormone, TH receptor, and GHS receptor all induce β -cell regeneration. GHS receptor properties make it a candidate for a potential diabetes` therapy. Adapted from RATHWA N *et al.*, 2020.

Besides hormones, there are also some small molecules, including nutrients and phytochemicals, that are known to induce regeneration. Verapamil, GIP and GLP-1 receptor (GLP-1R) agonists reduce apoptosis and increase the proliferation of β -cells in young human islets. Dipeptidyl peptidase-IV (DPP IV) inhibitors, dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase (DIRK) inhibitors, and Sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors induce proliferation. GLP-1, GIP-like peptide-1, GABA, and Statins increase transdifferentiation and neogenesis. Thiazolidinediones (TZD) have a protective effect, but serious adverse effects do not allow its common clinical use. Growth factors and hormones could also cause safety problems since they do not selectively increase proliferation of β -cells. Even so, some of these drug classes, already used in T2D treatment, have been studied in T1D as well (JOHNOSON JD, 2016; SKYLER JS, 2018; RATHWA N *et al.*, 2020).

4. Advanced Therapies in Type I Diabetes

The current epidemic of diabetes has instigated studies that aim to achieve pancreas regeneration. To develop a therapeutic solution, we need to uncover how to reinforce the endocrine islets' regenerative potential or to find a way to produce functional β -cells. Delivering such a solution would relieve many diabetes patients from the burden of daily insulin injections, where incorrect dosing often occurs and leads to complications in a short or long term. Complications are particularly worrying when it comes to children, to whom blood glucose fluctuations may endanger their lives. However, in order for advanced therapies to become more advantageous than current technical innovations, they must deliver insulin when it is needed, without the same concomitant risks (HALBAN PA *et al.*, 2001; ZHOU Q, MELTON D, 2018).

Pancreas transplantation was the very first approach, with complications such as acute rejection, thrombosis, infections, and cancers. Over the years techniques have been improved, as well as immunosuppressive therapies. Later on, came islet transplantation, a less invasive procedure, associated to less morbidity. Transplantation of β -cells has proved its success more than 40 years ago in diabetic rat models. Despite that, many complications reduce β -cell mass and cause failure in an initial phase (e.g., islet death, anoxia, loss of cells in the transplantation process). Nowadays, some T1D patients benefit from cadaveric islet transplantation, surviving without insulin for some years. However, considering there are few adequate cadaveric islets, which means there are few donors, the reduced cost-effectiveness, and because immunosuppression is required, only some exclusive patients apply. T1D patients diagnosed for more than 5 years, with difficulty in managing their glycaemia, and who have hypoglycaemia unawareness, which leads to severe episodes, are indicated for islet transplantation. Patients that had kidney transplantation are also selected since they already have to take immunosuppressive drugs chronically. Fortunately, immunosuppressive therapy is evolving, resulting in efficient drugs with less adverse effects, which may open horizons, since more patients may access this treatment. When this happens, islets must be produced on a larger scale, to respond to the increasing demand (SHAPIRO AM *et al.*, 2016; ELLIS C *et al.*, 2017; SKYLER JS, 2018; ZHOU Q, MELTON D, 2018; RATHWA N *et al.*, 2020).

The research spotlight is also centred on the replacement of β -cells, expanding them through regeneration or alternatively preserving them in the early stages of diabetes. Nowadays, different research groups are studying the stimulation of islet regeneration. This would solve the problem of lacking donor cells. However, the reduced capacity β -cells have

to regenerate, makes this an ambitious task. Therefore, different solutions must be found (Fig. 7) (ZHOU Q, MELTON D, 2018; RATHWA N *et al.*, 2020).

To form a non- β -cell that produces insulin, scientists started by introducing insulin genes, as well as stimulus-secretion proteins found in β -cells. The first example was in 1983, with the expression of insulin on a non- β -cell of a mouse model. However, the expression of insulin alone does not present us with adequate substitutes for this complex cell. Creating a perfect substitute for β -cells, comprising all of its functions, may not be feasible. We have to identify which characteristics are essential for a non- β -cell to function as a metabolic controller. Combining only one or two of the functions present in β -cells will not allow created cells to properly control their insulin secretion (HALBAN PA *et al.*, 2001; ELLIS C *et al.*, 2017).

To this day, we are still looking for a solution, one that is trustworthy and standardized, ideally without the need for immunosuppressive medicines. It is already possible to change immune characteristics in cells, using gene therapy, so that our immune system does not recognize them, however, this poses safety issues. Nevertheless, first, we need to find a way to produce insulin-producing cells in an unlimited way (HALBAN PA *et al.*, 2001; ELLIS C *et al.*, 2017; ZHOU Q, MELTON D, 2018).

4.1. How to produce Beta Cells

Across the years different cells were used in different protocols, to achieve a functional insulin-producing cell that mimics β -cells as closely as possible. To reach metabolic control, cells must quickly change their insulin output, so they do not cause hyperglycaemia or hypoglycaemia. Unfortunately, most altered cells can only constitutively produce insulin, meaning they only produce basal insulin and they do not adapt to a physiological responding system. It is necessary to create a cell that contains the sensing and releasing apparatus present in β -cells (HALBAN PA *et al.*, 2001).

4.1.1. Differentiating pluripotent Stem Cells

Stem cells are capable of constantly renewing themselves, and can differentiate into all or many cell types, including β -cells. One potential diabetes treatment and cure is the generation of β -cells, useful for both T1D, where these cells are destroyed, and T2D, where they are dysfunctional. For this treatment to be effective each patient needs to have at least 1×10^8 to 1×10^9 functional β -cells. One possible solution is creating the same conditions

that occur during natural pancreatic development. Protocols are being perfected, allowing researchers to create insulin-producing cells increasingly more similar to β -cells, and in almost limitless amounts (KIEFFER TJ, 2016; ELLIS C *et al.*, 2017; RANDOLPH LN *et al.*, 2019).

There are two methods to achieve the desired cells. One where insulin-producing cells consist of stem-cell-derivate β -like cells, and other that relies on *in situ* reprogramming. The first one is more direct, where human pluripotent stem cells (hPSCs) are differentiated into β -cells. This group of cells includes human embryonic stem cells (hESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs). The advantage of hPSCs is their quick and indefinite growth, which gives us a limitless source of β -cells (Fig. 7). For this to be an applicable diabetes treatment an efficient differentiation protocol must be developed, with sequential exposure to pre-determined doses of specific molecules. In the second type of cell, we use the concept of reprogramming to convert any cell type, obviating rejection but not autoimmunity. In a similar manner to the first technique, there is the need for an efficient selection of transcription factors to trigger this process (KIEFFER TJ, 2016; ELLIS C *et al.*, 2017; SKYLER JS, 2018; RANDOLPH LN *et al.*, 2019).

Both methods may revolutionize regenerative medicine, which is currently associated with a high risk of failure. Few patients are indicated for this therapy, due to the few donor tissues and immunosuppressive treatment complications. For our cells to be effective we must first understand all the steps that take place during human embryogenesis, more specifically during the pancreatic β -cell development. Cardiomyocytes have already been generated with success using iPSCs, but β -cells have more complex development stages (KIEFFER TJ, 2016; RANDOLPH LN *et al.*, 2019).

After extensive research, Dr. Douglas Melton's group was able to find a method that allows the production of functional β -like cells, which effectively produce insulin when necessary. In 2016 they applied their protocol to iPSCs, which involves 2 steps. Firstly, a signalling path inhibitor is used to induce the differentiation of iPSCs into pancreatic progenitor cells. Secondly, many factors are introduced to stimulate its differentiation into endocrine cells, followed by the formation of β -cells. This method enabled the production of functional β -like cells, close to human β -cells, starting with cells from diabetic donors (Fig. 7). Even though these were promising results, the number of individuals used was reduced and the autoimmune cause of the disease needs to be addressed to reach clinical efficacy (RANDOLPH LN *et al.*, 2019).

Another alternative is *in vivo* maturation of immature islets. Using hESCs that differentiate into pancreatic endoderm cells, and transplanting them so the maturation process finishes *in vivo* during 3 to 4 months (Fig. 7). In mice with diabetes, functional β -like cells were originated from pancreatic progenitor cells. Protocols used fewer reagents and produced cells in shorter periods. However, they still need to be improved when it comes to efficiency. Although these cells did not have all functions, they were able to prevent and reverse diabetes in mice that develop the disease spontaneously. Nevertheless, when considering results taken from animal models, we must always keep in mind that they have more efficient mechanisms to uptake glucose without insulin. In animals, even systems that do not respond to acute stimulation show promising results. To avoid false hopes, we must confirm that the system has a close resemblance to human physiology, through robust testing (HALBAN PA *et al.*, 2001; KIEFFER TJ, 2016; ELLIS C *et al.*, 2017).

Clinical trials, performed all over the world, are our best tool to ensure the safety and efficacy of cell therapy. There are studies using different sources of stem cells (ex.: mesenchymal stem cells), and focussing on different DM stages. As an example, the company ViaCyte has been developing a strategy, which relies on differentiation and maturation of hESCs to occur spontaneously. This way pancreatic progenitor cells, that are grafted into the patients inside a macro-encapsulation device, are able to transform into functional β -cells (Fig. 7). Inclusion criteria says that diabetes patients must have a diagnosis longer than 3 years, and have a stable treatment. During the maturation process, this procedure has a limitation, patients must monitor blood glucose and inject exogenous insulin since cells are not immediately functional. When functional cells are achieved there is still the need to monitor glucose values to prevent hypoglycaemic events, given that immature β -cells may secrete excessive amounts of basal insulin. A phase I/II trial (NCT02239354) started in 2014, however, its results are still unpublished. According to the website ClinicalTrials.gov, the expected completion date is 30 of June of 2021 and the required reporting date is 30 of June of 2022 (JOHNSON JD, 2016; KIEFFER TJ, 2016; ELLIS C *et al.*, 2017; RANDOLPH LN *et al.*, 2019).

Despite the hopeful results shown by the differentiation of hPSC lines, there is still the need of improving production efficiency and reducing the variability among cell lines. The existence of different developmental pathways that allow the formation of β -cells may contribute to such variability. After establishing the right protocol, measures that serve as both quality controls and inter batch variability reducers must be determined (RANDOLPH LN *et al.*, 2019).

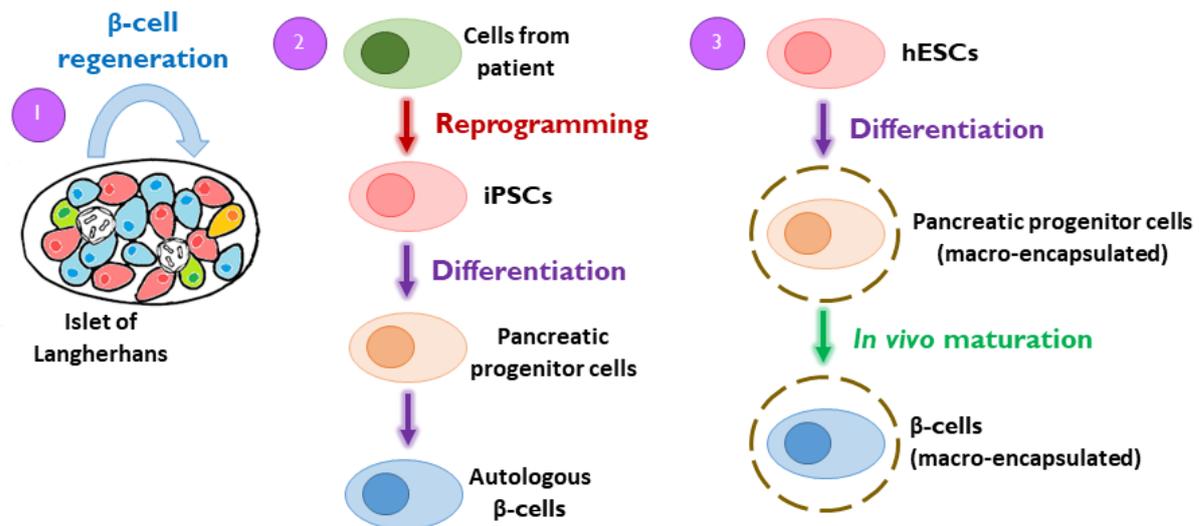


Fig. 7 – Transplantation of β -cells has proved its success more than 40 years ago; however, there are limitations due to the lack of donor cells. To develop a viable therapeutic solution, we must find an unlimited source of insulin-producing cells. **1)** Different research groups are trying to stimulate islet regeneration, but the reduced regenerative capacity of β -cells makes this task arduous. Therefore, a different solution must be found. **2)** Across the years different cells were used in different protocols, to achieve a functional insulin-producing cell that mimics β -cells as closely as possible. Human pluripotent stem cells (hPSCs) may be the answer, both human embryonic stem cells (hESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs), have been used in multiple protocols. The advantage of hPSCs is their capacity to constantly renew themselves. There are two methods to achieve the desired cells. Protocols using iPSCs start with cells from the patient and have 2 steps. First, the differentiation of iPSCs into pancreatic progenitor cells is stimulated using a signaling path inhibitor. Second, differentiation into endocrine cells occurs, followed by the formation of β -cells, is stimulated using many factors. The final result is the production of functional β -like cells, close to human β -cells. **3)** An alternative approach is the maturation of immature islets *in vivo* during 3 to 4 months, after transplanting endoderm cells, originated from the differentiation of hESCs. These endoderm cells are placed inside a macro-encapsulation device.

4.1.2. Reprogramming Somatic Cells

Reprogramming somatic cells may offer an alternative to pluripotent stem cells. As an example, stimulating the expression of the transcription factors MAFA and PDX1, allowed α -cells to behave similarly to β -cells (RANDOLPH LN *et al.*, 2019). Furthermore, in 2008 the same group led by Doctor Melton, reprogrammed murine exocrine cells from the pancreas, using 3 transcription factors, MAFA, PDX1, and NGN3. Unfortunately, the formation of islets did not occur, and further studies have confirmed the importance of islets formation for the cells to mature and survive (RANDOLPH LN *et al.*, 2019).

Endodermal-derived cells include exocrine pancreas and liver cells, among others with the same definitive endoderm progenitor. Liver cells were used in some of the first attempts, where important transcription factors, such as PDX1, were applied. Results were promising since potential insulin-producing cells were produced. Unfortunately, the immune system of T1D patients also targets insulin, leading to the recurrence of T1D autoimmunity, and attack

of liver cells expressing insulin-associated genes by T cells. There are still some barriers to overcome in order to find a successful therapy, namely the survival of the cells against these different immune attacks (HALBAN PA *et al.*, 2001; RANDOLPH LN *et al.*, 2019).

4.2. Transplantation Sites

The next challenge is finding the optimal site to transplant insulin-producing cells. The perfect transplantation site would allow easy graft removal, have an adequate volume to contain all the cells, and have sufficient vascularization. The pancreas is the first location that comes to mind, but autoimmunity may be more intense in this site and invasive treatment, such as the infusion of cells, can cause life-threatening pancreatitis. Therefore, the portal vein has been the preferred transplantation site in different studies already applied to phase III clinical trials. Islets stay inside small vessels in the liver, where they produce insulin when stimulated. The portal venous system allows insulin to be secreted into the portal circulation, imitating its natural secretion, and is highly vascularized, increasing the cells' survival. Disadvantages include difficulty to evaluate the cells' function and maturity through biopsy and potentially lethal complications (thrombosis, bleeding, and hepatic steatosis) (Fig. 8) (KIEFFER TJ, 2016; ELLIS C *et al.*, 2017).

Alternative implantation sites include the omentum, the gastrointestinal mucosa, the intramuscular space, the bone marrow, and the subcutaneous space. The omentum develops in the peritoneal cavity, and it consists of two mesothelial sheets enveloping adipocytes. This tissue is highly vascularized, and it performs simple immune functions, including cytokine production, cytotoxic reactions, and allorecognition. The omentum presents advantages for insulin-producing cells since this location is easy to access and allows cell products to drain directly into the portal vein. For cells to survive they were implanted inside a biodegradable scaffold. In animals, cells showed less metabolic stress, and in the first clinical trial (Phase I/II NCT02213003), two diabetes patients achieved control of glucose values, without exogenous insulin. Although less appropriate sites, like the intramuscular space and the bone marrow, showed some positive results in humans, these were not very evident, neither consistent. The subcutaneous space may present some advantages, allowing easy graft monitoring and removal, but lack sufficient vascularization, and the cells require graft support to survive (Fig. 8) (PLATELL C *et al.*, 2000; ELLIS C *et al.*, 2017).

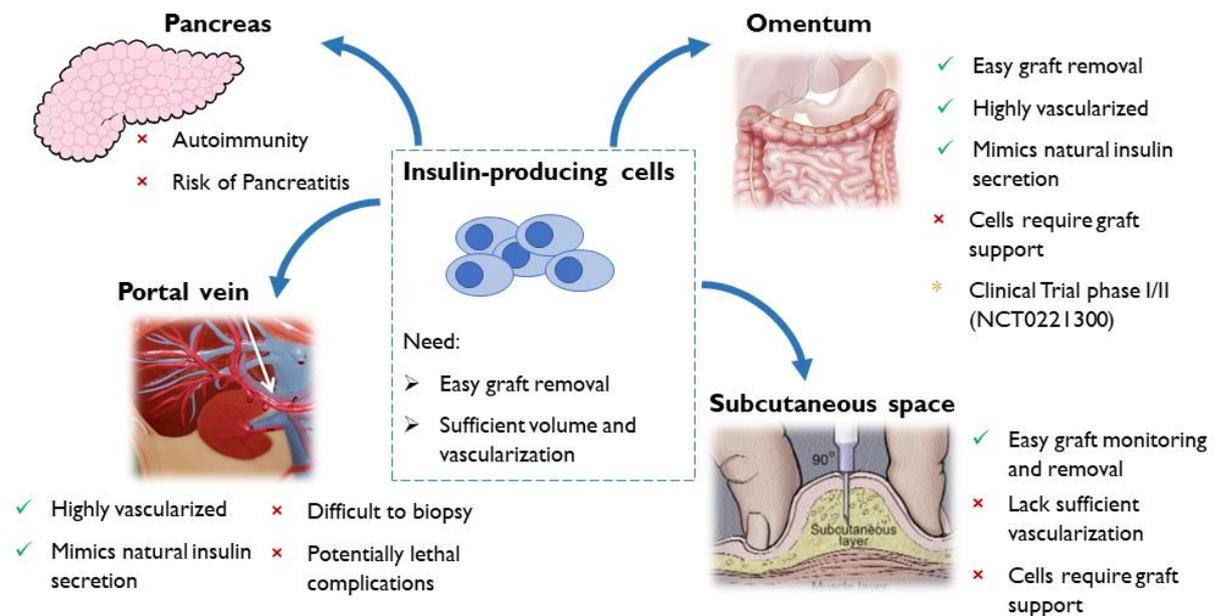


Fig. 8 – Finding the optimum transplantation site involves different criteria. We must ensure the practice is safe, has few adverse effects, allows cells to survive, and mimics natural secretion. Even though the pancreas looks like the perfect site, transplanting cells in this organ would result in an intense autoimmune response, and risk of potentially lethal pancreatitis. The portal vein is the most commonly used transplantation site, already applied in phase III clinical trials. However, it has the risk of complications, like thrombosis, bleeding, and hepatic steatosis. More recently, insulin-producing cells were placed, inside a biodegradable scaffold, in the omentum. Promising results were obtained, making the omentum the potential preferable transplantation site.

5. How to keep Cells Alive

After finding an unlimited source of functional insulin-producing cells, we must make sure they have access to glucose, oxygen, and nutrients, and that they can secrete insulin into the bloodstream. If one of these points fails, the cells will not function properly and most importantly, they will perish. Current immunosuppressive therapies offer only a transient benefit, with a decline in beta cell function after a short time. Some alternative solutions are encapsulation, increasing the regulatory T-cell population, and immune-engineering. The first one (encapsulation), provides cells a safe environment, since the structure surrounding them does not allow immune cells to reach and attack β -cells, but nutrients, on the other hand, can enter by diffusion. The second solution (increasing Treg cells), allows us to induce immune tolerance. The third one (immune-engineering), could prevent immune rejection towards the allogeneic cells, if proteins that cause this reaction are removed (LEW B *et al.*, 2018; SKYLER JS, 2018; RANDOLPH LN *et al.*, 2019; RATHWA N *et al.*, 2020).

5.1. Immunosuppressive Therapy

To treat T1D, we need to find a way to reduce or block immune attacks (acute and chronic rejection, as well as autoimmunity). An individualized approach may reduce the first two immune responses, but it does not prevent the recurrence of the disease. Immunosuppression is one way to tackle this issue. However, its lack of specificity leads to serious side effects and short-term efficacy. As an example, glucocorticoids, commonly used immunosuppressive agents, are known to cause insulin resistance and to diminish the pancreas endocrine function. Even regimens without glucocorticoids failed to keep the cells functioning because autoantibodies that function as type 1 diabetes` markers reappeared. Fortunately, immunosuppressive regimens are becoming less damaging to insulin-producing cells (HALBAN PA *et al.*, 2001; NIKOLIC T *et al.*, 2020).

Strategies based on islet transplantation have already been accepted, with positive results seen in stage III clinical trials. Even with earlier protocols, where immunosuppression is required, the success rates were promising. For 5 years, 50 % of the participants remained insulin-independent, and 73 % had better glycaemic control over the following 10 years. The short insulin-independence period is caused by rapid cell loss after transplantation, apoptosis, and in the longer term, due to toxicity towards the islets, that is caused by current immunosuppressive therapy (ELLIS C *et al.*, 2017).

The major issue is the chronic need for immunosuppression, since these drugs cause iatrogenic malignancy, affect renal function, and increase the risk of other diseases (e.g. cancer, infection). We must compare the adverse effects of chronic immunosuppression with the problems associated with chronic DM. A new therapy must be found, one that does not have this negative effect on cells, or such serious adverse effects. Only then can immunosuppression be considered a viable solution (HALBAN PA *et al.*, 2001; SHAPIRO AM *et al.*, 2016).

5.2. Inducing Immune Tolerance

In order to achieve immune tolerance, we need to amend the pathogenic factors that cause this autoimmune disease and prevent transplant rejection. While this tolerance has already been achieved in humans, we still need to rectify protocols for T1D patients. Among autoantigens that characterize DM, the most relevant one recognizes insulin, promoting T-cell reactivity. The dendritic cell (DC) is an antigen-presenting cell (APC), that functions as a sentinel, capturing proteins, processing them into peptides and presenting them to naïve T-cells. If they consider the site “normal” they activate regulatory T-cells, but if they consider it

“abnormal” autoreactive T-cells are activated, releasing pro-inflammatory molecules in the islets. In this case, insulin and β -cell peptides are considered “abnormal”, and an inflammatory reaction starts on the islets. To address autoimmunity, we may inhibit the stimulation of coreceptors on autoreactive/antiseif T-cells, preventing their activation, and/or stimulate the expansion of regulatory T-cells (BOT A *et al.*, 2002; PASQUALI L *et al.*, 2008).

A viable solution should be specific, modulating our immune system without affecting our response to infections or tumours. Using antigens or peptides, we should be able to selectively immunosuppress, since we are using the exact molecules that trigger autoimmunity. To address this immune reaction, we may inhibit the stimulation of coreceptors on autoreactive/antiseif T-cells, using specific peptides to inactivate them directly, stimulate the expansion of regulatory T-cells, or prevent the differentiation of autoreactive T-cells. The first endeavours were ineffective, preventing only temporarily the autoreactive process, until the autoimmune attack surpassed β -cell regeneration. There is the speculation that delivering antigens or peptides to areas where regulatory cytokines are produced (e.g., lungs, gut) may trigger mechanisms, leading to tolerance. For immunotolerance to be achieved, peptides should be released slowly, maximising their exposure in lymphoid tissue. Some potential strategies to ameliorate the pharmacokinetics of antigens are oil-in-water emulsions, and also DNA vaccination (BOT A *et al.*, 2002; PASQUALI L *et al.*, 2008; NIKOLIC T *et al.*, 2020).

A recent trial focused on tolerogenic dendritic cells (tolDCs), which are antigen-specific, to present the pro-insulin antigen to regulatory T-cells. These tolDCs were injected intradermally in long-standing T1D patients, to determine the safety of this procedure. The results showed stable diabetic control and β -cell function (determined before and after injecting tolDCs). There were no critical or irreversible side effects, no systemic immune suppression, no allergy to insulin, and no interference with exogenous insulin. To determine whether or not tolDCs may be a curative therapy for T1D, more tests must be undertaken, using larger and more diverse populations of diabetes patients (NIKOLIC T *et al.*, 2020).

5.3. Using Support Systems

In the pancreas, β -cells are surrounded by a complex architecture, which can be replaced by various support systems. Using biomaterials, we are not only shielding cells from stress but also allowing them to adhere, which is important for the cells` development, differentiation, growth, and viability (ELLIS C *et al.*, 2017).

Encapsulating islets may be a way to protect implanted cells from the immune system, without using immunosuppressive agents. This option could be safer and more beneficial to patients since encapsulation has three advantages, it protects and contains the cells, making them easily retrievable, and it allows the addition of factors, increasing their protection and survival. Even though such an idea is not new, there has been a search for a functional capsule or immune barrier. This synthetic material must be able to keep the immune system away from the implanted cells, while giving them conditions to survive and to secrete insulin when glucose levels are high. For this to happen cytokines must not be able to enter the capsule, but on the contrary, glucose, oxygen, and nutrients must enter, in order to keep these cells alive and functioning (HALBAN PA *et al.*, 2001; KIEFFER TJ, 2016; ELLIS C *et al.*, 2017).

To reach clinical application, we need to overcome some remaining challenges. For example, preventing hypoxia, a big issue after the transplantation, due to the lack of vasculature, and improving the cell function. As discussed before, in the section regarding beta cell regeneration, some of the drugs currently used to treat T2D decrease the apoptosis of β -cells and increase insulin secretion in the presence of nutrients. In a specific study, microspheres containing exenatide, a glucagon-like peptide-1 analog, were placed inside alginate capsules containing porcine islets. The drug was released throughout 21 days, increasing the cells' longevity and functionality (LEW B *et al.*, 2018).

6. Conclusion

Some exciting solutions to address diabetes are currently under investigation, but we cannot forget that science moves slowly, with the need for constant confirmation and refinement. The major barriers to a T1D cure lie in the reduced regenerative capacity of the β -cells and in the immune system since we still cannot inhibit autoimmunity without causing adverse effects. Without a solution to tackle the autoimmune attack, regenerative strategies cannot have a long-lasting beneficial effect. We need to find strategies that not only allow us to obtain mature β -cells but also keep them functional over time, ideally without the need for immunosuppression (SKYLER JS, 2018; RANDOLPH LN *et al.*, 2019; RATHWA N *et al.*, 2020).

Current methods still lack reproducibility and are unable to scale up to a potentially increasing number of T1D patients indicated for islet transplant. The best solution for obtaining fully functional insulin-producing cells may lie in islet-like structures. This culture with 4 dimensions would contain various types of cells that communicate through time using progenitors. This approach mimics the natural niche, improving cell development since pure beta-cells lack the paracrine interactions that take place in the islet (KIEFFER TJ, 2016; SKYLER JS, 2018).

Today we can understand better how the pancreas works, with new findings constantly unfolding. Diabetes treatment has improved significantly over the last generation, increasing life's expectancy and quality for DM patients. Even though the path is still long, we are, step by step, getting closer to finding a better solution for this chronic disease.

7. References

- A.D.A.M., Inc. - <https://medlineplus.gov/ency/article/000305.htm> [Consult. 23 dez. 2020]. Disponível em: <https://medlineplus.gov/ency/article/000305.htm>
- AFELIK, Solomon; ROVIRA, Meritxell - Pancreatic β -cell regeneration: Facultative or dedicated progenitors? **Molecular and Cellular Endocrinology**. ISSN 18728057. 445:2017) 85–94. doi: 10.1016/j.mce.2016.11.008.
- BALAZARD, F. *et al.* - Association of environmental markers with childhood type 1 diabetes mellitus revealed by a long questionnaire on early life exposures and lifestyle in a case-control study. **BMC Public Health**. ISSN 14712458. 16:1 (2016) 1–10. doi: 10.1186/s12889-016-3690-9.
- BENSELLAM, Mohammed; JONAS, Jean Christophe; LAYBUTT, D. Ross - Mechanisms of β -cell dedifferentiation in diabetes: Recent findings and future research directions. **Journal of Endocrinology**. ISSN 14796805. 236:2 (2018) R109–R143. doi: 10.1530/JOE-17-0516.
- BOT, Adrian; PHILLIPS, William J.; HERRATH, Matthias VON - Antigen-based immune modulation: DNA vectors and beyond. **Expert Opinion on Biological Therapy**. ISSN 14712598. 2:8 (2002) 929–942. doi: 10.1517/14712598.2.8.929.
- ELLIS, Cara; RAMZY, Adam; KIEFFER, Timothy J. - Regenerative medicine and cell-based approaches to restore pancreatic function. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**. ISSN 17595053. 14:10 (2017) 612–628. doi: 10.1038/nrgastro.2017.93.
- HALBAN, Philippe A. *et al.* - Gene and Cell-Replacement Therapy in the Treatment of Type 1 Diabetes: How High Must the Standards Be Set? **Diabetes**. ISSN 00121797. 50:10 (2001) 2181–2191. doi: 10.2337/diabetes.50.10.2181.
- JOHANNESSEN, Bjarki *et al.* - Toward beta cell replacement for diabetes. **The EMBO Journal**. ISSN 0261-4189. 34:7 (2015) 841–855. doi: 10.15252/embj.201490685.
- JOHNSON, James D. - The quest to make fully functional human pancreatic beta cells from embryonic stem cells: climbing a mountain in the clouds. **Diabetologia**. ISSN 14320428. 59:10 (2016) 2047–2057. doi: 10.1007/s00125-016-4059-4.
- KIEFFER, Timothy J. - Closing in on Mass Production of Mature Human Beta Cells. **Cell Stem Cell**. ISSN 18759777. 18:6 (2016) 699–702. doi: 10.1016/j.stem.2016.05.014.
- LEW, Benjamin *et al.* - Sustained exenatide delivery via intracapsular microspheres for improved survival and function of microencapsulated porcine islets. **Drug Delivery and**

Translational Research. ISSN 21903948. 8:3 (2018) 857–862. doi: 10.1007/s13346-018-0484-x.

NIKOLIC, Tatjana *et al.* - Safety and feasibility of intradermal injection with tolerogenic dendritic cells pulsed with proinsulin peptide—for type I diabetes. **The Lancet Diabetes and Endocrinology.** ISSN 22138595. 8:6 (2020) 470–472. doi: 10.1016/S2213-8587(20)30104-2.

PASQUALI, Lorenzo; GIANNOUKAKIS, Nick; TRUCCO, Massimo - Induction of immune tolerance to facilitate β cell regeneration in type I diabetes. **Advanced Drug Delivery Reviews.** ISSN 0169409X. 60:2 (2008) 106–113. doi: 10.1016/j.addr.2007.08.032.

PLATELL, Cameron *et al.* - The omentum. **Journal of the American Medical Association.** ISSN 23768118. 86:23 (2000) 1785. doi: 10.1001/jama.1926.02670490047029.

RANDOLPH, Lauren N.; BHATTACHARYYA, Agamoni; LIAN, Xiaojun Lance - Cellular reprogramming for curing diabetes. **Regen Eng Transl Med.** 5:1 (2019) 42–52. doi: 10.1007/s40883-018-0082-y.Human.

RATHWA, Nirali *et al.* - β -cell replenishment: Possible curative approaches for diabetes mellitus. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases.** ISSN 15903729. 30:11 (2020) 1870–1881. doi: 10.1016/j.numecd.2020.08.006.

SHAPIRO, A. M. Jame.; POKRYWCZYNSKA, Marta; RICORDI, Camillo - Clinical pancreatic islet transplantation. **Nature Reviews Endocrinology.** ISSN 17595037. 13:5 (2017) 268–277. doi: 10.1038/nrendo.2016.178.

SKYLER JS. Hope vs hype: where are we in type I diabetes? **Diabetologia.** 2018 Mar;61(3):509-516. doi: 10.1007/s00125-017-4530-x. Epub 2017 Dec 23. PMID: 29275427.

Patent US2020345815A1. THOMAS, Helen E. (Fitzroy) *et al.* 2020, 26 p.,

VANIKAR, Aruna V.; TRIVEDI, Hargovind L.; THAKKAR, Umang G. - Stem cell therapy emerging as the key player in treating type I diabetes mellitus. **Cytotherapy.** ISSN 14772566. 18:9 (2016) 1077–1086. doi: 10.1016/j.jcyt.2016.06.006.

VIACYTE - **A Safety, Tolerability, and Efficacy Study of VC-01™ Combination Product in Subjects With Type I Diabetes Mellitus** [ClinicalTrials.gov] [cited 5 Mar 2021]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02239354>>.

WEIR, Gordon C.; AGUAYO-MAZZUCATO, Cristina; BONNER-WEIR, Susan - B-cell dedifferentiation in diabetes is important, but what is it. **Islets.** ISSN 19382022. 5:5 (2013)

233–237. doi: 10.4161/isl.27494.

ZHOU, Qiao; MELTON, Douglas A. - Pancreas regeneration. **Nature**. ISSN 14764687. 557:7705 (2018) 351–358. doi: 10.1038/s41586-018-0088-0.