



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Abordagens imunossupressoras para a preservação das células beta na diabetes mellitus tipo 1

Joana Daniela de Araújo Pascoal

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Prof. Doutor Manuel Carlos Loureiro de Lemos

Covilhã, março de 2018

*“Há mais do que uma sabedoria, e todas elas são necessárias ao mundo;
não é mau que elas se vão alternando.”*

Marguerite Yourcenar (1903-1987)

Agradecimentos

Ao Prof. Doutor Manuel Lemos, orientador da dissertação, agradeço pelo apoio, disponibilidade e ajuda ao longo da realização deste trabalho.

A Faculdade de Ciências da Saúde, pela formação oferecida e pelo incentivo constante à aprendizagem e enriquecimento pessoal.

Ao Dr Abdel Maache, por me ter despertado o interesse pelo tema.

Aos meus pais, pelo incondicional apoio e por todo o suporte emocional ao longo deste percurso académico.

Aos meus amigos, por acreditarem sempre em mim, agradeço a paciência, a força e otimismo transmitido ao longo destes anos.

Aos meus colegas, agradeço a partilha de experiência, conhecimentos e conselhos.

Resumo

Introdução: A diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença de etiologia multifatorial com lesão das células beta do pâncreas. Constitui uma das doenças crônicas mais frequentes na infância e adolescência, tendo a sua incidência aumentado nas últimas décadas. No momento do diagnóstico, a maioria dos indivíduos apresenta função residual das células beta, quantificada através do peptídeo-C. Esta patologia leva à deficiente produção de insulina, hiperglicémia e aumento do risco de desenvolvimento de complicações vasculares. Atualmente a terapia existente consiste na administração exógena de insulina com esquemas complexos e na adoção de estilos de vida saudáveis.

Objetivo: O objetivo desta monografia foi apresentar o estado da evidência atual sobre as terapias imunomediadas em DM1 e demonstrar se há possibilidade de oferecer novos tratamentos, mais especificamente com terapias imunossupressoras, com vista à preservação da função das células beta e adiamento da insulino terapia intensiva.

Material e Métodos: O presente trabalho teve como base a pesquisa bibliográfica de artigos científicos na base de dados “PubMed/MEDLINE” com uso das palavras-chaves “type 1 diabetes” e “preservation”. A pesquisa foi limitada a ensaios clínicos randomizados, por estes fornecerem informação com maior validade e grau de evidência, representando o tipo de estudo mais fidedigno, comparativamente com estudos observacionais ou em animais. A pesquisa foi completada através da consulta de documentos de entidades científicas e livros da área abrangida pela tese.

Resultados: Este trabalho identificou 22 artigos que estudaram várias abordagens para a preservação das células beta e da secreção de peptídeo-C na prevenção de complicações e possível remissão da doença em indivíduos com diagnóstico recente. Os ensaios analisados fazem referência a terapias imunossupressoras no âmbito da prevenção terciária. As abordagens são variadas e visam a imunidade inata ou adaptativa, a modulação da resposta dos linfócitos B ou das células T. Nalguns estudos verificou-se que existem resultados promissores, no entanto a maioria dos ensaios clínicos não obteve resultados consistentes para serem aplicados na prática clínica.

Discussão: A falta de uma metodologia e critérios rigorosos para a elaboração de ensaios clínicos na área da DM1 limitou os resultados. Embora algumas terapias tenham alcançado a preservação da secreção do peptídeo-C, esta é geralmente transitória e com o aparecimento de eventos adversos.

Conclusão: No futuro, será importante dar continuidade à investigação desta temática, com metodologias e critérios rigorosos, incluindo também estudos pré-clínicos. Atualmente existem modelos pré-clínicos, murganhos diabéticos não obesos, desenvolvidos no âmbito da prevenção primária e secundária e que constituirão novas direções para a investigação.

Palavras-chave

Endocrinologia; diabetes; células beta; pâncreas; imunologia.

Abstract

Introduction: Type 1 diabetes mellitus (DM1) is a multifactorial disease with pancreatic beta cell lesion. It is one of the most frequent chronic diseases in childhood and adolescence, and its incidence has increased in the last decades. At the time of diagnosis, most individuals have residual beta cell function quantified through the C-peptide. This pathology leads to impaired insulin production, hyperglycemia and increased risk of developing vascular complications. Currently, existing therapy consists of the exogenous administration of insulin with complex regimens and the adoption of healthy lifestyles.

Objective: The objective of this monograph was to present the state of the current evidence on immune-mediated therapies in DM1 and to demonstrate whether it is possible to offer new treatments, more specifically with immunosuppressive therapies, in order to preserve beta cell function and postpone of intensive insulin therapy.

Material and Methods: The present work was based on the bibliographic research of scientific articles in the database "PubMed / MEDLINE" with the use of the keywords "type 1 diabetes" and "preservation". The research was limited to randomized clinical trials, because they provide more valid information and evidence, representing the most reliable type of study, compared to observational or animal studies. The research was completed through the consultation of documents of scientific entities and books of the area covered by the thesis.

Results: This work identified 22 articles that studied several approaches for the preservation of beta cells and C-peptide secretion in the prevention of complications and possible remission of the disease in individuals with a recent diagnosis. The studies that were analyzed refer to immunosuppressive therapies in the field of tertiary prevention. The approaches are varied and target either the innate or adaptive immunity, the modulation of B lymphocyte or T cell response. In some studies, it has been found that there are promising results, however most clinical trials have not achieved consistent results to be applied in clinical practice.

Discussion: The lack of a methodology and strict criteria for the development of clinical trials in the DM1 area limited the results. Although some therapies have achieved preservation of C-peptide secretion, it is generally transient and with the appearance of adverse events.

Conclusion: In the future, it will be important to continue research on this subject, with rigorous methodologies and criteria, including also preclinical studies. There are currently pre-clinical models, non-obese diabetic mice, developed in the context of primary and secondary prevention and that will constitute new directions for research.

Keywords

Endocrinology; diabetes; beta cells; pancreas; immunology.

Índice

Resumo	iv
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas.....	x
Lista de Acrónimos.....	xi
1. Introdução	12
1.1. Definição e classificação	12
1.2. Epidemiologia	13
1.3. Etiologia	13
1.4. Fisiopatologia.....	14
1.5. Secreção residual de peptídeo-C e prevenção	16
2. Material e Métodos	18
3. Resultados.....	19
3.1. Ludvigsson et al (2001)	19
3.2. Ortqvist et al (2004)	20
3.3. Huurman et al (2007)	20
3.4. Huurman et al (2008)	21
3.5. Ludvigsson et al (2008)	22
3.6. Mastrandrea et al (2009)	23
3.7. Rother et al (2009)	23
3.8. Pescovitz et al (2009).....	24
3.9. Ludvigsson et al (2010)	25
3.10. Martin et al (2011)	25
3.11. Sherry et al (2011).....	26
3.12. Ludvigsson et al (2012)	27
3.13. Strom et al (2012)	28
3.14. Ataie-Jafari et al (2013).....	29
3.15. Hagopian et al (2013)	30
3.16. Gitelman et al (2013)	30
3.17. Rigby et al (2013).....	31
3.18. Aronson et al (2014).....	33
3.19. Demeester et al (2014)	33
3.20. Rigby et al (2015).....	34
3.21. Gitelman et al (2016)	35
3.22. Pinckey et al (2016).....	35
4. Discussão	42
5. Conclusão	47
6. Bibliografia.....	48
Anexo	53
Anexo 1 - Autorização de reprodução da Figura 1.....	54

Lista de Figuras

Figura 1: Estádios no desenvolvimento da DM1.....	15
--	-----------

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características dos estudos incluídos.....	37
--	-----------

Lista de Acrónimos

AAC	Auto-anticorpo
ADA	American Diabetes Association
ATG	Anti-thymocyte globulin (globulina anti-timócito)
AUC	Area under the curve (área sob a curva)
CMV	Citomegalovírus
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
EBV	Epstein-Barr virus (vírus Epstein-Barr)
EUA	Estados Unidos da América
GAD65	Glutamic acid decarboxylase 65 antibody (anticorpo anti-descarboxilase do ácido glutâmico)
GCSF	Granulocyte colony-stimulating factor (fator estimulador de colónias de granulócitos)
HbA1c	Hemoglobina glicada
hrlFN- α	Human recombinant interferon-alpha (interferão-alfa humano recombinante)
HLA	Human leukocyte antigen (antigénio leucocitário humano)
IA-2	Tyrosine phosphatase antibody (anticorpo anti-tirosina fosfatase)
IAA	Insulin antibody (anticorpo anti-insulina)
ICA	Islet cell antibody (anticorpo anti-células dos ilhéus)
IDDA1c	Índice de remissão parcial
IDDM	Insulin-dependent diabetes mellitus (designação corrente de genes associados à diabetes mellitus insulino-dependente)
IFN γ	Interferon gamma (interferão gama)
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
LADA	Latent autoimmune diabetes of adult (diabetes latente autoimune do adulto)
MHC	Major histocompatibility complex (complexo principal de histocompatibilidade)
MDNO	Murganhos diabéticos não obesos
MMTT	Mixed-meal tolerance test (teste de tolerância com refeição mista)
MODY	Maturity-onset diabetes of the young (diabetes juvenil de início tardio)
NA	Nicotinamida
PCR	Proteína C reativa
PTGO	Prova de tolerância à glicose oral
Tef	Célula T efetora
Tcm	Célula T de memória central
Tem	Célula T de memória efetora
Tn	Célula T naïve
TNF α	Tumor necrosis factor-alpha (fator de necrose tumoral alfa)
Treg	Célula T reguladora
VD	Vitamina D
VE	Vitamina E
VNTR	Variable number tandem repeat (sequências curtas de repetições polimórficas)
ZnT8	Zinc transporter 8 antibody (anticorpo anti-transportador do zinco 8)

1. Introdução

1.1. Definição e classificação

A diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune caracterizada pela destruição progressiva das células beta dos ilhéus de Langerhans, produtoras de insulina a partir do precursor peptídeo-C, passando por vários estádios até à manifestação clínica da diabetes (1). Esta caracteriza-se por uma tríade clássica sintomática de polidípsia, polifagia e poliúria associado a um estado de hiperglicémia evidente, sendo necessário a implementação de insulino-terapia exógena para o resto da vida (1,2). Apesar da terapia, o controlo glicémico é frequentemente difícil de atingir, levando ao aparecimento gradual de complicações, nomeadamente microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macrovasculares (doença coronária e doença arterial periférica) (3).

Segunda a American Diabetes Association (ADA), os critérios de diagnóstico da diabetes mellitus (DM) definem-se por uma glicémia plasmática em jejum superior ou igual a 126mg/dl ou um valor superior a 200mg/dl após realização de uma prova de tolerância à glicose (PTGO). Em doentes com sintomas clássicos de hiperglicémia, um valor casual superior a 200mg/dl também faz diagnóstico de DM. Em alternativa às medições de glicémia para o diagnóstico de DM, recomenda-se a utilização da hemoglobina glicada (HbA1c). Assim, um valor de HbA1c superior ou igual a 6,5% é indicador de DM (4).

Existem múltiplos tipos de diabetes, sendo a diabetes mellitus tipo 2 a mais prevalente. Tem como origem o desenvolvimento de resistência à insulina que conduz a uma perda progressiva de secreção de insulina pelas células beta. A seguir vem a diabetes mellitus tipo 1, caracterizada por uma destruição autoimune dos ilhéus pancreáticos e consequente défice de insulina. A diabetes mellitus gestacional é diagnosticada durante a gravidez, sem que haja evidências de diabetes antes da gravidez. Finalmente existem outros tipos específicos de diabetes mais raros, incluindo síndromes de diabetes monogénica (diabetes neonatal, diabetes juvenil de início tardio (MODY), diabetes latente autoimune do adulto (LADA)), ou ligados a doenças do pâncreas exócrino ou induzida por produtos químicos (por exemplo uso de corticóides, após transplante de órgãos) ou outras causas (4).

Na DM1, a heterogeneidade da doença levou a propor a classificação de diabetes tipo 1A/autoimune e diabetes tipo 1B/idiopática (1). Cerca de 70 a 90% dos portadores de DM1 enquadram-se no tipo 1A, definido pela presença de um ou mais marcadores autoimunes no início das manifestações clínicas. Entre eles distinguimos os auto-anticorpos (AAC): anti-descarboxilase do ácido glutâmico (GAD65); anti-insulina (IAA); anti-tirosina-fosfatase (IA-2);

anti-transportador do zinco 8 (ZnT8); anti-células dos ilhéus (ICA) (2,4,5). Os AAC apresentam um pico de incidência mais elevado cerca de 2 anos antes do início da sintomatologia e os IAA são geralmente os primeiros a serem detetados. Apesar de ainda não terem um papel definido na patogenia da doença, são utilizados para confirmação do diagnóstico de DM1, identificação de pessoas com elevado risco de desenvolver a doença e seguimento do desenvolvimento da mesma (2,6).

1.2. Epidemiologia

Estudos epidemiológicos da DM1 demonstram um aumento importante da incidência da DM1 ao longo das últimas décadas, constituindo hoje uma das doenças crónicas mais frequentes da infância e adolescência (7) e representa 5-10% dos casos de diabetes segundo a ADA (4). O diagnóstico é mais frequente entre os 5-7 anos e durante a puberdade (2).

A DM1 apresenta uma distribuição muito variável no mundo. A doença é mais incidente na Finlândia e Sardenha (>60 e 40 casos/100000 habitantes, respetivamente), sendo menos frequente na China, Índia e Venezuela (0,1 caso/100000 habitantes). Em Portugal, Suécia, Noruega, Inglaterra e Canadá são observadas taxas superiores a 20 casos por 100000 habitantes. A variabilidade geográfica ainda não foi esclarecida e admite-se cada vez mais o papel influenciador dos fatores genéticos e ambientais tais como a dieta, vitamina D ou vírus (1,2). Em Portugal, em 2014, foram registados 3365 indivíduos com idades entre 0-19 anos com DM1, correspondendo a 0,16% da população portuguesa no escalão etário de crianças e jovens (8).

1.3. Etiologia

Embora o quadro etiológico da doença não tenha sido absolutamente esclarecido, a DM1 é hoje considerada uma doença desencadeada por uma combinação complexa entre resposta imunológica, fatores genéticos e fatores ambientais (9).

Dentro dos fatores genéticos, foram descritos mais de vinte *loci* que conferem suscetibilidade à DM1, denominados IDDM. Os mais importantes estão localizados nos cromossomos 6 (IDDM1) e 11 (IDDM2) (1,10). O sistema de antigénio leucocitário humano (HLA) localizado no cromossoma 6 (locus 6p21.3 ou IDDM1) e constituído por 3 classes (I, II e III) é responsável por cerca da metade da suscetibilidade genética que leva ao aparecimento da doença (2,11). A suscetibilidade ao desenvolvimento da DM1 está mais fortemente associada aos haplótipos HLA de classe II, divididos em 3 subclasses: HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP. Mais especificamente,

sabe-se que os haplótipos DRB1*0401-DQB1*0302 e DRB1*0301-DQB1*0201 conferem maior suscetibilidade à DM1 e os haplótipos DRB1*1501 e DQA1*0102-DQB1*0602 proporcionam resistência (2). O gene da insulina localizado no cromossoma 11 (locus 11p15 ou IDDM2) é o segundo mais importante fator genético de suscetibilidade para a DM1 (9,12). Sequências curtas de repetições polimórficas (VNTR) conferem também um maior risco de desenvolver a doença (1). Com menor peso, outras regiões do genoma humano têm um papel plausível no desenvolvimento da DM1. O gene CTLA-4 codifica uma molécula com ação reguladora das células T, através da ligação às células apresentadoras de antígeno (9). O gene PTPN22 codifica uma proteína envolvida na inibição da ativação dos linfócitos T. O polimorfismo associado ao PTPN22 leva a linfócitos T hiperreativos e aumento da autoimunidade (13).

Os determinantes ambientais mais estudados na DM1 incluem os fatores infecciosos e dietéticos. Dentro das hipóteses virais, o vírus da rubéola é frequentemente citado mas não há evidência direta do seu papel na patogenia da doença (2). Mais recentemente investigou-se o papel dos enterovírus na autoimunidade contra as células beta, mas a relação é ainda controversa. Outros vírus citados são o citomegalovírus (CMV), vírus Epstein-Barr (EBV) e vírus do sarampo mas sem evidência comprovada (1,9,14). Influências nutricionais também foram consideradas como fatores causais da DM1, nomeadamente a exposição precoce ao leite de vaca e à beta-caseína, apesar de a relação ser controversa. Por fim, dados sugerem que uma baixa concentração serológica de vitamina D e polimorfismos no gene do metabolismo da mesma estariam relacionados com o aparecimento da DM1. Com menor peso e evidência, foram sugeridos ainda fatores tóxicos (nitrosamina, dieta com nitrato) e perinatais (incompatibilidade ABO, peso à nascença, pré-eclâmpsia) como possíveis causadores da doença (1,9).

1.4. Fisiopatologia

Em termos fisiopatológicos, a DM1 traduz-se por uma destruição progressiva autoimune das células beta produtoras de insulina, caracterizada pelo quadro histológico de inflamação crónica, linfomononuclear, infiltrativa e seletiva dos ilhéus pancreáticos, designado insulite (3). No período de manifestação clínica da doença, caracterizado por hiperglicémia e cetose, considera-se que mais de 80-90% das células beta estão destruídas, gerando atrofia dos ilhéus. As células secretoras de outras hormonas, como glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático, são poupadas (1).

Segundo Atkinson (2), os agentes ambientais e infecciosos agem como “gatilhos” desencadeadores do processo de autoimunidade. Inicialmente o pâncreas é infiltrado por células dendríticas, linfócitos B e macrófagos que expressam moléculas MHC (complexo principal de histocompatibilidade) classe I e II e apresentam os auto-antígenos específicos

aos linfócitos T CD4+. As células apresentadoras de antígenos e linfócitos T autorreativos são depois ativados, levando à amplificação da resposta com geração de novos auto-antígenos, linfócitos e infiltração de monócitos. De seguida, a resposta imunitária é marcada pela ação dos linfócitos T CD8+ que reconhecem os auto-antígenos pancreáticos e destroem as células beta por citólise e apoptose. Os linfócitos T CD4+ ativados atuam em sinergia e secretam citocinas (fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ) e interleucina-1 (IL-1)) para perpetuar a expansão de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos. Os linfócitos B também participam no processo, primeiro atuando como célula apresentadora de antígenos, e segundo como plasmócitos secretores dos diferentes AAC (ICA, IAA, GAD-65, IA-2, ZnT2) (2,11,15). Gradualmente, as células beta vão diminuir em número e em função, levando à diminuição de produção de insulina e peptídeo-C até ao desenvolvimento da fase clínica da DM1 (3).

Recentemente, a Diabetes Juvenil Research Foundation, Endocrine Society e a American Diabetes Association, dividiram a história natural da DM1 em três estádios. O estádio 1 define-se pela presença de AAC mensuráveis com glicémia normal e sem sintomas. No estádio 2, mantem-se os ACC, surge disglucémia sem sintomas clínicos. O estádio 3 é o estado de diagnóstico clínico, com presença de AAC, hiperglicémia e a presença de poliúria, polidípsia e perda de peso (7).

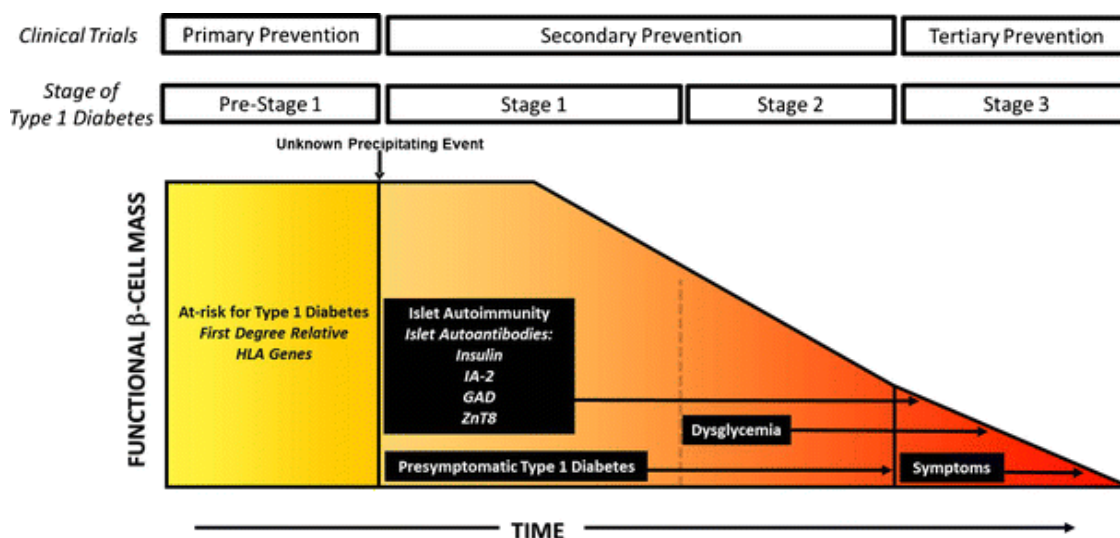


Figura 1: Estádios no desenvolvimento da DM1. Fatores genéticos e ambientais iniciam o processo de autoimunidade. O pré-estádio 1 representa um estado de risco com presença dos genes HLA. O estádio 1 é marcado pelo desenvolvimento de AAC (IAA, GAD-65, IA-2, ZnT2). A homeostasia da glicose é normal e os indivíduos são assintomáticos. No estádio 2, surge disglucémia sem sintomas clínicos. Finalmente no estádio 3, há perda significativa de insulina resultando no desenvolvimento dos sintomas. Definir estádios na DM1 permite desenvolver estratégias de prevenção adaptadas em cada fase: prevenção primária no pré-estádio 1, prevenção secundária nos estádios 1 e 2 e prevenção terciária no estádio 3. Reprodução com autorização de Simmons et al (7).

1.5. Secreção residual de peptídeo-C e prevenção

O declínio constante da função das células beta ao longo do desenvolvimento da doença sugere que é importante intervir no estadio inicial da doença, quando ainda existe uma secreção residual de insulina, pois a preservação da função das células beta melhora o controlo metabólico, diminui a hipoglicémia grave e protege das complicações micro e microvasculares (16). Segundo o Diabetes Control and Complications Trial, até níveis modestos de peptídeo-C endógeno (precursor da insulina) conferem benefícios de saúde a longo prazo (6). A medida padrão utilizada em investigação para medir a secreção endógena de peptídeo-C é o teste de tolerância com refeição mista (MMTT). Permite medir a secreção basal/em jejum, aleatória ou sob estímulo, tendo esta última melhor correlação em detetar uma pequena secreção residual. A medição do peptídeo-C faz-se com colheitas nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos ou mais, após a ingestão oral de refeição mista. Os resultados definem-se com os valores absolutos máximos obtidos após o estímulo ou através da área sob a curva (AUC) (16,17). Um valor de peptídeo-C entre 0,5 a 1,5 nmol/l (1,5 a 4,5 ng/ml) é considerado dentro da faixa de normalidade (16). Um valor <0,2 nmol/l (<0,6 ng/ml) numa colheita aleatória é um forte preditor de diagnóstico de DM1. Ao contrário, um valor $\geq 1,0$ nmol/l (≥ 3 ng/ml) sugere diagnóstico de outro tipo de diabetes em 50% dos casos (18). A resposta na secreção de peptídeo-C estimulado $\geq 0,2$ nmol/l ($\geq 0,6$ ng/ml) após refeição mista resulta em reduções significativas na progressão da retinopatia, nefropatia e taxas de hipoglicémia. Análises adicionais revelam ainda que os benefícios da secreção residual de peptídeo-C estendem-se abaixo do limiar de 0,2 nmol/l (0,6 ng/ml) e que existe praticamente uma correlação linear entre os níveis de peptídeo-C e o risco de complicações microvasculares e hipoglicémia. Assim, a preservação da secreção de peptídeo-C é um resultado primário legítimo para as terapias de intervenção e foi sugerido que este objetivo sirva de base para a aprovação de uma terapia de intervenção na DM1 (19).

Diversos ensaios clínicos nos vários estádios da doença foram desenvolvidos no sentido de prevenir o aparecimento da DM1 e retardar a implementação da insulino-terapia. Os estudos de prevenção primária têm tido como alvo intervenções tais como dietas ou suplementação para impedir o desenvolvimento dos AAC. O foco de ação da prevenção secundária centrou-se em terapias antigénicas em indivíduos portadores de AAC sem doença clinicamente diagnosticada. Por fim, um largo número de ensaios clínicos de prevenção terciária tem vindo a decorrer em indivíduos com DM1 de início recente, com função limitada das células beta. O objetivo tem sido preservar a função residual das células beta, atuando na modulação da resposta inflamatória e da tolerância, através de terapias antigénicas específicas e terapias celulares (6,7). Dentro das intervenções imunológicas, têm sido investigadas moléculas capazes de travar a imunidade inata. A imunidade adaptativa também tem sido alvo de estudo, através de ensaios contra as células B, bloqueios da co-estimulação necessária à ativação das células T, terapias antigénicas específicas, depleção e modulação das células T e

aumento das células T reguladoras, de modo a diminuir a resposta patológica autoimune (6,7).

O objetivo desta monografia é apresentar o estado da evidência atual sobre as terapias imunomediadas em DM1 e demonstrar se há possibilidade de oferecer novos tratamentos, mais especificamente com terapias imunossupressoras, com vista à preservação da função das células beta e adiamento da insulino terapia intensiva. Para tal, serão apresentados e discutidos os resultados de ensaios clínicos randomizados efetuados no âmbito da preservação das células beta na DM1.

2. Material e Métodos

Para a elaboração desta revisão foi efetuada uma pesquisa bibliográfica de artigos científicos, estudos e revisões bibliográficas referentes ao tema, publicados na base de dados “PubMed/MEDLINE” (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

A seleção dos artigos foi efetuada entre janeiro de 2017 e julho de 2017 com uso das palavras-chaves “type 1 diabetes” e “preservation”. A pesquisa restringiu-se a ensaios clínicos randomizados cegos ou duplamente-cegos e estudos realizados em humanos. Os estudos sem grupo controlo foram excluídos. Foram apenas selecionados ensaios clínicos com terapias imunossupressoras em indivíduos com diagnóstico de DM1.

Para localizar artigos que não foram encontrados na pesquisa inicial, recorreu-se ainda às listas de referências bibliográficas dos artigos seleccionados. Durante a pesquisa, não foi realizada limitação relativa à data de publicação dos artigos. Foram analisados artigos de língua inglesa e portuguesa.

A pesquisa foi completada através da consulta de documentos de entidades científicas e livros da área abrangida pela tese.

3. Resultados

A pesquisa bibliográfica na base de dados obteve 63 resultados. Um artigo foi excluído por ter sido retirado da literatura em 2014 (20). Após leitura dos títulos e resumos, 28 artigos foram considerados potencialmente elegíveis. Foram apenas selecionados os ensaios clínicos randomizados com abordagens imunossupressoras e excluídas outros tipos de intervenções isoladas, tais como transplante de células estaminais, dietas alimentares ou exercício físico. A avaliação do texto integral desses estudos levou a incluir 21 artigos. A pesquisa foi completada recorrendo às listas de referências bibliográficas dos artigos seleccionados. Para efeitos de apresentação de resultados nesta monografia, serão analisados 22 artigos obtidos em texto integral, com as características resumidas na Tabela 1.

3.1. Ludvigsson et al (2001) (21)

Este estudo sueco colocou a hipótese de que altas doses de antioxidantes (nicotinamida, vitamina C, vitamina E, beta-caroteno e selénio) podiam preservar a função das células beta em portadores de DM1, através do efeito protetor contra os radicais livres. A amostra composta por 46 jovens entre os 1 e 17 anos foi dividida em dois grupos: o grupo experimental com toma diária de um comprimido de antioxidantes e o grupo placebo com toma diária de um comprimido placebo. O tratamento teve duração de dois anos e um ano de seguimento. Os resultados mostraram não haver diferença significativa nas doses de insulina, na HbA1c ou nos valores séricos de peptídeo-C de jejum e estimulado. Além de não ter um efeito significativo na função de células beta residual, os antioxidantes também não produziram efeitos colaterais. O tratamento com antioxidantes não teve efeito sobre o processo autoimune, evidenciado pela produção mantida de AAC, concluiu-se que não se observou nenhum efeito protector. A dosagem utilizada pode ser a causa deste insucesso por gerar uma concentração muito baixa nos órgãos alvo, embora fossem escolhidas doses da mesma faixa como usadas em estudos anteriores e muito acima dos níveis normais de suplementação de vitaminas. Em conclusão, altas doses destes agentes antioxidantes não são eficazes na preservação das células beta. Este resultado não exclui novas abordagens com a utilização das mesmas substâncias, de forma isolada ou em combinação com outros antioxidantes e novas dosagens, administrada precocemente para adiar ou prevenir a manifestação de diabetes em indivíduos não-diabéticos com alto risco de desenvolver a doença.

3.2. Ortqvist et al (2004) (22)

Neste estudo, examinou-se o efeito do diazóxido, um estimulador de canal K⁺ sensível ao ATP e inibidor da secreção de insulina, nas células beta em 56 crianças com DM1 de início recente. O tratamento consistiu na toma 3 vezes ao dia de diazóxido (5-7.5 mg/kg de peso corporal) ou de um placebo durante 3 meses, mantendo a insulino terapia prescrita. A avaliação dos parâmetros HbA1c, AAC, doses de insulina e quantificação do peptídeo-C foi realizada aos 1, 2, 3, 6, 12, 18 e 24 meses. Durante os 3 meses de tratamento, houve um aumento transitório do peptídeo-C no grupo placebo contrastando com uma diminuição no grupo experimental. Após o período ativo de tratamento, os níveis de peptídeo-C estimulado no grupo experimental aumentaram, atingiu um máximo aos 6 meses, e seguiu-se um declínio para valores basais. No grupo placebo esta tendência não se verificou e os níveis continuaram a diminuir. Após 24 meses ambos os grupos apresentavam valores de peptídeo-C de jejum e estimulado próximo dos valores basais, apesar do declínio no peptídeo-C estimulado parecer ser mais suave no grupo experimental. Contudo, não houve diferenças no controlo glicémico, HbA1c e doses de insulina entre os grupos após 24 meses. Foi sugerido que o diazóxido tivesse um efeito inibidor da produção endógena de insulina e aumentasse a sensibilidade à insulina exógena. Os efeitos colaterais do diazóxido foram prevalentes, sobretudo com hipertricose e edema. No presente estudo, os resultados demonstraram que a inibição da libertação de insulina endógena por diazóxido suprimiu parcialmente a produção de insulina, atrasou o fenómeno de remissão e aumentou transitoriamente a função residual das células beta. No entanto, poucas crianças alcançaram concentrações de peptídeo-C estimulado na faixa normal, obtendo menos benefício com o tratamento em comparação com o mesmo estudo em adultos (23). Esta constatação talvez seja justificada pelo facto das crianças terem um processo destrutivo autoimune mais agressivo com um período mais curto de sintomas antes do diagnóstico e níveis mais baixos de peptídeo-C no momento do diagnóstico. A alta taxa de efeitos colaterais adversos, embora leves, e os resultados menos positivos em comparação com os adultos, tornaram o tratamento com diazóxido uma alternativa menos atraente no tratamento de crianças e abrindo portas para futuras investigações, com moléculas estimuladoras de canais K sensíveis a ATP mais específicas ou em combinação com novos regimes imunossupressores.

3.3. Hurman et al (2007) (24)

A proteína de choque térmico de 60 kDa (hsp60) é um dos auto-antígenos alvo conhecidos da DM1. O peptídeo imunogénico p277 modificado de hsp60 (DiaPep277) impede a destruição de

células beta, invertendo a produção de citocinas de um estado pró para anti-inflamatório e mantém a produção de insulina em murghanos diabéticos não obesos (MDNO). O ensaio apresentado estudou o efeito de DiaPep277 sobre a preservação das células beta. Uma amostra de 48 utentes foi dividida em quatro grupos: um recebeu injeções placebo; os outros três receberam injeções subcutâneas de 0,2, 1,0 ou 2,5 mg de DiaPep277 respetivamente ao início, após 1, 6 e 12 meses até completar um total de quatro injeções. Os indicadores de resultados avaliados envolveram a quantificação do peptídeo-C, HbA1c e doses diárias de insulina. Os níveis de peptídeo-C estimulado diminuíram significativamente ao longo de 12 meses em todos os grupos, exceto no grupo tratado com dose de 2,5 mg que manteve uma secreção próxima do valor basal. O grupo placebo foi o que revelou maior perda de peptídeo-C e o grupo 2,5 mg aquele que mais conservou a secreção. A HbA1c aumentou significativamente no grupo de 1,0 mg aos 2 meses e surpreendentemente aumentou no grupo de 2,5 mg aos 18 meses. Não foram observadas diferenças nas doses diárias de insulina. Deste modo, a administração múltipla de DiaPep277 parece segura e pode ter um efeito benéfico sobre os níveis de peptídeo-C ao longo do tempo, mas esta descoberta não é suportada pelos resultados de HbA1c e doses de insulina. É necessária uma investigação mais aprofundada numa escala maior.

3.4. Hurman et al (2008) (25)

Este estudo veio aprofundar os resultados do artigo anterior, na medida em que foi estudada a eficácia imunológica do DiaPep277 e feita uma correlação com os resultados clínicos. Nesta fase do estudo, foram realizados testes imunológicos até aos 18 meses após o início do ensaio para comparar a qualidade e quantidade de citocinas produzidas em resposta ao DiaPep277. Foi avaliada a resposta imune através da determinação da citocina maioritariamente produzida antes e após cada injeção. Antes do tratamento o número de células produtoras de citocinas era geralmente baixo. Após as injeções, os doentes do grupo experimental demonstraram uma resposta imune alterada para DiaPep277, dominada pela produção de IL-10. Estabeleceu-se uma correlação na qual a maior produção de IL-10 antes da terapia era associada à preservação das células beta e à diminuição da proliferação de células T. Relativamente ao peptídeo-C, os doentes que apresentavam uma resposta com IL-10 antes da terapia mostraram preservação da produção de peptídeo-C. Este resultado sugeriu que a resposta imune pré-tratamento possa ser preditiva do resultado e ser assim considerada um parâmetro relevante em futuras investigações. No entanto, não existe relação entre a produção de IL-10 e o resultado clínico. Pensa-se que IL-10 funciona em conjunto com outras moléculas para induzir tolerância imune e não se substitui à regulação imunológica induzida por DiaPep277. Os resultados demonstram que o tratamento com o DiaPep277 é

imunologicamente seguro, manifesta eficácia imunológica e permite abrandar a perda de células beta.

3.5. Ludvigsson et al (2008) (26)

A descarboxilase do ácido glutâmico (GAD)-alum é uma vacina que incorpora o AAC GAD65 humano recombinante combinado a um antigénio, foco de ação dos linfócitos T autorreativos na DM1. Pensa-se que a vacinação intermitente com esta proteína possa induzir tolerância imune ao GAD65, interrompendo a destruição da célula beta. Este ensaio sueco avaliou a capacidade GAD-alum em reverter a DM1 de início recente em jovens de 10 a 18 anos. Uma amostra de 70 indivíduos foi randomizada em dois grupos: o grupo experimental recebeu uma injeção subcutânea no dia 1 de 20 µg de GAD-alum seguida de reforço no dia 30 e o grupo controlo um placebo. Ambos mantiveram insulino-terapia para o objetivo de HbA1c <6.5%. Foram avaliados parâmetros relativos à Hb1Ac, necessidades de insulina, secreção de peptídeo-C, contagem de células brancas e inflamatórias e ocorrência de eventos adversos. A frequência e o padrão de eventos adversos durante o período principal do estudo foram semelhantes entre os dois grupos de estudo. As necessidades em insulina em ambos os grupos aumentaram ao longo do estudo, assim como a HbA1c e a glicémia plasmática. Ambos os grupos de estudo mostraram uma diminuição progressiva do nível de peptídeo-C de jejum e estimulado, indicando uma perda gradual da função das células beta, embora menor no grupo experimental. Não houve efeito significativo do tratamento com GAD-alum na variação do nível de peptídeo-C de jejum após 15 meses, embora tenha havido um efeito no peptídeo-C estimulado. Após 30 meses, a secreção de peptídeo-C (jejum e estimulado) teve um declínio significativamente menor no grupo GAD-alum do que no grupo placebo, demonstrando um efeito protetor aparente. No entanto, este efeito foi apenas observado no subgrupo de pessoas com diagnóstico há menos de 6 meses. Os resultados sugeriram que duas injeções de 20 µg de alumínio GAD podiam contribuir para a preservação da secreção residual de insulina em doentes com DM. Relativamente às células brancas, o GAD-alum induziu a produção de uma população de células T específicas com uma ampla gama de citocinas envolvida na regulação do sistema imunitário. O tratamento também induziu uma função de memória das células B mais duradoura e específica. Em conclusão, o tratamento com GAD-alum pode contribuir para a preservação das células beta e está associado à modulação das respostas imunes de memória ao GAD, talvez responsável pela preservação das células beta, embora não reduzisse as necessidades em insulina.

3.6. Mastrandrea et al (2009) (27)

O etanercept é uma proteína de fusão recombinante do recetor TNF- α que se liga ao TNF- α , de forma a eliminar e bloquear esta citocina destruidora das células beta. Foi realizado um ensaio com duração de 36 semanas. Os 18 participantes foram distribuídos aleatoriamente para injeções subcutâneas de placebo ou etanercept, duas vezes por semana durante 24 semanas. Entre as semanas 8 e 24 do tratamento, houve uma diminuição na HbA1c basal consistentemente maior a favor do grupo etanercept. A HbA1c sofreu uma diminuição nos dois grupos, mais importante no grupo etanercept entre as semanas 8 e 24 e manteve-se estável até às 4 semanas de seguimento. Os valores de glicémia pré-prandiais também diminuíram em ambos os grupos. A variação percentual da área sob a curva do peptídeo-C desde o início até à semana 24 aumentou 39% no grupo etanercept enquanto diminuiu 20% no grupo placebo, demonstrando um aumento da secreção de peptídeo-C no grupo experimental. Não houve associação entre a duração da DM1 e o peptídeo-C ou HbA1c. Durante o período total do estudo, as doses de insulina diminuíram 18% no grupo etanercept e aumentaram 23% no grupo placebo. Estes resultados sugeriram que a diminuição das necessidades em insulina fosse devido à preservação da secreção endógena de insulina. Não houve relatos de eventos adversos severos durante o estudo. Embora esses resultados sejam promissores, os indivíduos que recebem etanercept devem ser cuidadosamente monitorizados para o risco de desenvolver outras doenças imunológicas. São necessários mais estudos para confirmar que o etanercept pode modular a progressão da DM1, estudar a possível combinação com outro agente modulador das células T e avaliar de forma mais profunda a relação risco-benefício da terapia com etanercept nesta população.

3.7. Rother et al (2009) (28)

O estudo de Rother et al (28) é o primeiro ensaio randomizado que testou a segurança e eficácia da ingestão de interferão-alfa humano recombinante (hrIFN- α) sobre a preservação das células beta. A molécula tem propriedades imunológicas através do aumento das citocinas IL-4 e IL10. A amostra de 128 participantes foi dividida em 3 grupos: dois grupos experimentais tomaram o hrIFN- α mensalmente (doses de 5.000 e 30.000 U respetivamente) e o terceiro grupo recebeu um placebo. A monitorização foi feita a cada 3 meses com determinação da secreção de peptídeo-C e exame clínico para avaliação de eventuais eventos adversos, até completar 12 meses de estudo. Os indivíduos tratados com hrIFN- α apresentaram uma percentagem de perda de peptídeo-C aos 12 meses inferior em relação ao grupo controlo. Por outro lado, a preservação foi maior no grupo que recebeu 5.000 U. A superioridade da dose de 5.000 U de hrIFN- α relativamente à dose de 30.000 U é consistente

com dados humanos e animais que suportam uma maior eficácia de doses mais baixas de interferão em doenças autoimunes. Não houve diferenças significativas entre os grupos na diminuição de HbA1c, no aumento de doses de insulina e na ocorrência de eventos adversos. As limitações do estudo relacionaram-se com a falta de uniformização das medidas iniciais do peptídeo-C pelo facto do estudo decorrer em cinco centros clínicos diferentes. Também foi mencionada a dificuldade em ajustar a insulino-terapia de forma homogénea entre os participantes, podendo influenciar os valores de glicémia e preservação do peptídeo-C. Os efeitos a longo prazo de hrIFN- α na DM1 são desconhecidos, sendo necessários mais estudos para determinar se existe algum benefício.

3.8. Pescovitz et al (2009) (29)

Este estudo desenvolvido nos EUA e Canadá avaliou o efeito do rituximab (anti-CD20) na depleção dos linfócitos B. Os 87 participantes, com idades entre os 8 e 45 anos, foram randomizados para tratamento ativo e placebo. A intervenção baseou-se na injeção de rituximab ou placebo nos dias 1, 8, 15 e 22. O ensaio foi interrompido durante 2 meses devido a complicações graves que surgiram com o uso de rituximab em pacientes com lúpus eritematoso sistémico, até reunir as condições de segurança para prosseguir. O seguimento estendeu-se até aos 12 meses. Os indicadores de resultados contemplaram a AUC relativa ao peptídeo-C às 2 e 4 horas após MMTT; Hb1Ac; doses de insulina; contagem de CD19+, IgM e IgG, ocorrência de eventos adversos, aos 3, 6 e 12 meses. No final do seguimento, ambos os grupos apresentaram secreções de peptídeo-C inferiores ao basal, no entanto, os níveis de peptídeo-C foram significativamente maiores no grupo rituximab relativamente ao grupo placebo. O grupo experimental também apresentou níveis significativamente mais baixos de Hb1Ac e necessidades em insulina sensivelmente inferiores, comparativamente com o grupo placebo. Entre 3 meses e 12 meses, a taxa de declínio na secreção de peptídeo-C no grupo rituximab foi significativamente menor do que no grupo placebo (37,7% versus 55,8% por ano). Os efeitos positivos do tratamento foram mais evidentes entre os 0 e 3 meses. Os linfócitos B CD19+ foram esgotados no primeiro mês em pacientes com o grupo rituximab, mas os níveis aumentaram gradualmente para 69% dos valores basais ao fim de 12 meses. Os eventos adversos foram mais frequentes no grupo experimental, na maioria de grau leve, após a primeira infusão e atenuadas com infusões seguintes. Em conclusão, um tratamento com quatro doses de rituximab preserva parcialmente a função das células beta durante um período de um ano em doentes com DM1. Este estudo reforça a hipótese de que existem benefícios em atuar contra a resposta imunitária mediada por células B.

3.9. Ludvigsson et al (2010) (30)

Este estudo representa a continuidade da avaliação do ensaio sueco realizado em 2008 (26) que pretendeu avaliar a segurança e eficácia da injeção de GAD-alum em crianças e adolescentes com DM1 após 4 anos de seguimento. Os resultados após 30 meses mostravam preservação significativa da secreção residual de insulina. A eficácia foi mais evidente no subgrupo de doentes com diagnóstico de DM1 há menos de 6 meses. O tratamento foi muito bem tolerado, os efeitos adversos foram pouco frequentes e não relacionados com o tratamento. Após 4 anos, manteve-se a significativa e contínua preservação do peptídeo-C após a injeção de GAD-alum em doentes do grupo experimental com diagnóstico de DM1 há menos de 6 meses, em comparação com o placebo. No entanto, após a análise dos resultados de todos os participantes, o efeito do GAD-alum não foi estatisticamente significativo. Não houve diferença significativa na secreção de peptídeo-C entre os doentes do grupo experimental com diagnóstico de DM1 há mais de 6 meses e o grupo placebo. Apesar das limitações do estudo com o tamanho reduzido da amostra, o tratamento de crianças e adolescentes com DM1 com GAD-alum mostrou-se seguro mesmo 4 anos após a administração. Apesar da diminuição gradual, a secreção de peptídeo-C de jejum foi mais preservada nos doentes do grupo experimental com diagnóstico de DM1 há menos de 6 meses em comparação com o grupo placebo, o que sugere um efeito razoavelmente longo.

3.10. Martin et al (2011) (31)

O fármaco atorvastatina, agente hipolipemiante, também tem propriedades imunomoduladoras. O objetivo do estudo alemão DIATOR foi investigar o possível efeito da atorvastatina sobre o declínio da função residual das células beta na DM1. Os 89 participantes receberam placebo ou 80 mg/dia de atorvastatina durante 18 meses. Os níveis de peptídeo-C de jejum e estimulado diminuíram e não foram significativamente diferentes entre os grupos aos 18 meses. No entanto, o declínio iniciou mais cedo (aos 12 meses) e com maior intensidade no grupo placebo (de 0,34 para 0,23 e 0,20 nmol/l, $p < 0,001$) relativamente ao grupo experimental (de 0,34 para 0,27 e 0,30 nmol/l, ns). As concentrações medianas de peptídeo-C estimulado diminuíram no primeiro ano, seguido de uma perda importante aos 18 meses no grupo placebo, que não se verificou no grupo experimental. Os valores medianos do peptídeo-C em jejum e estimulado foram cerca de 50% e 48% maiores, respetivamente, no grupo atorvastatina em comparação com o grupo placebo, embora a diferença não permita afirmar que houve preservação das células beta. Os níveis médios de colesterol total diminuíram apenas no grupo de atorvastatina. A diminuição da proteína C reativa (PCR) mostrou uma redução dos processos inflamatórios, embora a análise das concentrações

circulantes de 14 mediadores imunes não revelasse alterações associadas ao tratamento com estatinas. O controlo metabólico foi semelhante entre os grupos, com diminuição da HbA1c (de 7,8 para 6,6% para atorvastatina e de 7,5 para 6,7% para placebo). Paradoxalmente houve um aumento nas doses diárias de insulina aos 12 meses, mais rápido no grupo experimental. Em conclusão, o tratamento com atorvastatina foi seguro e bem tolerado mas não preservou significativamente a função das células beta, embora tenha havido um declínio mais lento da função das células beta relativamente ao grupo placebo, o que merece mais estudos. Uma comparação com os resultados do ensaio em curso de atorvastatina em crianças e adolescentes com DM1 ajudará a avaliar o potencial desta modalidade de tratamento.

3.11. Sherry et al (2011) (32)

“Protégé” foi um estudo de fase III que teve como objetivo avaliar a eficácia e segurança de três dosagens intravenosas de teplizumab, na preservação do peptídeo-C na DM1, assim como identificar as características associadas à resposta à terapia. O teplizumab é um anticorpo anti-CD3 mutado humanizado para reduzir a ligação do recetor Fc e do complemento e assim diminuir a resposta autoimune. O ensaio teve lugar em 83 centros distribuídos pelos EUA, Europa, Israel e Índia. A amostra contou com 516 participantes randomizados em 4 grupos (2:1:1:1) estratificados por idades e país. O grupo “14 dias-alta-dose” recebeu uma dose cumulativa de 9.034 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ de teplizumab; o grupo “14 dias-baixa-dose” recebeu uma dose cumulativa de 2.985 $\mu\text{g}/\text{m}^2$; o grupo “6 dias-alta-dose” recebeu uma dose total de 2.426 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ durante 6 dias seguido de 8 dias de placebo e o grupo placebo recebeu 14 dias de infusões de placebo. Realizaram-se dois ciclos de tratamento, na semana 1 e 26 e o seguimento teve duração de dois anos. Todos os grupos mantiveram insulino-terapia com o objetivo de manter a HbA1c $\leq 6.5\%$. As características basais eram equilibradas dentro dos grupos, mas diferentes em função das regiões. Mais especificamente, os doentes na Índia apresentavam uma HbA1c e doses de insulina diárias mais elevadas e menor secreção basal de peptídeo-C. Após um ano, foi elaborado um artigo com os primeiros resultados apesar do estudo ainda decorrer. Os indicadores de resultados primários avaliados foram as variações de HbA1c e as doses de insulina e os indicadores de resultados secundários foram a variação na secreção de peptídeo-C (medida pela AUC), a proporção de doentes com HbA1c $< 7\%$ e com necessidades de insulina $< 0,5\text{U}/\text{kg}/\text{dia}$. Relativamente aos indicadores de resultados primários, a HbA1c e as doses diárias de insulina diminuíram após a entrada no estudo, mas aumentaram após o terceiro mês. O grupo “14 dias-alta-dose” apresentou a maior diminuição no uso de insulina ao longo do período de estudo, mas esta diferença não foi significativa. No entanto, 5% (19 doentes) dos doentes que receberam teplizumab não necessitaram de insulina exógena no primeiro ano em comparação com nenhum dos doentes do grupo placebo, sendo

que 15 doentes apresentaram uma HbA1c <7%. A proporção de participantes que atingiram HbA1c <7% e um uso de insulina <0,25 U/kg por dia foi maior no grupo “14 dias-alta-dose” do que no grupo placebo. Em relação ao peptídeo-C, o declínio foi menor no grupo “14 dias-alta-dose” do que no grupo placebo. Cerca de 40% do grupo “14 dias-alta-dose” apresentaram preservação ou aumento da AUC do peptídeo-C em relação à linha de base, em comparação com 28% do grupo placebo. Melhores resultados na preservação do peptídeo-C foram obtidos no grupo de “14 dias-alta-dose” e especificamente em três subgrupos: crianças de 8 a 11 anos; originário dos EUA; doentes randomizados às 6 semanas ou menos após o diagnóstico. Quase todos os participantes (99%) apresentaram eventos adversos e 10% manifestaram eventos adversos graves com um padrão semelhante entre os grupos. A linfopenia e a erupção cutânea ligeira e autolimitada foram os eventos adversos mais frequentes no grupo experimental. Uma elevada proporção de participantes apresentava IgG anti-EBV antes do estudo, sendo que apenas 5% dos participantes do grupo experimental tornaram-se positivos para EBV durante o estudo contra 7% dos participantes no grupo placebo. Uma maior proporção de pacientes nos grupos de teplizumab manteve uma secreção de peptídeo-C permitindo a descontinuação de insulina. A análise permitiu ainda identificar subgrupos mais propícios a responder ao tratamento. O aumento da resposta em pacientes dos EUA e aqueles tratados dentro de 6 semanas de diagnóstico sugere que há uma vantagem em tratar precocemente. Os resultados mostraram que o teplizumab teve efeito sobre a preservação de peptídeo-C e na redução das necessidades em insulina, mantendo o controlo glicémico, particularmente em subgrupos seleccionados. As limitações deste estudo incluíram a falta e necessidade de acompanhamento adicional para determinar a segurança e a eficácia a longo prazo assim como a ausência de documentação de eventos de hipoglicémias. Os dados sugerem que estudos futuros que pretendam examinar os efeitos da terapia anti-CD3 podem beneficiar do recrutamento de participantes jovens tratados precocemente após o diagnóstico.

3.12. Ludvigsson et al (2012) (33)

Após os resultados promissores dos estudos com GAD-alum em 2008 e 2010 (28,32), Ludvigsson et al realizaram novo ensaio com frequências diferentes de injeção de 20µg GAD-alum e uma amostra maior alargada a outros países europeus, de modo a aperfeiçoar a investigação sobre os possíveis efeitos do GAD-alum na preservação das células beta. Os 334 indivíduos seleccionados foram distribuídos aleatoriamente para receber um dos três tratamentos de estudo: quatro doses de 20 µg de GAD-alum nos dias 1, 30, 90 e 270; duas doses de GAD-alum nos dias 1 e 30 seguidas de 2 doses de placebo nos dias 90 e 270; quatro doses de placebo nos dias 1, 30, 90 e 270. Todos mantiveram a insulinoterapia concomitante. O indicador de resultado primário foi a variação da secreção de peptídeo-C estimulado entre a visita inicial e

a visita aos 15 meses. Os indicadores de resultados secundários incluíram a HbA1c, a dose média diária de insulina, a taxa de hipoglicémia, e os níveis de peptídeo-C de jejum, estimulado e máximo. Este estudo mostrou que o tratamento com GAD-alum não resultou em benefício significativo em relação à variação na secreção estimulada de peptídeo-C. Além disso, não houve benefício significativo na dose média diária de insulina ou no valor da HbA1c. A taxa de eventos adversos foi baixa nos três grupos de estudo. Em conclusão, o tratamento com diversos esquemas de injeção de GAD-alum não reduziu significativamente a perda de peptídeo-C estimulado e não melhorou os parâmetros clínicos ao longo de um período de 15 meses. Esta falta de eficácia no presente estudo, comparativamente com os anteriores, pode ser explicada pelo facto da amostra envolver indivíduos de países diferentes com abordagens não padronizadas relativamente ao tratamento convencional. Variações sazonais no sistema imunológico podem também desempenhar um papel, visto que o tratamento pareceu ter efeito em doentes que receberam a dose inicial de GAD-alumínio em março ou abril, efeito igualmente verificado no estudo de 2008. Durante o presente estudo, uma epidemia de gripe resultou numa vacinação generalizada, que também poderá ter influenciado os resultados. Para além disso, os grupos não foram estratificados pela idade nem pelo sexo, o que poderá ter alterado o resultado visto que o declínio do peptídeo-C costuma ser mais rápido em doentes mais jovens. O tratamento para DM1 com auto-antígenos merece uma compreensão mais aprofundada das doses e das vias que podem induzir a tolerância imunogénica.

3.13. Strom et al (2012) (34)

Este estudo alemão, baseado no ensaio de Martin et al (2011) (31) teve como objetivo a análise secundária e a identificação dos subgrupos de doentes que diferiram no declínio da função das células beta durante o tratamento com atorvastatina. Para esta análise secundária, os pacientes foram estratificados por características basais consideradas possivelmente modificáveis pelo tratamento com atorvastatina. A análise primária do ensaio DIATOR (31) não resultou num efeito significativo do tratamento com atorvastatina nas concentrações estimadas de peptídeo-C aos 18 meses, embora o valor mediano do peptídeo-C tenha sido cerca de 50% maior no grupo atorvastatina em comparação com o grupo placebo. O motivo subjacente foi uma grande variedade de concentrações de peptídeo-C entre os doentes aos 18 meses. Perante este facto, investigou-se a possibilidade das características basais dos participantes terem influência na preservação da função das células beta quando tratados com atorvastatina. Os subgrupos definidos por idade, sexo ou por parâmetros metabólicos basais como índice de massa corporal (IMC), colesterol sérico total ou peptídeo-C em jejum não diferiram na variação do peptídeo-C após o tratamento com atorvastatina. No entanto, o subgrupo com PCR basal elevada (acima da mediana) apresentou valores de

secreção de peptídeo-C estimulado significativamente maiores após tratamento com atorvastatina do que o subgrupo com PCR basal baixa. Os níveis de PCR basais individuais correlacionaram-se com o resultado do peptídeo-C no grupo atorvastatina, o que não foi verificado no grupo placebo. No entanto, não houve correlação entre a extensão da redução da PCR mediada pela atorvastatina e a secreção de peptídeo-C. Este facto sugeriu que o aumento das concentrações de PCR basais poderia ser um marcador de resposta ao tratamento com atorvastatina, mas que o grau de redução da PCR não estaria diretamente envolvido na melhor preservação da função das células beta em resposta à atorvastatina.

3.14. Ataie-Jafari et al (2013) (35)

Este estudo iraniano quis demonstrar que a suplementação com alfacalcidol podia preservar a função das células beta em crianças e adolescentes com DM1. A vitamina D parece modelar o sistema imune, através da regulação da função de tolerância da imunidade celular e humoral. Também regula a expressão do gene da insulina. O alfacalcidol é um análogo da vitamina D com maior duração de ação e baixa carga renal o que lhe oferece um perfil favorável risco/benefício relativamente ao calcitriol. Foi realizado um ensaio clínico cego com duração de 6 meses. A amostra composta por 61 participantes foi dividida aleatoriamente em 2 grupos: o grupo experimental recebeu 0.25 µg de alfacalcidol, duas vezes por dia, contra um placebo para o grupo de controlo. Todos mantiveram insulino-terapia concomitante. No final do estudo, os valores de peptídeo-C de jejum foram mais elevados e as doses diárias de insulina diminuíram no grupo experimental comparativamente com o placebo. As mudanças na dose diária de insulina precederam as variações no peptídeo-C de jejum, talvez explicado pelo facto da monitorização de peptídeo-C de jejum não detetar precocemente a perda de células beta tão eficazmente como a monitorização de peptídeo-C estimulado. Os participantes de sexo masculino responderam melhor ao alfacalcidol, resultado justificado por estes terem um nível basal de vitamina D mais elevado e pelo maior tempo de exposição solar no Irão. Não foram observados efeitos adversos. Em conclusão, o efeito do alfacalcidol na preservação da função das células beta foi relativamente modesto. Apesar do efeito limitado neste estudo, há espaço para investigar no futuro o efeito do alfacalcidol recorrendo a doses maiores e melhorando a metodologia através do aumento do tamanho da amostra e do tempo de estudo e do uso da monitorização do peptídeo-C estimulado.

3.15. Hagopian et al (2013) (36)

Este artigo constitui a análise após dois anos do ensaio “Protégé” centrada nos resultados do grupo “14 dias-alta-dose”, pois foi o grupo que mostrou melhores resultados após 12 meses (32). Os resultados finais revelaram que não houve diferenças significativas entre os grupos no que diz respeito à HbA1c. O tratamento com teplizumab levou a um declínio significativamente menor da AUC do peptídeo-C, comparativamente com o grupo placebo. Os resultados foram novamente melhores nos subgrupos: com diagnóstico ≤ 6 semanas; oriundos dos EUA; com idade em 8-11 anos. No que toca às doses de insulina, houve grandes diferenças regionais. De modo geral, as necessidades de insulinas diminuíram inicialmente e aumentaram depois progressivamente, mas a maioria dos indivíduos dos EUA alcançou o objetivo de manter uma Hb1Ac $< 7\%$ com doses diárias de insulina < 0.25 U/kg/dia, em comparação com o grupo placebo. Relativamente aos eventos adversos, não houve diferenças significativas entre os grupos. As limitações encontradas dizem respeito à heterogeneidade das características basais da amostra e à ausência de informação sobre marcadores genéticos HLA-DQ/DR que poderia ter ajudado na identificação de subgrupos com maior potencial de resposta. Após dois anos de estudo, concluiu-se que o tratamento com uma dose total de 17 mg de teplizumab por ciclo de tratamento é seguro, preserva a produção de insulina endógena e reduz as necessidades de insulina de modo a manter o controlo glicémico.

3.16. Gitelman et al (2013) (37)

No ensaio START, avaliou-se a segurança e a eficácia da globulina anti-timócito (ATG) de coelho na preservação da função dos ilhéus pancreáticos em participantes com DM1, com apresentação dos resultados aos 12 meses. A ATG provoca depleção das células T autorreativas, modula a ação das células T remanescentes, poupa e induz as células T reguladoras (Treg) e tem um possível papel nas células B e dendríticas. Este ensaio envolveu 154 participantes com idades entre 12 e 35 anos randomizados em dois grupos (2:1) experimental e placebo. O grupo experimental recebeu uma dose total de 6,5 mg/kg de ATG. Todos mantiveram a insulino-terapia concomitante e foram pré-medicados com difenidramina e paracetamol. Os pacientes do grupo ATG também receberam metilprednisolona intravenosa antes da infusão e nos dias 1, 3 e 4 após a infusão e profilaxia com co-trimoxazol e aciclovir em casos de exposição prévia aos vírus herpes ou varicela. A doença do soro foi tratada com prednisona. O indicador de resultado principal foi a medição da AUC do peptídeo-C-2horas entre 0 e 12 meses. Os resultados secundários incluíram a AUC do peptídeo-C-4horas aos 12 meses; HbA1c; uso de insulina; proporção de participantes que estavam isentos de insulina

aos 12 meses; hipoglicémias; frequência e gravidade dos eventos adversos e contagem de células T. Relativamente aos resultados, não foi registada nenhuma diferença entre os grupos: os participantes no grupo ATG tiveram uma diminuição do peptídeo-C de $-0,195$ pmol/ml versus $-0,239$ pmol/ml no grupo placebo. A análise das alterações da AUC do peptídeo-C-2 horas sugeriram uma diminuição inesperada e mais rápida nos primeiros 6 meses, mais pronunciada no subgrupo 12-21 anos, seguida por uma descida em *plateau* nos meses seguintes; o grupo placebo mostrou queda constante durante todo o período. Não houve diferenças significativas na HbA1c, uso de insulina, proporção de participantes isentos de insulina e ocorrência de hipoglicémias. Todos, exceto um participante no grupo ATG, tiveram a síndrome de liberação de citocinas e doença do soro. No grupo ATG, houve depleção aguda de células T, exceto na subpopulação de células T efectoras de memória (Tem). Seguiu-se uma fase de reconstituição lenta ao longo de 12 meses. A taxa de eventos adversos moderados e severos foi mais pronunciada no grupo ATG, associada à depleção de células T, mas não foi detetada diferença entre os grupos na incidência de doenças infecciosas. Para justificar a diminuição de peptídeo-C, pensa-se que a ATG sofreu uma activação imune não intencional nos primeiros 6 meses. A exposição das células beta a um meio desfavorável no início do estudo, como a síndrome de libertação de citocinas e doença do soro, combinada com a administração prévia de glucocorticóides poderá explicar o resultado. Outra explicação possível é o facto das células Tem não terem diminuído, das células Treg estarem esgotadas ou ambos. O tratamento com ATG induziu a depleção rápida de células T na circulação periférica mas uma subpopulação de células T chave, as células Tem, foi refratária ao tratamento. Os efeitos pleiotrópicos de ATG em outros tipos de células, como as células dendríticas, podem contribuir para modificar a resposta autoimune. Em conclusão, os achados sugeriram que um breve curso de ATG não resulta na preservação da função das células beta em doentes com DM1 após 12 meses. São necessários mais estudos centrados numa população com idade >21 anos pois esta apresentou um potencial de estabilização da função das células beta comparativamente com o grupo mais novo.

3.17. Rigby et al (2013) (38)

O estudo multicêntrico T1DAL desenvolvido em 14 centros clínicos nos EUA teve como objetivo avaliar o efeito da imunomodulação com alefacept (anti-CD2) sobre as mudanças quantitativas e qualitativas das células T efectoras e na preservação da secreção endógena de insulina pelas células beta remanescentes. O alefacept é uma proteína de fusão que liga a região CD2 das células T de memória efectoras CD4⁺ e CD8⁺, principais responsáveis pela destruição das células beta na DM1. Ele interrompe a co-estimulação das células T mediada por CD2 e induz apoptose das mesmas. O ensaio foi desenhado com uma amostra de 49 indivíduos randomizados em dois grupos (2:1). O grupo experimental recebeu alefacept na

dose de 15 mg semanalmente durante dois períodos de 12 semanas, intervalados por 12 semanas. O grupo controlo recebeu um placebo. As características demográficas e basais foram semelhantes entre os grupos. O indicador de resultado primário foi a medição da AUC do peptídeo-C-2horas à semana 24. Os indicadores de resultados secundários envolveram a medição da AUC do peptídeo-C-4horas à semana 52; alteração na secreção média de peptídeo-C; doses de insulina; hipoglicémia *major*; HbA1c; frequência e severidade dos eventos adversos. Em termos de resultados aos 12 meses, o grupo alefacept teve um aumento médio de 0,015 nmol/l na AUC do peptídeo-C-2horas, enquanto o grupo placebo apresentou diminuição média de 0,115 nmol/l, no entanto esta diferença não foi significativa após ajuste para o valor de peptídeo-C na linha de base ($p=0,065$). No que toca aos indicadores de resultados secundários, a análise da alteração na AUC média do peptídeo-C-4horas revelou que o grupo alefacept apresentou um aumento médio de +0,015 nmol/l versus uma diminuição de -0,156 nmol/l no grupo placebo, diferença significativa após o ajuste para a linha de base ($p=0,019$). Ambos os grupos alcançaram um bom controlo glicémico, com níveis médios de HbA1c de 6,9% para o grupo alefacept e 7,2% para o grupo placebo. As necessidades de insulina foram superiores no grupo placebo versus alefacept. A taxa de hipoglicémias *major* foi significativamente menor no grupo experimental. Aos 12 meses, não foi ainda possível definir o perfil de segurança do alefacept. Todos os participantes experimentaram pelo menos um evento adverso mas não houve eventos adversos graves. Ao início do tratamento a expressão de CD2 foi superior na subpopulação de células T de memória efetora (Tem) CD4+ e CD8+, seguida das células T de memória central (Tcm) e T naïve (Tn) e finalmente mais baixa na subpopulação Treg. No grupo alefacept, 15,2% dos participantes apresentaram declínio transitório na contagem de CD4 para <250 células/ μ L, o que não foi observado no grupo do placebo. Após os 12 meses, a contagem total de glóbulos brancos no grupo experimental manteve-se relativamente inalterada apesar de variações nas subpopulações. Mais especificamente, no compartimento de células CD4+, as células Tn aumentaram 25%, Tcm e Tem diminuíram em média 25 e 50% respetivamente e Treg mantiveram valor constante. No compartimento CD8+, Tn e Tcm diminuíram mas Tem não sofreu variações, representando um achado inesperado. Consequentemente, estas variações resultaram em aumentos significativos nas relações Treg/Tcm CD4+, Treg/Tcm CD8+ e Treg/Tem CD4+. Assim o alefacept teve maior efeito nas células com níveis mais altos de CD2 (Tcm e Tem) ao passo que poupou as subpopulações Tn e Treg. Em conclusão, aos 12 meses de T1DAL, observou-se depleção de células patogénicas Tem e Tcm, preservação de células Tregs e uma melhoria na razão Treg/Tem e Treg/Tcm. O alefacept foi eficaz na preservação do peptídeo-C, reduziu as necessidades de insulina e as hipoglicémias. Assim, o alefacept poderá restabelecer um estado de tolerância imune através da depleção das células T efetoras mais patogénicas (Tem e Tcm) e poupança das Treg, constituindo uma estratégia útil para preservar a função da célula beta na DM1.

3.18. Aronson et al (2014) (39)

O estudo multicêntrico de fase II DEFEND-1 (39) desenvolvido em 9 países da Europa e da América do norte teve como objetivo avaliar a eficácia e segurança da molécula de otelexizumab (anti-CD3) após um único e curto tratamento em pessoas com DM1. O estudo foi desenvolvido com uma amostra de 272 participantes randomizados em dois grupos (2:1). Os grupos não apresentavam diferenças significativas nas características basais. O grupo experimental recebeu uma dose cumulativa total de 3,1 mg de otelexizumab assim como terapia profilática contra libertação de citocinas, em casos julgados necessários pelos investigadores. O grupo controlo recebeu um placebo. O estudo teve duração de 12 meses. As variáveis incluíram o nível basal de peptídeo-C estimulado após 2 horas medido pela AUC; HbA1c; dose de insulina; ajustes na dose de insulina consoante a HbA1c; ocorrência de eventos adversos. Em termos de resultados, não foram encontradas diferenças entre os grupos no nível basal de peptídeo-C-2 horas estimulado ao 12º mês, nem nos valores de HbA1c. Os eventos adversos foram mais frequentes no grupo experimental e foram consistentes com os eventos adversos já relatados dos anticorpos anti-CD3 (síndrome de libertação de citocinas), no entanto não houve reativação do vírus EBV. Reduções transitórias na contagem de linfócitos e na modulação do recetor CD3 das células T foram observadas no grupo experimental. Em conclusão, o estudo DEFEND-1 demonstrou que o uso de dose cumulativa de otelexizumab não foi eficaz na preservação de níveis de peptídeo-C, como tinha sido demonstrado no estudo de fase II. Uma dose reduzida revelou um perfil mais seguro mas não alcançou ganhos efetivos. São necessários mais estudos com variações de dose para determinar uma janela terapêutica viável e comprovar um perfil seguro e eficaz.

3.19. Demeester et al (2014) (40)

Demeester et al (40) colocaram a hipótese de que o perfil específico de AAC na altura do diagnóstico de DM1 podia prever a eficácia de um tratamento com otelexizumab (anti-CD3). Este último visa principalmente as células T efectoras, preservando as células T reguladoras. Causa ainda uma depleção transitória dos linfócitos B, células responsáveis por um aumento da resposta imunitária local através de citocinas e/ou apresentação de antígeno aos linfócitos T. No estudo entraram 80 participantes com DM1, entre os 12 e 39 anos, randomizados em dois grupos (1:1). Os grupos não apresentavam diferenças significativas nas características clínicas, laboratoriais e na expressão de haplótipos HLA. O procedimento envolveu a administração de otelexizumab (48 mg) durante 6 dias consecutivos para o grupo experimental. O estudo teve duração de 18 meses, com seguimento a cada 3 meses. Os parâmetros avaliados foram a AUC-peptídeo-C (60-140 minutos) após um teste de *clamp*

hiperglicêmico, tipo e dose de insulina; IMC; glicêmias diárias; eventos adversos; HbA1c e contagem de AAC (IAA, IA-2A, GAD e ZnT8A). Apesar de haver em ambos os grupos uma perda global de células beta, embora mais lenta no grupo experimental, a análise estatística concluiu que um nível elevado de IAA na altura do diagnóstico era um forte preditor da eficácia de anti-CD3 na preservação das células beta. Indivíduos com IAA >p50 apresentaram uma diminuição das necessidades de insulina e aumento da secreção do peptídeo-C, comparado com indivíduos com IAA <p50 e com o grupo placebo. O estudo sugeriu que a presença elevada de IAA na altura do diagnóstico poderia vir a ser um possível critério para iniciar uma intervenção imunossupressora em pessoas com DM1. O tamanho da amostra e a baixa prevalência de IAA foram as principais limitações do estudo.

3.20. Rigby et al (2015) (41)

Este artigo relatou os resultados do ensaio T1DAL, apresentado anteriormente (38). Todos os indicadores de resultados primários e secundários foram reavaliados após 24 meses. Em termos de resultados, não houve diferenças significativas no controlo glicémico e na ocorrência de eventos adversos. O grupo alefacept diminuiu as necessidades de insulina (0.43 U/kg/dia vs 0.60 U/kg/dia), contabilizou menos hipoglicémias *major* (9.6 evento/pessoa/ano vs 19.1 evento/pessoa/ano) e manteve uma secreção endógena de peptídeo-C superior ao grupo controlo. A contagem total de células brancas manteve-se inalterada em ambos os grupos, caracterizada por manutenção das células Treg e declínio de células CD4+ e CD8+ no grupo experimental durante os dois períodos de tratamento ativo, atingindo uma redução máxima de 40-60% à 35ª semana e retorno progressivo ao valor basal até finalizar o período de estudo. De modo geral, os resultados apresentados na análise aos 12 meses foram melhores relativamente ao período total, com preservação da produção endógena de insulina, diminuição das necessidades em insulina e das hipoglicémias *major*. Após 24 meses, a terapia manteve as melhorias alcançadas aos 12 meses. A taxa de eventos adversos foi semelhante entre os grupos, na maioria de grau leve. Estes resultados sugeriram então aumentar a frequência de administração do alefacept ou associar outra terapia para manter o efeito imunossupressor a longo prazo. As limitações identificadas foram o tamanho reduzido da amostra que impediram a possível deteção de eventos adversos mais raros.

3.21. Gitelman et al (2016) (42)

Este artigo apresenta os resultados aos 24 meses do ensaio de Gitelman, cuja análise aos 12 meses foi feita anteriormente (37). O estudo avaliou a segurança e a eficácia da globulina anti-timócito (ATG) de coelho na preservação da função dos ilhéus pancreáticos em participantes com DM1 de início recente, comparando dois grupos: experimental e placebo. Numa análise *post-hoc*, os participantes mais velhos (22-35 anos) do grupo ATG apresentaram uma AUC de peptídeo-C significativamente maior em comparação com os do grupo placebo, embora houvesse diminuição da secreção de peptídeo-C nos dois grupos. Todos os doentes relataram pelo menos um evento adverso, três vezes mais frequentes no grupo ATG (1148 versus 415). O número de infecções foi semelhante entre os grupos e não houve infecções oportunistas. As subpopulações de células T circulantes esgotadas pela ATG foram parcialmente reconstituídas ao longo dos 24 meses, mas as subpopulações de células Tem, Treg e Tn permaneceram abaixo do nível basal aos 24 meses. Os auto-anticorpos contra as células beta não variaram ao longo dos 24 meses nos participantes tratados com ATG ou placebo. Em conclusão, um breve curso de ATG permitiu esgotar substancialmente as subpopulações de células T, incluindo células Treg, mas não preservou a função dos ilhéus depois de 24 meses na maioria dos indivíduos com DM1. A ATG preservou a secreção de peptídeo-C em participantes mais velhos, o que pode justificar um estudo mais aprofundado.

3.22. Pinckey et al (2016) (43)

Este artigo representou a análise *post-hoc* realizada após o ensaio T1DAL (38,41) para correlacionar as variáveis hipoglicémia, medidas de controlo glicémico (Hb1Ac e média das glicémias capilares) e preservação de peptídeo-C após terapia com alefacept em indivíduos com DM1. Foram usados os dados do ensaio T1DAL. A secreção de peptídeo-C-4horas avaliada pela AUC na linha de base e aos 12 meses foi um preditor significativo do número de hipoglicémias durante os 12 meses. Observou-se uma forte associação entre a AUC do peptídeo-C-4horas e as glicémias baixas e altas. No entanto houve uma forte correlação inversa entre os valores da AUC do peptídeo-C-4horas e as duas medidas do controle glicémico: HbA1c e média das glicémias. Foi utilizado o índice de remissão parcial (IDAA1c) calculado com a HbA1c e a dose diária de insulina exógena para determinar uma remissão parcial, definida por um valor ≤ 9 e correspondendo a um valor preditivo de peptídeo-C estimulado >300 pmol/l (44). O estudo demonstrou ainda uma forte correlação inversa entre os valores da AUC do peptídeo-C-4horas e o IDAA1c, bem como uma forte correlação entre os valores de IDAA1c e a média das glicémias capilares, sugerindo que a variabilidade reduzida da glicémia estivesse associada a uma tendência em direção a uma remissão parcial. Porém,

nenhuma dessas análises permitiu encontrar diferenças significativas entre os grupos. As medidas de variabilidade, controlo glicémico, e taxas de hipoglicémia estavam significativamente correlacionadas com a preservação do peptídeo-C, independentemente desta ter sido alcançada por meio de intervenção imune com alefacept ou pela variabilidade natural dos indivíduos com DM1. Assim, a preservação da produção endógena de insulina por um fármaco imunomodulador poderá conferir benefícios clínicos semelhantes aos observados em indivíduos com maior secreção de peptídeo-C basal devido à progressão lenta da doença.

Tabela 1 - Características dos estudos incluídos.

Autor	Ano	Pais / nome do ensaio	Terapia	Duração	Amostra e grupos	Idades	Tempo desde o diagnóstico	Parâmetros avaliados	Principais conclusões/limitações
Ludvigsson et al	2001	Suécia	Conjunto de antioxidantes (nicotinamida, vitamina C, vitamina E, beta-caroteno, selénio)	36 meses	N=46 (1:1)	1-17 anos	<4 semanas	Peptídeo-C de jejum; Peptídeo-C estimulado; Doses de insulina; HbA1c; Níveis de AAC; Efeitos adversos.	Não foi demonstrada eficácia dos antioxidantes.
Ortqvist et al	2004	Suécia	Diazóxido (5-7,5 mg/kg ou placebo)	24 meses	N=56 (1:1)	7-17 anos	≤1 semana	Peptídeo-C de jejum; Peptídeo-C estimulado; Doses de insulina; HbA1c; Efeitos adversos.	O diazóxido apenas aumentou o peptídeo-C após o tratamento ativo, continuado por um declínio gradual para valores inferiores aos basais. Efeito menos benéfico em crianças. Efeitos adversos de grau leve prevalentes.
Huurman et al	2007	Israel	DiaPep277 (0,2; 1,0; 2,5 mg ou placebo)	18 meses	N=48 (1:1:1:1)	18-45 anos	≤42 meses	Peptídeo-C estimulado; Doses de insulina; HbA1c.	Diminuição significativa do peptídeo-C estimulado. Não houve melhorias na HbA1c nem nas doses de insulina. Limitações: diferenças significativas entre os grupos nos valores basais de peptídeo-C; parâmetro duplamente-cego falhou em alguns casos; atraso no início do tratamento levou a que indivíduos já não preenchessem os critérios de inclusão.
Huurman et al	2008	Israel	DiaPep277 (0,2; 1,0; 2,5 mg ou placebo)	18 meses	N=48 (1:1:1:1)	18-45 anos	≤42 meses	Contagem de citocinas; Peptídeo-C estimulado; Doses de insulina; HbA1c.	Indivíduos com resposta prévia dominada por IL-10 mostraram maior preservação de peptídeo-C. Não existe uma relação clara entre a produção de IL-10 e o resultado clínico, sugerindo que a IL-10 não permita substituir a regulação imunológica induzida por DiaPep277.
Ludvigsson et al	2008	Suécia	GAD-alum (20 µg ou placebo)	30 meses	N=70 (1:1)	10-18 anos	<18 meses	Peptídeo-C de jejum Peptídeo-C estimulado; HbA1c; Contagem de células imunitárias; Contagem de citocinas; Doses de insulina; Eventos adversos.	Diminuição progressiva do peptídeo-C, embora menor no grupo experimental. Aumento da HbA1c e doses de insulina. Padrão de eventos adversos similar entre os grupos. Existe efeito protetor do GAD-alum e eficácia na preservação do peptídeo-C.

Tabela 1 - Características dos estudos incluídos (continuação).

Autor	Ano	País / nome do ensaio	Terapia	Duração	Amostra e grupos	Idades	Tempo desde o diagnóstico	Parâmetros avaliados	Principais conclusões/limitações
Mastrandrea et al	2009	EUA	Etanercept 0,4 mg/kg ou placebo	36 semanas	N=18 (1:1)	3-18 anos	≤4 semanas	AUC de peptídeo-C; HbA1c; Doses de insulina; Glicemia pré-prandial; Eventos adversos.	Doses de insulina e glicémias pré-prandiais diminuíram com etanercept. Secreção de peptídeo-C aumentou 39% no grupo experimental, sugerindo eficácia do etanercept. Não houve relatos de eventos adversos severos durante o estudo.
Rother et al	2009	EUA	hrIFN-α (5000, 30000 U ou placebo)	12 meses	N=128 (1:1:1)	3-25 anos	<6 semanas	Peptídeo-C; HbA1c; Doses diárias de insulina; Eventos adversos.	Eficácia e preservação de peptídeo-C no grupo experimental com dose 5000U. Não houve diferenças significativas na HbA1c, doses de insulina e ocorrência de eventos adversos. Limitações: falta de uniformização das medidas basais realizadas nos centros; reduzido tempo de estudo.
Pescovitz et al	2009	EUA e Canadá	Rituximab (375 mg/m ² ou placebo)	12 meses	N=87 (2:1)	8-45 anos	Não mencionado	AUC peptídeo-C-2horas; AUC peptídeo-C-4horas; HbA1c; Doses diárias de insulina; Contagem de células brancas; Eventos adversos.	Diminuição de HbA1c e doses de insulina no grupo experimental. O rituximab preserva parcialmente a função das células beta durante um período de um ano em doentes com DM1.
Ludvigsson et al	2010	Suécia	GAD-alum (20 µg ou placebo)	48 meses	N=70 (1:1)	10-18 anos	<18 meses	Peptídeo-C de jejum Peptídeo-C estimulado; HbA1c; Contagem de células imunitárias; Contagem de citocinas; Doses de insulina; Eventos adversos.	Manutenção do peptídeo-C em doentes do grupo experimental com diagnóstico de DM1 há menos 6 meses, em comparação com o placebo. GAD-alum é seguro e apresenta um efeito razoavelmente longo. Limitações: tamanho reduzido da amostra.
Martin et al	2011	Alemanha/ Estudo DIATOR	Atorvastatina (80 mg ou placebo)	18 meses	N=89 (1:1)	18-39 anos	Não mencionado	Peptídeo-C de jejum; Peptídeo-C estimulado; HbA1c; Doses diárias de insulina; Colesterol total; Colesterol LDL.	Diminuição não significativa do peptídeo-C e da HbA1c em ambos os grupos. Aumento nas doses diárias de insulina, mais rápido no grupo atorvastatina. Tratamento é seguro e bem tolerado mas ineficaz.

Tabela 1 - Características dos estudos incluídos (continuação).

Autor	Ano	País / nome do ensaio	Terapia	Duração	Amostra e grupos	Idades	Tempo desde o diagnóstico	Parâmetros avaliados	Principais conclusões/limitações
Sherry et al	2011	EUA, Europa, Israel e Índia/ Estudo "Protégé"	Tepizumab (9,034 µg/m ² ; 2,985 µg/m ² ; 2,426 µg/m ² ou placebo)	24 meses	N=516 (2:1:1:1)	8-35 anos	≤12 meses	AUC do peptídeo-C; HbA1c; Doses diárias de insulina; Proporção de doentes com necessidades de insulina <0.5U/kg/dia; Proporção de doentes com HbA1c <7%; Eventos adversos.	<i>Resultados aos 12 meses:</i> Grupo "14 dias-alta-dose" com melhor preservação do peptídeo-C, maior diminuição da HbA1c e necessidades de insulina. Melhores resultados nos subgrupos: crianças de 8 a 11 anos; originário dos EUA; doentes randomizados às 6 semanas ou menos após o diagnóstico. Taxa de eventos adversos elevada de grau leve. Limitações: falta de acompanhamento adicional para determinar a segurança e a eficácia a longo prazo; ausência de documentação de eventos de hipoglicemias.
Ludvigsson et al	2012	9 países (Finlândia, França, Alemanha, Itália, Suécia, Holanda, Eslovénia, Espanha, e Reino Unido)	GAD-alum 20 µg	15 meses	N=334 (1:1:1)	10-20 anos	<3 meses	Peptídeo-C de jejum; Peptídeo-C estimulado; Peptídeo-C máximo; HbA1c; Dose média diária de insulina; Taxa de hipoglicemia.	GAD-alum não é eficaz na preservação de peptídeo-C, na diminuição de HbA1c e doses de insulina. Baixa taxa de eventos adversos. Insucesso explicado pela falta de estratificação da amostra, variações sazonais e abordagens não padronizadas entre os centros de estudos.
Strom et al	2012	Alemanha/ Estudo DIATOR	Atorvastatina (80 mg ou placebo)	18 meses	N=89 (1:1)	18-39 anos	Não mencionado	Peptídeo-C estimulado; PCR.	Correlação entre os níveis de PCR basais e os níveis de peptídeo-C estimulado no grupo atorvastatina, mas não houve correlação entre a extensão da redução da PCR e a secreção de peptídeo-C.
Ataie-Jafari et al	2013	Irão	Alfalcicidol (0,25 µg ou placebo)	6 meses	N=61 (1:1)	8-15 anos	<8 semanas	Peptídeo-C de jejum; Doses diárias de insulina; Eventos adversos.	Efeito modesto do alfalcicidol na preservação das células beta, com aumento do peptídeo-C de jejum e diminuição das doses diárias de insulina. Não foram observados efeitos adversos. Limitações: tamanho reduzido da amostra; tempo de estudo insuficiente, ausência de monitorização de peptídeo-C estimulado.

Tabela 1 - Características dos estudos incluídos (continuação).

Autor	Ano	País / nome do ensaio	Terapia	Duração	Amostra e grupos	Idades	Tempo desde o diagnóstico	Parâmetros avaliados	Principais conclusões/limitações
Hagopian et al	2011	EUA, Europa, Israel e Índia/ Estudo "Protégé"	Teplizumab (9,034 µg/m ² ; 2,985 µg/m ² ; 2,426 µg/m ² ou placebo)	24 meses	N=516 (2:1:1:1)	8-35 anos	≤12 meses	AUC do peptídeo-C; HbA1c; Doses diárias de insulina; Proporção de doentes com necessidades de insulina <0.5U/kg/dia; Proporção de doentes com HbA1c <7%; Eventos adversos.	<i>Resultados aos 24 meses:</i> O tratamento com teplizumab é seguro, preserva a produção de insulina endógena e reduz as necessidades de insulina. Limitações: heterogeneidade das características basais da amostra.
Gitelman et al	2013	EUA/ Estudo START	Globulina anti-timócito - ATG (6,5 mg/kg ou placebo)	24 meses	N=154 (2:1)	12-35 anos	≤100 dias	AUC peptídeo-C-2horas; AUC peptídeo-C-4horas; HbA1c; Doses diárias de insulina; Proporção de participantes isentos de insulina em 12 meses; Taxa de hipoglicémias; Eventos adversos; Contagem de células T.	<i>Resultados aos 12 meses:</i> Diminuição da secreção de peptídeo-C em ambos os grupos. Não houve diferenças significativas entre os grupos na HbA1c, uso de insulina, proporção de participantes isentos de insulina e ocorrência de hipoglicémias. No grupo ATG, depleção aguda de células T, exceto na subpopulação Tem e elevada taxa de eventos adversos de grau moderado e severo. ATG não resultou na preservação das células beta após 12 meses.
Rigby et al	2013	EUA/ Estudo T1DAL	Alefacept (15 mg ou placebo)	24 meses	N=49 (2:1)	12-35 anos	≤100 dias	AUC peptídeo-C-2horas; AUC peptídeo-C-4horas; Secreção média de peptídeo-C; Doses de insulina; Hipoglicémias <i>major</i> ; HbA1c; Eventos adversos.	<i>Resultados aos 12 meses:</i> Manutenção da secreção de peptídeo-C; Redução da HbA1c, doses de insulina e taxa de hipoglicémias. Alefacept é eficaz e aumenta a razão Treg/Tefetoras. Necessidade de prolongar a análise até 24 meses para definir o perfil de segurança do alefacept.
Aronson et al	2014	EUA, Canadá, Alemanha, Dinamarca, Espanha, Finlândia, Itália, Suécia e Reino Unido/ Estudo DEFEND-1	Otelixizumab (3,1 mg ou placebo)	12 meses	N=272 (2:1)	12-45 anos	Não mencionado	AUC peptídeo-C-2h; HbA1c; Doses diárias de insulina; Eventos adversos; Contagem de linfócitos.	Não houve diferenças entre os grupos na variação do peptídeo-C e na HbA1c. Ocorrência de eventos adversos mais elevada no grupo experimental. Uma dose reduzida de otelixizumab revelou um perfil mais seguro mas não foi eficaz na preservação do peptídeo-C.

Tabela 1 - Características dos estudos incluídos (continuação).

Autor	Ano	País / nome do ensaio	Terapia	Duração	Amostra e grupos	Idades	Tempo desde o diagnóstico	Parâmetros avaliados	Principais conclusões/limitações
Demeester et al	2014	Bélgica e Alemanha	Otelixizumab (48 mg ou placebo)	18 meses	N=80 (1:1)	12-39 anos	≤4 semanas	AUC de peptídeo-C; HbA1c; Dose diária de insulina; IMC; Eventos adversos.	Subgrupos com níveis de IAA mais elevados apresentaram menor declínio de peptídeo-C e melhor preservação das células beta. Limitações: tamanho da amostra e baixa prevalência de IAA.
Rigby et al	2015	EUA/ Estudo T1DAL	Alefacept (15 mg ou placebo)	24 meses	N=49 (2:1)	12-35 anos	≤100 dias	AUC peptídeo-C-2horas; AUC peptídeo-C-4horas; Secreção média de peptídeo-C; Doses de insulina; Hipoglicemias <i>major</i> ; HbA1c; Eventos adversos.	<i>Resultados aos 24 meses:</i> Manutenção dos resultados alcançados aos 12 meses com secreção de peptídeo-C conservada; redução da HbA1c, doses de insulina e taxa de hipoglicemias. Ocorrência de eventos adversos semelhante nos dois grupos, na maioria de grau leve. Limitações: tamanho reduzido da amostra.
Gitelman et al	2016	EUA/ Estudo START	Globulina anti-timócito - ATG (6,5 mg/kg ou placebo)	24 meses	N=154 (2:1)	12-35 anos	≤100 dias	AUC peptídeo-C-2horas; AUC peptídeo-C-4horas; HbA1c; Doses diárias de insulina; Proporção de participantes isentos de insulina em 12 meses; Taxa de hipoglicemias; Eventos adversos; Contagem de células T.	<i>Resultados aos 24 meses:</i> Diminuição global do peptídeo-C em ambos os grupos embora com preservação significativa no subgrupo 22-35 anos. Ocorrência elevada de eventos adversos de grau moderado e severo no grupo ATG. ATG não foi eficaz na preservação da função dos ilhéus depois de 24 meses.
Pinkney et al	2016	EUA/ Estudo T1DAL	Alefacept (15 mg ou placebo)	24 meses	N=49 (2:1)	12-35 anos	≤100 dias	AUC peptídeo-C-4horas; Secreção média de peptídeo-C; Doses de insulina; Hipoglicemias <i>major</i> ; HbA1c; Glicemias capilares; IDAA1c.	Associação entre a secreção aumentada de peptídeo-C e a redução da taxa de hipoglicemias. O IDAA1c correlacionou-se fortemente com as glicemias e inversamente com a secreção de peptídeo-C. Porém, não houve diferenças significativas entre os grupos. Limitações no estudo: tamanho reduzido da amostra; curto tempo de seguimento; uso de um único agente imunomodulador.

4. Discussão

A DM1 é uma doença crónica frequente em crianças cuja incidência tem vindo a aumentar continuamente. Apesar da insulino-terapia funcional com bombas de insulina associada às novas tecnologias de monitorização contínua da glicémia terem atualmente contribuído para uma melhoria do estado de saúde dos doentes, muitos ainda não atingem os objetivos do controlo metabólico (2,3,45). A investigação em modelos animais fornece inúmeros benefícios para o desenvolvimento de terapias através da melhor compreensão dos processos imunológicos inerentes à DM1. De facto os murganhos diabéticos não obesos (MDNO) representam o modelo preferido para estudar a DM1, pois estes dispõem de um genoma bem definido, apresentam um custo razoavelmente baixo e existe maior quantidade de reagentes monoclonais para a análise de componentes do sistema imune (46). Os MDNO exibem um processo autoimune espontâneo causador de DM1, com fisiopatologia semelhante à observada em humanos (46). Nas últimas décadas, os resultados promissores obtidos em modelos pré-clínicos e o maior interesse dos cientistas em preservar uma secreção de insulina residual, levaram ao desenvolvimento de ensaios clínicos (45,47). Os ensaios clínicos randomizados controlados pertencem ao tipo de estudos mais fidedignos e com maior grau de evidência, comparativamente com estudos observacionais ou em animais e por este motivo serviram de base para a elaboração desta monografia.

No entanto, ainda não existem critérios definidos para a elaboração de ensaios clínicos em DM1. Sabemos hoje que os indivíduos que apresentam uma secreção residual de peptídeo-C (>0.2 nmol/l) apresentam taxas menores de complicações microvasculares e macrovasculares (48). Os estudos desenvolvidos no estadio 3 de progressão da doença restringem-se a uma população com peptídeo-C basal ainda positivo, nas primeiras semanas/meses da doença clínica (7,48). Contudo, as células beta remanescentes coexistem com as células do processo de insulite, pelo que não parece existir razão para excluir doentes além de 3-6 meses após o diagnóstico desde que possuam peptídeo-C doseável (49).

Os ensaios clínicos apresentados desenvolvem abordagens englobadas na prevenção terciária. Esta tem como objetivo preservar a função residual das células beta através da modulação da resposta imunitária com terapias antigénicas, baseadas em células ou uso de moléculas orgânicas (7). Embora nenhum estudo até ao momento tenha permitido alcançar remissão completa da DM1, vários estudos mostraram a preservação transitória da função das células beta (32,36,39,40). As abordagens são variadas e visam a imunidade inata ou adaptativa, a modulação da resposta dos linfócitos B ou das células T (2,7,50).

Um dos primeiros ensaios de intervenção imune visando a depleção das células T envolveu a combinação de ATG com prednisona e melhorou a HbA1c assim como reduziu as necessidades de insulina, abrindo assim a porta a uma investigação mais aprofundada desta terapia (51). Em 2013, o estudo START comparou ATG com placebo (37). Surpreendentemente, não houve benefício no grupo ATG: a secreção de peptídeo-C apresentou um declínio acelerado nos primeiros 6 meses seguido de uma fase de estabilização. Este facto foi potencialmente justificado pelo facto da maioria dos participantes desenvolverem a síndrome de libertação de citocinas e doença do soro, sugerindo uma ativação imune adversa no início da terapia. Outra hipótese foi que apesar da profunda depleção de células T e Treg, as células Tem foram resistentes à depleção e conduziram ao aumento da razão Treg/Tefetoras, desfavorável ao tratamento (37,50). Este resultado contrastou com um estudo recente combinando ATG com o fator estimulador de colónias de granulócitos (GCSF), que demonstrou eficácia clínica em associação com a preservação relativa de Treg. No entanto, não está claro se os efeitos observados foram devido à dose mais baixa de ATG utilizada (um terço da dose utilizada no START) ou à combinação com GCSF (52).

Algumas terapias foram desenvolvidas no sentido de modular a resposta das células T para restaurar o equilíbrio entre células Treg e Tem, tendo em conta que modelos pré-clínicos demonstraram que as terapias que resultam num equilíbrio favorável de Treg/Tefetoras são eficazes no abrandamento da autoimunidade e resultam em proteção a longo prazo de doenças (53). O estudo de referência de Herold et al demonstrou que o teplizumab preservou a secreção de peptídeo-C e manteve níveis reduzidos de HbA1c (54). Ensaios maiores subsequentes com administração de anticorpo monoclonal humanizado anti- CD3 (teplizumab ou otelixizumab) tiveram um sucesso transitório, mas nenhum desses estudos estabeleceu de forma conclusiva o efeito benéfico a longo prazo de anti-CD3 (32,36,39,55). O ensaio DEFEND-1 com otelixizumab apresentou um perfil de segurança mas não alcançou os resultados esperados, talvez pela baixa dose selecionada (39). Noutro estudo, altas doses de otelixizumab foram eficazes mas com uma proporção importante de eventos adversos (reativação do vírus EBV ou síndrome de libertação de citocinas) (55).

Além disso, descobriu-se que os parâmetros relacionados com a contagem basal de AAC podiam influenciar a resposta ao fármaco imunossupressor. De facto, no ensaio de Demeester et al (40) a presença de um nível elevado de IAA na altura do diagnóstico teve um papel preditor da eficácia teplizumab na preservação das células beta e pode vir a ser utilizado como possível critério para iniciar terapia imunossupressora. O ensaio “Protégé” evidenciou melhorias em subpopulações jovens e recomenda aprofundar a investigação numa faixa etária jovem restrita e tratadas precocemente (32,36).

Um segundo agente modulador de células T recentemente investigado na DM1 foi o alefacept (anti-CD2). Estudos anteriores demonstraram eficácia do alefacept na psoríase (56), através da depleção parcial das células Tem e modulação da co-estimulação mediada por CD2. Estes

resultados levaram a conduzir o teste T1DAL no qual dois ciclos de tratamento com alefacept resultaram na preservação de peptídeo-C, na redução significativa do uso de insulina e da taxa de hipoglicémias aos 12 meses. A análise dos subconjuntos de células T por citometria de fluxo mostrou reduções significativas nas células CD4+ e CD8+ de memória efetora e central, preservação de Treg e aumento favorável na razão Treg/Tefetoras, proporcionando assim um mecanismo plausível para os efeitos clínicos deste fármaco. O alefacept pode vir a ser um agente promissor, pois demonstrou eficácia sem efeitos adversos severos (38,41,43,50).

Outra forma de regular a resposta imune passa pela depleção das células B. O anticorpo monoclonal rituximab (anti-CD20) esgota substancialmente as células B e é amplamente utilizado para tratar linfomas de células B. A sua eficácia na artrite reumatóide (57) levou a alargar a investigação à DM1. Um ensaio de 12 meses com rituximab na DM1 provocou uma profunda depleção das células B com preservação significativa da secreção de peptídeo-C mas foi acompanhado por um aumento significativo dos efeitos adversos de foro viral (reativação do vírus BK, EBV e poliomavírus). Neste momento, não está clara a vantagem da depleção das células B na DM1, assim como o uso de ciclos repetidos tendo em conta o risco infeccioso. No futuro talvez seja viável a combinação de agentes de depleção de células B e T (6,29,50).

A terapia específica por antigénio tem como objetivo atuar diretamente sobre a patologia subjacente que leva ao desenvolvimento da DM1 sem promover a depleção imune e os eventos adversos associados. O GAD65 constitui um dos principais AAC na DM1, pelo que tem sido amplamente estudado como um possível alvo de tratamento. Através da incorporação de um adjuvante tal como hidróxido de alumínio, para formar o GAD-alum, este último tem capacidade para induzir as células Treg (6). Ludvigsson et al (26) investigaram esta molécula num primeiro ensaio em 2008 com 20 µg de GAD-alum. Após 6 meses os resultados pareciam promissores com menor perda de peptídeo-C no grupo experimental em comparação com o grupo com placebo. O GAD-alum induziu uma resposta imune favorável, com diminuição das células CD4+, células T efetoras CD8+ e Treg. Mais tarde, um novo estudo foi realizado para determinar o efeito de 2 ou 4 doses de 20 µg de GAD-alum com uma amostra alargada a outros países europeus. Surpreendentemente, o tratamento com GAD-alum não melhorou a preservação das células beta neste estudo, insucesso possivelmente justificado pela variabilidade geográfica e variações sazonais no sistema imunológico (33). O tratamento com GAD-alum na DM1 tem sido até agora dececionante a longo prazo, não mostrando eficácia com uso isolado para prevenir ou reverter o declínio das células beta (6).

A proteína de choque térmico 60 (hsp60, p277) considerada importante na prevenção do dano induzido pelo stress às proteínas, foi investigada como auto-antigénio potencial na DM1. O DiaPep277 promove efeitos anti-inflamatórios ao inibir a migração celular e alterando o perfil de secreção de citocinas (6). O ensaio de Huurman et al (25) demonstrou resultados modestos com efeito benéfico no peptídeo-C mas sem melhorias das medidas do controlo glicémico. Apesar de ter sido estabelecido uma correlação entre a preservação das células beta e a

produção de IL-10 em resposta à administração de DiaPep277, ficou pouco claro se a resposta imune prévia ao tratamento poderia ser considerada um parâmetro relevante em próximas investigações (24,25). Foram postas esperanças num ensaio alargado em que foi administrado 1 mg de DiaPep277 ou placebo, uma vez a cada 3 meses durante 2 anos. Infelizmente, as manipulações de resultados levaram a retirar o artigo em 2014 (20).

Até ao momento, as abordagens agressivas com transplante autólogo de células estaminais e globulina anti-timócito (ATG) para remoção das células imunes ativadas revelaram-se as abordagens com maior sucesso, mas com riscos provavelmente superiores aos benefícios (7,58,59). Curiosamente, no ensaio START, o uso isolado de ATG levou à depleção das células T mas não conseguiu manter a produção endógena de insulina, indicando que certas terapias de combinação são capazes de fornecer sinergias para melhorar a eficácia (42).

Por fim, foram testadas diversas abordagens infrutuosas. Abordagens com compostos orgânicos, tais como vitamina E ou altas doses de antioxidantes não mostraram efeito significativo na preservação da secreção de peptídeo-C e na melhoria do controlo metabólico (21,60). O diazóxido teve apenas um efeito transitório com elevados eventos adversos, tornando-se uma hipótese menos atraente (22). O interferão alfa humano recombinante também não demonstrou resultados consistentes no tempo (28). Por fim, vários estudos envolveram a administração de atorvastatina mas sem sucesso (31,34).

Através da análise efetuada, o insucesso dos ensaios pode ter diversas causas, nomeadamente a metodologia. O desenvolvimento da patologia é diferente em função do indivíduo e reforça a necessidade de estratificação da amostra (por idade, sexo, etnia, características basais, presença/ausência de AAC, peptídeo-C basal) nas investigações futuras ou a realização de mais estudos para cada faixa etária (61). Notavelmente, a inclusão de crianças em ensaios clínicos é altamente desejável desde que exista uma avaliação de risco adequada, pois os benefícios da imunoterapia são maiores em crianças (45). Além da idade, o momento da inclusão e a janela de oportunidade para o sucesso em relação à progressão da doença permanecem mal definidos, embora a inclusão precoce até 3 meses após o diagnóstico tenha-se tornado um critério frequente de inclusão. A utilização dos parâmetros imunológicos basais na selecção e randomização dos participantes é cada vez mais pertinente, pois permite ajudar a determinar o resultado clínico, aumentar a probabilidade de detetar a eficácia terapêutica e localizar subpopulações de doentes com benefício específico, falta de eficácia ou mesmo respostas adversas (45). Do mesmo modo, ensaios com seguimentos curtos (12 meses) não permitem observar as diferenças reais na produção do peptídeo-C, pois o declínio da função das células beta, especialmente em adultos, é lento. Futuramente aconselha-se um acompanhamento longo, pelo menos de 2 anos, para permitir um declínio suficiente da função das células beta nos grupos em estudo (61). Por outro lado, a maioria dos ensaios apresentados testaram a eficácia de uma terapia administrada de forma isolada, com pouco ou nenhum sucesso, porém acredita-se que seja possível obter resultados mais encorajadores

investigando combinação de terapias (45,61). Finalmente é mal definida a percentagem de aumento de produção de peptídeo-C estimulado necessária para poder afirmar o sucesso de uma terapia. Na literatura atual, considera-se um valor de 40-50%, embora uma percentagem inferior também possa demonstrar sucesso (61).

5. Conclusão

Este trabalho permitiu dar a conhecer as abordagens testadas para a preservação de secreção de peptídeo-C em indivíduos com DM1 com diagnóstico recente, porém até ao momento, nenhuma abordagem demonstrou eficácia e segurança para ser aplicada na clínica. Todavia, algumas vias continuam a ser exploradas pois a preservação das células beta poderá constituir um passo importante para a prevenção de complicações e possivelmente para a remissão da DM1. Os modelos pré-clínicos estão a ser desenvolvidos no âmbito da prevenção primária e secundária, com a utilização de MDNO com incorporação de moléculas MHC humanas, antigénios, fatores predisponentes e células imunes humanas, e representam provavelmente uma direção futura para a investigação.

6. Bibliografia

- (1) Atkinson MA. The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(11):1-18.
- (2) Atkinson M, Eisenbarth G, Michels A. Type 1 Diabetes. *Lancet.* 2014;383(9911):69-82.
- (3) Sesterheim P, Saitovitch D, Staub H. Type 1 diabetes mellitus: multifactors that confer susceptibility to the autoimmune pathogenesis. *Sci Med.* 2007;17(4):212-7.
- (4) American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. *Diabetes Care.* 2018;41(Supplement 1):S13-27.
- (5) Masharani U, German MS: Pancreatic Hormones and Diabetes Mellitus. In: Gardner D, Shoback D. *Greenspan's basic & clinical endocrinology.* 9th edition. McGraw-Hill Professional, 2011.
- (6) Rydén AKE, Wesley JD, Coppieters KT, Von Herrath MG. Non-antigenic and antigenic interventions in type 1 diabetes. *Hum Vaccines Immunother.* 2014;10(4):838-46.
- (7) Simmons KM, Gottlieb PA, Michels AW. Immune Intervention and Preservation of Pancreatic Beta Cell Function in Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep.* 2016;16(10):1-11.
- (8) Sociedade Portuguesa de Diabetologia. Diabetes: Factos e Numeros. Letra Soluvel - Publicidade e Marketing, Lda. 2014.
- (9) Acharjee S, Ghosh B, Al-Dhubiab BE, Nair AB. Understanding type 1 diabetes: Etiology and models. *Can J Diabetes.* Elsevier Ltd; 2013;37(4):269-76.
- (10) Gaspar C. Etiopatogenia da Diabetes Mellitus tipo 1 [dissertação de mestrado]. Universidade do Porto-ICBAS. 2014;1-29.
- (11) Vidal-Puig A, Figuerola Pino D, Reynals de Blasis E, Ruiz M, Morosoni ML: Diabetes Mellitus. In: Rozman C, Cardellach F. Farreras-Rozman, *Medicina Interna.* 18 edición. Elsevier, editor. Vol. 2. 2016.
- (12) Alberto P. Genetics of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2004;33(1):1-16.
- (13) Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet.* 2004;36(4):337-8.
- (14) Hyöty H, Taylor K. The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia.* 2002;45(10):1353-61.
- (15) Silva MER, Mory D, Davini E. Marcadores genéticos e auto-ímmunes do diabetes melito tipo 1: da teoria para a prática. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(2):166-80.
- (16) Rodacki M, Milech A, Oliveira JEP. C-Peptide Residual Secretion Makes Difference on Type 1 Diabetes Management? *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(2):322-33.
- (17) Besser REJ, Shields BM, Casas R, Hattersley AT, Ludvigsson J. Lessons From the Mixed-

- Meal Tolerance Test Use of 90-minute and fasting C-peptide in pediatric diabetes. *Diabetes Care*. 2013;36(2):195-201.
- (18) Ludvigsson J. C-peptide in diabetes diagnosis and therapy. *Front Biosci*. 2013;5:214-23.
- (19) Ehlers MR. Strategies for clinical trials in type 1 diabetes. *J Autoimmun*. 2016;71:88-96.
- (20) Raz I, Ziegler AG, Linn T, Scherthaner G, Bonnici F, Distiller LA, et al. [This article has been retracted] Treatment of Recent-Onset Type 1 Diabetic Patients With DiaPep277: Results of a Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Phase 3 Trial. *Diabetes Care*. 2014;37(5):1392-1400.
- (21) Ludvigsson J, Samuelsson U, Johansson C, Stenhammar L. Treatment with antioxidants at onset of type 1 diabetes in children: a randomized, double-blind placebo-controlled study. *Diabetes Metab Res Rev*. 2001;17(2):131-6.
- (22) Ortqvist E, Ork EB, Wallensteen M, Ludvigsson J, Åman J, Johansson C, et al. Temporary Preservation of B-Cell Function by Diazoxide Treatment in Childhood Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27:2191-7.
- (23) Björk E, Berne C, Kämpe O, Wibell L, Oskarsson P, Karlsson FA. Diazoxide treatment at onset preserves residual insulin secretion in adults with autoimmune diabetes. *Diabetes*. 1996;45(10):1427-30.
- (24) Huurman VAL, Decochez K, Mathieu C, Cohen IR, Roep BO. Therapy with the hsp60 peptide DiaPep277TM in C-peptide positive type 1 diabetes patients. *Diabetes Metab Res Rev*. 2007;23:269-75.
- (25) Huurman VAL, Van Der Meide PE, Duinkerken G, Willemen S, Cohen IR, Elias D, et al. Immunological efficacy of heat shock protein 60 peptide DiaPep277TM therapy in clinical type I diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2008;152(3):488-97.
- (26) Ludvigsson J, Faresjö M, Hjorth M, Axelsson S, Chéramy M, Pihl M, et al. GAD treatment and insulin secretion in recent-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2008;359(18):1909-20.
- (27) Mastrandrea L, Yu J, Behrens T, Buchlis J, Albini C, Fournier S, et al. Etanercept treatment in children with new-onset type 1 diabetes: Pilot randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Diabetes Care*. 2009;32:1244-9.
- (28) Rother KI, Brown RJ, Morales MM, Wright E, Duan Z, Campbell C, et al. Effect of ingested interferon-alpha on beta-cell function in children with new-onset type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32:1250-5.
- (29) Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, Becker DJ, Gitelman SE, Goland R, et al. Rituximab, B-Lymphocyte Depletion, and Preservation of Beta-Cell Function. *N Engl J Med*. 2009;22361(26):2143-52.
- (30) Ludvigsson J, Hjorth M, Chéramy M, Axelsson S, Pihl M, Forsander G, et al. Extended evaluation of the safety and efficacy of GAD treatment of children and adolescents with recent-onset type 1 diabetes: A randomised controlled trial. *Diabetologia*. 2011;54(3):634-40.

- (31) Martin S, Herder C, Schloot NC, Koenig W, Heise T, Heinemann L, et al. Residual beta cell function in newly diagnosed type 1 diabetes after treatment with atorvastatin: The randomized DIATOR trial. *PLoS One*. 2011;6(3):1-8.
- (32) Sherry N, Hagopian W, Ludvigsson J, Jain SM, Wahlen J, Ferry RJ, et al. Teplizumab for treatment of type 1 diabetes (Protégé study): 1-year results from a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2011;378(9790):487-97.
- (33) Ludvigsson J, Krisky D, Casas R, Battelino T, Castaño L, Greening J, et al. GAD65 Antigen Therapy in Recently Diagnosed Type 1 Diabetes Mellitus Johnny. *N Engl J Med*. 2012;366(5):433-42.
- (34) Strom A, Kolb H, Martin S, Herder C, Simon MC, Koenig W, et al. Improved preservation of residual beta cell function by atorvastatin in patients with recent onset type 1 diabetes and high CRP levels (DIATOR trial). *PLoS One*. 2012;7(3):1-6.
- (35) Ataie-Jafari A, Loke S-C, Rahmat AB, Larijani B, Abbasi F, Leow MKS, et al. A randomized placebo-controlled trial of alphacalcidol on the preservation of beta cell function in children with recent onset type 1 diabetes. *Clin Nutr*. 2013;32(6):911-7.
- (36) Hagopian W, Ferry RJ, Sherry N, Carlin D, Bonvini E, Johnson S, et al. Teplizumab preserves C-peptide in recent-onset type 1 diabetes: Two-year results from the randomized, placebo-controlled Protégé trial. *Diabetes*. 2013;62(11):3901-8.
- (37) Gitelman SE, Gottlieb PA, Rigby MR, Felner EI, Willi SM, Fisher LK, et al. Antithymocyte globulin treatment for patients with recent-onset type 1 diabetes: 12-month results of a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2013;1(4):306-16.
- (38) Rigby M, DiMeglio A, Rendell M, Felner E, Dostou J, Gitelman S, et al. Targeting effector memory T cells with alefacept in new onset type 1 diabetes: 12 month results from the T1DAL study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2013;1(4):284-94.
- (39) Aronson R, Gottlieb PA, Christiansen JS, Donner TW, Bosi E, Bode BW, et al. Low-dose otelexizumab anti-CD3 monoclonal antibody DEFEND-1 study: Results of the randomized phase III study in recent-onset human type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2014;37:2746-54.
- (40) Demeester S, Keymeulen B, Kaufman L, Van Dalem A, Balti E V., Van De Velde U, et al. Preexisting insulin autoantibodies predict efficacy of otelexizumab in preserving residual b-Cell function in recent-onset type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2015;38:644-51.
- (41) Rigby MR, Harris KM, Pinckney A, DiMeglio LA, Rendell MS, Felner EI, et al. Alefacept provides sustained clinical and immunological effects in new-onset type 1 diabetes patients. *J Clin Invest*. 2015;125(8):3285-96.
- (42) Gitelman SE, Gottlieb PA, Felner EI, Willi SM, Fisher LK, Moran A, et al. Antithymocyte globulin therapy for patients with recent-onset type 1 diabetes: 2 year results of a randomised trial. *Diabetologia*. 2016;59(6):1153-61.
- (43) Pinckney A, Rigby MR, Keyes-Elstein L, Soppe CL, Nepom GT, Ehlers MR. Correlation

- among Hypoglycemia, Glycemic Variability, and C-Peptide Preservation after Alefacept Therapy in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus: Analysis of Data from the Immune Tolerance Network T1DAL Trial. *Clin Ther.* 2016;38(6):1327-39.
- (44) Hao W, Gitelman S, Di Meglio LA, Boulware D, Greenbaum CJ. Fall in C-peptide during first 4 years from diagnosis of type 1 diabetes: Variable relation to age, HbA1c, and insulin dose. *Diabetes Care.* 2016;39(10):1664-70.
- (45) Von Herrath M, Peakman M, Roep B. Progress in immune-based therapies for type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol.* 2013;172(2):186-202.
- (46) Kirsten V, Sesterheim P, Saitovitch D. Animal models for type 1 diabetes studies. *Medicina, Ribeirao Preto.* 2010;43(1):3-10.
- (47) Hinman M, Smith M, Cambier J. B cells and type 1 diabetes ...in mice and men. *Immunol Lett.* 2014;160(2):128-32.
- (48) George P, Mccrimmon RJ. Potential role of non-insulin adjunct therapy in Type1 diabetes. *Diabetic Medicine.* 2013;30:179-88.
- (49) Campbell-Thompson M, Wasserfall C, Kaddis J, Albanese-O'Neill A, Staeva T, Nierras C, et al. Network for Pancreatic Organ Donors with Diabetes (nPOD): Developing a tissue biobank for type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2012;28(7):608-17.
- (50) Ehlers MR. Immune Interventions to Preserve Beta Cell Function in Type 1 Diabetes. *J Investig Med.* 2016;64(1):7-13.
- (51) Eisenbarth GS, Srikanta S, Jackson R, Rabinowe S, Dolinar R, Aoki T, et al. Anti-thymocyte globulin and prednisone immunotherapy of recent onset type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res.* 1985;2(6):271-6.
- (52) Haller MJ, Gitelman SE, Gottlieb PA, Michels AW, Rosenthal SM, Shuster JJ, et al. Anti-thymocyte globulin / G-CSF treatment preserves B cell function in patients with established type 1 diabetes. *J Clin Invest.* 2015;125(1):448-55.
- (53) Bour-Jordan H, Bluestone JA. Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells. *Immunol Rev.* 2009;229(1):41-66.
- (54) Herold KC, Hagopian W, Auger JA, Poumian-Ruiz E, Taylor L, Donaldson D, et al. Anti-CD3 Monoclonal Antibody in New-Onset Type 1 Diabetes Mellitus. *N Engl J Med.* 2002;346(22):1692-8.
- (55) Guglielmi C, Williams SR, Toro R Del, Pozzilli P. Efficacy and safety of Otelixizumab use in new-onset type 1 diabetes mellitus. *Expert Opin Biol Ther.* 2016;16(6):841-6.
- (56) Rønholt K, Iversen L. Old and new biological therapies for psoriasis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(11):1-23.
- (57) Schioppo T, Ingegnoli F. Current perspective on rituximab in rheumatic diseases. *Drug Des Devel Ther.* 2017;11:2891-904.
- (58) Snarski E, Milczarczyk A, Hałaburda K, Torosian T, Paluszewska M, Urbanowska E, et al. Immunoablation and autologous hematopoietic stem cell transplantation in the treatment of new-onset type 1 diabetes mellitus: long-term observations. *Bone Marrow Transplant.* 2015;398-402.

- (59) Couri CEB, Oliveira MCB, Stracieri ABPL, Moraes DA, Madeira MIA, Malmegrim KCR, et al. C-Peptide Levels and Insulin Independence Following Autologous Nonmyeloablative Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Newly Diagnosed Type 1 Diabetes Mellitus. *JAMA*. 2009;301:1573-9.
- (60) Pozzilli P, Visalli N, Cavallo MG, Signore A, Baroni MG, Buzzetti R, et al. Vitamin E and nicotinamide have similar effects in maintaining residual beta cell function in recent onset insulin-dependent diabetes (the IMDIAB IV study). *Eur J Endocrinol*. 1997;137(3):234-9.
- (61) Ludvigsson J. Combination therapy for preservation of beta cell function in Type 1 diabetes: New attitudes and strategies are needed! *Immunol Lett*. 2014;159(1-2):30-5.

Anexo

Anexo 1 - Autorização de reprodução da Figura 1.

**SPRINGER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Nov 04, 2017

This Agreement between FCS ("You") and Springer ("Springer") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer and Copyright Clearance Center.

License Number	4221950209881
License date	Nov 04, 2017
Licensed Content Publisher	Springer
Licensed Content Publication	Current Diabetes Reports
Licensed Content Title	Immune Intervention and Preservation of Pancreatic Beta Cell Function in Type 1 Diabetes
Licensed Content Author	Kimber M. Simmons, Peter A. Gottlieb, Aaron W. Michels
Licensed Content Date	Jan 1, 2016
Licensed Content Volume	16
Licensed Content Issue	10
Type of Use	Thesis/Dissertation
Portion	Figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Author of this Springer article	No
Order reference number	
Original figure numbers	Figure 1
Title of your thesis / dissertation	2018
Expected completion date	Jul 2018
Estimated size(pages)	50
Requestor Location	FCS-UBI Avenida infante dom henrique Covilhã, 6200-506 Portugal Attn: FCS-UBI
Billing Type	Invoice
Billing Address	FCS-UBI Avenida infante dom henrique Covilhã, Portugal 6200-506 Attn: FCS-UBI
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

Introduction

The publisher for this copyrighted material is Springer. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions