

Luísa Dniela Gomes Garcez

Prevenção da Diabetes Tipo 2 por meio da Insulina Oral

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor António José Ribeiro e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Eu, Luísa Daniela Gomes Garcez, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2006021074, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

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

Coimbra, 11 de Julho de 2014.

Prevenção da Diabetes tipo 2 por meio da Insulina Oral

-Julho 2014-

Orientador de Monografia:

(Prof. Doutor António José Ribeiro)

Orientando:

(Luísa Daniela Gomes Garcez)

Lista de Acrónimos

AAb - Autoantibody

AAg - Autoantigen

APC - Antigen-presenting Cell

DC - Dendritic Cell

DM1- Diabetes *Mellitus* 1

DM2 - Diabetes *Mellitus* 2

DPP - Diabetes Prevention Program

IFG - Impaired Fasting Glucose

IGT - Impaired Glucose Tolerance

IL-1 - Interleucina 1

NK - Natural Killer

NOD- Non - Obese Diabetic

OGTT - Oral Glucose Tolerance Test

pAPC - Professional APC

TCR - T-cell Receptor

TNF - Tumour Necrosis Factor

Treg cell - Regulatory T-cell

TRIPOD - Troglitazone in Prevention of Diabetes

Resumo

A *Diabetes Mellitus* (DM) abrange um grupo de distúrbios metabólicos comuns que partilham o fenótipo de hiperglicémia.

Existem diversos tipos de DM, causados por uma complexa interação de fatores genéticos, ambientais e de estilo de vida. De acordo com a etiologia da DM, os fatores que contribuem para a hiperglicémia podem incluir redução da produção de insulina, diminuição da utilização e aumento da produção de glicose. A desregulação metabólica associada à DM provoca alterações fisiopatológicas secundárias em múltiplos sistemas orgânicos. Com incidência mundial crescente, a DM será uma das principais causas de morbidade e mortalidade no futuro próximo.

Uma revisão da literatura científica acerca da insulina na prevenção da doença foi realizada durante um longo período de tempo em modelo animal, *NOD* mice, pois é o modelo que desenvolve a doença espontaneamente, partilha genética e imunopatologia com o humano. Mas o estudo continua e agora em humanos e cada vez mais se aposta nesta área, pois a prevenção da diabetes, trará grandes benefícios para a saúde mundial. Os resultados obtidos na prevenção da DM 2 por meio da insulina oral são em modelo animal. Vão ser explicados os processos imunológicos que abriram lugar a vários caminhos para o desenvolvimento de terapias imunomoduladoras, que continuam em estudo e estão em constante desenvolvimento.

Palavras-chave

Auto-imunidade, *Diabetes Mellitus tipo2*, *Insulite*, *Insulina*, *Prevenção*, *Processos Imunopatológicos*.

Abstract

The Diabetes Mellitus (DM) includes a group of disorders that share common metabolic phenotype of hyperglycemia. There are several types of DM, caused by a complex interaction of genetic, environmental factors and lifestyle. According to the etiology of DM, the factors which contribute to hyperglycemia can include reduction in insulin production, decreased production and increased use of glucose. The metabolic dysregulation associated with DM causes secondary pathophysiologic changes in multiple organ systems. With increasing incidence worldwide, DM will be a major cause of morbidity and mortality in the near future.

A review of the scientific literature on insulin to prevent the disease was performed over a long period of time in an animal model NOD mice, as is the model that spontaneously develop the disease, genetically sharing and immunopathology in the human. But the study continues and now in humans and increasingly bet in this area because the prevention of diabetes, will bring great benefits to global health. The results in the prevention of DM2 through oral insulin are in an animal model. Will be explained immunological processes that place opened several avenues for the development of immunomodulatory therapies, which are still under study and are in constant development.

Keywords

Autoimmunity, Diabetes Mellitus type2, Insulite, Insulin ,Prevention, Process immunopathological.

Índice

| | |
|---|----|
| 1. Introdução | 9 |
| 1.1. Classificação | 9 |
| 1.2. Epidemiologia | 10 |
| 1.3. Biossíntese, secreção e ação da insulina | 11 |
| 1.3.1. Biossíntese..... | 11 |
| 1.3.2. Secreção | 11 |
| 1.3.3. Ação..... | 12 |
| 1.4. Fisiopatologia da <i>Diabetes Mellitus 2</i> | 13 |
| | |
| 2. Prevenção da <i>Diabetes Mellitus 2</i> | 15 |
| | |
| 3. Análise do estudo da insulina na prevenção da <i>Diabetes Mellitus 2</i> em modelo animal | 17 |
| 3.1. Imunopatologia | 18 |
| 3.1.1. O início da doença | 18 |
| | |
| 4. Conclusão | 24 |
| | |
| 5. Referências Bibliográficas | 25 |

I Introdução

I.1 Classificação

Em 1997, a *American Diabetes Association (ADA)* publicou os novos critérios da classificação e do diagnóstico, modificados em 2003 no que respeita ao diagnóstico de alteração da glicose em jejum.

A classificação da DM inclui quatro classes clínicas:

1. Diabetes tipo 1 (DM1): resulta da destruição da célula beta, o que implica deficiência absoluta de insulina.
2. Diabetes tipo 2 (DM2): resulta de defeito secretório de insulina associado a insulinoresistência.
3. Outros tipos específicos de diabetes devidos a outras causas, por exemplo, defeitos genéticos na função da célula beta, defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino (como a fibrose cística) e induzida por fármacos ou substâncias químicas (tais como no tratamento da SIDA ou transplante de órgãos).
4. DM gestacional: diagnosticada durante a gravidez (1).

| Tipos \ Estádios | Normoglicémia | Hiperglicémia | | | |
|--------------------------|-----------------------------|------------------------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------------|
| | Tolerância à glicose normal | Alteração da regulação: TDG ou GJA | Diabetes | | |
| | | | Não insulino-necessitante | Insulina para controlo | Insulina para sobrevivência |
| Tipo 1 | | | | | |
| Tipo 2 | | | | | |
| Outros tipos específicos | | | | | |
| Diabetes Gestacional | | | | | |

Tabela I- Alteração da glicémia: Tipos etiológicos e Estádios Clínicos Adaptado de CALDEIRA, J., PARREIRA, J., SAGREIRA, L., ANDRÉ, O., LISBOA, M., LISBOA, P., MARTINS, J., *Tópicos sobre diabetes*. 14ª Edição (2009).

Dando principal foco aos tipos 1 e 2. A DM tipo 1A, resulta da destruição auto imune das células beta, que leva à insuficiência de insulina. Os indivíduos com DM tipo 1B não possuem os marcadores imunológicos indicativos de processo destrutivo autoimune das células beta. Entretanto apresentam deficiência de insulina por mecanismos desconhecidos e propensão à cetose. Relativamente poucos pacientes com DM tipo 1 pertencem à categoria idiopática do tipo 1B; muitos deles são afrodescendentes ou de origem asiática (2).

A DM tipo 2 é um grupo heterogêneo de distúrbios caracterizados por diferentes graus de resistência e secreção inadequada à insulina, e produção aumentada de glicose (3).

Defeitos genéticos e metabólicos distintos na ação e/ou secreção originam o fenótipo comum de hiperglicemia na DM tipo 2. Processos patogênicos neste tipo de diabetes têm implicações terapêuticas potenciais, importantes à medida que agentes farmacológicos dirigidos às disfunções metabólicas específicas tornam-se disponíveis. A DM tipo 2 é precedida de homeostase anormal da glicose (1).

1.2 Epidemiologia

A prevalência mundial aumentou drasticamente nas últimas duas décadas. Embora a prevalência de diabetes tipo 1 e 2 esteja a aumentar, espera-se que a prevalência do tipo 2 cresça mais rapidamente no futuro devido aos níveis crescentes de obesidade e diminuição da atividade física. As taxas de DM aumentam com o envelhecimento. Em 2000 estimou-se a prevalência da DM em 0,19% das pessoas com idade inferior a 20 anos e em 8,6% daquelas com mais de vinte anos. Em indivíduos com mais de 65 anos a prevalência foi de 20,1%. A prevalência é semelhante em homens e mulheres ao longo da maioria das faixas etárias, mas é ligeiramente maior nos homens com mais de 65 anos (1).

Existe considerável variação geográfica na incidência de DM tipo 1 e 2. A Escandinávia apresenta a maior taxa de DM tipo 1, a costa do Pacífico apresenta menor incidência. A Europa do Norte e os EUA compartilham uma incidência intermédia (1).

A prevalência da DM tipo 2 é mais elevada em algumas ilhas do Pacífico, intermédia em países como a Índia e os EUA e relativamente baixa no Rússia e na China. Essa variabilidade deve-se provavelmente a fatores genéticos, comportamentais e ambientais. A prevalência também varia entre as diferentes populações étnicas de determinado país. Em 2000, a prevalência de DM nos EUA foi de 13 % entre os afrodescendentes, de 10,2% entre os norte-americanos de origem latina e 7,8% entre os brancos não latinos (1).

1.3 Biossíntese, secreção e ação da insulina

1.3.1 Biossíntese

A insulina é produzida nas células beta das ilhotas pancreáticas. É inicialmente sintetizada como um polipeptídeo precursor de 86 aminoácidos de cadeia simples, a pré-pró-insulina. Processos proteolíticos subsequentes removem o peptídeo sinalizador aminoterminal, originando a pró-insulina. A pró-insulina está estruturalmente relacionada com os fatores de crescimento semelhantes à insulina I e II, os quais se ligam fracamente ao recetor da insulina. A clivagem de um fragmento interno de 31 resíduos a partir da pró-insulina gera o peptídeo C e as cadeias de insulina A (21 aminoácidos) e B (30 aminoácidos) que são ligadas por ligações de dissulfureto. A molécula de insulina e o peptídeo C são armazenados juntos e co-secretados a partir dos grânulos de secreção das células beta. Por ser menos suscetível do que a insulina à degradação hepática, o peptídeo C é um importante marcador da secreção insulínica e permite a discriminação entre as fontes endógenas e exógenas da insulina na avaliação da hipoglicémia. Atualmente a insulina humana é produzida pela tecnologia do DNA recombinante; as alterações estruturais em um ou mais resíduos são úteis para fazer modificações nas características físicas e farmacológicas (2).

1.3.2 Secreção

A glicose é transportada para o interior da célula por meio do transportador de glicose GLUT 2. A enzima glicocinase cataliza a transferência do fosfato do ATP para a glicose formando glicose-6-fosfato. O aumento dos níveis citosólicos dos níveis gerados pela glicólise e o ciclo de Krebs, promove o fecho dos canais K^+ sensíveis ao ATP levando à desfosforilação da membrana plasmática e promovendo a abertura dos canais de Ca^{2+} , permitindo o influxo de Ca^{2+} do retículo endoplasmático liso. Os aumentos citosólicos de Ca^{2+} levam à migração e fusão de vesículas secretoras de insulina, que por excitação se libertam para a circulação (1).

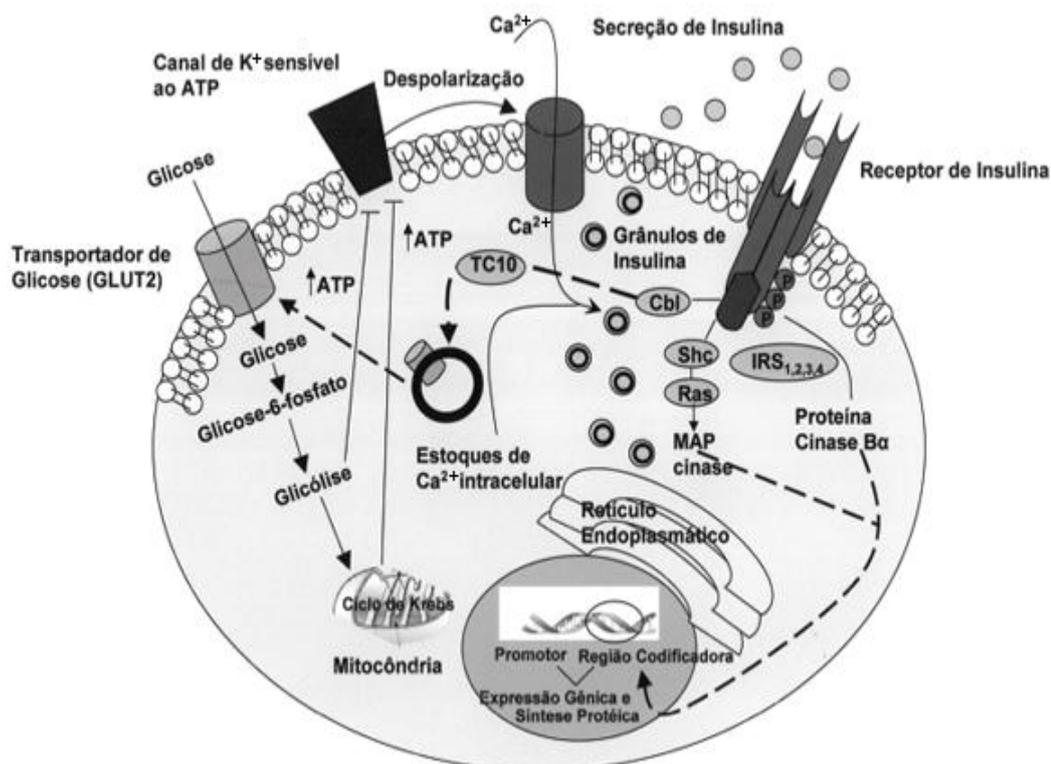


Figura 1- Secreção De insulina e sinalização da célula beta pancreática (Adaptado de Bell GI & Polonsky KS, 2001).

1.3.3 Ação

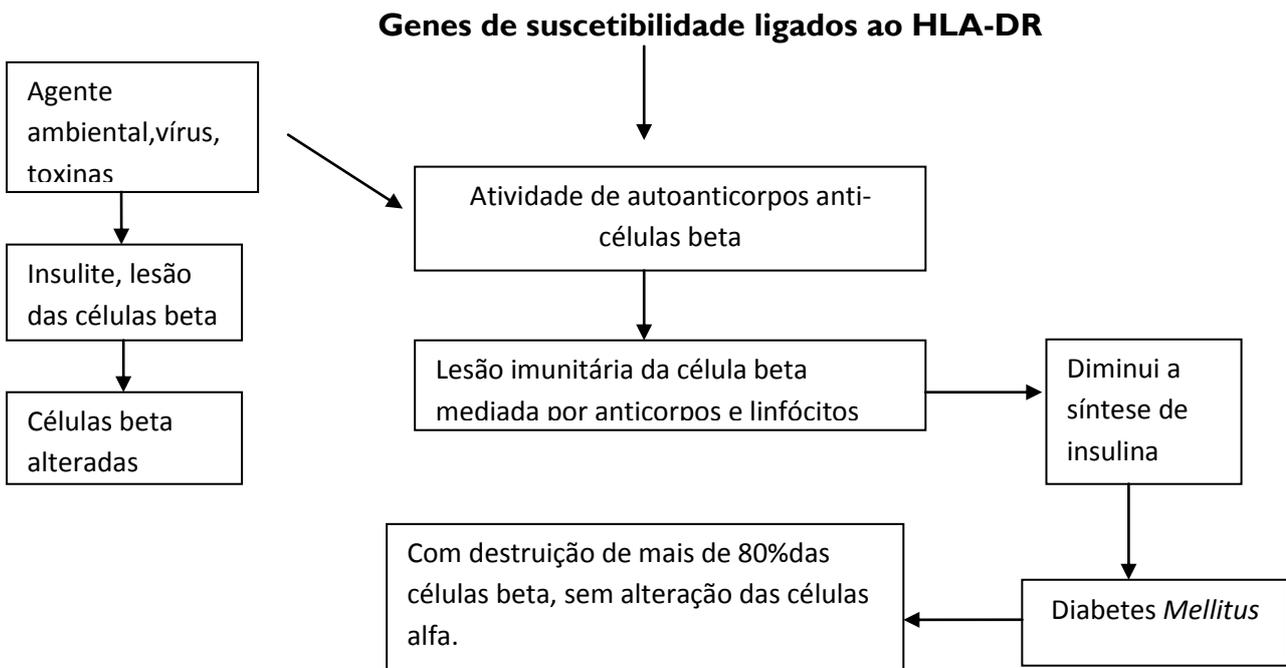
Quando a insulina é secretada no sistema venoso portal, cerca de 50% são degradados pelo fígado. A insulina que não é extraída, alcança a circulação sistêmica onde se liga aos recetores nos tecidos-alvo. A ligação da insulina ao seu recetor estimula a atividade intrínseca da tirosinocinase, levando à auto-fosforilação do recetor e ao recrutamento de moléculas sinalizadoras intracelulares como os substratos do recetor de insulina. Essas e outras proteínas iniciam uma cascata complexa de reações de fosforilação e desfosforilação, que geram efeitos metabólicos da insulina. Como exemplo, a ativação da via do fosfatidilinositol-3-cinase (PI-3-cinase) estimula a translocação dos transportadores da glicose (GLUT4) para a superfície celular, que é fundamental para a captação de glicose pelo músculo esquelético e tecido adiposo. A ativação de outras vias sinalizadoras do recetor de insulina induz a síntese de glicogénio, de proteínas, de lípidos (3).

A homeostase da glicose reflete o equilíbrio preciso entre a produção hepática de glicose e a captação e utilização de glicose periférica. A insulina é o regulador mais importante deste equilíbrio metabólico. No estado de jejum, os baixos níveis de insulina

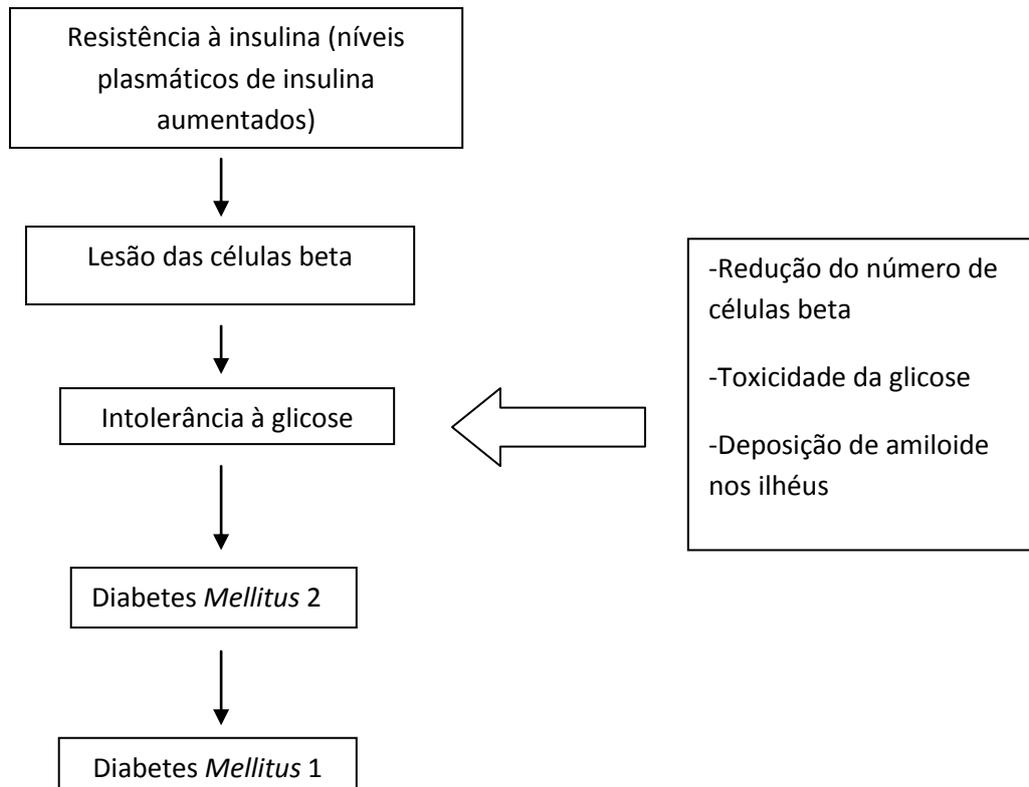
aumentam a produção de glicose ao promoverem a gliconeogénese e a glicogenólise hepáticas. O glucagon também estimula a glicogenólise e a gliconeogénese pelo fígado e a medula. Os baixos níveis de insulina diminuem a síntese de glicogénio, reduzem a captação de glicose pelos tecidos sensíveis e promovem a mobilização dos precursores armazenados. Após uma refeição a carga de glicose, promove aumento de insulina e queda de glucagon, levando à reversão dos processos. A maior parte da glicose pós-prandial é utilizada pelo músculo esquelético, efeito da captação de glicose estimulada pela insulina. Os demais tecidos, principalmente o cérebro, utilizam a glicose de maneira independente da insulina (1).

1.4 Fisiopatologia da *Diabetes Mellitus* tipo 2

A DM2 caracteriza-se por três anormalidades fisiológicas: secreção reduzida e resistência periférica à insulina e produção hepática excessiva de glicose. A obesidade em particular, a visceral ou central, é muito comum na DM2. Os adipócitos segregam produtos biológicos (TNF-alfa, ácidos gordos livres) que modulam a secreção e a ação da insulina e o peso corporal além de contribuírem para a resistência à insulina. Nos estádios iniciais da doença, a tolerância à glicose permanece normal, apesar da resistência à insulina, porque as células beta pancreáticas realizam a compensação por meio do aumento do débito de insulina. À medida que a resistência e a hiperinsulinémia avançam, as ilhotas pancreáticas, em alguns indivíduos tornam-se incapazes de sustentar o estado hiperinsulinémico. Então há a elevação na glicose pós-prandial. O declínio da secreção de insulina e o aumento da produção hepática da glicose levam a diabetes com hiperglicemia em jejum. Por fim pode existir insuficiência das células beta. Os marcadores da inflamação como o IL-6 e a proteína C reativa estão elevados na diabetes tipo 2 (1).



Esquema 1 - Fisiopatologia da Diabetes Mellitus I. Adaptado de CALDEIRA, J., PARREIRA, J., SAGREIRA, L., ANDRÉ, O., LISBOA, M., LISBOA, P., MARTINS, J., **Tópicos sobre diabetes**. 14ª Edição (2009).



Esquema 2 - Fisiopatologia da Diabetes Mellitus 2. Adaptado de CALDEIRA, J., PARREIRA, J., SAGREIRA, L., ANDRÉ, O., LISBOA, M., LISBOA, P., MARTINS, J., **Tópicos sobre diabetes**. 14ª Edição (2009).

2 Prevenção da Diabetes Mellitus tipo 2

A primeira questão a ser colocada é se realmente devemos tentar prevenir a diabetes. Existem pelo menos cinco condições que devem ser cumpridas para justificar um programa para prevenir uma doença. Idealmente, estes critérios devem ser aplicados para prevenção da morbidade e da mortalidade e não apenas do diagnóstico (5).

O primeiro critério está relacionado com o facto da doença ser uma problema de saúde de elevada prevalência. Que no caso da diabetes se confirma (5).

Em segundo, o desenvolvimento natural da doença deve ser entendido para identificar os parâmetros que identificam a progressão desta. Temos então uma grande quantidade de dados que afirmam que a incidência da diabetes está fortemente relacionada com a hiperglicemia com *IFG (impaired fasting glucose)* e *IGT (impaired glucose tolerance)*. Não há evidência de que outros fatores estão relacionados com a diabetes de forma independente, idade, história familiar de diabetes, relação cintura-quadril, IMC (Índice de massa corporal), pressão arterial e os níveis de lípidos. Nenhum deles isoladamente é um fator forte de progressão da doença, mas estes em conjunto com os níveis de glicose são mais preditivos para o desenvolvimento da doença que os níveis de glicose apenas (5).

Em terceiro, deve existir um teste que seja seguro e preditivo para deteção da pré-diabetes. São estes a medição da glicose em jejum e o teste da tolerância à glicose (5).

Em quarto, o método para prevenir ou atrasar o desenvolvimento da diabetes deve ser seguro, eficaz e ter um nível de confiança alto (5).

E por último, encontrar as pessoas com alto risco de contrair a doença, e que o custo dessa intervenção seja rentável (5).

Outra questão que deve ser abordada é: “Quais são os potenciais candidatos para este tipo de intervenção?” A maior parte dos estudos de prevenção de diabetes escolhem indivíduos *IGT (impaired glucose tolerance)* inferior a 140 mg/dl e 2h *OGTT (oral glucose tolerance test)* tenha valores de 140 a 190 mg/dl, este é importante o principal critério de inscrição neste tipo de estudo (5).

| Estudo | Critérios Elegíveis | | | Participantes atuais | | |
|---|---------------------|-------|-------------|----------------------|-----------|-------------------|
| | Idade | IMC | FPG (mg/dl) | Idade Média | IMC média | FPG Média (mg/dl) |
| Malmo (29) | 47-49 | NS | NS | 47-49 | >25 | NG |
| Da Qing (30) | NS | NS | NS | 44 | >25 | NG |
| Finnish (31;J.Tuomilehto, personal communication) | 40-65 | >= 25 | NS | 55 | 31 | 110 |
| DPP(33,34) | >=25 | > =24 | 95-125 | 51 | 34 | 106 |
| TRIPOD (35) | NS | NS | NS | 35 | 30 | 94 |
| STOP-NIDDM (36,37) | 40-70 | 25-40 | 101-139 | 55 | >31 | 101-139 |

NG- Não Determinado ;NS- Não específico ou relevante

Tabela 2 - Critérios e características de elegibilidade dos participantes com IGT em ensaios de prevenção de diabetes. Adaptado de **Prevention or Delay of Type 2 Diabetes- American Diabetes Association National Institute of Diabetes And Digestive And Kidney Diseases, Diabetes care**, volume27, suplemento I, (2004).

Na escolha do teste de triagem não existem estudos que avaliem a utilidade do teste A1C, para prever futuros diabéticos (5).

Os rastreios têm também a função, de além de detetarem IFG e IGT, mas também casos de diabetes não diagnosticados. As estratégias para identificar indivíduos para os quais é necessário iniciar a prevenção da diabetes também identifica os doentes que precisam de iniciar o t Apesar de todas as tentativas e muito estudo para a prevenção da doença um substancial número de doentes (mais de metade) não consegue atingir os alvos recomendados para o controle da glicose, apenas menos de 10% alcançam os níveis recomendados de glicose, lípidos e controlo da pressão arterial. A indicação é clara: necessitamos de dispor de tratamentos ainda mais eficazes e fáceis para o doente. Nesse sentido existe, atualmente uma considerável pesquisa e desenvolvimentos de fármacos, que realmente poderão vir ajudar a medicina no sentido da prevenção da doença de uma forma mais dirigida e efetiva (5).

Existe uma grande investigação, em terapêuticas com novos mecanismos de ação, incluindo novas terapêuticas insulínicas (4).

| |
|---|
| Idade ≥ 45 anos |
| Excesso de peso(IMC ≥ 25 kg/m ²) |
| Inatividade física habitual |
| Membro de uma população étnica de alto risco (Latino, Índio, Asiático Americano, Ilhas do Pacífico) |
| Familiar de primeiro Grau com diabetes |
| Identificado com Pré-diabetes anteriormente (IFG ou IGT) |
| Hipertensos ($\geq 140/90$ mmHg) |
| História de doença vascular |
| História de diabetes Gestacional |

Tabela 3- Fatores de risco para a Diabetes Tipo 2. (Adaptado **Prevention or Delay of Type 2 Diabetes-** American Diabetes Association National Institute of Diabetes And Digestive And Kidney Diseases, *Diabetes care*, volume27, suplemento 1, (2004).

3 Análise do estudo da insulina na prevenção da diabetes tipo 2 em modelo animal

Atualmente, o melhor modelo animal para o estudo do desenvolvimento da doença é o *NOD(non-obese diabetic) mouse* pois desenvolve a doença espontaneamente e partilha características genéticas e imunopatagénicas com o humano portador da *Diabetes Mellitus Tipo 1*. Este modelo tem sido extensivamente estudado e deu uma enorme contribuição para a compreensão da doença no humano (6).

Analisa as potencialidades e limitações das estratégias de imunoterapia em *NOD Mice* e que se encontram agora a ser testados em indivíduos portadores da DM I e em pessoas em risco de desenvolver DM I (6).

A diabetes é uma doença autoimune em que as células betas produtoras de insulina no pâncreas são seletivamente destruídas. Existe um infiltrado inflamatório (células dendríticas, macrófagos e linfócitos T) que invade as ilhotas. A perda progressiva das células beta faz com que haja deficiência de insulina e consequente hiperglicemia. Apesar da administração de insulina exógena uma grande percentagem de doentes desenvolvem complicações microvasculares e macrovasculares, levando a um aumento da mortalidade e morbilidade de indivíduos portadores da doença (6).

O conhecimento adquirido através destes estudos ajudam a estabelecer estratégias de imunomoduladores para prevenir o aparecimento da doença em indivíduos que são suscetíveis de a desenvolver geneticamente (6).

3.1 Imunopatologia

3.1.1 O início da doença

Os *pAPCs* (*professional APCs*), as células apresentadoras de antígeno são as primeiras células aparecer em volta das ilhotas, iniciando-se assim uma cascata imunopatológica que leva a destruição das células beta. A falta de acesso a estas células leva a um grande desafio por parte dos investigadores, para entender realmente o papel destas, na doença. Foi então proposto que a morte das células beta ocorre em *NOD mice* como consequência da remodelação do tecido. Isto pode ocorrer como resposta a uma infecção viral ou mudanças metabólicas. A migração do CCR7 (*CC chemokine receptor 7*) positivo monócito, macrófago e células dendríticas para os ilhéus é promovida pela elevada expressão do tecido-linfóide de quimiocinas tais como CCL-19 (*CC chemokine ligand 19*) encontrado em *NOD mice*. Os macrófagos produzem as citocinas TNF- alfa e IL-1 beta, que são diretamente células beta tóxicas e leva a produzir um excesso de IL-12 e acumulação de células dendríticas para a célula beta. Isto agrava a resposta inflamatória e há uma ativação inapropriada das células T auto reativas em *NOD mice*. Além disso devido ao aumento da produção da prostaglandina (PGE 2) os macrófagos dos *NOD mice* são prejudicados na sua capacidade fagocitária e de apresentar antígenos próprios para a indução de respostas imunitárias (6).

Portanto os macrófagos de *NOD mice* são fundamentais não só no início da insulite mas também na progressão e destruição das células beta (6).

Nas base dos papéis importantes da IL-1 beta e TNF- alfa em danos nas células beta, as crianças diagnosticadas recentemente com DMI foram tratadas com IL-1RAS (IL-1 receptor antagonist) e antagonistas TNF, em muitos estudos. Em ambos os tratamentos houve pequenos aumentos na produção de insulina em 4-5 meses de tratamento (6).

Em *NOD mice* vários subconjuntos de células dendríticas estão presentes mDCs (myeloide DCs), linfoide DCs e pDCs (plasmacytoid DCs). mDCs têm um importante papel no processamento de antígenos e apresentação de células T reativas levando a sua ativação (6).

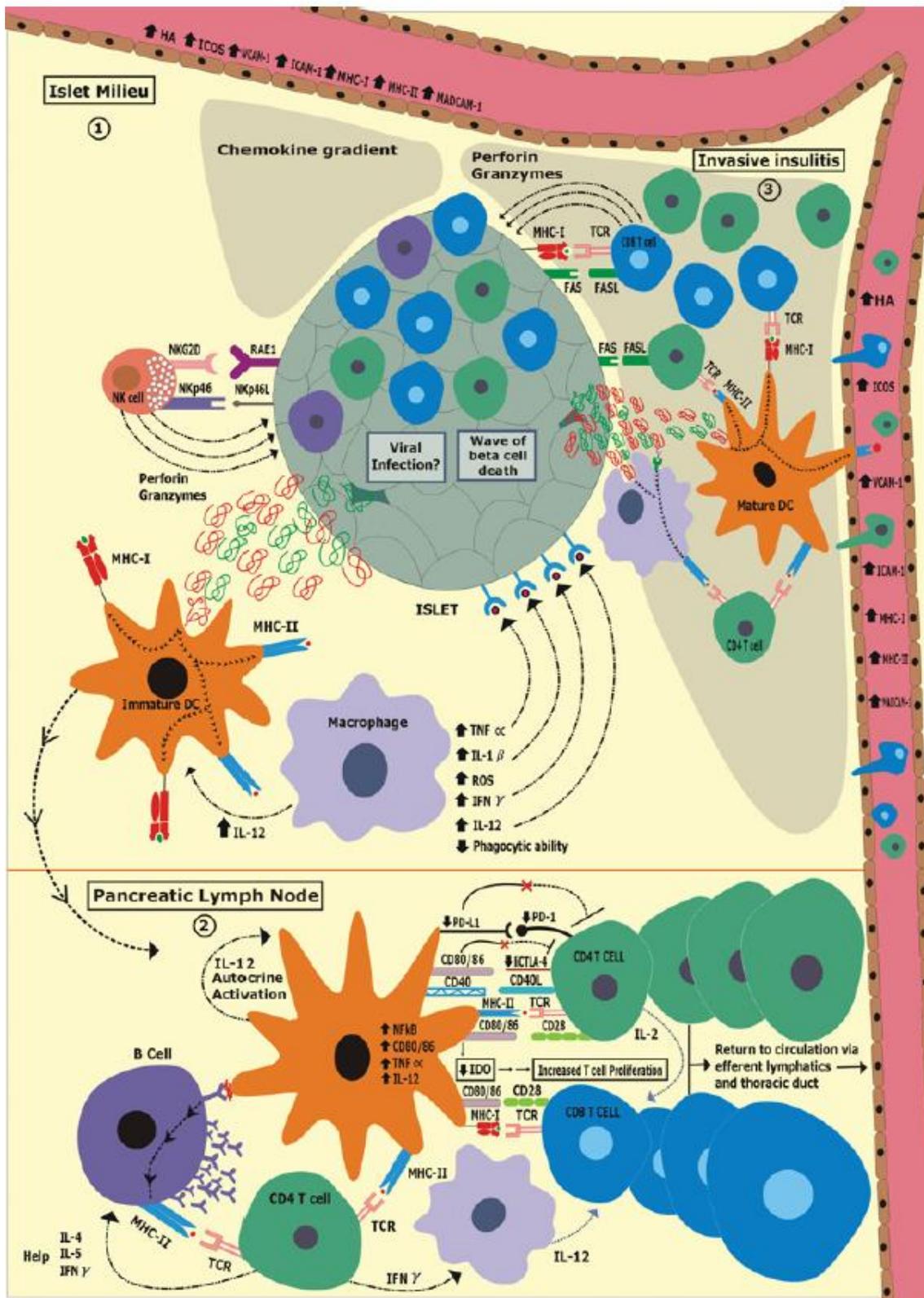


Figura 2- Características imunopatogênicas da destruição das células beta em *NOD mice*. 1) O processo que provoca a liberação das células beta é desconhecido, mas tem sido proposto que a infecção viral e/ou a morte das células beta pode promover o recrutamento inicial de NK, DC ou macrófagos para o meio da ilhota. Os macrófagos *NOD* têm capacidade fagocitária reduzida mas leva ao aumento da secreção de ROS, TNF-alfa e IL-1 beta que promovem a morte das células beta, assim

como aumentam os níveis de citocinas pró-inflamatórias IFN e IL-12, que aumentam a expressão de MHC locais e promovem ativação das células dendríticas.

2) As células dendríticas ativadas migram para o nódulo linfóide, onde fornecem o antígeno das células beta residentes de células apresentadoras de antígeno e células T. 3) Ativados os linfócitos, estes migram, expressando HÁ, ICOS, VCAM-1, ICAM-1, MADCAM-1, MHC class I e MHC class 2, para o tecido dos ilhéus. Ativado o local APCs, há a retenção e expansão de CD8 e células T CD4, que “matam” as células beta (6).

A tabela 4 sumaria a potencial relevância para humanos e o seu significado clínico através dos estudos com o modelo animal.

Estes estudos na últimas décadas têm contribuído para inúmeras terapias imunomoduladoras, e muitas foram testadas em humanos. Apesar de sucesso na prevenção da diabetes em *NOD mice* há um sucesso limitado com as intervenções terapêuticas em indivíduos em risco de contrair a doença. As terapias não antígeno- não específicas que têm como alvo as células T, utilizam anti CD3m Abs, B cells, anti CD20 mAbs e APCs usam Sctla4lg, demonstraram alguma prevenção para a doença. Contudo terapias similares em humanos demonstraram eficácia limitada (6).

O papel dos antígenos nas células beta, pelo estudo da pró-insulina em *NOD mice*, teve importância clínica pela indução da tolerância à insulina onde foi testada pela via intranasal em que os autoanticorpos positivos dos indivíduos tiveram aumento dos anticorpos e diminuição da resposta das células T à insulina (6).

Pela via oral, os doentes com DMI de início recente não mostraram nenhuma melhoria na secreção de peptídeo C ou IgG de anticorpos de insulina, e houve perda acelerada de células beta em alguns doentes (6).

Pela via intramuscular de DMI de início recente, mostraram aumento específico da insulina regulada pelas T cell, dois anos após o tratamento (6).

GAD65 são autoanticorpos presentes em *NOD mice* e humanos. Foi avaliada indução da tolerância GAD65/alum pela via subcutânea em doentes com início recente da patologia, em que não houve nenhuma melhoria significativa de níveis de peptídeo C; está atualmente a ser estudado a combinação da vitamina C com o ibuprofeno em ensaios clínicos de Fase II (6).

Os estudos em *NOD mice* para avaliar o papel das células T revelou que Anti – CD3 em doentes de início recente e em risco, diminui a dependência da insulina ao longo de quatro anos. No entanto, um estudo recente (otelixizumab) não mostrou eficácia em termos de peptídeo C, insulino-dependência e HbA1c, mas estes ainda decorrem (6).

Ensaio de modulação imunes antigénio-específica em *NOD mice*, que envolvem a insulina foram bem sucedidos. No entanto, nenhum dos testes em humanos(crianças) têm demonstrado eficácia significativa. As explicações propostas para o fracasso destes estudos incluem o facto que a via de administração ser ineficaz e a dose inadequada para induzir tolerância. Em alternativa, poderá existir um estudo apenas para os indivíduos em risco antes do desenvolvimento das células T e A Abs (6).

As combinações terapêuticas que inibem ativação das células T e melhoram a sua tolerância foram bem sucedidas em *NOD mice* (6).

Um estudo recente em combinações terapêuticas, envolveu a Rapamicina para suprimir o desenvolvimento das células T efectoras, em combinação com IL-2 para induzir a formação de células T reg. Infelizmente nenhum dos doentes em tratamento apresentaram preservação das células beta (6).

O tratamento, em doentes recém-diagnosticados, com Rituximab, anti CD20 mAb. Resultou uma transitória preservação da massa das células beta. Esta terapia apesar de ainda transitória, será uma promessa para aqueles que estão em risco de desenvolver diabetes tipo I, se administrado logo no início do processo da doença (6).

| Estudos em <i>NOD mice</i> | Potenciais relevâncias no humano DM1 | Significado clínico |
|---|--|---|
| Papel do ambiente | | |
| Vitamina D protege de DM1 em <i>NOD mice</i> | Redução da incidência em DM1 em regiões equatoriais de alta luz solar UVB é essencial para a síntese da vitamina D A vitamina D tem efeitos anti-inflamatórios | A suplementação de vitamina D: DM1 de início recente não teve resultados significativos na área da proteção |
| Ácidos gordos ómega -3 protegem da DM1 em <i>NOD mice</i> | Redução da incidência da DM1 em grupos étnicos (com grande consumo de peixe na sua alimentação) Ácidos gordos ómega-3 | Suplementação de ómega -3: Em crianças suscetíveis geneticamente, a incidência de DM1 foi |

| | | |
|---|---|---|
| | são anti-inflamatórios | reduzida |
| Probióticos protegem da DM1 em <i>NOD mice</i> | Incidência da DM1 ao uso de antibióticos | Administração com probiótico em estudo, a eficácia ainda não é conhecida |
| Papel dos recetores de citocina/citocina | | |
| Produção de macrófagos TNF-alfa e IL-1 beta são células beta tóxicas em <i>NOD mice</i> | Macrófagos estão presentes em amostras pancreáticas de cadáveres de doentes com DM1 | IL-1RA recombinante em crianças com início recente de DM1, não houve mudanças na capacidade de secreção de insulina HbA 1c Foram relatados necessidade de níveis mais baixos de insulina após 4 meses de tratamento Antagonista de TNF (etanercept, infliximab e adalimumab) em crianças com início recente de DM1, HbA1c foi reduzida e a produção de insulina aumentou após 24 semanas de tratamento |
| Papel das DC | | |
| Maturação de DC defeituosa em <i>NOD mice</i> | Existe controlo na tolerância das DCs em comparação com a ativação das células T | Autólogos das DCs, manipulado para reduzir a co-estimulação e a capacidade de promover a tolerância aos doentes com DM1 e os indivíduos |

| | | |
|--|--|--|
| | | em risco A segurança foi estabelecida mas a eficácia ainda está em estudo |
| Aumento da ativação de NF-kB em DCs mieloide em <i>NOD mice</i> | Aumento da ativação de NF-kB em DCs mieloide em doentes com DM1 | |
| Aumento da produção de IL-12 em DCs de <i>NOD mice</i> | | |
| Papel da co-estimulação | | |
| Redução da expressão de co-estimulação da molécula inibidora CTLA-4 em <i>NOD mice</i> | Redução da expressão de CTLA-4 solúvel em doentes humanos com DM1 | IgCTLA-4 proteína de fusão de bloqueio da co-estimulação (abatacept) :e doentes de início recente de DM1 o tratamento resultou numa melhoria inicial de peptídeo C e não conservou a massa de células beta ,após dois anos |
| A expressão de CTLA-4 reduz a incidência de DM1 em <i>NOD mice</i> | | |
| O tratamento precoce com IgCTLA-4 protege <i>NOD mice</i> de DM1 | | |
| Expressão reduzida da molécula inibitória PL-L1 | Redução da expressão de PD-1 em células T humanas em doentes humanos com DM1 | |
| Maior expressão de ICOS | | |
| Papel de antígenos de | | |

| | | |
|--|--|--|
| células beta | | |
| Pró-insulina | | |
| <i>NOD mice</i> transgênicos | | |
| Expressão da pró-insulina no timo leva à proteção da DM1, sugerindo que o papel da expressão da insulina no timo é manter a tolerância | O polimorfismo do promotor da insulina humana, com menor expressão da pró-insulina no timo, com perda de tolerância à DM1 e à insulina | A indução da tolerância à insulina foi testada com: Via intra-nasal: autoanticorpos positivos em indivíduos tiveram aumento de anticorpos e diminuíram a resposta das células T à insulina |
| <i>NOD mice</i> transgênicos que expressam a pró-insulina mutante (falta de peptídeo imunogénico) foram protegidos da DM1 | Respostas das células T contra a insulina humana em doentes com DM1 Autoanticorpos de insulina presentes em doentes humanos com DM1 | Via oral: doentes com DM1 de início recente, não mostrou nenhuma melhoria na secreção de peptídeo C ou IgG anticorpos de insulina e perda acelerada de células beta |
| Autoanticorpos de insulina em <i>NOD mice</i> com DM1 | | Via intramuscular: doentes com início recente de DM1 mostraram aumento específico de insulina em células Treg dois anos após o tratamento |
| Respostas em células T contra a insulina estão presentes em <i>NOD mice</i> | | |
| GAD65 | | |
| GAD65 autoanticorpos estão presentes em <i>NOD mice</i> | GAD65 estão presentes em humanos doentes com DM1 | Via subcutânea: doentes com DM1 de início recente não teve nenhuma |

| | | |
|---|--|---|
| | | melhoria significativa nos níveis de peptídeo C |
| Papel das células T | | |
| Células T auto reativas presentes na insulite em <i>NOD mice</i> | Células T auto reativas presentes na insulite em humanos com DM1 | Anti CD3 m Ab em doentes com DM1 com início recente reduziu a dependência de insulina ao longo de quatro anos |
| Células T auto reativas transferem a doença para <i>NOD mice</i> | Células T CD8 estão presentes em ilhotas em cadáveres dos doentes com DM1 | |
| Células T cd8 são mediadores primários para “matar” células beta em <i>NOD mice</i> | | |
| O tratamento intravenoso de anti -CD3 protege <i>NOD mice</i> de DM1 | | |
| Anti-CD3 oral reverte DM1 em <i>NOD mice</i> | | |
| Papel das células | | |
| Células B presentes na insulite em <i>NOD mice</i> | Células B presentes em amostras pancreáticas de cadáveres de doentes com DM1 | Anti –CD20 (rituximab):doentes com DM1 de início recente melhorou HbA1c e dependência de insulina após um ano |
| Os anticorpos contra os antígenos das células beta estão presentes em <i>NOD</i> | Os anticorpos contra os antígenos das células beta estão presentes em | |

| | | |
|-------------|-----------------|--|
| <i>mice</i> | humanos com DM1 | |
|-------------|-----------------|--|

Tabela 4 - Resumo dos resultados clínicos em doentes com DM1 co base nos estudos em *NOD mice*.

Adaptado de **Advances in understanding of the pathophysiology of Type I diabetes: lessons from the NOD mouse**, JAYASIMHAN, A., MANSOUR, K.P., SLATTERY, R.M., Review article, Clinical Science (2014).

4 Conclusão

A DM2 é uma das doenças crônicas que aumentam em proporções epidêmicas nos EUA e em todo o mundo. As complicações decorrentes da doença são as principais causas de morbidade e mortalidade, e estão associados com o dano e a falhas de alguns órgãos como os rins, os olhos e os nervos. Estes indivíduos também têm uma maior probabilidade de desenvolver acidente vascular cerebral, hipertensão, dislipidemia e doença vascular periférica.

Devido a todas estas razões, a prevenção da diabetes é alvo de estudo e de vários ensaios clínicos.

Atualmente, o melhor modelo animal para o estudo do desenvolvimento da doença é o *NOD (non-obese diabetic) mouse* pois desenvolve a doença espontaneamente e partilha características genéticas e imunopatagênicas com o humano portador da *Diabetes Mellitus Tipo 1*. *NOD mouse* tem sido extensivamente estudado e deu a maior fonte de informação da doença. Como demonstra semelhanças na genética e nos mecanismos autoimunes com os humanos, o entendimento destes mecanismos levou a ciência a uma série de caminhos terapêuticos atualmente testados.

Os ensaios de modulação imunes antigénio-específica em *NOD mice*, que envolvem a insulina foram bem sucedidos. No entanto, nenhum dos testes em humanos (crianças) têm demonstrado eficácia significativa. As explicações propostas para o fracasso destes estudos incluem o facto de a via de administração ser ineficaz e a dose inadequada induzir tolerância. Em alternativa, poderá existir uma estudo apenas para os indivíduos em risco antes do desenvolvimento das células T e A Abs.

As combinações terapêuticas que inibem ativação das células T e melhoram a sua tolerância foram bem sucedidas em *NOD mice*.

O trabalho e o interesse atualmente existente nesta área levará a resultados ainda mais consistentes de investigação científica na área da diabetes tipo 2, o que se prevê que possam vir a melhorar consideravelmente a prevenção e o tratamento desta doença.

5 Referências Bibliográficas:

- 1) KASPER, D.L., FAUCI A.S., LONGO, D.L., BRAUNWALD, E., HAUSER, S.L., JAMESON J.L.- **Harrison Medicina Interna**, Mc Graw Hill, 16ªed, Vol. II (2006) 2260-2269.
- 2) CALDEIRA, J., PARREIRA, J., SAGREIRA, L., ANDRÉ, O., LISBOA, M., LISBOA, P., MARTINS, J., **Tópicos sobre diabetes**. 14ª Edição (2009) 9-31.
- 3) **Atualização em Endocrinologia**, ed. Portuguesa do volume 5, Advanced Studies in Medicine Johns Hopkins- University School of Medicine (2008) 37-59.
- 4) ALVES, M., ARTEIRO, C., BOAVIDA, J.M., CARRILHO, F., CARVALHO, D., BRAGA, D.C., CORREIA, F., DIAS, T., DUARTE, R., RAPOSO, J.F., FREITAS, P., TELES, A., CORREIA, L.G., NAGALHÃES, A., SILVA, P.M., MATOS, P., MEDINA, J.L., NEVES, C., VARELA, A., **Diabetomecum**, (2008) 1-50.
- 5) **Prevention or Delay of Type 2 Diabetes-** *American Diabetes Association National Institute of Diabetes And Digestive And Kidney Diseases, Diabetes care*, volume27, suplemento I, (2004)47-54.
- 6) **Advances in understanding of the pathophysiology of Type I diabetes: lessons from the NOD mouse**, JAYASIMHAN, A., MANSOUR, K.P., SLATTERY, R.M., Review article, *Clinical Science* (2014) 126-143.