

# PREVENÇÃO DA DIABETES MELLITUS INSULINO-DEPENDENTE

M. MARGARIDA LOUREIRO, RUI DUARTE, JOSÉ M. BOAVIDA, PEDRO E. LISBOA

Serviço de Endocrinologia do I.P.O.F.G. de Lisboa  
Serviço de Medicina IV do Hospital Santa Maria. Lisboa

## RESUMO

O facto de existirem marcadores capazes de identificarem os indivíduos susceptíveis anos antes das primeiras manifestações clínicas conduziu à tentativa da prevenção da diabetes mellitus insulino-dependente. Esta é uma doença auto-imune com uma base genética fortemente associada com os alelos DR3 e DR4 da classe II. Refere-se a importância dos anticorpos anti-células dos ilhéus pancreáticos, (ICA) anti-insulina (IAA) e anti-GAD na patogenia e rastreio da diabetes. Faz-se também referência aos marcadores de reserva funcional. Por exemplo, a medição da secreção de insulina na primeira fase (dose segregada nos primeiros minutos após um estímulo de glicose) oferece um marcador e preditor sensível, do grau de progressão para diabetes. Várias têm sido as tentativas da prevenção da diabetes mellitus insulino-dependente desde imunossuppressores generalizados, agentes anti-inflamatórios, imunomoduladores não específicos e destruidores de radicais livres. A sua toxicidade interrompeu os estudos com a azatioprina e a ciclosporina. Outros apenas são, por enquanto, usados no campo da experimentação animal. Outros ainda, como os anticorpos monoclonais, altamente específicos, cuja utilização ainda está longe dos estudos de intervenção em larga escala. Os candidatos actuais são: a nicotinamida e a insulina (oral, subcutânea e endovenosa) estando planeados 2 estudos multicêntricos, em larga escala. Um na Europa - ENDIT - (European Nicotinamida Diabetes Intervention Trial) e outro nos EUA (Diabetes Prevention Trial) já em plena actividade, em que se irão testar os benefícios, em indivíduos susceptíveis, da terapêutica profilática com insulina.

## SUMMARY

### Prevention of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus

At the present time, there are markers which we can use to identify individuals with a high susceptibility of developing insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) years before the onset of the disease. Insulin-dependent diabetes mellitus is an autoimmune disease strongly associated with HLA antigens DR3 and DR4. In this manuscript, we discuss the usefulness of several markers, such as islet cell antibodies, insulin autoantibodies and glutamic acid decarboxylase antibodies, to identify individuals with a high susceptibility to IDDM before the disease is clinically evident. Monitoring first phase insulin release during intravenous glucose administration is a useful index of residual beta cell function that can be used to detect individuals who are close to insulin dependence. Several drugs have been used to prevent the development of IDDM. These include immunodepressors, anti-inflammatory agents, non-specific immunomodulators and free radical scavengers. Due to their toxicity, studies employing azathioprine and cyclosporin were discontinued. Other agents, such as tetrandrin and lymphotoxin, are now restricted to non-human trials. Currently, two large-scale multicentric human trials, one in Europe using nicotinamide (European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial, ENDIT) and the other in the USA using insulin (Diabetes Prevention Trial), are now in full activity and will test the benefits of these drugs in the prophylaxis of IDDM in highly susceptible individuals.

## INTRODUÇÃO

A diabetes mellitus insulino-dependente (IDDM) é uma doença auto-ímnica podendo a agressão das células ser detectada anos antes do início clínico da doença. Determinações de autoanticorpos específicos e testes de estimulação podem identificar os parentes em 1º grau de doentes com IDDM nos quais o risco de diabetes é superior a 90% em 5 anos.<sup>1,2</sup>

Provocando uma elevada morbidade e diminuição da esperança de vida, sendo já uma das doenças crónicas mais comum da infância e adolescência, justifica-se todo o empenho na sua prevenção.

Neste artigo propomo-nos fazer uma revisão dos vários agentes que têm vindo a ser usados com esse fim; no entanto para podermos definir uma estratégia preventiva temos de ter alguma noção da sua etiopatogenia. Assim faremos uma breve referência aos vários elementos implicados como factores etiológicos bem como à patogénese da doença.

## ETIOPATOGENIA

Factores genéticos e ambientais interactuam e causam a diabetes insulino-dependente.

### I - FACTORES GENÉTICOS

A maior parte da susceptibilidade genética está associada com genes do complexo de histocompatibilidade major (MHC) no braço curto do cromossoma 6.

Foi nos anos setenta que se começou a descobrir a associação entre HLA e IDDM quando se verificou que os doentes com diabetes eram mais frequentemente positivos para os antigénios HLA-B8 e B15 do que os controlos não diabéticos.<sup>3</sup>

Com a descoberta das moléculas da classe II tornaram-se aparentes associações entre antigénios no locus DR e IDDM. Verificou-se que 95% dos diabéticos são DR3 ou DR4 ou DR3/DR4 ao passo que apenas 40-50% da população caucasiana tem estas moléculas.<sup>4</sup> Constatou-se também que o risco relativo de contrair a doença é muito maior entre os heterozigóticos DR3/DR4 do que entre os homozigóticos DR3 ou DR4.<sup>5</sup>

Com os avanços na biologia molecular estes estudos foram conduzidos ao nível do DNA. Foi assim possível observar associações com o locus DQ que pareceram ainda mais fortes do que com o locus DR.

Quando o aminoácido na posição 57 da cadeia DQ é outro que não o ácido aspártico (não asp. 57) há uma grande susceptibilidade para a diabetes enquanto que o ácido aspártico nesta posição parece conferir resistência para a doença pois 95% dos diabéticos são homozigóticos para não-asp. ao passo que apenas 19,5% dos controlos o são.<sup>6</sup> A doença é também mais frequente quando o aminoácido na posição 52 da cadeia DQ, é a arginina. A presença na célula deste heterodímero DQ poderá ser um substracto genético que forneça susceptibilidade para a doença.<sup>7</sup>

A associação incompleta entre não asp e IDDM sugere que outros factores (genéticos ou ambientais) também contribuem para o aparecimento da doença.

## ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS

O exame histológico do pâncreas em doentes com início recente da doença revelou insulite na sua maioria mas com uma distribuição bastante heterogéneo. Alguns lóbulos pancreáticos são preferencialmente atingidos sendo outros poupados na sua totalidade, ou em parte. Macrófagos, linfócitos T helper e T citotóxicos estão presentes, formando um infiltrado mononuclear, à volta dos ilhéus de diabéticos recentemente diagnosticados sugerindo que eles são de primordial importância na destruição das células beta.

Foulis et al verificaram que o pâncreas de doentes com IDDM hiperexpressavam moléculas HLA classe I.<sup>8</sup> Bottazzo e colegas descreveram a presença de alfa-interferon na grande maioria dessas células (93%) enquanto que apenas 0,4% das células normais o produzem.<sup>9</sup>

Mais tarde também se verificou que os doentes com tiroidite auto-ímnica exprimiam moléculas HLA classe II nas células foliculares tiroideias o que não sucede em indivíduos normais.

Uma vez despertado o processo de destruição ímnica, respostas ímnicas secundárias e terciárias são também iniciadas. As citocinas produzidas, poderão mediar estas lesões das células. Estas incluem o alfa interferon, a interleucina 1 (IL-1) que tem mostrado, *in vitro*, ser selectivamente tóxica para as células beta e o factor de necrose tumoral (TNF) o qual potencia os efeitos da IL-1.<sup>9</sup>

### a) Celular

Em doentes diabéticos estão também descritas alterações na quantidade relativa de linfócitos. Indivíduos com diabetes recém diagnosticada têm um número aumentado de linfócitos T activados circulantes sendo a maioria destas células CD4+. O número de células CD8+, consoante os estudos, tem sido descrito como normal, aumentado ou diminuído em relação às pessoas normais.

Outros estudos demonstraram que antes do início clínico da diabetes as células CD4+ estavam diminuídas e as CD8+ normais ou aumentadas com a resultante diminuição do ratio CD4+/CD8+ que também se encontra noutras doenças autoímnicas.<sup>10</sup>

Os linfócitos de diabéticos insulino dependentes podem ser citotóxicos *in vitro* relativamente a vários antigénios das células pancreáticas.<sup>11</sup>

### b) Humoral

O ataque das células beta parece ser um processo lento. As alterações ímnicas humorais associadas foram detectadas mais de 15 anos antes da doença clínica. Continua por saber se é um processo lento contínuo ou se é um processo intermitente e se uma vez iniciado alguma vez regride completamente.

## ANTICORPOS ANTI-CÉLULAS DOS ILHÉUS PANCREÁTICOS (ICA)

O aparecimento de anticorpos circulantes contra o citoplasma das células dos ilhéus (ICA) antes do início clínico da IDDM em doentes com outras doenças auto-ímnicas

nes foi a 1ª alteração imune *pré-diabética* identificada.

Estes anticorpos podem ser encontrados anos antes do início clínico da doença e é este facto que formou a base do conceito do longo pródromo da IDDM embora não seja possível prever quando, e se, o indivíduo que os tem, ficará diabético insulino-dependente.

Estes anticorpos estão presentes no soro de diabéticos recentemente diagnosticados sendo detectáveis no soro na altura do diagnóstico em cerca de 87%, caindo para cerca de 30% 5 anos após o diagnóstico.<sup>12</sup> São imunoglobulinas IgG capazes de reagir com o citoplasma de todas as células dos ilhéus e não exclusivamente com as células.

O estudo de Bart's-Windsor seguiu as famílias de 208 indivíduos com IDDM num total de mais de 4000<sup>13</sup>. Durante 10 anos de *follow-up* 16 indivíduos ficaram diabéticos.<sup>13</sup> De acordo com este estudo o valor preditivo de ICA para o aparecimento de IDDM dentro de 10 anos varia de 100% (80 Unidades Juvenil Diabetes Federation) a 40% para valores positivos mais baixos, (4 Unidades J.D.F.) e a sensibilidade varia de 31% (80 Unidades J.D.F.) a 88% (4 Unidades J.D.F.)<sup>14</sup>. Se os indivíduos forem classificados de acordo com o pico de ICA detectado durante o *follow-up*, a análise de tabelas de vida mostra que o risco aumenta com títulos de ICA mais elevados. Os indivíduos com valores de ICA a subir parecem estar mais longe da diabetes clínica do que aqueles que atingiram o pico ou após este.

Embora seja provável que desempenham um papel activo na destruição das células beta, a sua importância relativa a outros factores não é conhecida. Não foi ainda possível, por exemplo, transferir diabetes para animais experimentais pela injeção de anticorpos. Além disso eles ligam-se a todas as células dos ilhéus indiscriminadamente enquanto que o processo destrutivo é específico das células beta.

#### ANTICORPOS ANTI-INSULINA ( IAA )

Foram pela 1ª vez descritos em IDDM recentemente diagnosticados antes de iniciarem tratamento com insulina.

Diferentes estudos usando RIA ou ELISA mostraram que os IAA são preditivos de IDDM em estudos familiares, nomeadamente em gémeos. A questão principal é determinar se têm um papel preditivo independente e se superior ou inferior ao dos ICA's.

Os vários estudos efectuados mostraram que ICA e IAA tendem a ocorrer no mesmo indivíduo e que estes são mais prevalentes nos que têm altos títulos de ICA.

No estudo de Bart's-Windsor a sensibilidade e a especificidade de ICA superior 4 JDF com IAA positivo é semelhante a ICA > 20 JDF.

Há uma correlação negativa entre IAA e a idade de diagnóstico nos diabéticos recentemente diagnosticados, o que sugere que estes anticorpos poderiam aparecer cedo na vida de indivíduos susceptíveis à IDDM e desaparecer igualmente cedo.

#### ANTICORPOS ANTI-DESCARBOXILASE DO ÁCIDO GLUTÂMICO (GAD)

Os anticorpos contra o antigénio 64K da célula do ilhéu, são chamados anticorpos anti-GAD, uma vez que

se identificou a proteína 64K como sendo a enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD). Esta enzima existe em duas isoformas codificadas por dois genes distintos: GAD 65 ou GAD I, com 585 a.a. e GAD 67 ou GAD II formada por 594 a.a.

Enquanto que no rato ambas as isoformas estão presentes nos neurónios e células dos ilhéus, nos humanos, parece que apenas a GAD 65 é expressa nas células, sendo portanto importante como autoantigénio.

Num estudo efectuado recentemente em 32 indivíduos pré-diabéticos que eram ICA positivos, 2 a 48 meses antes do início clínico da diabetes, verificou-se que 78% eram anti-GAD positivos mas se a população de estudo fosse dividida em 2 grupos (pré e pós adolescente quando do início clínico da diabetes) esta percentagem subia no grupo pós adolescente. Os IAA eram positivos em 72% (grupo total) subindo se se considerasse apenas o grupo pré adolescente. Anticorpos anti-GAD e IAA foram detectados em 56% dos 28 testados para os 2 tipos de anticorpos.<sup>15</sup>

Estes anticorpos parecem também ser altamente preditivos de diabetes estando vários estudos prospectivos em curso.

#### MARCADORES DA RESERVA FUNCIONAL DA CÉLULA BETA

Os anticorpos ICA, IAA, anti-GAD constituem marcadores sensíveis na identificação das pessoas cujas células pancreáticas estão a ser *atacadas* mas não dão nenhuma indicação sobre a extensão do processo.

##### a) Intolerância à glucose

Um início lento de IDDM com hiperglicemia progressiva ou intermitente durante vários meses foi encontrada em membros familiares sob *follow-up* e um teste de tolerância à glucose oral de tolerância diminuída foi descrita mais de 10 anos antes do início de sintomas.<sup>16</sup>

Usando os resultados de parentes em 1º grau com ICA > 40 JDF o grupo de Joslin descobriu, uma subida progressiva nos valores de glicemia de jejum e aos 60 min no teste de tolerância à glucose intravenosa, durante os 18 meses anteriores ao aparecimento de diabetes.<sup>17</sup>

##### b) Secreção de insulina

A resposta de insulina a uma sobrecarga de glucose i.v. constitui a medida de função da célula beta mais largamente usada na predição de IDDM. Um progressivo declínio na 1ª fase de secreção de insulina antes da diabetes se *instalar* foi provado em estudos prospectivos familiares e de gémeos.<sup>18,19</sup>

A perda da 1ª fase de secreção de insulina é considerada altamente preditiva de IDDM eminente em indivíduos com ICA detectáveis.

O curto intervalo de tempo entre a perda da 1ª fase de secreção da insulina e a necessidade de insulina implica que a massa de célula é apenas um pouco maior do que na altura do diagnóstico. Parece assim que a vantagem de interferir nesta fase seja pequena. É necessário procurar marcadores metabólicos mais precoces.

### c) Potenciais marcadores metabólicos precoces

Exames específicos para proinsulina e seus derivados foram desenvolvidos e padrões alterados de secreção de proinsulina basal e estimulada foram encontrados nos grupos de alto risco.<sup>20</sup>

## II- FACTORES AMBIENCIAIS

A prevalência de IDDM na população em geral é de 0,3%, nos parentes em 1º grau de doentes diabéticos é de 3% e em gémeos homocigóticos entre 30-50%. A taxa de concordância tende a variar consoante o haplotipo DR sendo maior nos heterocigóticos DR3/DR4 mas nunca alcança os 100% que se esperava se a IDDM fosse apenas geneticamente determinada.

A incidência da diabetes varia muito com a área geográfica. Japoneses, chineses, indianos, índios americanos, esquimós, negros do sul da África e polinesianos têm uma incidência relativamente baixa. A maior incidência ocorre na Finlândia havendo também uma alta incidência em outros países da Escandinávia. Estas diferenças foram atribuídas a diferenças na frequência de genes HLA susceptíveis entre grupos raciais e países. No entanto outros trabalhos apontam para factores não genéticos. Por exemplo, um estudo efectuado em Montreal, revelou que as taxas de incidência de IDDM entre os franceses canadianos e os judeus vivendo em Montreal eram aproximadamente o dobro das obtidas em França e Israel, respectivamente. Embora não se possa excluir alguma contribuição da mistura genética tem que se admitir a contribuição da exposição ambiental para justificar o aumento de incidência de diabetes nos emigrantes franceses e judeus.

O *Eurodiab Study* identificou os casos novos de diabetes em indivíduos com menos de 15 anos de idade, entre 1989 e 1990, em 24 regiões na Europa e Israel, num total de 16,8 milhões de indivíduos. Na Sicília encontrou-se uma incidência semelhante à da Espanha e na Sardenha similar à da Escandinávia. Embora não tenha sido encontrado um gradiente norte-sul (como tem sido descrito noutros estudos), havendo mesmo uma alta incidência numa pequena parte de Itália, estes dados não permitem por si afastar a hipótese da existência de factores ambientais.<sup>21</sup>

Assim, embora a susceptibilidade genética seja evidentemente necessária para o desenvolvimento da IDDM, não é suficiente para causar a doença. Factores ambientais desconhecidos devem ter um papel importante na promoção da doença.

Factores apontando para uma etiologia ambiental:

### 1- ALIMENTAÇÃO

A importância da introdução precoce do leite de origem animal, na alimentação, tem sido descrita em vários estudos.

Em análise univariada a maioria dos anticorpos do leite de vaca estão associados com risco de IDDM.<sup>22</sup> Isto está em acordo com estudos prévios que mostraram que a introdução de produtos lácteos aumenta a incidência de diabetes em ratos Brio Breeding. (BB)

Num estudo realizado na Finlândia, verificou-se que as crianças diabéticas recentemente diagnosticadas, tinham altos títulos de anticorpos contra compostos do leite de vaca (proteína – albumina soro bovino (BSA) a maior parte dos quais dirigidos contra um péptido com 17 aminoácidos (ABBOS). Foi também identificado um antígeno do ilhéu – 69 ou ICA 69 – em que há várias porções com homologia molecular com a BSA. Surgiu assim a teoria de que, a exposição precoce ao leite de vaca (BSA) de crianças geneticamente susceptíveis, levaria à formação de células de memória sensíveis a porções da BSA, originando-se uma reacção cruzada com eventual destruição das células.

Em estudos mais recentes foi no entanto posta a hipótese de que, a existência de anticorpos anti-BSA apenas traduz uma alteração no sistema de tolerância imunitária significando uma predisposição a doenças auto-imunes.

Outros trabalhos apontam mais para o papel da sobrecarga ponderal – *Um ganho de peso precoce parece ser um factor de risco para o desenvolvimento de IDDM. O menor ganho de peso nas crianças amamentadas ao peito pode explicar o efeito protector da amamentação contra a IDDM observada em vários estudos.*<sup>23</sup>

### 2- VIROSES

Verifica-se a existência duma relação temporal entre o início de certas infecções virais (rubéola, papeira, Cox-sackie B, citomegalovirus, Epstein-Barr, retrovirus) e o aparecimento de novos casos de IDDM ou seja, existem picos estacionais de incidência de diabetes que coincidem com picos na incidência de infecções virais (Outono e Inverno).

Anticorpos virais em títulos crescentes, têm sido encontrados no soro de diabéticos de início recente. O vírus da papeira parece ter capacidade de infectar as células beta em cultura e aumentar a quantidade de moléculas HLA classe II em células beta infectadas.

*A eliminação da papeira pela vacinação, pode ter diminuído o risco de IDDM na Finlândia; uma possível relação causal é consubstanciada pela concomitante redução de anticorpos antivírus da papeira nas crianças diabéticas.*<sup>24</sup>

No entanto, se há de facto um longo período pré diabético na maioria dos casos de IDDM, isto parece ser difícil de conciliar com a teoria duma infecção viral ocorrendo pouco tempo antes do início da diabetes clínica.

### PREVENÇÃO

Como dissemos, no início, para prevenir uma doença temos de conhecer a(s) sua(s) etiologia(s) e os factores de risco a ela associados.

Identificamos o indivíduo susceptível e em seguida procuramos impedir o aparecimento da doença, evitando a acção sobre ele, dos factores de risco conhecidos.

### IMUNOTERAPIA

Atendendo à natureza ímune da destruição da célula parece lógico que se tente travar o processo de doença

por uma intervenção também ela de natureza ímune. Pode-se intervir a 2 níveis: nos diabéticos recém diagnosticados, no sentido de se tentar preservar alguma função pancreática residual; nos *pré-diabéticos* para se tentar prevenir a doença clínica.

#### a) Azatioprina

É um antagonista das purinas que previne a geração de linfócitos T citotóxicos e de células Natural Killer (N.K.)

Têm sido efectuados vários estudos em diabéticos quer usando a azatioprina isoladamente, quer associando-a a glucocorticoides, os quais sequestram as células T maduras e interferem com a secreção de citoquinas.

Nos estudos efectuados verificou-se que os indivíduos imunossuprimidos necessitaram de menores doses de insulina. No entanto os resultados dos exames efectuados têm sido contraditórios e difíceis de interpretar.<sup>25</sup>

Na prática clínica ninguém a usa, por causa dos seus efeitos secundários.

#### b) Ciclosporina A

Potente droga imunossupressora que actua selectivamente nos linfócitos T (helper e citotóxicos) inibindo a actividade dependente da interleucina (IL)2, o factor de activação dos macrófagos, provocando uma supressão da imunidade celular.

Há vários estudos em diabéticos recentemente diagnosticados. Um grupo francês demonstrou que a ciclosporina era capaz de aumentar a frequência e duração das remissões da insulino dependência, numa população de adultos não seleccionada, com diabetes tipo 1 de início recente.<sup>26</sup>

Numa análise retrospectiva dos doentes verificou-se que era particularmente útil se administrada nas primeiras 4 semanas do diagnóstico, em doentes com sintomas moderados, menor perda de peso e menor frequência de cetoacidose. Os anticorpos anti-insulina e anti-ilhéus e o fenotipo HLA não eram preditivos da resposta à ciclosporina. A ausência de correlação de características genéticas ou imunológicas com indução de remissão sugere que todas as crianças com diabetes podem responder à droga se esta for administrada precocemente.<sup>26</sup>

Nestes vários estudos verificou-se que a ciclosporina tem um efeito protector da função da célula. Estes resultados são temporários quer se suspenda ou mantenha a terapêutica. Nos que recidivaram e que fizeram provas de estimulação do peptido C, não foram encontrados níveis mais baixos como seria de esperar.

Uma das preocupações no seu uso são as acções acessórias, reversíveis ou não. Hiperplasia gengival, alopecia, hipertricose e talvez o mais importante: a nefrotoxicidade. Embora por vezes reversível, uma nefrite intersticial crónica, dose dependente, pode ocorrer. Não estamos pois, perante uma droga que se deva utilizar como arma de primeira linha na prevenção da diabetes. Tem no entanto um papel importante nos indivíduos transplantados.

Estudos em doentes que receberam transplantes pancreáticos indicam que o processo auto-ímune pode ser reactivado várias décadas após o início da diabetes logo que se suspende a imunossupressão. Isto sugere que a

imunossupressão para tratamento da IDDM deve ser mantida indefinidamente para manter a remissão.

Novos agentes imunossupressores estão em estudo:

Ciclosporina G – análogo da ciclosporina A mas sem efeito nefrotóxico

Pentoxifilina – inibidor de citoquinas

Ketotifeno – potente agente anti-inflamatório e anti-histamínico usado em estudos em pré-diabéticos.

FK 505 – potente agente com acção imunossupressiva cujo mecanismo de acção é semelhante ao da ciclosporina A. Previne o desenvolvimento de diabetes em ratos BB e NOD. Nos EUA está a ser testado, em doentes com diabetes recentemente diagnosticada.

**c) Vacina com linfócitos** – esta vacina composta de linfócitos isolados de baços de ratos NOD diabéticos torna-se imunogénica pelo tratamento com glutaraldeído foi usada para vacinar ratos. A percentagem de ratos permanecendo não diabéticos era de 50% no grupo vacinado com linfócitos T comparativamente a 20% no grupo não vacinado ( $p < 0,05$ ). Aparentemente é segura e a sua eficácia indica que pode ter valor na fase pré-diabética em seres humanos.<sup>27</sup>

#### d) Experiências em animais :

1 – A adesão de leucócitos à superfície endotelial de vénulas dos ilhéus pancreáticos parece ser um dos passos iniciais no desenvolvimento de IDDM. Essa adesão parece envolver vários receptores: L-selectina e VLA-4 . Bloqueando estes receptores com anticorpos monoclonais específicos inibe-se a insulite prevenindo-se assim a diabetes no rato. Pensa-se que os receptores L-selectina e VLA-4 intervêm como mediadores na união dos leucócitos aos ilhéus e que a intervenção a este nível poderá fornecer uma nova abordagem no tratamento de doenças auto-ímmunes como a IDDM.

2 – A administração prolongada de tetrandrina (um novo agente anti-inflamatório) a ratos BB reduziu a incidência cumulativa de diabetes de 73% para 41%. Se associarmos o potente agente imunossupressor FK506 a incidência de diabetes baixa para apenas 3,6%. Sugere-se que a associação tetrandrina+FK506 poderá constituir uma hipótese terapêutica para doentes com diabetes emite ou recentemente declarada.

3 – Linfotóxina, uma citoquina com características morfológicas e funcionais semelhantes ao TNF protege ratos NOD de diabetes.

4 – Anticorpos anti CD3, CD5 – usados para impedir a rejeição aguda de enxertos mas com uso limitado em doenças imunológicas como a diabetes pelas acções acessórias.

5 – Anticorpos monoclonais contra o receptor da IL2 - altamente específicos, mas ainda longe da possibilidade da sua utilização nos estudos de intervenção em larga escala.

6 – Imunoestimulação com IL1 e/ou IL2, -TNF e tuberculina no adjuvante incompleto de Freund – protege de diabetes ratos NOD e porque o defeito da célula T subjacente é similar em humanos poderá ter utilidade potencial.<sup>28</sup>

## MANIPULAÇÃO DIETÉTICA

A importância da alimentação na indução da diabetes é uma ideia já com muitos anos. Desde a diminuição na incidência de diabetes observada em situações de guerra, (em que há diminuição do fornecimento de alimentos) passando pelos estudos efectuados por Maclaren et al (importância do leite e das proteínas dos cereais e redução da ocorrência de diabetes substituindo a caseína por caseína hidrolizada).

Os resultados de um estudo recente na Finlândia sugerem que a amamentação prolongada pode proteger da IDDM.

Na Escandinávia está a efectuar-se um estudo envolvendo 3000-4000 crianças com parentes em 1º grau com IDDM, em que o grupo de teste não terá leite de vaca durante os primeiros nove meses de vida e terão um *follow-up* de 10 anos. (Hakerblom and H. M. Dosch - comunicação pessoal)

## AGENTES MICROBIANOS

Durante algum tempo agentes microbianos foram implicados na etiologia de doenças auto-ímmunes incluindo IDDM. Estudos recentes, no entanto, revelaram que a exposição precoce, a certos micróbios, de animais geneticamente susceptíveis a diabetes, prevenia a indução e progressão da doença. Isto sugere que agentes infecciosos podem modular o status imunológico dum indivíduo geneticamente susceptibilizado para a IDDM. Imunização com agentes microbianos numa fase precoce pode oferecer uma nova perspectiva na imunoterapia da IDDM.<sup>25</sup>

## ANTIOXIDANTES

Se a produção de radicais livres de oxigénio (anião superóxido, peróxido de hidrogénio, radicais hidroxil) e ou óxido nítrico em quantidade superior à de antioxidantes lesa a célula levando à sua morte, é de esperar que o uso de antioxidantes ou inibidores da sintetase do óxido nítrico, tenham uma acção benéfica. Peroxidase do glutation, vitamina E, superóxido dismutase, aminoguanidina (inibidora da sintetase do óxido nítrico) e nicotinamida têm sido usados em vários estudos.

### a) MDL 29,311 (4,4 metilenobis(tio)bis (1,1dimetiletil) fenol)

Um análogo do antioxidante probucol, administrado a ratas diabéticas não obesas reduz a prevalência de diabetes de 49 para 4%. A interrupção às 24 semanas não resulta num súbito início de diabetes. O probucol não previne IDDM. Noutro modelo de diabetes – após injeção de estreptozocina – o MDL também diminui a prevalência de diabetes.<sup>29</sup>

### b) Nicotinamida

É uma vitamina hidrosolúvel (B3) derivada do ácido nicotínico.

O ácido nicotínico e a nicotinamida têm sido usados no tratamento de psoríase, esquizofrenia, doença arterial coronária e necrobiose lipóidica.

Em estudos em animais com diabetes espontânea ou provocada a nicotinamida consegue: diminuir a lesão da célula, melhorar a sua regeneração, aumentar a síntese de insulina e prevenir ou atrasar a diabetes clínica (se administrada antes do início da doença).

Tem sido usada em doses de 3-12 g/dia durante anos e as acções acessórias descritas nestas doses são: rash, eritema facial, urticária, náuseas, vômitos, cefaleias, fadiga e cabelo seco. Está descrito um caso de toxicidade hepática num doente tratado com 9 gr/dia, e que foi reversível após suspensão da droga.

Trata-se assim duma substância sem acções acessórias deletérias (aparentemente) nas doses propostas.

A exposição prolongada, *in vitro*, a altas doses de glucose diminui a sensibilidade das células pancreáticas à estimulação pela glucose, mas se juntarmos nicotinamida, a célula recupera a capacidade de secreção de insulina. A nicotinamida parece proteger a célula da dessensibilização.

Foram propostos dois mecanismos de acção:

1 – Durante a agressão imunológica das células os macrófagos libertam radicais de oxigénio e citoquinas que causam fragmentação do DNA. A enzima polissintetase (ADP-ribose) ao reparar o DNA usa NAD o que leva à sua depleção intracelular. O NAD é usado como antioxidante no sistema glutation/ NADP e ac. ascórbico/ NAD.

A nicotinamida ao inibir a sintetase protege a célula da depleção de NAD prevenindo a sua disfunção e morte. Por outro lado pode também actuar directamente como antioxidante.

2 – Provavelmente diminui a apresentação pelas células de autoantigénios às células T helper.

Vários estudos foram já efectuados quer em diabéticos quer em indivíduos com prédiabetes. Num 1º ensaio efectuado pelo grupo de Marselha, (com 16 doentes, 7 dos quais com diabetes recentemente diagnosticada) o efeito benéfico foi sugerido pela capacidade de parar a insulina, mantendo-se o equilíbrio metabólico. Um 2º estudo, executado pelo mesmo grupo, com 26 doentes entre 15-40 anos, fazendo tratamento com insulina desde há 1-5 anos mas ainda com secreção residual desta. A dose de nicotinamida foi de 3 g/dia. A nicotinamida preservou a função da célula e esteve associada a menores necessidades de insulina com melhor controlo metabólico. Não houve efeitos colaterais.<sup>30</sup>

O grupo cooperativo New Zealand e Denver fez um estudo em 14 crianças (1-16 anos) com prédiabetes e 8 controlos. Os critérios de selecção foram: idade inferior a 16 anos, ICA superior a 80 J.D.F., primeira fase de secreção de insulina (FPIR) < 5º percentil. A dose máxima de nicotinamida foi de 3g/dia. Ao fim de 1 ano, no grupo controlo 4 (em 8) ficaram diabéticos. no grupo tratado, 0 (em 9). Ao fim de 2 anos no grupo controlo, 7 (em 8) estavam diabéticos. No grupo que recebeu nicotinamida continuava a não haver nenhum diabético. Ao fim de 30 meses todos os controlos<sup>8</sup> estavam diabéticos, no grupo tratado apenas 1 diabético. Portanto no grupo não tratado todos os 8 elementos ficaram diabéticos e 1 de 14 no grupo tratado ( $p < 0,00004$ ).<sup>31</sup>

Se a nicotinamida for administrada a indivíduos já com FPIR muito baixos (<27mU/L) já não é protectora contra o desenvolvimento de diabetes. Isto aliás não é surpreendente pois se a nicotinamida protege as células alvo que estão sob ataque autoimune deverá ser utilizada quando ainda estão presentes um nº suficiente de células; isto é nos estadios precoces da diabetes. Assim e atendendo à aparente inocuidade da droga parece ser ideal para se usar em indivíduos pré-diabéticos.

Estão a ser criados vários estudos colaborativos multicêntricos para testar a sua eficácia em indivíduos de alto risco. Um deles é o European Nicotinamide Diabetes Intervention (ENDIT) coordenado por Edwin Gale no Bartholomew's Hospital, em Londres e que está temporariamente suspenso.

Trata-se dum estudo multinacional internacional com controlo placebo que se destina a verificar a utilidade ou não da nicotinamida na prevenção ou atraso da apresentação clínica da diabetes mellitus insulino dependente em indivíduos em alto risco para a doença. Rastrear-se-ão cerca de 22000 familiares em primeiro grau de doentes com diabetes mellitus insulino-dependente. Os indivíduos seleccionados serão tratados com nicotinamida ou placebo durante cinco anos. É um dos primeiros e maiores ensaios em indivíduos em alto risco a

## INSULINA

*In vitro* as células mais activas produzem mais insulina e são mais susceptíveis a ataques imunes incluindo acções citotóxicas de citoquinas, do que as células menos activas. Tal sugere que pondo – as em repouso se pode alterar a sua susceptibilidade à destruição.

Foi baseado nestes estudos que Gotfredsen et al.<sup>32</sup> fizeram a primeira experiência usando insulina profilática em ratos BB. Reduziram a incidência de diabetes de 44% para 22%. Noutra estudo iniciando a terapêutica mais precocemente conseguiram baixar a incidência ainda mais de 56% para 2%.<sup>33</sup>

Vários mecanismos de acção têm sido propostos:

1 – A insulina actuaria nas células colocando-as em repouso e portanto diminuindo a sua expressão antigénica ou tornando-a menos susceptível à acção de interleucinas.

2 – Como imunossupressor – embora haja estudos apoiando esta acção, outras experiências tornam-na menos provável. (por ex.: a terapêutica com insulina previne diabetes mas não tiroidite em ratos BB).

3 – Tornando o sistema imune mais tolerante, ao estimular os linfócitos T supressores.

Como dado a favor desta hipótese temos a diminuição da incidência de diabetes em ratos NOD após administração de insulina oral ( processamento no sistema imune do intestino?).

Um dos receios da aplicação destes estudos em seres humanos foi o receio do possível efeito diabetogénico da insulina. No entanto num estudo recente Bock et al (1992) observaram 481 doentes que tinham sofrido tratamentos de choque com insulina por motivos psiquiátricos. Os resultados obtidos não foram diferentes dos esperados na população em geral. Assim estes doentes tinham

recebido injeções intramusculares (59±29) de insulina de origem mista (bovina/porcina) na quantidade de 78±28 unidades. Os doentes foram estudados durante uma média de 22 anos. Em 27 deles foram feitas determinações de ICA, IAA e glicemia de jejum. Nenhum ICA positivo e apenas 2 IAA positivos provavelmente por formação de anticorpos contra a insulina administrada. Durante este período apenas um se tornou diabético insulino dependente (o que está de acordo com a taxa esperada na população em geral).<sup>34</sup>

Começaram já os primeiros estudos de terapêutica profilática com insulina, nomeadamente do Grupo de Joslin Diabetes Center.

Num primeiro estudo, aos parentes em 1º grau de doentes com IDDM com ICA e IAA positivos e diminuição da FPIR (indivíduos em alto risco) fez-se a administração de insulina i.v. durante 5 dias, na dose de 0,2 unid/Kg/dia seguida por insulina s.c. durante 2 dias. Resultados: os ICA permaneceram positivos, a FPIR aumentou drasticamente. Isto sugeriu que a perda da 1ª fase de secreção de insulina pode ser reversível em fases precoces da doença.

Usando os valores de IAA, ICA e a FPIR este grupo consegue identificar os familiares com um risco de 72% de desenvolver diabetes dentro de 3 anos e um risco superior a 90% em 4 anos. A estes indivíduos em alto risco, entre os 7 e os 40 anos foi oferecida terapêutica profilática com insulina. A proposta foi feita a 12 e 7 não aceitaram. Estes serviram como controlos. Todos os 7 controlos e um dos 5 tratados ficaram diabéticos em 2,2-3,3 anos de *follow-up*. Não houve diferença entre os 2 grupos nos valores de ICA, IAA e FPIR.<sup>35</sup>

Um outro estudo efectuado em Munique obteve resultados semelhantes.<sup>36</sup>

Neste momento prepara-se nos EUA um estudo em larga escala, contribuindo para a sua realização vários centros de investigação. É o Diabetes Prevention Trial cujo objectivo é determinar se uma intervenção precoce baseada em terapêutica antigénica ( insulina por via parentérica ou autoantigénios por via oral) a familiares não diabéticos de pessoas com IDDM, mas que tenham marcadores imunológicos de risco, poderá atrasar ou impedir o aparecimento de diabetes clínica. Serão feitos 2 grupos . A um, considerado de alto risco (probabilidade de 50% de desenvolver diabetes dentro de 5 anos) será feita profilaxia com insulina subcutânea. Ao outro considerado de risco intermédio, (probabilidade de 25 a 50% de diabetes em 5 anos) será oferecida insulina oral. O estudo terá a duração de 4 anos e serão observadas entre 60000 - 80000 pessoas.

## CONCLUSÕES

A possibilidade de se interferir, impedindo ou retardando o aparecimento duma doença, é aliciente. Quando essa doença tem consequências tão devastadoras como é o caso da diabetes, a sua prevenção parece ainda mais excitante.

Existem ainda, no entanto, problemas substanciais. Primeiro porque quase todos os estudos até agora realizados utilizaram apenas os familiares em primeiro grau. Ora a diabetes mellitus insulino-dependente é esporádica em

85-90% dos casos. Para podermos ter uma prevenção eficaz teríamos de rastrear a população em geral para detectarmos todos os casos de pré diabetes. Os custos inerentes a tal atitude tornam-na de momento, impraticável.

Os estudos de intervenção imunológica, em diabéticos recentemente diagnosticados, embora não tenham demonstrado de uma forma clara que o seu uso alterasse a evolução clínica permitiram pelo menos, comprovar a existência de mecanismos imunológicos na etiopatogenia da diabetes. Parece que nos indivíduos com diabetes clínica as terapêuticas imunológicas apenas prolongam a fase de lua de mel.

Dever-se-á assim intervir num estadio anterior ao da diabetes declarada, estadio esse em que ainda esteja presente um número significativo de células activas. Aqui se levanta o segundo problema: é que esta atitude intervencionista deve ser ponderada e avaliar os benefícios versus riscos de intervir numa população de indivíduos assintomáticos em que o único risco é a evolução possível, num tempo indefinido para diabetes clínica.

Assim qualquer intervenção terá de ser inofensiva. Tal não se tem verificado até à data para a maioria dos fármacos propostos.

Se a prevenção da diabetes parecia um sonho até à década de 70, quando se começou a elucidar sobre a etiologia da situação, hoje em dia começa a desenhar-se os seus contornos. Talvez dentro de 10 anos possamos ter um tratamento preventivo eficaz e sem riscos para todos aqueles que dele venham a necessitar.

A mais recente introdução do conceito de prevenção da IDDM com agentes antigénicos (insulina ou fragmentos antigénicos da sua molécula ou outras proteínas como por exemplo: GAD) poderá inclusivamente levar ao fabrico duma futura vacina para a diabetes tipo 1.

## BIBLIOGRAFIA

- ZIEGLER AG, ZIEGLER R, VARDI P, JACKSON RA, SOELDNER JS, EISENBARTH GS: Life table analysis of progression to diabetes of anti-insulin-autoantibody positive relatives of type 1 diabetics. *Diabetes* 1989; 38: 1320-1325
- TAM AC, THOMAS JM, DEAN BM, INGRAM D, SCHWARZ G, BOTTAZZO GF, GALE EM: Predicting insulin dependent diabetes. *Lancet* 1988; i: 845-850
- NERUP J, PLATZ P, ANDERSON O et al: HLA antigens and diabetes mellitus. *Lancet* 1974; ii: 864-867
- PICKUP J, WILLIAMS G: Cap.14 Genetics of insulin-dependent diabetes mellitus. *Text book of Diabetes* 1991; 113-21
- CUDWORTH A, WOLF E: The genetic susceptibility to type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Clin Endocrinol Metabol*, 1982; 11: 389-407
- MOREL PA, DORMAN JS, TODD JA, MCDEVITT HO, TRUCO M: Aspartic acid at position 57 of the HLA-DQ beta chain protects against Type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1988; 85: 8111-8116
- NEPOM BS, SCHWARTZ D, PALMER JP, NEPOM GP: Trans-complementation of HLA genes in IDDM; HLA-DQ alpha and beta chains produce hybrid molecules in DR / DR heterozygotes. *Diabetes* 1987; 36: 114-117
- FOULIS A: Histology of the islet in insulin-dependent diabetes mellitus. Cap. 13 Pickup J. Williams G. (eds) *Textbook of Diabetes* 1991: 107-112
- BONIFACIO E, BOTTAZZO GF: Immunology of I.D.D.M. (type 1 diabetes)- entering the 90's. Cap.2 Alberti K, Kroll (eds). *The Diabetes Annual/G*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers 1991; 20-47
- ANDREANI D, DI MARIO U, ROZZILLI P: Prediction, prevention, and early intervention in insulin-dependent diabetes. *Diabetes /Metabolism Reviews* 1991; 7: 61-77
- DE BERARDINIS P, LANDEI M, JAMES RFL et al: Do CD4-positive cytotoxic T cells damage islet beta cell in type 1 diabetes? *Lancet* 1988; ii: 823-4
- The DERI Study Group: the epidemiology and immunogenetics of IDDM in Italian-heritage populations. *Diabetes Metabolism Reviews*, 1990; 6: 63-69
- GORSUCH A N, DEAN B M, SPENCER K M, BOTTAZZO G F, CUDWORTH A G: Evidence for a long prediabetic period in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Lancet* 1981; 19/26: 1363-1365
- AH-CHUAN THAI, M B B S, M M E D, GEORGE S. EISENBARTH, MD, PD: Natural history of I D D M. *Diabetes Reviews*. Spring 1993; 1: 1
- ZIMMET P Z, ELLIOTT R B, MACKAY I R, TUOMI T, ROWLEY M J, PILCHER C C, KNOWLES W J: Autoantibodies to Glutamic Acid Decarboxylase and Insulin in Islet Cell Antibody Positive Presymptomatic Type 1 Diabetes Mellitus: Frequency and Segregation by Age and Gender. *Diabetic Medicine* 1994; 11(9): 866-871
- ROSENBLOOM AL, HUNT SS, ROSEBLOOM EK, MACLAREN NK: Ten-year prognosis of impaired glucose tolerance in siblings of patients with insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 1982; 31: 385-387
- ZIEGLER AG, HERSKOWITZ RD, JACKSON RA, SOELDNER JS, EISENBARTH GS: Predicting type 1 diabetes. *Diabetes Care* 1990; 13:762-775
- SRIKANTA S, GANDA OP, JACKSON RA et al: Type 1 diabetes mellitus in monozygotic twins: chronic progressive beta cell dysfunction. *Annals of Internal Medicine* 1983; 99: 320-326
- VIALETES B, MATTEI-ZEVACO C, BADIER C, RAMAHAN-DRIDONA G, LASSMAN-VAGUE V, VAGUE PH: Low acute insulin response to intravenous glucose. A sensitive but non-specific marker of early stages of Type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1988; 31: 592-596
- HEATON DA, MILLWARD BA, GRAY I: Increased proinsulin levels as an indicator of -cell dysfunction in non-diabetic twins of Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 1988; 3: 182-184
- The DERI Study Group: the epidemiology and immunogenetics of IDDM in Italian -heritage populations. *Diabetes Metab Rev* 1990; 6: 63-69
- VIRTANEN SM, SAUKKONEN T, SAVILAHTI E et al: *Diet, cow's milk protein antibodies and the risk of IDDM in Finnish children*. *Diabetologia* 1994; 37: 381-387
- JOHANSSON C, SAMUELSSON U, LUDVIGSSON J: *A high weight gain early in life is associated with an increased risk of Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus*. *Diabetologia* 1994; 37: 91-94
- AKERBLOM HK: *Childhood diabetes in Finland study group* *Diabetologia* 1993; 36: 1303-1308
- JANET SILVERSTEINS MD, NOEL MACLAREN MD et al: *Immunosuppression with azathioprine and prednisone in recent onset insulin-dependent Diabetes mellitus*. *N Engl J Med* 1988; 319: 599-604
- C BOITARD, J P GARDIN et al: *Factors associated with early remission of type 1 diabetes in children treated with ciclosporine*. *N Engl J Med* 1988; 318: 663-701
- NOEL K MACLAREN: *Diabetes Intervention Therapy*. *J Diab Comp* 1993; 7: 151-156
- SINGH-B, ROBINOVITCH-A: *Influence of microbial agents on the development and prevention of autoimmune diabetes*. *Autoimmunity*. 1993; 15(3): 209-213
- HEINEKE-EW, JOHNSON-MB, DILLBERGER-JE, ROBINSON-KM: *Diabetes* 1993; 42(12): 1721-30
- P VAGUE, R PICQ, M BERNAL, V LASSMANN: *Effect of nicotinamide treatment on the residual insulin secretion in Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients*. *Diabetologia* 1984; 32:316-321
- ELLIOTT R B, CHASE H P: *Prevention or delay of Type 1 (insulin dependent) diabetes mellitus in children using nicotinamide*. *Diabetologia* 1991; 34: 362-365
- GOTTFREDSEN CF, BUSCHARD K, FRANSEN EK: Reduction of diabetes incidence of BB Wistar rats by early prophylactic insulin treatment of diabetes-prone animals. *Diabetologia* 1985; 28: 933-935
- LIKE AA: Insulin injections prevent diabetes in Bio-Breeding/Worcester (BB-Wor) rats. Abstract. *Diabetes* 1986; 35(Suppl.): 74A
- BOCK T, PEDERSEN CR, JOSEFSEN K, BOTTAZZO GF, PALMER JP et al: No risk of diabetes after insulin-shock treatment. *Lancet* 1992; 339: 1504-1506
- KELLER RJ, EISENBARTH GS, JACKSON RA: Insulin prophylaxis in individuals at high risk of type 1 diabetes. *Lancet* 1993; 341: 927-928
- ZIEGLER AG, BACHMANN W, RABL W: Prophylactic Insulin Treatment in Relatives at High Risk for Type 1 Diabetes. *Diabetes /Metabolism Reviews* 1993; 9: 289-293