



Mariana Moreira Coelho Silveira

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Modelos experimentais na Diabetes *Mellitus* Tipo I” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, da Dra. Isabel Folhas, do Dr. Vitor Dias e da Professora Doutora Isabel Vitória Figueiredo e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Capa disponível em: https://usercontent2.hubstatic.com/4795235_f520.jpg

Mariana Moreira Coelho Silveira

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Modelos experimentais na Diabetes *Mellitus* Tipo I” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, da Dra. Isabel Folhas, do Dr. Vítor Dias e da Professora Doutora Isabel Vitória Figueiredo e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2017

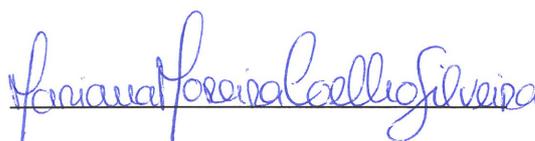


UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Mariana Moreira Coelho Silveira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011165178, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Modelos experimentais na Diabetes *Mellitus* Tipo I” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 13 de setembro de 2017.



(Mariana Moreira Coelho Silveira)

Agradecimentos

Aos meus pais e à minha irmã

À minha família

Aos meus amigos de casa

Aos meus amigos de Coimbra

À Professora Isabel Vitória Figueiredo

À Dra. Isabel Folhas e ao Dr. Vítor Dias

A todos vós, que me ajudaram a crescer das mais variadas formas, não tenho palavras suficientes para agradecer

A todos vós, muito obrigada.

“Every ending has a new beginning.”

(Santosh Kalwar)

“Success is a science; if you have the conditions, you get the result.”

Oscar Wilde

Abreviaturas

ADP – Adenosina Difosfato.

AMP – Adenosina monofosfato.

AMPK – AMP proteína-cinase.

COE – Contraceção Oral de Emergência.

DMI – Diabetes *Mellitus* Tipo 1.

DM2 – Diabetes *Mellitus* Tipo 2.

DNA – Ácido Desoxirribonucleico.

GMP – *Good Manufacturing Practice*.

Via IP – Via intraperitoneal.

IPC – *In Process Control*.

MHC – Complexo Major de Histocompatibilidade.

Mini-Tabs – *Mini-Tablets*.

MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica.

MSRM – Medicamento Sujeito a Receita Médica.

Murganho NOD – Murganho *Non Obese Diabetic*.

NAD⁺ – Dinucleótido de Nicotinamida Adenina.

PARP – Poli-ADP-Ribose Polimerase.

Rato BB – Rato *Biobreeding*.

RE – Retículo Endoplasmático.

ROS – *Reactive Oxygen Species* (Espécies reativas de oxigénio).

SASUC – Serviços de Ação Social da Universidade de Coimbra.

STZ – Streptozotocina / *Streptozotocin*.

T1D – *Type I Diabetes*.

UC – Universidade de Coimbra.

Índice

Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Resumo.....	6
Abstract	6
Introdução	7
Análise SWOT	8
Forças – <i>Strengths</i>	8
Fraquezas – <i>Weaknesses</i>	10
Oportunidades – <i>Opportunities</i>	10
Ameaças - <i>Threats</i>	11
Caso Clínico	12
Conclusão	13
Bibliografia.....	14

Parte II - Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Resumo.....	16
Abstract	16
Índice de Figuras	17
Introdução	18
Análise SWOT	19
Forças – <i>Strengths</i>	19
Fraquezas – <i>Weaknesses</i>	20
Oportunidades – <i>Opportunities</i>	20
Ameaças - <i>Threats</i>	20
Introdução de uma nova forma farmacêutica no Iberfar-Indústria Farmacêutica S.A. ...	21
Conclusão	21
Bibliografia.....	23

Parte III - Experimentação animal na Diabetes Mellitus Tipo I

Resumo.....	25
Abstract	25
Índice de Figuras	26
Índice de Tabelas	26
Índice de Gráficos	27
Introdução	28

Experimentação animal na Diabetes Mellitus Tipo I	29
Diabetes Mellitus Tipo I	29
Modelos animais para a DMI	29
Indução química da DMI com Streptozotocina	33
Utilização de modelos de indução da DMI por Streptozotocina	34
Ensaio pré-clínico em que foram aplicados estes modelos animais	36
Comparação entre os vários estudos	38
Estudo piloto para a caracterização de uma nova formulação à base de polímero de insulina	39
Material e Método	39
Apresentação de Resultados e Discussão	40
Conclusão	50
Bibliografia	51
Anexos	53
Anexo I – “New formulation of oral insulin”	53

Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Resumo

Tendo por referência o paradigma socioeconómico atual da profissão de farmacêutico, o estágio na Farmácia Isabel Folhas permitiu compreender que a Farmácia Comunitária já não se cinge apenas à dispensa de medicamentos, mas que nos últimos anos sofreu mudanças acentuadas e é agora um pilar chave na saúde pública, evoluindo no sentido da melhoria dos resultados clínicos obtidos com a utilização de medicamentos.

Por outro lado, desencadeia-se uma perceção da tremenda importância que um bom sistema de gestão de uma farmácia tem, cabendo também nas funções de um farmacêutico o equilíbrio das necessidades do doente com a farmácia, tendo sempre por objetivo a saúde da população que a mesma abrange.

O estágio curricular foi mais do que uma obrigação para terminar o percurso académico, foi sim uma aproximação valiosa à realidade em que vivemos, bem como uma apresentação, ainda que breve, do mercado de trabalho que indubitavelmente teremos que enfrentar num futuro próximo.

Abstract

Nowadays, a new social-economic paradigm has been developed about pharmacists, and the internship in Farmácia Isabel Folhas has allowed the understanding that the Community Service Pharmacy is not just the trade-in of medicines, but it has also suffered considerable changes and is now a key column of the good public health, evolving to improve the clinical outcomes of medicines' usage.

On the other hand, there is the possibility to have the perception of how important a good management system is, in a pharmacy, and that a pharmacist's role, between other functions, is to create a balance between the patient's needs and the pharmacy, always aiming towards its population's health condition.

The curricular internship, which was more than a duty only to finish the course, was a valuable encounter with the reality which we live in, as well as a brief introduction to the working market we will certainly have to face in a near future.

Introdução

Estamos, atualmente, num ponto de desenvolvimento da nossa sociedade em que os paradigmas pré-concebidos nas mais diversas áreas, estão em constante mutação. Não sendo exceção, a atividade farmacêutica tem vindo a confrontar-se com profundas mudanças, experienciando maior crescimento e melhorias significativas. Ainda que o farmacêutico continue sempre a ser um profissional da saúde e do medicamento, há agora um maior envolvimento da sua parte na saúde pública, de forma a trazer melhorias nos resultados clínicos obtidos com a utilização de medicamentos.⁽¹⁾

Neste documento será explanada a forma como foi possível adquirir as capacidades necessárias para deter o título de farmacêutica, no que concerne a “Preparação da forma farmacêutica dos medicamentos; (...); Aprovisionamento, preparação, controlo, armazenamento, distribuição e venda de medicamentos seguros, eficazes e com a qualidade exigida nas farmácias abertas ao público; (...); Informação e aconselhamento sobre os medicamentos em si, incluindo a sua utilização apropriada; Notificação de reações adversas a produtos farmacêuticos às autoridades competentes; Apoio personalizado a doentes que aplicam a sua própria medicação; Contribuição para campanhas de saúde pública locais ou nacionais.”⁽³⁾

Propõem-se assim explicitar o modo como o estágio curricular em Farmácia Comunitária na Farmácia Isabel Folhas, em Coimbra, se desenvolveu, analisando o que foi possível realizar, e de como foi possível alcançar esse mesmo objetivo.

Análise SWOT

(Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats)

Forças – Strengths

- Comunicação fácil com a diretora técnica e restantes colegas, para efeitos de esclarecimento de dúvidas e apreensão de novos conhecimentos.

Sempre que foi necessário esclarecer qualquer tipo de dúvida ou demonstrado interesse em aprender novos conceitos, todos os elementos trabalhadores da farmácia prontamente se dispuseram a ajudar. Este conjunto de situações permitiram assim uma evolução maior e mais rápida durante o estágio.

- Várias formações a que foi dado acesso sobre MNSRM (Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica).

Sempre que ocorreu algum tipo de formação sobre MNSRM ou Dermocosmética, foi permitido assistir às mesmas na totalidade, o que conseqüentemente tornou mais acessível a aquisição de novos conhecimentos na área.

- Necessidade frequente de preparação de medicamentos manipulados.

Desde início, foi permitido assistir à preparação de medicamentos manipulados na farmácia e, posteriormente, foi disponibilizada a oportunidade de efetuar a preparação dos mesmos. Assim, foi possível aplicar os conhecimentos apreendidos ao longo do percurso académico teórico, no que diz respeito à área da Farmácia Galénica.

- Armazenagem, organização e distribuição de medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) por robot.

Como na farmácia a armazenagem, a organização e a distribuição dos Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM) pelos balcões é efetuada por robot, foi possível realizar um atendimento mais completo e mais célere. Desta forma, foi possível presenciar maior número de casos clínicos e desenvolver melhor os conhecimentos de aconselhamento farmacêutico.

➤ A Farmácia é frequentada por um elevado número de doentes.

A elevada frequência de doentes da farmácia permitiu aprender a conciliar melhor o tempo de atendimento com o melhor serviço farmacêutico possível e ter um maior contato com um maior número de doentes.

➤ As várias áreas/subáreas de produtos e as tarefas encontram-se distribuídas entre os vários colaboradores (no que diz respeito a encomendas, formações, gestão, medicamentos manipulados, receituário).

Na farmácia, as várias áreas de MNSRM, Dermocosmética e Suplementos alimentares encontram-se divididas entre os colaboradores, no que diz respeito a encomendas, gestão de stocks, medicamentos manipulados, receituário e formações (bem como o nível de conhecimento de cada colaborador é especializado na área que o mesmo trabalha). Esta distribuição de produtos pelos colaboradores, com a consequente especialização de cada um nos mesmos, facilitou a aprendizagem nas temáticas dos MNSRM e Dermocosmética, pois o conhecimento que foi possível assimilar através de cada um dos colaboradores, foi mais completo e mais específico.

➤ Executar tarefas nas várias áreas da farmácia.

Durante o período de estágio na farmácia, foi dada a oportunidade de participação em tarefas nas várias áreas da farmácia (como por exemplo, receção de encomendas e medicamentos manipulados), o que estimulou a evolução ao longo do estágio e garantiu uma aprendizagem diversificada e detalhada.

➤ Formação *on job*.

Antes de reunir as condições necessárias para efetuar um atendimento ao balcão de modo independente, em determinados momentos, a diretora técnica apresentou possíveis casos clínicos que poderiam ocorrer na farmácia e para os quais foi necessário encontrar a resolução mais adequada, quer no que diz respeito ao aconselhamento farmacêutico em si, quer no cariz social desse mesmo aconselhamento (como por exemplo, qual a linguagem mais apropriada consoante o tipo de doente a atender).

Fraquezas – Weaknesses

- Menor tempo diário de atendimento ao balcão em relação aos colaboradores.

Como este foi um período de formação curricular, foi disponibilizado menor tempo de atendimento ao balcão em relação aos colaboradores da farmácia, o que levou a que houvesse menor contato com os doentes, visto ser necessário maior conhecimento sobre os medicamentos e outros produtos na farmácia para resolução dos problemas apresentados pelos utentes.

- O grande volume de clientes em determinados momentos do dia tornava complexa a gestão pessoal do tempo em relação à qualidade do atendimento, devido à pouca experiência profissional.

A farmácia tem um elevado volume de clientes em determinados momentos do dia, o que, devido à pouca experiência profissional, tornou mais complexa a gestão pessoal entre o tempo de atendimento e a qualidade do aconselhamento farmacêutico, podendo afetar negativamente o tempo de atendimento.

Oportunidades – Opportunities

- Nos tempos livres, foi dada a possibilidade de adquirir documentação de suporte, quer no que concerne à gestão da farmácia, quer no que diz respeito a MNSRM e produtos de venda livre.

Ao longo de todo o período de estágio, foi sempre dada a oportunidade de consultar materiais extra de suporte para a apreensão de novos conhecimentos sobre o sistema de gestão da farmácia (procedimentos operacionais em vigor), e sobre determinados produtos de venda livre (nomeadamente nas áreas de Dermocosmética e Suplementos alimentares) e MNSRM, sendo facilmente permitido o acesso aos mais variados materiais, desde panfletos informativos a tabelas de aconselhamento farmacêutico.

- Flexibilidade de horário.

A diretora técnica sempre se mostrou disponível para, fora das horas habituais, dar assim a oportunidade de serem conhecidas as diferentes realidades que surgem ao longo de um “dia” da farmácia (como por exemplo, em horário de fim-de-semana ou noites de serviço).

➤ Oportunidade de auxiliar na formação inicial de um novo estagiário.

Nas últimas semanas do período de estágio, foi dada a possibilidade de auxiliar na formação inicial de um novo estagiário, o que favoreceu a oportunidade de consolidar os conhecimentos adquiridos ao longo de todo o estágio e evoluir um pouco mais no que diz respeito à comunicação interpessoal.

Ameaças - Threats

➤ Proximidade de grandes superfícies e Parafarmácias

A proximidade de grandes superfícies e de Parafarmácias levou a que houvesse um grande número de pessoas a pedir esclarecimentos na farmácia sobre os mais variados produtos (MNSRM, Dermocosmética e Suplementos alimentares), tendo estas a intenção de comprar os produtos nesses outros locais, utilizando tempo e serviços da farmácia necessários para atendimento dos doentes. Estas situações demonstram um respeito diminuto sobre a atividade do farmacêutico, uma vez que nesses mesmos locais, atrás mencionados, são aconselhados produtos por pessoas não habilitadas na área e sem a supervisão de um profissional competente na temática, um farmacêutico.

Caso Clínico

Jovem de 19 anos, estudante na Universidade de Coimbra (UC), procurou na farmácia aconselhamento sobre a utilização da contraceção oral de emergência (COE). A jovem foi encaminhada para o gabinete do utente, de modo a estabelecer maior privacidade para efetuar algumas questões que permitiriam averiguar a necessidade de COE e oferecer o melhor aconselhamento farmacêutico possível.

Seguidamente, iniciou-se um pequeno questionário à jovem para então averiguar a situação. Concluiu-se que a relação sexual de risco tinha ocorrido num período inferior a 48h, que a jovem não utilizava nenhum método contraceutivo oral diário, que a última menstruação tinha ocorrido na semana anterior (não estava no período fértil do ciclo menstrual), que tinha ocorrido ejaculação, mas que tinha sido utilizado um método contraceutivo de barreira, o qual não fora comprometido fisicamente.

Assim sendo, pediu-se à jovem que descrevesse qual tinha sido a situação geradora da possível necessidade de utilização de COE, acabando a utente por explicar que no fim da relação sexual, tinha detetado um líquido na superfície exterior do preservativo, ficando algum receio de que o líquido seminal tivesse vazado. Ao questionar se, ainda que o preservativo tivesse mantido a sua integridade física, haveria alguma folga aquando da colocação do mesmo, a jovem respondeu negativamente.

De acordo com estas declarações, chegou-se à conclusão que não haveria necessidade de sujeitar a jovem à toma da COE. No entanto, antes de ser apresentada a opinião profissional à utente, conferenciou-se em privado com as farmacêuticas mais experientes na farmácia, concordando elas com a opção anterior.

Comunicou-se por fim à jovem que, de acordo com as suas respostas às questões, não haveria necessidade da toma da COE. Informou-se ainda a utente de todos os cuidados necessários a ter e dos efeitos secundários aquando da toma da COE. A jovem concordou que não iria tomar.

No final, antes de dispensar a jovem, aconselhou-se ainda a marcação de uma consulta de Planeamento Familiar e Ginecologia, que se encontra ao dispor dos alunos da UC através dos SASUC (Serviços de Ação Social da Universidade de Coimbra), onde deveria discutir a hipótese de iniciar a toma de um contraceutivo oral diário, para além da utilização de um método contraceutivo de barreira.

Conclusão

Após finalizar o estágio curricular na Farmácia Isabel Folhas, concluiu-se que o conceito de Farmácia Comunitária já não passa simplesmente pela dispensa de medicamentos, mas igualmente pelo acompanhamento e aconselhamento dos doentes, tornando-se, ao longo do tempo, um local de confiança, não só a respeito da terapêutica medicamentosa como também, de certo modo, da terapêutica psicológica para as pessoas que frequentam a farmácia e, cada vez mais, é prezada a promoção e prevenção da saúde pública, através de um atendimento mais personalizado e mais especializado.

Por outro lado, foi também permitido concluir que o bom funcionamento de uma farmácia comunitária tem por pilares mestres a boa gestão da farmácia e dos seus colaboradores, sendo que à profissão de farmacêutico cabe principalmente a função de satisfazer as necessidades dos seus doentes, tendo sempre como objetivo fundamental o bem-estar físico, mental e social do doente.

Por fim, foi possível verificar a extrema importância do estágio curricular para a consolidação dos conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do percurso académico e na evolução dos conhecimentos práticos da futura profissão, bem como no desenvolvimento pessoal, aproximando-se da realidade do mercado de trabalho que será necessário enfrentar num futuro próximo.

Bibliografia

- (1) SANTOS, H.J.; *et al.* - *Boas Práticas Farmacêuticas para a farmácia comunitária*. Concelho Nacional da Qualidade da Ordem dos Farmacêuticos, 2009. [Consultado em 14 de Junho de 2017]. Disponível na internet: http://www.ordemfarmaceuticos.pt/xFiles/scContentDeployer_pt/docs/Doc3082.pdf
- (2) INFARMED - *Normas relativas à dispensa de medicamentos e produtos de saúde*. [Consultado a 14 de Junho de 2017]. Disponível na internet: http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/Normas_Dispena_20151029.pdf/4c1ae a02-a266-4176-b3ee-a2983bdf790
- (3) Art.º 44º, nº 2 da Diretiva 2013/55/UE, do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Novembro de 2013. [Consultado em 14 de Junho de 2017]
- (4) Decreto-Lei nº 307/2007, de 31 de Agosto, do Diário da República, 1ª Série, 168. [Consultado em 16 de Junho de 2017]
- (5) Decreto-Lei nº 109/2014, de 10 de Julho - *Procede à quinta alteração ao Decreto-Lei nº 307/2007, de 31 de Agosto, que estabelece o regime jurídico das farmácias de oficina*. [Consultado em 16 de Junho de 2017]
- (6) Decreto-Lei nº 7/2011, de 10 de Janeiro, do Diário da República, 1ª Série, 6. [Consultado em 16 de Junho de 2017]
- (7) Portaria nº 31-A/2011, de 11 de Janeiro, do Diário da República, 1ª Série, 7. [Consultado em 16 de Junho de 2017]
- (8) Portaria nº 198/2011, de 18 de Maio, do Diário da República, 1ª série, 96. [Consultado em 16 de Junho de 2017]
- (9) Lei nº 14/2000, de 8 de Agosto, da Constituição Portuguesa. [Consultado em 16 de Junho de 2017]
- (10) http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=39678&tipo_doc=rcm [Consultado em 09 de Setembro de 2017]
- (11) GUILBERT, E.; BLACK, A.; DUNN, S. – *Missed Hormonal Contraceptives: New recommendations*. SOGC Committee Opinion, N°219; Novembro de 2008.

Parte II – Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Resumo

A profissão farmacêutica tem vindo a ser explorada nas mais variadas áreas de trabalho, como por exemplo na Indústria Farmacêutica.

Ao longo do estágio curricular, foi dada a oportunidade de executar um estágio de 3 meses no departamento de produção do Iberfar-Industria Farmacêutica S.A., uma empresa que “presta serviços num dos ramos industriais de maior rigor, fabricando especialidades farmacêuticas para os mercados mais exigentes do mundo, com elevados padrões de qualidade e flexibilidade. As suas atividades cobrem todos os campos desta indústria: Produção e embalagem de produtos farmacêuticos; Marketing, distribuição e assuntos regulamentares; Logística e armazenamento.”⁽¹⁾.

Com esta oportunidade, foi possível consolidar conhecimentos obtidos ao longo do percurso académico, principalmente, em Tecnologia Farmacêutica, Assuntos Regulamentares e Gestão, ajudando também a solidificar a ponte que faz a ligação entre o curso e a realidade profissional desta área do medicamento.

Abstract

Nowadays, the pharmacists' role has been explored in many different fields of work, such as the Pharmaceutical Industry.

During the curricular internship, it was given the opportunity to have a 3 months internship in the production department in Iberfar-Pharmaceutical Industry S.A., a company that “provides services in one of the strictest industry fields, producing pharmaceutical specialties for the most demanding markets in the world, with high quality standards and flexibility. Its activities include all the fields of this industry: Manufacturing and packaging of pharmaceutical products; Marketing, distribution and regulatory affairs; Logistics and storage.”⁽¹⁾.

This chance reinforced the knowledge learned along the course, mainly in Pharmaceutical Technology, Regulatory affairs and Management, setting the “bridge” that links the faculty and the Pharmaceutical Industry's working market.

Índice de Figuras

Figura I: *Mini-Tablets*

20

Introdução

A profissão farmacêutica já não se limita às funções de um boticário, na preparação e venda de produtos medicamentosos.

Atualmente, a área farmacêutica tem vindo a ser explorada nas mais diversas vertentes, desde a conhecida Farmácia Comunitária, passando pela Farmácia Hospitalar e Análises Clínicas, até à Indústria Farmacêutica, entre outros.

É neste documento que será explicitado como foram adquiridas as capacidades, ao longo do estágio curricular no Iberfar - Indústria Farmacêutica S.A., Queluz, Lisboa, que permitirão no futuro próximo efetuar “Fabrico e Controlo de medicamentos; (...); Controlo de medicamentos num laboratório de ensaios de medicamentos; (...); Armazenamento, conservação e distribuição de medicamentos na fase de comércio por grosso.”⁽³⁾, uma vez que o mesmo permitiu acompanhar o que é de fato o departamento de produção de uma Indústria Farmacêutica e aprender que as respetivas operações deverão seguir procedimentos inequivocamente definidos e devem respeitar os princípios da *Good Manufacturing Practice* (GMP), de modo a serem obtidos produtos com a qualidade requisitada e a estarem de acordo com as autorizações de produção e *marketing* concedidas⁽²⁾.

Apresenta-se aqui este relatório da forma mais adequada possível e estabelecem-se todos os comentários, conclusões e opiniões pessoais definidas como pertinentes e apropriadas.

Análise SWOT

(Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats)

Forças – Strengths

➤ Comunicação fácil com o diretor da produção e restantes colegas.

Sempre que foi necessário esclarecer qualquer tipo de dúvida ou demonstrado interesse em aprender novos conceitos, qualquer elemento trabalhador da fábrica se predispôs a ajudar. Este conjunto de situações permitiram assim uma evolução maior e mais rápida durante o estágio.

➤ Formação *in situ* sobre as várias máquinas que compõem a área da produção.

Ao longo deste estágio, foi disponibilizada a oportunidade de acompanhar os processos de fabrico e embalagem de medicamentos junto das máquinas envolvidas em todo o processo, bem como esclarecer quaisquer dúvidas sobre o mesmo com os operadores técnicos que se encontravam no momento a trabalhar com a máquina, o que possibilitou a consolidação das noções teóricas prévias sobre a área da produção e uma aprendizagem mais rápida durante o estágio.

➤ Possibilidade de executar tarefas nos vários processos de fabrico e embalagem de medicamentos.

Durante o acompanhamento presencial feito aos processos de fabrico e embalagem, foi permitido desempenhar diversas tarefas práticas nas linhas de produção, o que facilitou a aprendizagem durante o estágio no Iberfar.

➤ Oportunidade de aprendizagem em outras áreas (Armazém, Garantia e Controlo de Qualidade).

Apesar de, na sua maioria, o período do estágio no Iberfar ter sido ocupado na área da produção, foi disponibilizada a hipótese de compreender também um pouco mais sobre algumas das restantes áreas que compõem a empresa, nomeadamente o Armazém, a Garantia e o Controlo de Qualidade (quer em laboratório quer nos ensaios IPC – *In Process Control*).

Fraquezas – Weaknesses

- Menor disponibilidade dos colegas para formação em trabalhos mais complexos.

O Iberfar fecha temporariamente durante o mês de Agosto e como é necessário terminar todos os processos em desenvolvimento (desde a produção em si a organização de documentação obrigatória) antes do fecho da fábrica, para que daí não incorra nenhum inconveniente para os clientes, houve menor disponibilidade dos colegas especializados para oferecerem formação mais específica e mais complexa nas semanas finais do estágio, devido ao grande volume de trabalho.

Oportunidades – Opportunities

- Oportunidade de assistir a ensaios de fabrico e embalagem de novas formas farmacêuticas recém-introduzidas na empresa.

Durante o estágio curricular, ocorreu no Iberfar a introdução de um medicamento com uma nova forma farmacêutica, o que levou à realização de ensaios em todas as fases do processo de fabrico e embalagem primária, tendo sido dada a oportunidade de assistir e participar no desenvolvimento destes ensaios. Esta situação será explanada de um modo mais detalhado posteriormente.

Ameaças - Threats

- Problemas associados ao bom funcionamento das máquinas.

Em determinados momentos, ainda que muito esporadicamente, problemas relacionados com bloqueios, erros ou calibração das máquinas, causaram ligeiros atrasos na progressão da aprendizagem ao longo do estágio, uma vez que mantinha os colegas especializados com grande quantidade de trabalho e reduzia a sua disponibilidade para possibilitarem formação mais específica.

Introdução de uma nova forma farmacêutica no Iberfar- Indústria Farmacêutica S.A.

Durante os meses de Junho e Julho, iniciaram-se no Iberfar os procedimentos necessários para introdução de uma nova forma farmacêutica na fábrica, os *Mini-Tablets* (*Mini-Tabs*). (ver Figura 1)

Mini-Tablets são comprimidos de muito reduzidas dimensões que têm um diâmetro igual ou inferior a 3mm, podendo ser colocados dentro de uma cápsula ou em saquetas, para poderem ser facilmente administrados. Estes pequenos comprimidos têm várias vantagens em relação a comprimidos unitários de maiores dimensões, pois libertam de um modo consistente os fármacos da forma farmacêutica, apresentam resultados clínicos uniformes, têm maior flexibilidade durante o desenvolvimento da formulação e possuem estabilidade máxima para armazenamento. Para além disso, os *Mini-Tablets* são muito fáceis de produzir utilizando um método de compressão direta, que envolve poucos passos e equipamentos menos complexos, poupando assim tempo e custos. Esta forma farmacêutica apresenta ainda formatos regulares e uma uniformidade de tamanho excelente ⁽⁴⁾.

Procederam-se aos ensaios necessários para validação dos processos de fabrico e de embalagem e foi dada a oportunidade de assistir a todo o processo e executar algumas tarefas práticas, quer durante o processo de fabrico em si, quer na realização de alguns dos IPC's.

O processo de validação iniciou-se com a utilização de uma mistura placebo, permitindo validar alguns dos parâmetros do processo de fabrico em si e o processo de embalagem primária. Posteriormente, foi utilizada uma mistura teste com a substância ativa, que permitiu determinar quais as características essenciais do procedimento de fabrico, para que seja possível produzir os *Mini-Tabs* sem inconvenientes e em grande escala.



Figura 1: *Mini-Tablets* (mão para referência).

Conclusão

Após terminar o estágio curricular no Iberfar - Indústria Farmacêutica S.A., foi possível concluir que o papel do farmacêutico no ciclo de vida do medicamento começa muito antes de o produto chegar às farmácias para ser disponibilizado ao público.

O farmacêutico tem uma intervenção que vem desde a formulação do medicamento, passando pela gestão, monitorização e consolidação de todo o processo de fabrico e embalamento, no controlo da qualidade destes produtos, até à distribuição dos mesmos, sendo ainda um profissional essencial na gestão e resolução de problemas e possíveis erros associados a todo o ciclo.

Por fim, confirmou-se a extrema importância do estágio curricular em Indústria Farmacêutica para consolidar os vários conhecimentos de Tecnologia Farmacêutica, Assuntos Regulamentares e Gestão que foram progressivamente adquiridos no decorrer do percurso académico, estabelecendo assim uma ponte mais sólida entre o curso e a realidade profissional que poderemos vir a enfrentar no futuro.

Bibliografia

- 1) <http://www.iberfar.pt/pt/quem-somos> [Consultado em 29 de Julho de 2017]
- 2) COMISSÃO EUROPEIA. EudraLex – The Rules Governing Medicinal Products in the European Union: Good Manufacturing Practice. Bruxelas, 2010. ISBN 145-338-415-4 (Volume 4, Capítulos 3, 5 e 6). [Consultado em 27 de Julho de 2017].

Disponível na internet em: https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4_en

- 3) Art.º 44º, nº 2 da Diretiva 2013/55/UE, do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Novembro de 2013. [Consultado em 12 de Junho de 2017]
- 4) MOHD, A. H.; RAGHAVENDRA RAO, N. G.; AVANAPU, S. R. - Matrix-mini-tablets of lornoxicam for targeting early morning peak symptoms of rheumatoid arthritis. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**. ISSN 20083874 , 17(5), 357–369.

**Parte III – Experimentação animal na
Diabetes *Mellitus* Tipo I**

Resumo

A Diabetes *Mellitus* Tipo I (DMI) é uma doença autoimune causada por uma destruição seletiva das células produtoras de insulina, as células β pancreáticas dos ilhéus de Langerhans. Os modelos animais utilizados nos estudos relacionados com esta síndrome, vão desde modelos de desenvolvimento espontâneo da diabetes, a modelos de indução química. O modelo de indução química mais utilizado é o modelo de indução por Streptozotocina (STZ) em ratos ou murganhos.

O presente documento apresenta uma revisão sobre alguns desses modelos e os resultados obtidos no ensaio piloto de desenvolvimento de uma formulação de insulina específica, com recurso ao modelo de indução da DMI por STZ em rato Wistar.

Palavras-Chave: Diabetes *Mellitus* Tipo I, Ensaio pré-clínico, Indução química, Ratos Wistar, Streptozotocina.

Abstract

Type I Diabetes (T1D) is an autoimmune disease, that is caused by the selective destruction of the insulin-producing cells, the Langerhans islets' pancreatic β -cells. The animal models that are used in the scientific studies that are related with this syndrome, go from spontaneously developed diabetes to chemically induced models. The mainly used animal model is the Streptozotocin(STZ)-induced model, with rats or mice.

This document shows a review about some of these models and presents the results of using the STZ-induced diabetes in Wistar rat model, applied while studying a new formulation of oral insulin.

Keywords: Chemical induction, Pre-clinical Trial, Type I Diabetes, Streptozotocin, Wistar rats.

Índice de Figuras

Figura 1: Mecanismo de ação da STZ nas células β pancreáticas	31
Figura 2: Os principais efeitos patogénicos do Alozano	32

Índice de Tabelas

Tabela I: Resumo dos modelos da DMI	32
Tabela II: Resumo dos estudos pré-clínicos em análise e do estudo do ensaio piloto a ser apresentado	35
Tabela III: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato I, caixa A	41
Tabela IV: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato II, caixa A	41
Tabela V: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato III, caixa A	41
Tabela VI: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato I, caixa B	41
Tabela VII: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato II, caixa B	42
Tabela VIII: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato III, caixa B	42
Tabela IX: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato I, caixa C	42
Tabela X: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato II, caixa C	42
Tabela XI: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato III, caixa C	43
Tabela XII: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato I, caixa D	43
Tabela XIII: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato II, caixa D	43
Tabela XIV: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato III, caixa D	43

Índice de Gráficos

Gráfico I: Variação do peso dos animais da caixa A ao longo do tempo	44
Gráfico II: Variação do peso dos animais da caixa B ao longo do tempo	45
Gráfico III: Variação do peso dos animais da caixa C ao longo do tempo	45
Gráfico IV: Variação do peso dos animais da caixa D ao longo do tempo	46
Gráfico V: Variação da glicémia dos animais da caixa A ao longo do tempo	46
Gráfico VI: Variação da glicémia dos animais da caixa B ao longo do tempo	47
Gráfico VII: Variação da glicémia dos animais da caixa C ao longo do tempo	47
Gráfico VIII: Variação da glicémia dos animais da caixa D ao longo do tempo	48

Introdução

Têm vindo a ser ponderadas e investigadas, ao longo dos anos, as mais variadas estratégias para que os modelos utilizados na fase pré-clínica do desenvolvimento de um novo fármaco mimetizem o melhor possível o organismo humano, tentando sempre alcançar-se uma combinação das características fisiológicas com as características genéticas da doença em estudo. O mesmo tem vindo a ocorrer na investigação na área da Diabetes *Mellitus* Tipo I (DMI). Para tal, têm vindo a ser apresentados diversos modelos animais, nomeadamente roedores, que variam, quer na espécie e estirpe, quer no modo como surge a doença, podendo esta ser de origem endógena ao organismo do animal ou de origem externa, por indução química ou por vetor viral.

Adiante no documento, serão apresentadas algumas considerações sobre a experimentação animal na DMI e serão também apresentados os resultados obtidos num dos modelos animais mais utilizados, aquando da participação na fase pré-clínica do desenvolvimento de um novo fármaco.

Experimentação animal na Diabetes *Mellitus* Tipo I

Diabetes *Mellitus* Tipo I

A Diabetes *Mellitus* Tipo I (DMI) apresenta-se como uma doença metabólica crônica caracterizada por uma deficiência, ou mesmo ausência, de produção de insulina, resultando em hiperglicémia⁽¹⁾ e na necessidade de injeções subcutâneas regulares de insulina⁽²⁾. Esta patologia autoimune é causada por uma destruição seletiva das células β pancreáticas produtoras de insulina⁽³⁾ e sendo uma doença metabólica, pode apresentar várias complicações para a saúde do doente caso este não seja sujeito a terapêutica adequada atempadamente, desde nefropatia, retinopatia, neuropatia, a aumento do risco de doença cardiovascular⁽¹⁾.

A incidência da DMI em humanos é maior no sexo masculino do que no sexo feminino⁽²⁾ e surge mais frequentemente em crianças e jovens⁽¹⁾, estimando-se que em 2020, o número de crianças com idade inferior a 5 anos que apresentam DMI, irá duplicar⁽²⁾.

Modelos animais para a DMI

No que diz respeito aos modelos animais utilizados para investigação da DMI, estes devem ser cuidadosamente selecionados, dependendo dos objectivos do trabalho experimental. Para além disso, os modelos animais têm um papel importante na compreensão da patogénese da diabetes, uma vez que permitem uma combinação da caracterização genética e funcional da síndrome⁽¹⁾. No caso específico dos ratos, o modelo de indução da DMI fornece características laboratoriais, histopatológicas e clínicas, muito semelhantes à síndrome em humanos⁽³⁾.

O rato, como modelo animal, apresenta numerosas vantagens em relação a animais de maior porte, uma vez que são mais económicos e fáceis de manipular, no que diz respeito a condições de acomodação, higiene e alimentação, sendo também animais relativamente resistentes a problemas infecciosos⁽³⁾.

Em modelos animais de ratos para a DMI, a deficiência na produção de insulina pode ser obtida por uma variedade de diferentes mecanismos⁽²⁾, desde modelos genéticos a modelos de indução química por Streptozotocina (STZ) ou Aloxano⁽¹⁾.

Os modelos autoimunes mais utilizados na DMI são o murganho NOD (*Non-Obese Diabetic*) e o rato BB (*Biobreeding*), mas em 2001 foi descrito um outro modelo, o rato

LEW.IARI/-iddm. Apesar de tudo, o modelo NOD ainda domina a literatura como o modelo autoimune preferencial⁽²⁾.

O murganho NOD foi desenvolvido nos Laboratórios Shionogi de Pesquisa, em Osaka, no Japão, em 1974. Estes murganhos desenvolvem insulite entre as 3 e as 4 semanas de idade. No estágio pré-diabético, os ilhéus pancreáticos são infiltrados predominantemente por linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, ainda que estejam presentes células B e NK. A insulite causa a destruição das células β pancreáticas, mas os primeiros sintomas evidentes da diabetes surgem normalmente quando já existe uma quebra de cerca de 90% na concentração de insulina, aproximadamente entre as 10-14 semanas de idade dos murganhos⁽²⁾. Ainda que o modelo NOD tenha algumas limitações, continua a ser extensivamente utilizado, uma vez que representa vários aspetos da doença em humanos e é um modelo que tem ajudado a identificar muitas das vias genéticas e de sinalização que podem originar a DMI⁽²⁾.

Os ratos BB foram gerados a partir de ratos Wistar. A diabetes autoimune espontânea foi descrita pela primeira vez em 1974 numa colónia canadiana e levou à criação de duas colónias fundadoras das quais todas as subestirpes derivaram. Os ratos BB desenvolvem habitualmente diabetes logo após a puberdade e surgem com uma incidência semelhante em machos e fêmeas. Cerca de 90% dos ratos desenvolvem diabetes às 8 ou às 16 semanas de idade⁽²⁾. Este modelo tem sido muito valioso no esclarecimento da genética da DMI e tem sido sugerido como o modelo animal de pequena dimensão favorito para indução de tolerância aquando da transplantação de ilhéus. Os ratos BB têm sido utilizados em estudos interventivos sobre neuropatia diabética⁽²⁾.

O modelo de DMI de ratos LEW.IARI/-iddm, surgiu espontaneamente numa colónia de ratos Lewis com um haplotipo MHC definido, que estavam a ser criados no Instituto de Ciência Animal em Laboratório na Faculdade de Medicina de Hannover. Estes ratos desenvolvem insulite, e a diabetes manifesta-se cerca das 8-9 semanas de idade, tendo uma incidência semelhante em ambos os sexos. Os animais exibem um período pré-diabético em que ocorre infiltração nos ilhéus, aproximadamente uma semana antes dos ratos se tornarem hiperglicémicos⁽²⁾. Atualmente, os estudos com este modelo têm sido utilizados para investigação de mecanismos envolvidos no desenvolvimento da diabetes⁽²⁾.

O murganho AKITA foi inicialmente desenvolvido em Akita, no Japão, a partir de uma estirpe de murganho C57BL/6NSlc com uma mutação espontânea no gene insulina-2, que leva a um incorreto processamento da pro-insulina⁽¹⁾. Esta situação causa uma sobrecarga de proteínas anómalas e subsequente *stress* do retículo endoplasmático. Tal resulta numa diabetes

insulinodependente severa que se expressa entre as 3 e as 4 semanas de idade e é caracterizada por hiperglicemia, hipoinsulinemia, poliúria e polidipsia. Animais homocigóticos não tratados raramente sobrevivem para além das 12 semanas. A falta de células β pancreáticas neste modelo torna-o uma alternativa aos murganhos tratados com STZ em estudos de transplantação. Este modelo tem também sido utilizado para estudo de doenças macrovasculares e neuropatias na DMI e é, ainda, habitualmente utilizado em estudos de potenciais redutores do *stress* do retículo endoplasmático dos ilhéus e, neste campo, é um bom modelo de alguns fatores associados à patologia da Diabetes *Mellitus* Tipo 2 (DM2)⁽²⁾.

No que diz respeito à indução química da diabetes, esta é muito utilizada para estudos de novas formulações de insulina, modelos de transplantação e tratamentos preventivos da destruição das células β pancreáticas⁽²⁾.

O Aloxano e a STZ são considerados os diabetogénicos químicos mais potentes utilizados em estudos sobre diabetes. Ambos os químicos funcionam como análogos citotóxicos da glucose, tendo tendência para se acumular nas células β pancreáticas através do transportador 2 de glucose (Glut-2)⁽¹⁾.

A STZ [2-deoxy-2-(3-(metil-3-nitrosureido)-D-glucopiranosose] é sintetizada pela bactéria *Streptomyces achromogenes*. Após administração intraperitoneal ou intravenosa, a STZ entra nas células β pancreáticas através do transportador Glut-2 e causa a alquilação do DNA⁽²⁾. Para além disso, é ainda fonte de radicais livres que contribuem para a fragmentação do DNA e morte celular subsequente. Esta substância é normalmente administrada numa dose única elevada ou em múltiplas doses reduzidas⁽²⁾, doses essas que em murganhos vão de 100-200mg/Kg de peso corporal do animal, e em ratos vão de 35-70mg/Kg⁽¹⁾.

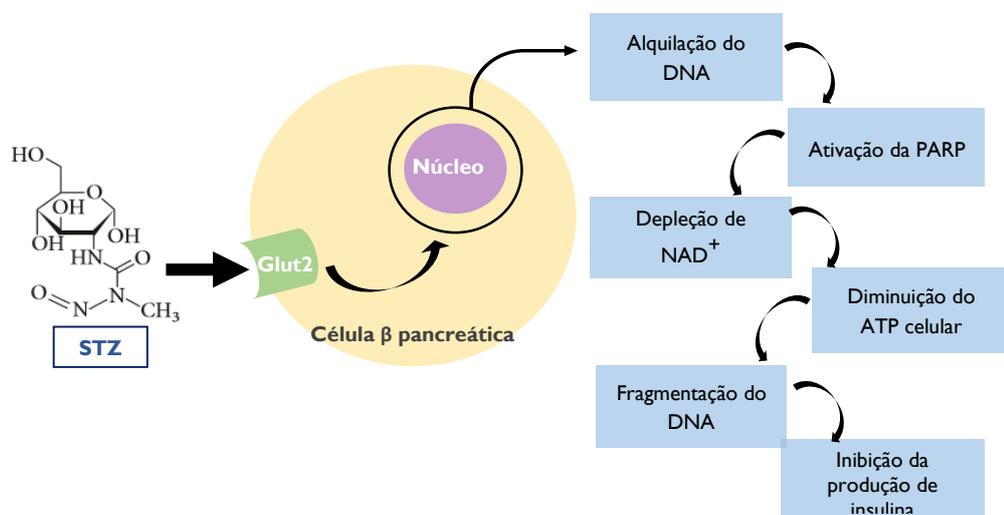


Figura 1: Mecanismo de ação da STZ nas células β pancreáticas.

O efeito diabetogénico do Aloxano [2,4,5,6-tetraoxipirimidina] é atribuído principalmente à sua rápida absorção pelas células β pancreáticas e à formação de radicais livres, contra os quais as células β têm poucos mecanismos de defesa⁽²⁾. O Aloxano pode inibir seletivamente a secreção de insulina dependente de glucose através da inibição da Glucocinase, causando um estado diabético insulino-dependente ao estimular a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), o que por sua vez irá provocar a necrose das células β ⁽¹⁾.

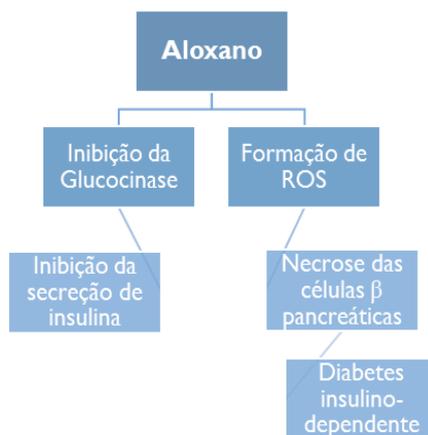


Figura 2: Os principais efeitos patogénicos do Aloxano⁽¹⁾.

As doses administradas de Aloxano em murganhos variam entre 50-200 mg/Kg de peso corporal e em ratos entre 40-200mg/Kg de peso corporal, dependendo da espécie e da via de administração, sendo que a via intraperitoneal e a via subcutânea requerem uma dose até 3 vezes superior à dose por via intravenosa⁽²⁾. Para além disso, deve ter-se em conta que o Aloxano apresenta uma dose diabetogénica estreita e que, mesmo uma overdose ligeira, pode causar toxicidade generalizada no animal, especialmente a nível renal⁽²⁾.

Tabela I: Resumo dos modelos da DMI⁽²⁾.

Mecanismo de indução	Modelo	Principais características	Utilizações possíveis
Indução química	Dose única elevada de STZ	Modelo simples de hiperglicemia	<ul style="list-style-type: none"> • Nova formulação de insulina • Modelo de transplante • Tratamentos que podem prevenir a morte das células β
	Aloxano	Modelo de insulite induzida	
	Múltiplas doses reduzidas de STZ	Destruição das células β devido a um processo autoimune	
Processo autoimune espontâneo	Murganhos NOD	Destruição das células β devido a um processo autoimune	<ul style="list-style-type: none"> • Estudos genéticos sobre a DMI • Estudos sobre os mecanismos da DMI • Tratamentos que podem prevenir a morte das células β • Tratamentos que podem manipular o processo autoimune
	Ratos BB		
	Ratos LEW. IAR1/-iddm		
Geneticamente induzido	Murganhos AKITA	Destruição das células β devido a <i>stress</i> do RE. Dependente de insulina.	<ul style="list-style-type: none"> • Nova formulação de insulina • Modelos de transplante • Tratamentos para prevenir o <i>stress</i> do RE • Pode ser utilizado em estudos sobre a DM2

Indução química da DMI com Streptozotocina

A STZ atua como um análogo da nitrosureia, em que o grupo N-metil-N-nitrosureia da STZ se liga ao carbono-2 da hexose do DNA⁽¹⁾. A transferência do grupo da molécula do citocímico para a molécula de ácido nucleico causa danos, seguindo uma cascata de eventos que, em última instância, levam à fragmentação do DNA⁽¹⁾. Após a administração de STZ por

via intraperitoneal ou intravenosa, esta entra nas células β pancreáticas através do transportador Glut-2 e causa a alquilação do DNA. A subsequente ativação da poli-ADP-ribose polimerase (PARP) leva a uma depleção de NAD^+ , à diminuição do ATP celular e à consequente inibição da produção de insulina⁽²⁾.

Como descrito anteriormente, a STZ pode ser assim administrada uma única vez, em murganhos, numa dose entre 100-200 mg/Kg de peso corporal dependente da estirpe do animal⁽²⁾, ou em ratos, numa dose entre 35-70 mg/Kg de peso corporal⁽¹⁾, levando a rápida destruição das células β pancreáticas e hiperglicémia⁽²⁾. Tem vindo a ser sugerido que a regeneração dos ilhéus β pode ocorrer mesmo após tratamento com STZ, pelo que deverão ser efetuados controlos suficientes nos estudos em que se utiliza este modelo animal, de modo a determinar se a melhoria dos níveis de glicémia é devida à substância ativa em estudo ou à regeneração endógena espontânea das células β ⁽²⁾.

A STZ pode também ser administrada em múltiplas doses reduzidas, por períodos iguais ou superiores a 5 dias, de modo a induzir insulite em murganhos ou em ratos, sendo que as doses administradas variam entre 20-40 mg/kg de peso corporal por dia, dependendo da espécie e da estirpe de animal⁽²⁾.

Utilização de modelos de indução da DMI por Streptozotocina

Seguidamente, serão analisados a termo comparativo, alguns artigos em que foram utilizados alguns dos modelos animais descritos anteriormente: indução da DMI por administração de STZ em múltiplas doses reduzidas por períodos iguais ou superiores a 5 dias em murganhos C57BL/6, ou em dose única em ratos Wistar ou murganhos C57BL/6.

Em todos os ensaios pré-clínicos que aqui irão ser revistos, a administração de STZ foi efetuada por via intraperitoneal.

Tabela II: Resumo dos estudos pré-clínicos em análise e do estudo piloto a ser apresentado.

Estudos pré-clínicos	Estirpe animal	Pesos do animal	Dose administrada	Glicémia /DM
<i>“Chloroquine improves left ventricle diastolic function in streptozotocin-induced diabetic mice”</i> ⁽⁵⁾	C57BL/6 Machos	16-18g	60mg/Kg/dia (durante 6 dias)	> 300,9mg/dL
<i>“Chronic Treatment with the AMP-Kinase Activator ICAR Increases Glycogen Storage and Fatty Acid Oxidation in Skeletal Muscles but Does Not Reduce Hyperglucagonemia and Hyperglycemia in Insulin Deficient Rats”</i> ⁽⁶⁾	Wistar albinos Machos	180-200g	65mg/kg (administração única)	> 450mg/dL (25mmol/L)
<i>“Effects of caffeine on locomotor activity in streptozotocin-induced diabetic rats”</i> ⁽⁷⁾	Wistar albinos Machos	300-500g	50mg/Kg (administração única)	> 250mg/dL
<i>“Multifunctional Composite Microcapsules for Oral Delivery of Insulin”</i> ⁽⁸⁾	Wistar Machos	200 ± 20g	65mg/Kg (administração única)	> 300,3mg/dL (16,67mmol/L)
<i>“Protective effects of berberine on renal injury in streptozotocin (STZ)-Induced diabetic mice”</i> ⁽⁹⁾	C57BL/6	20-25g	150mg/Kg (administração única)	> 288,3mg/dL (16mmol/L)
<i>“Resveratrol ameliorates myocardial fibrosis by inhibiting ROS/ERK/TGF-β/periostin pathway in STZ-induced diabetic mice”</i> ⁽¹⁰⁾	C57BL/6 Machos	20-25g	40mg/Kg/dia (durante 5 dias)	> 250,5mg/dL (13,9mM)
<i>Estudo piloto para caracterização de uma nova formulação à base de um polímero de insulina</i>	Wistar Machos	300-400g	55mg/Kg (administração única)	> 300mg/dL

Ensaio pré-clínico em que foram aplicados estes modelos animais

1) “*Chloroquine improves left ventricle diastolic function in streptozotocin-induced diabetic mice*”⁽⁵⁾

Este ensaio pré-clínico tinha por objetivo analisar os efeitos terapêuticos da cloroquina, um inibidor da autofagia, na função do ventrículo esquerdo, em murganhos diabéticos por indução com STZ. Para o estudo, foram utilizados murganhos C57BL/6 macho saudáveis (com 6 semanas de idade e pesando entre 16-18g), nos quais foi induzida a diabetes por uma administração diária, durante 6 dias, de uma solução de 60mg/Kg de STZ em tampão citrato pH 4,5, preparada diariamente de modo a evitar problemas de estabilidade. 6 dias após a última injeção de STZ, confirmou-se se os murganhos estavam hiperglicêmicos, medindo-se a concentração de glucose na corrente sanguínea através de um medidor de glicemia, utilizando sangue extraído da veia da cauda. Consideraram-se diabéticos os animais que apresentavam valores de glicemia superiores a 300,9 mg/dL (16,7 mmol/L).

2) “*Chronic Treatment with the AMP-Kinase Activator ICAR Increases Glycogen Storage and Fatty Acid Oxidation in Skeletal Muscles but Does Not Reduce Hyperglucagonemia and Hyperglycemia in Insulin Deficient Rats*”⁽⁶⁾

O segundo ensaio pré-clínico vem apresentar um estudo que pretende concluir se o efeito cumulativo do glicogénio, aquando da utilização crónica de um fármaco ativador da AMPK (AMP proteína-cinase), pode favorecer o controlo da glicemia em condições de deficiência de insulina. Como modelo de estudo, foram utilizados ratos Wistar albinos macho, com peso entre 180-200g e com acesso livre a comida e água até ao momento da administração do citotóxico. Foi induzida a diabetes com a administração de uma dose única de STZ, numa dose de 65mg/kg peso corporal do animal. 48 horas após a injeção, os valores de glicemia foram medidos através de sangue retirado da veia superficial principal da coxa num medidor de glicemia, e apenas os animais que apresentavam valores de glicemia superiores a 450mg/dL (25mmol/L) foram considerados diabéticos.

3) “*Effects of caffeine on locomotor activity in streptozotocin-induced diabetic rats*”⁽⁷⁾

No terceiro ensaio pré-clínico, cujo objetivo era compreender os efeitos que uma dose média-baixa de cafeína poderia ter na atividade locomotora do animal, no qual foi induzida a

diabetes por administração de STZ, foram utilizados ratos Wistar albinos macho, com pesos entre 300-350g e 3-4 meses de idade. A diabetes foi induzida por uma administração única de STZ, numa dose de 50mg/Kg de peso corporal, diluída numa solução salina a 0,9%. Uma semana após a administração de STZ, os valores de glicémia foram medidos num medidor apropriado, utilizando sangue extraído da veia da cauda, e os animais que apresentavam valores superiores a 250mg/dL, foram considerados diabéticos e incluídos no estudo. Os ratos que apresentavam valores de glicémia acima de 600mg/dL foram excluídos, uma vez que esses valores indicam um reduzido potencial biológico para o ensaio, o que por sua vez não asseguraria a sobrevivência dos animais a longo prazo.

4) “Multifunctional Composite Microcapsules for Oral Delivery of Insulin”⁽⁸⁾

No decorrer deste estudo pré-clínico, foi desenhado e desenvolvido um novo sistema de transporte de insulina por microencapsulação, tendo por objetivo controlar a libertação do fármaco e impedir a sua degradação, de modo a melhorar a biodisponibilidade do mesmo quando administrado por via oral. Como modelo de teste, foram utilizados ratos Wistar macho, com pesos de 200g ± 20g e 12-13 semanas de idade. Induziu-se a diabetes com uma única administração de uma solução de STZ a 65mg/Kg de peso corporal em tampão citrato pH 4,5, e sete dias após a administração do citotóxico, os ratos que apresentavam sintomas de poliúria, perda de peso e níveis de glucose superiores a 300,3mg/dL (16,67mmol/L), foram considerados diabéticos.

5) “Protective effects of berberine on renal injury in streptozotocin (STZ)-Induced diabetic mice”⁽⁹⁾

No quinto ensaio, foram investigados os possíveis efeitos terapêuticos da Berberina na prevenção e tratamento da nefropatia diabética. Para este estudo, foram usados murganhos C57BL/6 com 6 semanas de idade e pesos entre 20-25g. A diabetes foi induzida por administração de STZ diluída em 0,1M de tampão citrato pH 4,5, numa dose única de 150mg/Kg de peso corporal do animal. Os murganhos foram considerados diabéticos a partir do momento em que os respetivos níveis de glicémia atingiram valores superiores a 288,3mg/dL (16mmol/L).

6) “Resveratrol ameliorates myocardial fibrosis by inhibiting ROS/ERK/TGF- β /periostin pathway in STZ-induced diabetic mice”⁽¹⁰⁾

No último ensaio pré-clínico analisado, foram investigados os efeitos terapêuticos do Resveratrol na melhoria da fibrose miocárdica em murganhos diabético. Como modelo animal, foram utilizados murganhos C57BL/6 macho, nos quais se induziu a diabetes por uma administração diária de uma solução de STZ diluída em 0,1M de tampão citrato pH 4,5, numa dose de 40mg/kg de peso do animal por dia, durante 5 dias consecutivos. Os murganhos que 3 dias após a última injeção de STZ apresentavam valores de glicemia superiores a 250,5mg/dL (13,9mM), foram considerados diabéticos e utilizados na continuação do estudo.

Comparação entre os vários estudos

Estabelecendo agora uma comparação entre estes vários estudos, foi possível concluir que os modelos animais mais utilizados para teste de novas formulações de fármacos são ratos ou murganhos macho, uma vez que as fêmeas apresentam maiores oscilações hormonais, que podem interferir no desenvolvimento da diabetes.

No que diz respeito ao peso dos animais, confirmou-se que o peso ideal dos murganhos C57BL/6 será aproximadamente 18 a 20g, e dos ratos Wistar entre os 200-300g, sendo que deste modo haverá maior facilidade em prever os efeitos e a eficácia da administração da STZ, bem como o tipo de problemas que este método de indução da diabetes pode provocar nos animais.

Para além disso, são mais frequentemente utilizadas administrações únicas de STZ em doses mais elevadas para indução da DMI, visto que causa rápida destruição das células β pancreáticas e hiperglicémia⁽²⁾, sendo, portanto, um método mais rápido e eficaz.

A via de administração de STZ que é maioritariamente utilizada é a via intraperitoneal, pois é uma via rápida, segura e consistente na distribuição de grandes volumes de substâncias na cavidade peritoneal, onde são facilmente absorvidas⁽¹¹⁾. Por outro lado, a via intraperitoneal pode causar maior *stress* no animal⁽¹²⁾, pelo que de modo a evitar efeitos negativos nos animais e influenciar os resultados dos ensaios, nos casos em que os ratos ou murganhos não estiveram anteriormente expostos a procedimentos causadores de *stress*, é recomendada a habituação destes aos processos de manuseamento antes de se iniciarem os ensaios⁽¹³⁾.

Quanto às doses de STZ que foram administradas aos animais, nos ratos às quais foi dada uma dose única do citotóxico, para os de menor peso foi de 65mg/Kg de peso corporal

e 50mg/Kg de peso corporal no estudo em que os ratos apresentavam maior peso inicial. Nos murganhos aos quais foi administrada uma dose única de STZ, esta foi numa dose de 150mg/Kg de peso corporal. Em qualquer um dos estudos de administração única, as doses de STZ estavam dentro dos valores previstos para estes modelos específicos (35-70 mg/Kg de peso corporal para ratos⁽¹⁾ e 100-200 mg/Kg de peso corporal dos murganhos, dependente da estirpe dos animais⁽²⁾). Para as administrações múltiplas em doses reduzidas foram utilizadas doses de STZ de 45-60mg/Kg de peso corporal dos murganhos por dia, por períodos de 5 ou mais dias, ficando um dos estudos um pouco acima do habitual nestes modelos, no que diz respeito à dose diária (doses de referência: 20-40 mg/kg de peso corporal por dia, dependendo da espécie e da estirpe de animal⁽²⁾). Estas administrações permitiram em todos estes estudos a obtenção de modelos animais com DMI induzida por STZ, para prosseguir as respetivas pesquisas.

Foi ainda possível constatar nos estudos analisados, que um dos fatores sujeitos a maior variabilidade foi o valor de glicémia a partir do qual os animais foram considerados diabéticos e apresentaram ainda assim potencial biológico para serem utilizados nos ensaios pré-clínicos subsequentes, sendo que esses mesmos valores de referência variaram entre 250mg/dL a 450mg/dL. Há que ter em conta que nos ratos e nos murganhos, os valores de glicémia acima dos quais os animais são diagnosticados como diabéticos, são substancialmente superiores aos valores de referência para humanos (glicémia em jejum >126mg/dL⁽¹⁴⁾).

Estudo piloto para a caracterização de uma nova formulação à base de polímero de insulina

Com o objetivo de preparar e caracterizar uma nova formulação à base de polímero de insulina recorreu-se ao modelo de indução de DMI pela administração única de STZ a ratos Wistar machos.

Material e Método

O estudo foi desenhado e 12 ratos Wistar machos saudáveis (divididos por 4 grupos de trabalho, identificados por – A, B, C e D), com pesos entre 300-400g, foram mantidos em ambiente adequado, com controlo de temperatura ($\pm 22^{\circ}\text{C}$), com ciclos circadianos de 24h (12h de luz diárias) e acesso livre a comida. Doze horas antes da administração de STZ, os animais foram colocados em jejum, com acesso livre a água. Os ratos foram fornecidos pelo biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e o protocolo experimental

foi realizado de acordo com a Diretiva 2010/63/EU da União Europeia⁽¹⁵⁾, em vigor desde 1 de Janeiro de 2013.

No dia da indução da DMI, foi preparada uma solução extemporânea de STZ (*Sigma*®) a 100mg/mL em tampão citrato a pH 4,5, que foi administrada, no máximo, durante a hora que procedeu à sua preparação. Antes de ser administrada a solução de STZ, pesaram-se todos os animais, apresentando pesos entre 312-380g, e mediu-se a glicémia basal com um medidor *OneTouch Verio*® IQ através de uma gota de sangue extraída de uma perfuração mínima na ponta da cauda.

Induziu-se quimicamente a DMI através de uma injeção intraperitoneal de STZ e em dose única elevada, de 55 mg/Kg de peso corporal do animal. Durante as primeiras 24h que sucederam à indução, foi fornecido aos ratos soro glicosilado a 5% (m/v), de modo a prevenir uma possível hipoglicémia reacional desencadeada pela destruição das células β do pâncreas. Os animais que, entre 7 a 14 dias após a indução, apresentaram sintomas de poliúria, polifagia, polidipsia, perda de peso e níveis de glicémia superiores a 300mg/dL, foram considerados diabéticos e com potencial biológico para poderem ser incluídos no estudo de uma nova formulação de insulina, que procederia à utilização deste modelo de indução da DMI.

Apresentação de Resultados e Discussão

Consideram-se nas tabelas o dia 0 como o dia da indução química da DMI com STZ, e o dia 13 como o dia em que foi iniciado o estudo da nova formulação à base de polímero de insulina.

Caixa A

Tabela III: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato I, caixa A.

Caixa A – Rato I				
Dias	0	2	6	13
Valores				
Peso corporal (g)	365	350	317	287
Glicémia (mg/dL)	77	393	598	400

Tabela IV: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato II, caixa A

Caixa A – Rato II				
Dias \ Valores	0	2	6	13
Peso corporal (g)	316	302	275	266
Glicémia (mg/dL)	85	425	405	411

Tabela V: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato III, caixa A.

Caixa A – Rato III				
Dias \ Valores	0	2	6	13
Peso corporal (g)	331	241	210	X
Glicémia (mg/dL)	104	400	80 ¹	X

Nota 1: Nas determinações do dia 6, o Rato III apresentava sintomas de hipoglicémia marcada, derivados dos efeitos tóxicos da STZ no organismo do animal. No entanto, este não recuperou dos efeitos da STZ e acabou por morrer.

Caixa B

Tabela VI: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato I, caixa B.

Caixa B – Rato I				
Dias \ Valores	0	2	6	13
Peso corporal (g)	318	322	321	----- ²
Glicémia (mg/dL)	102	95	117	----- ²

Tabela VII: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato II, caixa B.

Caixa B – Rato II				
Dias \ Valores	0	2	6	13
Peso corporal (g)	312	311	309	----- ²
Glicémia (mg/dL)	104	117	108	----- ²

Nota 2: Ao fim dos 13 dias, os Ratos I e II foram considerados não diabéticos, pois não apresentaram nem sintomas característicos da DMI nem valores de glicémia acima do valor considerado normal, ao longo das duas semanas. Foram assim retirados do estudo.

Tabela VIII: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato III, caixa B.

Caixa B – Rato III				
Dias \ Valores	0	2	6	13
Peso corporal (g)	318	290	286	258
Glicémia (mg/dL)	107	357	419	345

Caixa C

Tabela IX: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato I, caixa C.

Caixa C – Rato I				
Dias \ Valores	0	2	6	13
Peso corporal (g)	328	283	X ³	X ³
Glicémia (mg/dL)	83	417	X ³	X ³

Tabela X: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato II, caixa C.

Caixa C – Rato II				
Dias \ Valores	0	2	6	13
Peso corporal (g)	360	321	334	330
Glicémia (mg/dL)	97	353	>600	>600

Tabela XI: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato III, caixa C.

Caixa C – Rato III				
Dias \ Valores	0	2	6	13
Peso corporal (g)	342	297	X ³	X ³
Glicémia (mg/dL)	72	443	X ³	X ³

Nota 3: No dia 6, o Rato I e o Rato III não resistiram aos efeitos de STZ tendo morrido.

Caixa D

Tabela XII: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato I, caixa D.

Caixa D – Rato I				
Dias	0	2	6	13
Peso corporal (g)	370	316	X ⁴	X ⁴
Glicémia (mg/dL)	71	399	X ⁴	X ⁴

Tabela XIII: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato II, caixa D.

Caixa D – Rato II				
Dias	0	2	6	13
Peso corporal (g)	380	338	341	315
Glicémia (mg/dL)	77	462	513	437

Tabela XIV: Evolução do peso corporal e dos valores de glicémia do Rato III, caixa D.

Caixa D – Rato III				
Dias	0	2	6	13
Peso corporal (g)	367	316	X ⁴	X ⁴
Glicémia (mg/dL)	79	436	X ⁴	X ⁴

Nota 4: No dia 6, o Rato I e o Rato III não resistiram aos efeitos de STZ tendo morrido.

Em todos os ratos que foram considerados diabéticos no estudo piloto, os principais sintomas apresentados pelos animais foram poliúria, polidipsia e uma perda de peso drástica e progressiva, com os animais a registar uma redução de peso de 8-21%, no fim de duas semanas após a indução química. Apresentam-se abaixo os gráficos que representam a evolução dos animais ao longo das duas semanas após a indução da DMI, no que diz respeito aos pesos e aos valores de glicémia basal.

Nos gráficos, o dia 0 representa o dia da administração da STZ e o dia 13, o dia do início do estudo da nova formulação de insulina; o “X” representa o momento em que o animal morreu e “ND” representa o momento em que o animal foi retirado do estudo por não ser diabético.

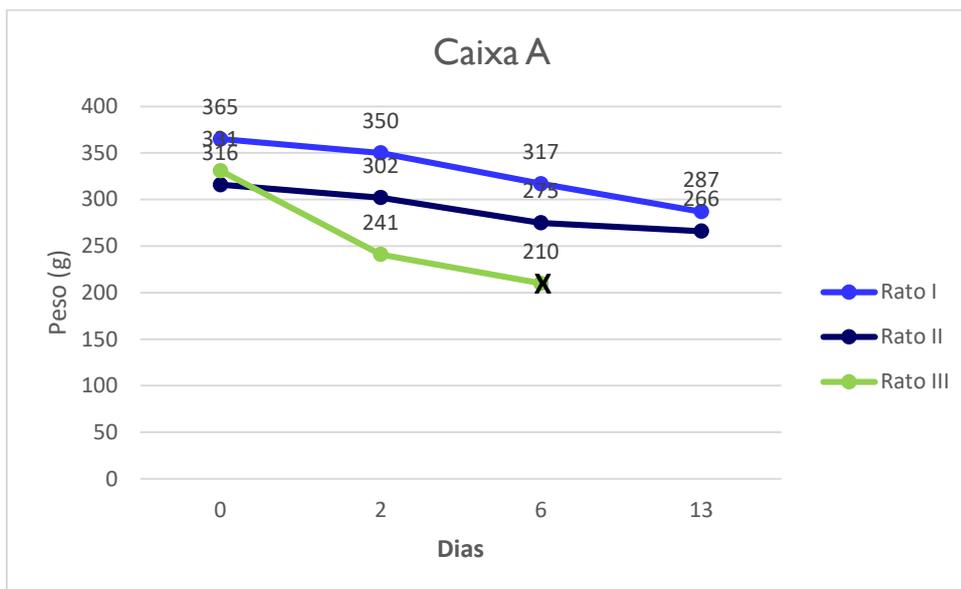


Gráfico I: Variação do peso dos animais da caixa A ao longo do tempo.

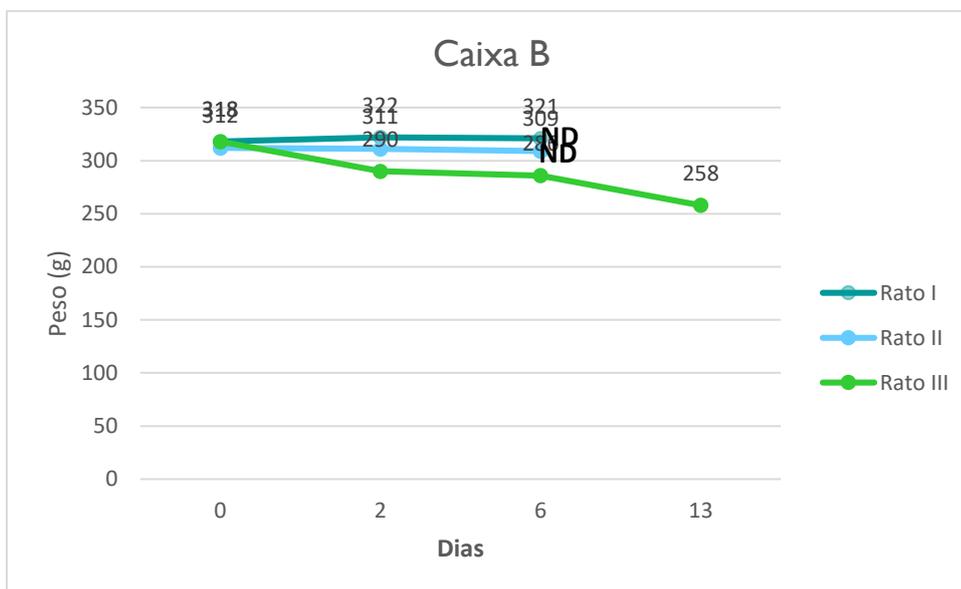


Gráfico II: Variação do peso dos animais da caixa B ao longo do tempo.

Parte III – Experimentação animal na Diabetes Mellitus Tipo I

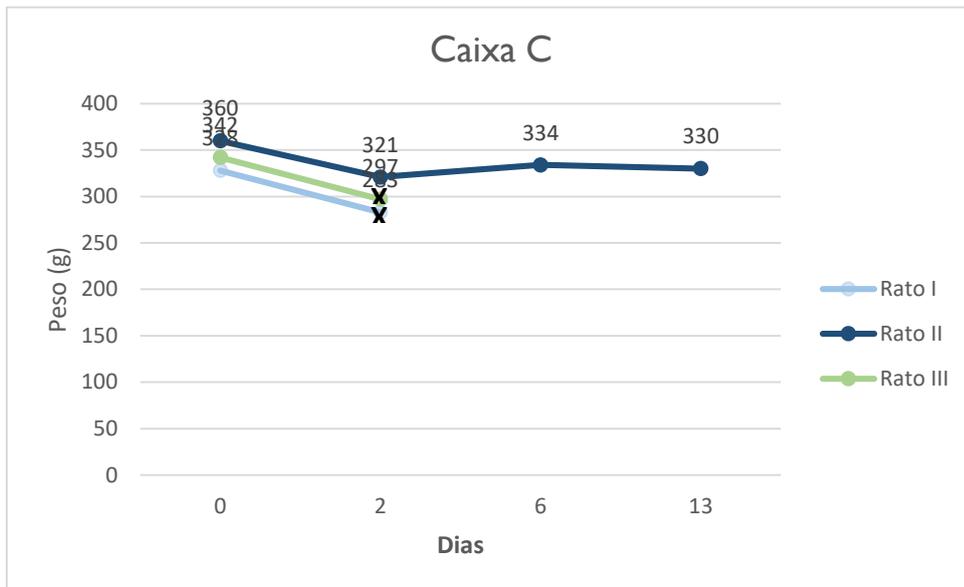


Gráfico III: Variação do peso dos animais da caixa C ao longo do tempo.

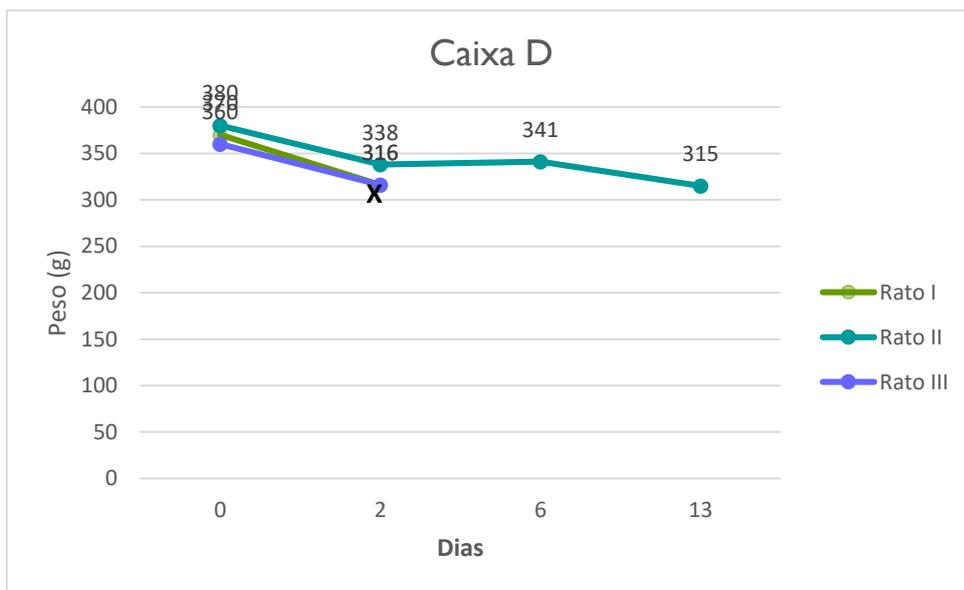


Gráfico IV: Variação do peso dos animais da caixa D ao longo do tempo.

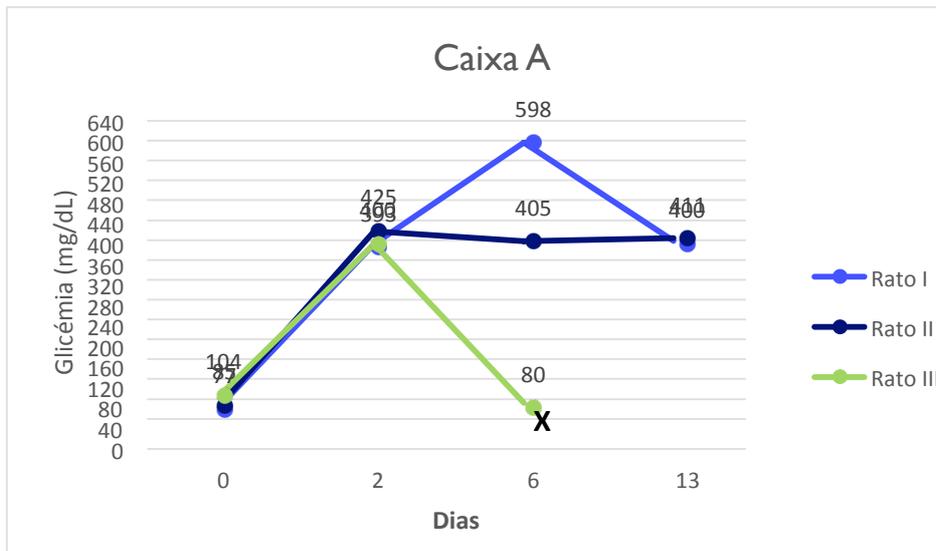


Gráfico V: Variação dos valores de glicemia dos animais da caixa A ao longo do tempo.

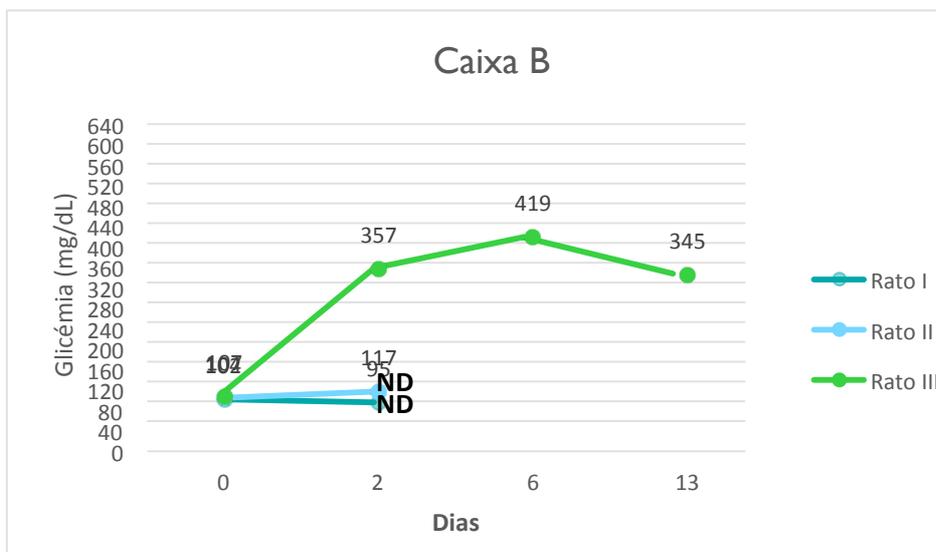


Gráfico VI: Variação dos valores de glicemia dos animais da caixa B ao longo do tempo.

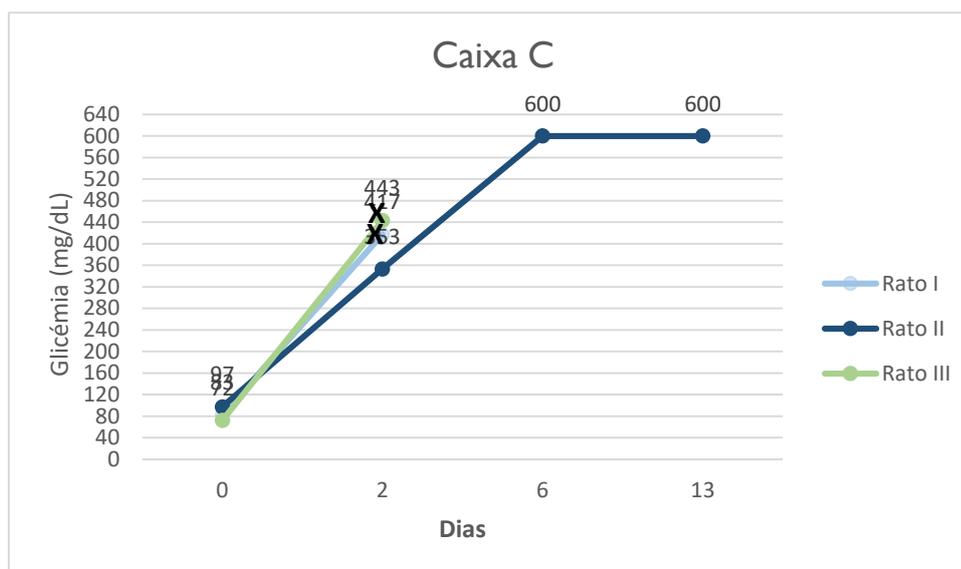


Gráfico VII: Variação dos valores de glicemia dos animais da caixa C ao longo do tempo.

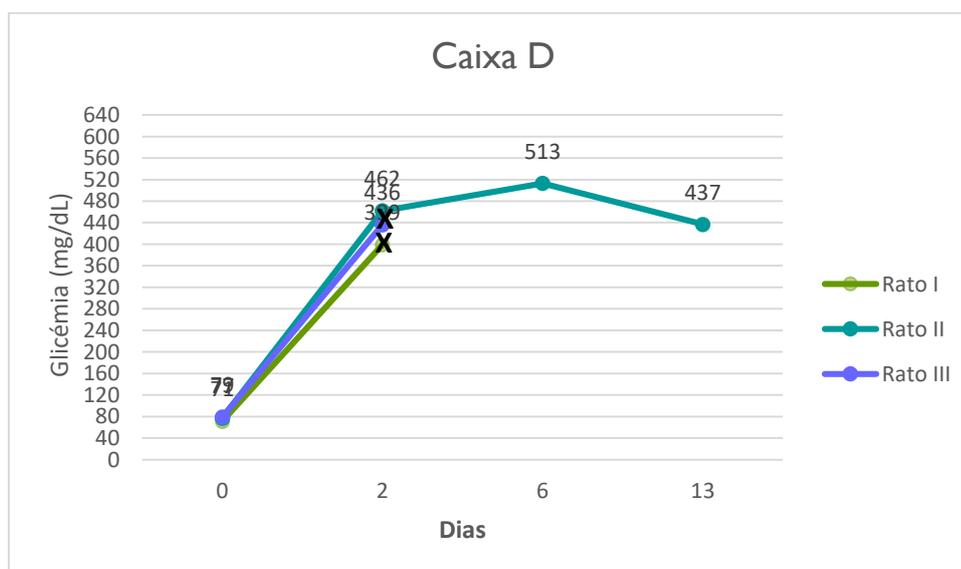


Gráfico VIII: Variação dos valores de glicemia dos animais da caixa D ao longo do tempo.

Após a análise realizada aos vários ensaios pré-clínicos, apresentados nos artigos científicos anteriormente mencionados, e face aos resultados obtidos no estudo pré-clínico apresentado acima, foi possível determinar as diferenças e as variáveis do modelo de indução da DMI por STZ. O fator comum a qualquer dos casos foi o meio de administração do citotóxico, a via intraperitoneal (IP).

No caso da variação da estirpe do animal utilizado, para além da facilmente detetável diferença de pesos médios dos animais (os murganhos C57BL/6 têm substancialmente menores dimensões que os ratos Wistar), foi possível concluir que a dose de STZ utilizada para indução da DMI é superior nos murganhos, em relação aos ratos, particularmente aquando de uma administração única de citotóxico, com uma dose de 150mg/Kg de peso corporal em administração única, ou de 40-60mg/Kg de peso corporal do animal em caso de administrações repetidas por períodos iguais ou superiores a 5 dias. Quanto às diferenças de dose de STZ entre ratos Wistar, verificou-se que existe relativa variação desse valor, tendo nestes casos sido de 50-65 mg/Kg de peso corporal do animal.

Do mesmo modo, não parece existir um consenso sobre qual o valor de glicémia acima do qual os animais se consideram diabéticos e apresentam ainda potencial biológico para prosseguir os ensaios, sendo que nos murganhos o valor de referência manteve-se sempre próximo dos 300 mg/dL (250-300mg/dL), mas que nos ratos variou de 250-450 mg/dL.

No final do processo de indução da diabetes (apresentado nos gráficos como o dia 13, o dia em que se efetuou a administração da nova formulação de insulina), obtiveram-se três resultados diferentes, ao fim das duas semanas, na indução da DMI com este modelo de ratos Wistar, 5 ratos diabéticos, 5 ratos que morreram e 2 ratos que não apresentaram qualquer sintomatologia da síndrome nem valores de glicémia fora do normal, tendo sido considerados como não diabéticos.

Perante estes dados, foi possível concluir que o método de indução da DMI por STZ em ratos Wistar, ainda que continue a ser um dos modelos mais completos e adequados para estudos de novas formulações de medicamentos, não está totalmente otimizado, quer na dose adequada de STZ a administrar aos animais para indução da patologia (havendo algumas variações no que diz respeito aos efeitos do citotóxico, de acordo com a respetiva quantidade administrada), quer nos valores de glicémia de referência a serem utilizados para determinar a presença da DMI e o potencial biológico dos ratos para prossecução dos estudos pré-clínicos para os quais se utiliza este modelo.

Surge assim a necessidade de estudos mais detalhados e com maior número de animais testados, para que seja possível discriminar as variações intraespécie maioritárias na resposta à STZ, determinar qual a dose adequada deste citotóxico a administrar em dose única elevada ou em doses múltiplas reduzidas, e demarcar o valor de glicémia de referência acima do qual os animais são considerados diabéticos e com potencial biológico para continuação do ensaio

pré-clínico, de modo a uniformizar os resultados obtidos com este modelo, protocolando possivelmente o seu método de utilização e processamento.

Conclusão

Atualmente, os modelos animais que se utilizam para estudos relacionados com a DMI, abrangem um grande número de fatores fisiológicos e genéticos relacionados com a síndrome, mimetizando o melhor possível a doença humana. Um dos modelos mais completos para estes estudos, é o modelo de indução química da DMI por STZ em roedores de pequeno porte, ainda que apresente alguma variabilidade no rácio procedimento-resultados, como foi possível constatar ao longo deste documento.

Após a comparação do trabalho laboratorial desenvolvido com alguns estudos prévios em que foi utilizado o mesmo modelo animal de DMI, foi possível concluir que o método de indução química da diabetes por STZ é ainda um método pouco otimizado. Utilizam-se valores de referência divergentes, quer na concentração de citotóxico administrada, quer no valor de glicémia a partir do qual o animal é considerado diabético e apresenta ainda potencial biológico para prosseguir o estudo, e obtêm-se resultados com uma grande variabilidade, como foi o caso do estudo piloto apresentado, em que num total de 12 ratos, se alcançaram os 3 resultados possíveis com a indução da DMI, animais diabéticos, animais que não resistiram aos efeitos do citoquímico e acabaram por morrer, e animais não diabéticos.

Como tal, parece revelar-se assim a necessidade de estudos mais aprofundados e com maior número de animais, de modo a ser possível a determinação das principais variantes que causam estas inconstâncias de procedimentos e resultados, de modo a desenvolver um possível protocolo otimizado, que permita a obtenção de resultados mais fiáveis e mais preditivos nos estudos pré-clínicos em que se aplique este modelo animal de indução da DMI.

Bibliografia

- (1) AL-AWAR, A. *et al.* - Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. **Journal of Diabetes Research**. ISSN 2314-6745 , 2016, 1–12. doi: 10.1155/2016/9051426.
- (2) KING, A. J. F. - The use of animal models in diabetes research. **British Journal of Pharmacology**. ISSN 00071188 , 166(3), 877–894. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x.
- (3) LERCO, M. M. *et al.* - Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos: estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirurgica Brasileira**. ISSN 0102-8650, 18(2), 132–142. doi: 10.1590/S0102-86502003000200010.
- (4) STØRLING, J.; POCIOT, F. - Type I diabetes candidate genes linked to pancreatic islet cell inflammation and beta-cell apoptosis. **Genes**. ISSN 20734425 , 8(2), 1–12. doi: 10.3390/genes8020072.
- (5) WU, X.; CHEN, W. - Chloroquine improves left ventricle diastolic function in streptozotocin-induced diabetic mice. , 2729–2737.
- (6) VITZEL, K. F. *et al.* - Chronic Treatment with the AMP-Kinase Activator AICAR Increases Glycogen Storage and Fatty Acid Oxidation in Skeletal Muscles but Does Not Reduce Hyperglucagonemia and Hyperglycemia in Insulin Deficient Rats. **PLoS ONE**. ISSN 19326203 , 8(4), 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0062190.
- (7) SV, B. *et al.* - Effects of caffeine on locomotor activity in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of medicine and life**. ISSN 1844-3117 (Electronic) , 9(3), 275–279.
- (8) SUN, S. *et al.* - Multifunctional Composite Microcapsules for Oral Delivery of Insulin. **International journal of molecular sciences**. ISSN 14220067 , 18(1). doi:

10.3390/ijms18010054.

- (9) ZHANG, X. *et al.* - Protective effects of berberine on renal injury in streptozotocin (STZ)-Induced diabetic mice. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 14220067 , 17(8), 1–15. doi: 10.3390/ijms17081327.
- (10) WU, H. *et al.* - Resveratrol ameliorates myocardial fibrosis by inhibiting ROS/ERK/TGF- β /periostin pathway in STZ-induced diabetic mice. **BMC Cardiovascular Disorders**. ISSN 1471-2261 , 16(1), 5. doi: 10.1186/s12872-015-0169-z.
- (11) BAEK, J. M. *et al.* - Evaluation of a novel technique for intraperitoneal injections in mice. **TL - 44. Lab animal**. ISSN 0093-7355 , 44 VN-r(11), 440–444. doi: 10.1038/lab.an.880.dfgd
- (12) CLOUTIER, S. *et al.* - The social buffering effect of playful handling on responses to repeated intraperitoneal injections in laboratory rats. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**. ISSN 1559-6109 , 53(2), 168–73.
- (13) DOU, S. *et al.* - Intraperitoneal Injection is Not Always a Suitable Alternative to Intravenous Injection for Radiotherapy. **Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals**. ISSN 1557-8852 , 28(4). doi: 10.1089/cbr.2012.1351.
- (14) Circular normativa da Direção Geral de Saúde, nº 09/DGCG de 04/07/02, *Atualização dos Critérios de Classificação e Diagnóstico da Diabetes Mellitus*. (Consultada a 23/07/2017)
- (15) Diretiva 2010/63/EU do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2010 na proteção de animais utilizados para fins científicos.

Anexos

Anexo I – “New formulation of oral insulin”

New formulation of oral insulin

J. Moreira¹, I.V. Figueiredo^{2,3}, M. Silveira², P. Gonçalves², L. Roque^{1,4}, C. Silva^{1,4}, A. R. Carvalho¹, M. Nicolai^{1,4}, T. Almeida^{1,4}, Saraiva^{1,4}, M. Eduardo-Figueira⁵, P. Faisca^{1,4}, I. Correia⁶, L. Ascensão⁷, P. Riço^{1,4,5} and C. Reis^{1,3,4,8}

¹ Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT), Lisboa, Portugal.
² Faculty of Pharmacy, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.
³ Institute of Biomedical Imaging and Life Sciences (IBILI), Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.
⁴ Center for Research in Biosciences and Health Technologies (CBIOS), ULHT, Lisboa, Portugal.
⁵ iMed.ULisboa, Faculty of Pharmacy, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.
⁶ Centro de Química Estrutural, Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal.
⁷ CESAM, Faculty of Sciences, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.
⁸ IBEB, Faculty of Sciences, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

*catarinapintoreis@ulusofona.pt



INTRODUCTION

Diabetes mellitus is a chronic disease caused by inherited and/or acquired deficiency in production of insulin by the pancreas, or by the ineffectiveness of the insulin produced. People with Type 1 diabetes are usually totally dependent on insulin injections for survival and require daily administration of insulin. Orally administered insulin should improve the patient compliance. In addition, intestinally absorbed-oral insulin actually mimics insulin's natural location and gradients in the body by first passing through the liver (Reis, 2008). The aim of this study was to prepare and characterize a new polymeric-based formulation of oral insulin.

RESULTS

1- NPs characterization

Table 2 – Size, zeta potential and EE.

Mean Particle Size (nm)	Zeta Potential (mV)	Encapsulation efficiency (%)
613.3 ± 76.7	-14.93 ± 0.01	59.8 ± 2.56

MATERIALS AND METHODS

Insulin polymeric nanoparticles (NPs) were produced by spontaneous emulsification method with solvent dispersion followed a specific coating (Fig. 1). Mean particle size, polydispersity index of the NPs and zeta potential were measured in a Particle Analyser. Morphology was assessed by scanning electron microscope. Free insulin present in the supernatant was analyzed by HPLC method and Encapsulation Efficiency (EE%) was determined. The secondary structure of insulin released from NPs was analyzed by circular dichroism and quantified by ELISA. *Ex-vivo* permeation study was performed using segments of excised intestine of Wistar rats (Fig. 2). *In vivo* efficacy studies were performed using STZ-induced diabetic Wistar male rats (Table 1). Empty NPs and insulin-loaded NPs were orally administered through gavage and glycemic values were measured every 15 minutes during the first hour, then every half an hour for the next two hours and, at last, every hour until the 8th hour post-administration.

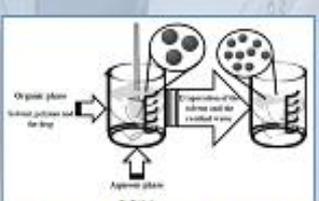


Fig.1 – NPs preparation according to the spontaneous emulsification/solvent displacement method.



Fig.2 – Segments of intestines (duodenum, jejunum, ileum).

Table 1 – Preliminary efficacy <i>in vivo</i> test	
Animal Group	Oral Treatment
I (n=4)	Loaded NPs at 50 IU/kg
II (n=4)	Empty NPs at 50 IU/kg

2- Circular dichroism study (CD spectrum)

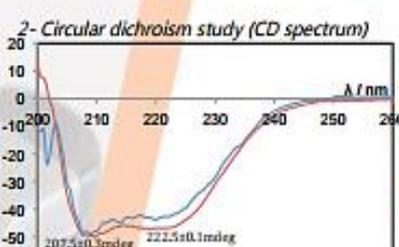


Fig. 4 – CD-Spectra of Commercial insulin (Actrapid 100IU/mL) (Blue) and insulin released from NPs (Red).

It was observed that the secondary structure of protein remains unchanged after the encapsulation process. ✓

3- Ex vivo assay – Histology

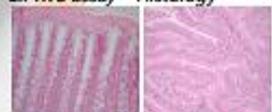


Fig.5 –Histological analysis of the small intestine.

Intestines remain viable after administration of the NPs. ✓

4- In vivo assay

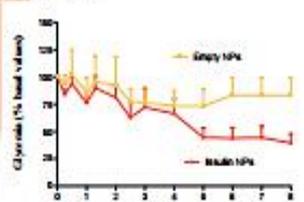


Fig.6 – Mean blood glucose levels of STZ-induced diabetic rats after oral administration NPs (*p=0.0291, n=4 each group).

After 5h, glycemia decreased more than 50%. ✓

CONCLUSION

NPs were capable of releasing bioactive insulin *in vivo*. All excipients used are well accepted in the pharmaceutical field and thus this formulation is able to markedly improve the intestinal absorption of insulin and will be of interest in the treatment of diabetes with oral insulin.