

Artigo Revisão

O Papel das Células T Reguladoras na Diabetes Mellitus Tipo 1



Margarida Vieira ^{a,*}, Celestino Neves ^{a,b}, João Sérgio Neves ^{a,b,c}, Davide Carvalho ^{a,b}

^a Faculdade de Medicina da Universidade do Porto / Universidade do Porto, Porto, Portugal

^b Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo / Centro Hospitalar Universitário São João, Porto, Portugal

^c Departamento de Cirurgia e Fisiologia, Unidade de Investigação Cardiovascular, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, Portugal

INFORMAÇÃO SOBRE O ARTIGO

Historial do artigo:

Received/ Recebido: 2020-04-08

Accepted/Aceite: 2020-07-12

Final: 2021-01-19

© Autor (es) (ou seu (s) empregador (es)) e Revista SPEDM 2020. Reutilização permitida de acordo com CC BY-NC. Nenhuma reutilização comercial.

© Author(s) (or their employer(s)) and SPEDM Journal 2020. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use.

Palavras-chave:

Diabetes Mellitus Tipo 1/immunologia;
Diabetes Mellitus Tipo 1/tratamento;
Linfócitos T Reguladores.

Keywords:

Diabetes Mellitus, Type 1/immunology;
Diabetes Mellitus, Type 1/therapy;
T-Lymphocytes, Regulatory.

R E S U M O

A diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune causada por um desequilíbrio entre as células T reguladoras (Treg), que controlam o mecanismo de tolerância imunológica, e os restantes subtipos de células T, que ao reagirem contra o próprio organismo levam à destruição das células beta dos ilhéus pancreáticos. A DM1 é uma das doenças crónicas mais comuns no mundo, com taxas de incidência e prevalência a aumentar a cada ano. Contudo, os tratamentos atualmente disponíveis para a DM1 não garantem a resolução da patologia, e por isso, atualmente, grande parte dos doentes evolui com o passar dos anos para complicações graves, o que aumenta a sua morbilidade e mortalidade.

A medicina tem caminhado cada vez mais no sentido de personalizar os tratamentos dirigidos a cada patologia, e os estudos na área das doenças autoimunes, em particular da DM1, não são exceção. Terapêuticas dirigidas às alterações celulares observadas em doentes diabéticos estão em constante estudo e evolução, nomeadamente com foco no reequilíbrio da função das células Treg. Estas células expressam marcadores à superfície que as distinguem estruturalmente de todas as outras e que são essenciais para a sua ação imunossupressora. Por esta razão são também chamadas células CD4+ CD25+ CD127- FOXP3+. Estudos focados no papel que cada um destes marcadores desempenha na função das células Treg e, conseqüentemente, na progressão da DM1, são abordados nesta revisão, assim como o seu potencial uso no tratamento desta doença. Uma outra área de investigação promissora é o isolamento e expansão *in vitro* de células Treg de doentes com DM1, com fatores que potenciam o seu crescimento e eficácia, seguidamente introduzidas na circulação do doente, com o intuito de aumentar o número de células Treg capazes de combater o desequilíbrio autoimune subjacente. Neste sentido, têm também surgido vários estudos na procura de antigénios que marquem especificamente as células Treg que atuam no pâncreas, de modo a tornar o tratamento o mais dirigido possível para o local da doença. As várias técnicas atualmente desenvolvidas nesta área, assim como futuras recomendações e limitações das mesmas serão discutidas neste trabalho.

The Role of Regulatory T Cells in Type 1 Diabetes

A B S T R A C T

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease caused by a shift from the balance of regulatory T cells (Tregs), that control immune tolerance and modulate the autoimmune response, and effector T cells, which become autoreactive, leading to massive destruction of the pancreatic islets beta cells. T1D is one of the most frequent chronic diseases in the world, with increasing incidence and prevalence ratios over the years. However, the treatments currently available for T1D do not cure the disease, causing a high prevalence of patients who still progress into severe complications and

* Autor Correspondente / Corresponding Author.

E-Mail: margarida_v_18@hotmail.com (Margarida Vieira)

Rua São João Batista n° 2097

4805-319 Ponte - Guimarães, Portugal

<https://doi.org/10.26497/ar200022>

1646-3439/© 2020 Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo. Publicado por Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

therefore having higher morbidity and mortality rates.

The medical area is evolving each day into personalized treatments, specific for every patient and for each disease. The papers on autoimmune diseases, namely T1D, show that this area is no exception. Therapies that target specific cellular changes in T1D patients are rapidly emerging, particularly focusing on restoring the imbalance caused by Tregs dysfunction. This group of cells express some cellular markers on the surface that distinguish them from the other cells of the immune system. According to that, they are also referred to as CD4+ CD25+ CD127- FOXP3+ cells. In this review, we examine the work of several authors on the role of these markers on Tregs function and thus, on T1D progression, as well as their potential as clinical treatments for this disease. A new promising area of investigation has emerged with the isolation and expansion of autologous Treg from T1D patients, using factors that enhance their growth and efficacy *in vitro*. They are then infused into the patients' bloodstream to increase the number of Tregs that can fight the underlying autoimmune imbalance of the body. Authors have also been working on identifying which antigens better help select the group of Tregs that act preferentially in the pancreatic islets, in order to obtain a more adapted and selective Treg treatment for T1D. The different techniques developed so far, as well as future recommendations and limitations from these studies will be addressed in this review.

Introdução

A diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune que resulta da destruição das células beta dos ilhéus pancreáticos por células T autorreativas, tendo por base fatores genéticos e ambientais.¹⁻³ Esta reação autoimune é causada por um desequilíbrio nas células T reguladoras (células Treg), que em situações fisiológicas controlam o mecanismo de tolerância imunológica, ao inibirem a ação de outras células do sistema imune contra o próprio organismo.^{1,4} É este desequilíbrio, em que há aumento de células autorreativas e diminuição das células Treg, que se pensa estar na base de várias doenças autoimunes. Por outro lado, um aumento descontrolado de células Treg pode levar ao aparecimento de tumores, por supressão da resposta imune antitumoral fisiológica do organismo.⁵

Sabe-se que a DM1 é uma das doenças crónicas mais comuns no mundo, com taxas de incidência e prevalência a aumentar a cada ano.^{2,4} Não obstante todos os avanços até hoje realizados nos tratamentos disponíveis para esta patologia, cerca de dois terços dos doentes continuam a não conseguir atingir ou manter os valores glicémicos necessários para evitar complicações agudas e lesões de órgão alvo crónicas.⁶ Torna-se, portanto, cada vez mais emergente a necessidade de um tratamento eficaz, idealmente curativo, para a DM1.

As células Treg podem dividir-se em centrais e periféricas, caso sejam, respetivamente, produzidas no timo ou resultem da indução de outras células T à periferia após ligação com antígenos. O principal grupo implicado na patogénese da DM1 é o de células Treg centrais, que se encontram normalmente em tecidos linfóides e migram para tecidos periféricos aquando de processos inflamatórios locais. Contudo, ambos os tipos exercem funções imunossupressoras que se complementam no processo da tolerância autoimune.^{4,5}

O percurso dos tratamentos dirigidos à patofisiologia da DM1 começou pela utilização de células Treg expandidas, com o intuito de travar a destruição das células betas pancreáticas, o que só é possível em doentes com diagnóstico muito recente de DM1 ou em indivíduos com alto de risco de vir a desenvolver esta doença, que ainda têm reserva pancreática valorizável. Contudo, face às várias limitações que esta estratégia apresentou, outras abordagens foram surgindo, como o uso de anticorpos dirigidos ao pâncreas, e a manipulação de outras vias que resultam no aumento do número e função destas células.^{3,6}

Atualmente, existem duas teorias predominantes acerca da desregulação das células Treg: 1) a de que o número de células Treg se encontra diminuído, assim como a sua função; 2) a de

que este desequilíbrio se deve unicamente a um défice funcional das células Treg no mecanismo de supressão de células T autorreativas.⁵ De qualquer forma, não foi possível negar que existem alterações na eficácia das células Treg à medida que a doença progride. E por isso, atualmente, a investigação nesta área foca-se essencialmente em dois campos, seja a potenciação do desenvolvimento e da função das células Treg *in vivo*, pela administração de fatores que se pensa serem fundamentais para a ação destas células, seja o isolamento e expansão de células Treg funcionais *in vitro*, seguidamente infundidas no organismo, de modo a aumentar o número de células Treg capazes de combater o desequilíbrio autoimune subjacente.^{5,7}

Neste trabalho, pretende-se rever os avanços descritos até hoje no que toca às terapêuticas com foco nas células Treg para o tratamento desta patologia, abordando os vários mecanismos autoimunes com potencial uso terapêutico para a DM1. Futuras recomendações e limitações aos tratamentos atualmente em estudo serão também discutidas neste artigo.

Alterações nas células Treg na DM1

As células Treg são o subtipo de células T responsável pelo controlo da autoimunidade, que atuam inibindo as células T auxiliares, T citotóxicas, células B e células apresentadoras de antígenos.^{5,8} Distinguem-se estruturalmente dos restantes subtipos de células T por expressarem à superfície CD4, elevados níveis da cadeia alfa do recetor da interleucina-2 (IL-2RA, também designado CD25) e baixos níveis da subunidade alfa do recetor da interleucina-7 (IL-7RA, também designado CD127).^{5,8} Contêm ainda o fator de transcrição *forkhead box P3* (FOXP3), que é essencial para o seu desenvolvimento e função imunossupressora (Fig. 1).^{8,9}

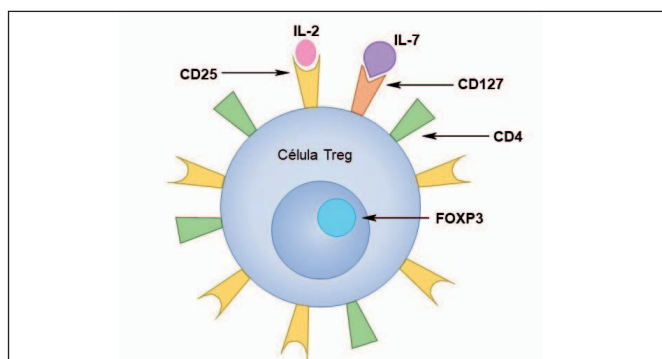


Figura 1. Marcadores celulares expressos pelas células T reguladoras.

Inicialmente considerou-se que o desequilíbrio das células T se devia diretamente a uma redução do valor absoluto de células Treg em circulação e aumento das células T autorreativas. Contudo, os estudos que procuraram identificar alterações quantitativas nas células Treg na DM1 obtiveram resultados divergentes.^{4,6,8,10,11} Khamechian T *et al* verificaram uma diminuição do número e da função das células Treg centrais e periféricas, em doentes com DM1.¹¹ Por outro lado, Aghili B *et al* e Visperas A *et al* relataram uma diminuição isolada da função das células Treg, sem diminuição do seu número.^{4,10} Atualmente, pensa-se que a alteração das células Treg que está na base do desenvolvimento da DM1 não se deve à diminuição da sua quantidade, mas sim a um défice da sua ação imunossupressora.^{4,6} Tem havido, por isso, um maior enfoque da comunidade científica para a pesquisa de alterações qualitativas nas células Treg em doentes diabéticos, nomeadamente através do papel de fatores essenciais à sua função, que sendo potenciados, poderão induzir remissão da doença.^{5,6}

A expansão *in vitro* de células Treg na DM1

A expansão de células Treg autólogas *in vitro* e consequente reintrodução na corrente sanguínea foi a técnica que primariamente mostrou atrasar a DM1 em NOD mice e pessoas com a doença (Fig. 2).^{5,12} Na base desta técnica, está a teoria de que estas células, depois de injetadas à periferia, migram para os locais de maior inflamação, nomeadamente o pâncreas, onde ajudam a restituir o equilíbrio das células T, travando a progressão da doença.⁵

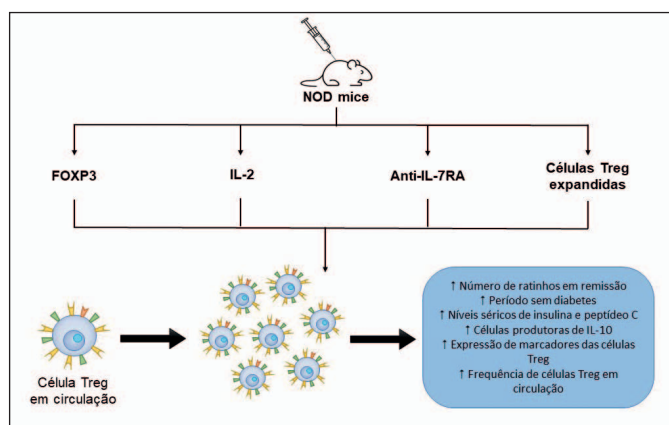


Figura 2. Resumo dos estudos realizados em NOD mice. Os estudos concluídos até à data em modelos de ratinhos diabéticos focaram-se no uso de FOXP3, IL-2, anti_IL-7RA ou células Treg expandidas, tendo apresentado, em conjunto, os resultados descritos na imagem.

O primeiro estudo a demonstrar eficácia na administração de células Treg autólogas expandidas em doentes diabéticos foi publicado em 2012. Verificou-se que, num grupo de 10 crianças diagnosticadas com DM1 há menos de dois meses, oito permaneceram em remissão, definida como dose diária de insulina necessária inferior a 0,5 UI/kg, e duas mantiveram-se sem necessidade de insulina até um ano após a infusão de células Treg autólogas funcionais. Verificou-se ainda que os valores de hemoglobina glicada (HbA1C) variavam inversamente com a dose de células administrada em cada doente e que os valores de peptídeo C se mantiveram superiores no grupo tratado durante todo o seguimento. Mostrou-se ser um tratamento seguro, sem efeitos secundários de relevo.^{12,13}

Um ensaio clínico de fase 1 realizado mais tarde, com 14 do-

entes, mostrou capacidade de expandir e estabilizar as células Treg autólogas durante 14 dias, com manutenção da sua atividade e da resposta à IL-2. Após a introdução na corrente sanguínea, a quantidade de células seguiu uma curva descendente com duas fases. A diminuição inicial mais aguda foi atribuída a um aumento da morte celular por défice de IL-2, o que poderá ser colmatado com uma combinação terapêutica de IL-2 aquando da infusão. Contudo, os resultados metabólicos deste estudo ficaram aquém do esperado, pelo que trabalhos de maior amplitude deverão ser levados a cabo para melhor determinar a eficácia deste tratamento.¹⁴ Sabendo que este procedimento apresenta poucos ou nenhuns efeitos adversos, torna-se assim plausível avançar para estudos de fase 2, de modo a avaliar a verdadeira eficácia terapêutica e determinar a dose de cada um dos elementos do regime terapêutico.

Contudo, uma das principais limitações a realçar nesta técnica é o facto das células Treg usadas serem policlonais e introduzidas na corrente sanguínea, o que não garante a sua chegada ao pâncreas.⁸ Por esta razão, tem-se procurado estratégias para identificar e isolar células Treg que atuem especificamente nos ilhéus pancreáticos, de modo a garantir uma terapêutica mais dirigida e eficaz.^{5,15} Apesar de serem conhecidos alguns antígenos específicos das células Treg do pâncreas em ratinhos diabéticos, não se sabe ainda qual o antígeno humano que melhor seleciona as células Treg pancreáticas responsáveis pelo desenvolvimento da DM1.^{16,17} Alguns investigadores têm-se focado no estudo de antígenos específicos da cadeia beta do recetor de células T (TCR-beta), enquanto outros parecem mostrar que as células Treg que controlam a progressão da DM1 podem ser identificadas através de antígenos específicos dos ilhéus pancreáticos, nomeadamente antígenos para a insulina.^{16,18} Mais estudos nesta área serão necessários para perceber quais os antígenos que melhor permitem selecionar as células Treg que de facto exercem um papel relevante no controlo da DM1, de modo a garantir uma ação direta no local da doença e aumentar a eficácia terapêutica ao máximo.

Adicionalmente, ainda não é possível preservar células Treg expandidas *in vitro* por tempo suficiente para que o tratamento possa ser prolongado por mais de um a dois anos. Este avanço é algo que poderá favorecer bastante a transição desta técnica terapêutica para a prática clínica.⁶

O FOXP3 na DM1

O FOXP3 é uma proteína presente nas células Treg do sistema imune que é essencial para o seu desenvolvimento, transcrição e função imunossupressora, demonstrado *in vivo* e *in vitro*.⁹ Vários estudos mostraram que, na ausência de FOXP3 funcional, o ser humano desenvolve uma síndrome de desregulação autoimune, poliendocrinopatia e enteropatia (IPEX), um quadro que é semelhante ao produzido em ratinhos sob as mesmas condições e que quando tratado com células Treg FOXP3+ se resolve.¹⁹ Ratinhos com défice de células Treg, por disfunção de FOXP3, desenvolveram diabetes autoimune mais cedo do que seria esperado e mostraram infiltrados autoimunes no pâncreas após apenas 2 semanas.⁴ Aghili B *et al* mostraram que a expressão do fator FOXP3 estava diminuída num grupo de doentes com DM1, quando comparado com o grupo de controlo sem a doença, apesar da quantidade de células marcadas com CD4+ CD25+ FOXP3+ CD127- não apresentar diferenças entre os grupos. Este concluiu assim que a função imunorreguladora das células Treg se encontra diminuída em doentes com DM1 devido à expressão reduzida de FOXP3 em cada uma destas células.¹⁰ Isto sugere que a administração de FOXP3 poderá ser determinante na resolução da DM1.

Nesta linha de pensamento, em 2018 Amatya C *et al* usaram uma proteína de fusão (FP) constituída pelos fatores de transcrição FOXP3 e *pancreatic duodenal homeobox-1* (PDX1) em modelos de ratinhos “*non-obese diabetic mice*” (*NOD mice*) e *in vitro*. O fator de transcrição PDX1 é um elemento crucial para o desenvolvimento das células beta do pâncreas. O objetivo foi construir uma proteína que combinasse o tratamento dirigido à desregulação autoimune, através do FOXP3, com um mecanismo de restituição da produção de insulina, pelo aumento direto de células beta pancreáticas. Os resultados *in vitro* mostraram um aumento de células “*Treg-like*”, que levaram a uma diminuição da secreção de citocinas proinflamatórias e da resposta autoimune. Nos *NOD mice*, o tratamento com FP levou a um aumento significativo de insulina e peptídeo C e a um *shift* antiinflamatório, com aumento do número de células Treg, maior número de células produtoras da interleucina anti-inflamatória IL-10 e menor número de células produtoras de interferão gama (Fig. 2).²⁰ Contudo, não teve impacto no controlo da glicemia nestes ratinhos. Por fim, apenas existem estudos acerca da administração deste fator em modelos de ratinhos, pelo que estes resultados carecem de corroboração em pessoas com DM1.

O IL-2RA na DM1

As células Treg expressam constitutivamente IL-2RA, um recetor que lhes confere elevada afinidade para a interleucina-2 (IL-2). Sabe-se que perturbações na ligação do recetor com a IL-2 têm impacto direto na função, estabilidade e sobrevivência das células Treg.^{8,21} Verificou-se que as células Treg encontradas no pâncreas de *NOD mice* com DM1 têm níveis reduzidos de IL-2RA e da proteína antiapoptótica Bcl2, o que sugere um aumento da morte celular causado pela privação de IL-2, devido à reduzida expressão do seu recetor nas células.^{8,21,22} Este mecanismo poderá explicar a diminuição do número de células Treg em doentes e ratinhos diabéticos, demonstrado por alguns estudos. Paralelamente, está relatada uma relação direta entre a diminuição da expressão de IL-2RA e o aumento do risco de desenvolvimento de DM1.²³ Estes resultados suportam a ideia de que a IL-2 não só é indispensável para a função imunossupressora das células Treg como também para a sua sobrevivência, daí ser um potencial alvo terapêutico para travar esta doença.^{21,22}

Posto isto, foi demonstrado que o tratamento de doentes diabéticos com baixa dose de IL-2 aumenta o número e a função das células Treg, de forma dose-dependente.²⁴ Contudo, sabe-se que a IL-2, ainda que com menor afinidade, ativa também outras células do sistema imune, como células T memória e células NK, o que agrava a DM1.^{8,22} Face a esta limitação, Brenu EW *et al* realizaram um estudo em que combinou IL-2 com inibidores da migração de células T autorreativas para o pâncreas. Porém, ao contrário do que foi teorizado, esta combinação acelerou a progressão da DM1, por levar à ativação de células T CD8+ e células NK residentes no pâncreas.²⁵ Por outro lado, em 2018, um estudo em que se combinou IL-2 com rapamicina, um agente que impede a ativação de células T não reguladoras por diminuir a sua afinidade para o IL-2, mostrou que a terapêutica combinada provocou um aumento da função imunossupressora e da prevenção do desenvolvimento de diabetes em ratinhos maior do que cada um das terapêuticas isoladamente.¹⁵

No sentido de perceber qual a melhor estratégia de uso de IL-2 no tratamento da DM1, Seelig E *et al* propuseram um regime terapêutico com Aldesleukin, uma proteína IL-2 recombinante, numa dose reduzida de $0,26 \times 10^6$ IU/m² a cada 3 dias, com um aumento registado de 30% do número de células Treg e um aumento de

25% da expressão de IL-2RA, com alterações mínimas nos outros grupos celulares e sem efeitos adversos de relevo.²³ Por outro lado, Trotta E *et al* testaram a possibilidade de desenvolver uma proteína IL-2 seletiva para células Treg, através da combinação com um anticorpo específico (F5111.2). Isto resultou numa conformação de IL-2 que ativou preferencialmente a proteína STAT5 *in vitro*, que atua seletivamente nas células Treg, promovendo a expansão isolada destas células em ratinhos. Verificou-se remissão da diabetes em 50% dos ratinhos ao fim de uma semana, sendo que a maioria permaneceu normoglicémico durante as quatro semanas de seguimento, e um aumento substancial dos marcadores de atividade das células Treg, sem que algum aumento das restantes células do sistema imune ou dos seus marcadores celulares fosse registado (Fig. 2).²⁶

Existem de momento vários estudos de fase 1 e 2 a ser conduzidos acerca do uso da IL-2 para o tratamento da DM1. Dois deles decorrem atualmente no *Assistance publique – Hôpitaux de Paris* e propõe-se a estudar a relação dose-efeito de IL-2 recombinante em baixa dose nas células Treg *in vivo* e a sua capacidade de travar a destruição progressiva autoimune das células beta pancreáticas, assim como otimizar o risco-benefício deste tratamento na DM1.^{27,28} Ambos apresentam um número de participantes mais representativo, face aos estudos prévios. Um outro estudo na mesma área decorre atualmente sob a colaboração de vários institutos de investigação, nos Estados Unidos da América.²⁹ Os resultados destes trabalhos, em conjunto com o conhecimento atual, permitirão retirar informações mais conclusivas acerca do verdadeiro papel da IL-2 no tratamento da DM1.

O IL-7RA na DM1

O IL-7RA é um recetor expresso à superfície de várias células, cuja ligação com a interleucina-7 (IL-7) leva à diferenciação de células imunologicamente ativas. O bloqueio deste recetor promove um *shift* do balanço imunológico de atividade autorreativa para um estado de maior regulação. Um estudo com *NOD mice* mostrou que o uso de anticorpos anti-IL-7RA causa um aumento da frequência de células Treg à periferia, com elevada expressão de FOXP3 e da proteína *programmed cell death protein 1* (PD-1), que favorece a atividade destas células. Estas alterações foram acompanhadas por um atraso na progressão da DM1 nos *NOD mice* (Fig. 2). Contudo, pela diminuição marcada das células responsáveis pela resposta imune do organismo, questionou-se a probabilidade deste tratamento causar imunodeficiência. Para colmatar este efeito adverso, os autores propuseram o uso de anticorpos anti-IL-7RA por curtos períodos de tempo, em combinação com outras terapêuticas potenciadoras do efeito imunomodulador das células Treg.³⁰ Neste sentido, em 2019, os mesmos autores usaram uma combinação de anticorpos anti-IL-7RA com uma vacina específica para antigénios dos ilhéus, tendo-se verificado uma redução do número de células T reativas, sem o aumento esperado do número de células Treg. Os resultados indicaram ainda que os anticorpos anti-IL-7RA reduziram a eficácia da vacina e não tiveram efeito no retardar da doença em ratinhos.³¹ Esta abordagem carece de mais estudos para melhor entender de que forma os anticorpos anti-IL-7RA poderão ser usados em conjugação com outros tratamentos, de forma a aumentar a ação das células Treg sem causar imunodeficiência nos doentes.

O futuro da DM

Os estudos mencionados, com foco nas terapêuticas celulares

digidas para a DM1, têm mostrado resultados promissores, especialmente os que relatam o uso de IL-2 em doentes diabéticos e a infusão de células Treg autólogas expandidas *in vitro* (Fig. 3). Contudo, amostras demasiado pequenas e a divergência dos resultados entre os estudos são dois dos principais fatores que limitam a sua fiabilidade clínica. Como tal, emerge a necessidade de conduzir estudos mais alargados, idealmente tanto em doentes diabéticos como em pessoas em risco de ter a doença, que almejem otimizar as técnicas abordadas, em termos de doses, tempo de tratamento, combinações terapêuticas, entre outros (estudos de fase 2). As combinações de tratamentos parecem ser um campo importante de investigação futura, já que vários autores mencionaram falhas nas técnicas usadas, que sugerem ser colmatadas pela introdução conjunta de outro elemento terapêutico.^{14,31} A combinação de células Treg autólogas expandidas com administração de IL-2 parece ter um papel particularmente promissor na remissão da DM1, pois permitirá aumentar a sobrevivência das células *in vivo* e assim diminuir o número de infusões necessárias para a sua maior eficácia. Um estudo de fase 1, que tem o objetivo de avaliar a segurança e a dose da infusão combinada de IL-2 e células Treg autólogas em doentes com DM1 recém-diagnosticada, encontra-se atualmente em curso, na Universidade da Califórnia, em São Francisco.³² Os resultados deste estudo poderão trazer uma nova esperança no que toca ao tratamento definitivo da DM1. O uso de anticorpos antigénio-específicos para os ilhéus pancreáticos parece também trazer vantagens na capacidade de dirigir os tratamentos seletivamente para o pâncreas, apesar de ainda serem necessários mais estudos neste sentido.

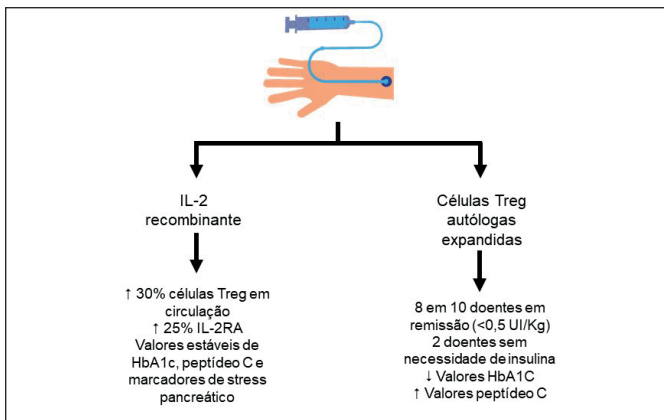


Figura 3. Resumo dos estudos realizados em doentes diabéticos. Os estudos concluídos até à data focaram-se no uso de IL-2 recombinante e células Treg autólogas expandidas, tendo apresentado os resultados descritos na figura.

Uma outra proteína com um papel importante na regulação do sistema imune, através da ativação da apoptose de células T não reguladoras e inibição da apoptose de células Treg, é a PD-1. Um estudo de Vecchione *A et al*, de 2019, procuraram investigar a frequência das células Treg centrais e periféricas e a sua expressão de PD-1, em crianças com DM1 ou com autoanticorpos definidores de risco da doença, e em NOD *mice*. Os resultados mostraram níveis de PD-1 mais baixos nas crianças diabéticas e em risco, do que nas crianças sem autoanticorpos. Os níveis de PD-1 foram também diminuindo nos ratinhos pré-diabéticos à medida que a doença se instalava, mostrando que a expressão deste marcador diminui em paralelo com a progressão da doença.³³ Assim, apesar de até hoje não ter sido estudado o seu papel direto no tratamento da DM1, o PD-1 parece ser um potencial biomarcador da progres-

são da DM1, pelo que poderá ser relevante no futuro do tratamento desta patologia.

Conclusão

Sabe-se que desde o início da desregulação autoimune até ao aparecimento dos primeiros sintomas existe um período de latência de meses ou até anos, de tal forma que à apresentação clínica é visível uma destruição pancreática de cerca de 80% da massa de células beta na maioria dos doentes, o que os torna menos respondedores a quaisquer tratamentos dirigidos à restituição da função pancreática endócrina.^{6,18} Um ponto fundamental é, por isso, a identificação de pessoas em risco de desenvolver DM1, antes do aparecimento da doença. Quais os marcadores que nos indicam com maior certeza de que a pessoa irá desenvolver a doença, e quais as pessoas que devem ser rastreadas para tal são duas das principais questões por responder. Apesar de haver um forte componente hereditário, grande parte dos doentes com DM1 não tem história familiar da doença, o que torna mais difícil a sua deteção. Alguns anticorpos específicos dos ilhéus pancreáticos, nomeadamente anticorpos anti-insulina estão já relatados em doentes diabéticos, mas apresentam baixa sensibilidade e por isso deixam escapar muitos casos.³⁴

Dentro dos tratamentos abordados, a expansão de células Treg antigénio-específicas mostrou-se um dos mais eficazes, assim como a administração de IL-2, daí se conjecturar que a combinação destas duas técnicas possa ter resultados melhorados. Contudo, importa lembrar que, apesar do elevado potencial destes tratamentos para travar a progressão da DM1, ainda são necessários muitos estudos nesta área para comprovar a eficácia e estabilidade clínica dos mesmos e para transitar da fase de ensaios clínicos para o meio hospitalar com segurança.

Por fim, é importante também realçar que a DM1 é uma doença relativamente heterogênea, a nível genético, clínico e celular, o que de certa forma explica que alguns doentes nos estudos apresentados tenham respondido positivamente aos tratamentos, enquanto outros se mantiveram sem alterações. Este conceito de heterogeneidade na diabetes é cada vez mais aceite e compromete a aplicabilidade clínica dos tratamentos dirigidos aqui abordados. Torna-se, por isso, importante perceber se fará sentido classificar os doentes em respondedores e não respondedores no que toca às terapêuticas celulares dirigidas e desenhar estudos que sejam capazes de identificar estes grupos de doentes.⁷

Responsabilidades Éticas

Conflitos de Interesse: Os autores declaram não possuir conflitos de interesse.

Suporte Financeiro: O presente trabalho não foi suportado por nenhum subsídio o bolsa ou bolsa.

Proveniência e Revisão por Pares: Não comissionado; revisão externa por pares.

Ethical Disclosures

Conflicts of interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Financial Support: This work has not received any contribution grant or scholarship.

Provenance and Peer Review: Not commissioned; externally peer reviewed.

References / Referências

- Schuster C, Jonas F, Zhao F, Kissler S. Peripherally induced regulatory T cells contribute to the control of autoimmune diabetes in the NOD mouse model. *Eur J Immunol*. 2018; 48: 1211-6. doi: 10.1002/eji.201847498.
- Wang Z, Xie Z, Lu Q, Chang C, Zhou Z. Beyond genetics: what causes type 1 diabetes. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017; 52: 273-86. doi: 10.1007/s12016-016-8592-1.
- Yu H, Paiva R, Flavell RA. Harnessing the power of regulatory T-cells to control autoimmune diabetes: overview and perspective. *Immunology*. 2018; 153: 161-70. doi: 10.1111/imm.12867.
- Visperas A, Vignali DA. Are regulatory T cells defective in type 1 diabetes and can we fix them? *J Immunol*. 2016; 197: 3762-70. doi: 10.4049/jimmunol.1601118.
- ElEssawy B, Li XC. Type 1 diabetes and T regulatory cells. *Pharmacol Res*. 2015; 98: 22-30. doi: 10.1016/j.phrs.2015.04.009.
- Gitelman SE, Bluestone JA. Regulatory T cell therapy for type 1 diabetes: May the force be with you. *J Autoimmun*. 2016; 71: 78-87. doi: 10.1016/j.jaut.2016.03.011.
- Gomez-Tourino I, Arif S, Eichmann M, Peakman M. T cells in type 1 diabetes: Instructors, regulators and effectors: A comprehensive review. *J Autoimmun*. 2016; 66: 7-16. doi: 10.1016/j.jaut.2015.08.012.
- Spence A, Tang Q. Restoring regulatory T cells in type 1 diabetes. *Curr Diab Rep*. 2016; 16: 110. doi: 10.1007/s11892-016-0807-6.
- Holohan DR, Van Gool F, Bluestone JA. Thymically-derived Foxp3+ regulatory T cells are the primary regulators of type 1 diabetes in the non-obese diabetic mouse model. *PLoS One*. 2019; 14: e0217728. doi: 10.1371/journal.pone.0217728.
- Aghili B, Amirzargar AA, Rajab A, Rabbani A, Sotoudeh A, Assadiasl S, et al. Altered Suppressor Function of Regulatory T Cells in Type 1 Diabetes. *Iran J Immunol*. 2015; 12: 240-51. Sotoudeh A, Assadiasl S, Larjani B.
- Khamechian T, Irandoust B, Mohammadi H, Nikouejad H, Akbari H. Association of Regulatory T Cells with Diabetes Type-1 and Its Renal and Vascular Complications Based on the Expression of Forkhead Box Protein P3 (FoxP3), Helios and Neuropilin-1. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2018; 17: 151-7.
- Marek-Trzonkowska N, Mysliwiec M, Dobyszek A, Grabowska M, Techmanska I, Juscinska J, et al. Administration of CD4+CD25highCD127-regulatory T cells preserves beta-cell function in type 1 diabetes in children. *Diabetes Care*. 2012; 35: 1817-20. doi: 10.2337/dc12-0038.
- Marek-Trzonkowska N, Mysliwiec M, Dobyszek A, Grabowska M, Derkowska I, Juscińska J, et al. Therapy of type 1 diabetes with CD4(+)CD25(high)CD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets - results of one year follow-up. *Clin Immunol*. 2014; 153: 23-30. doi: 10.1016/j.clim.2014.03.016.
- Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, Gitelman SE, Gupta S, Hellerstein MK, et al. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med*. 2015; 7: 315ra189. doi: 10.1126/scitranslmed.aad4134.
- Manirarora JN, Wei CH. Combination Therapy Using IL-2/IL-2 Monoclonal Antibody Complexes, Rapamycin, and Islet Autoantigen Peptides Increases Regulatory T Cell Frequency and Protects against Spontaneous and Induced Type 1 Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *J Immunol*. 2015; 195: 5203-14. doi: 10.4049/jimmunol.1402540.
- Spence A, Purtha W, Tam J, Dong S, Kim Y, Ju CH, et al. Revealing the specificity of regulatory T cells in murine autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018; 115: 5265-70. doi: 10.1073/pnas.1715590115.
- Krishnamurthy B, Selck C, Chee J, Jhala G, Kay TW. Analysis of antigen specific T cells in diabetes - Lessons from pre-clinical studies and early clinical trials. *J Autoimmun*. 2016; 71: 35-43. doi: 10.1016/j.jaut.2016.03.018.
- Akbarpour M, Goudy KS, Cantore A, Russo F, Sanvito F, Naldini L, et al. Insulin B chain 9-23 gene transfer to hepatocytes protects from type 1 diabetes by inducing Ag-specific FoxP3+ Tregs. *Sci Transl Med*. 2015; 7: 289ra281. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa3032.
- Bacchetta R, Barzaghi F, Roncarolo MG. From IPEX syndrome to FOXP3 mutation: a lesson on immune dysregulation. *Ann N Y Acad Sci*. 2018; 1417: 5-22.
- Amatya C, Radichev IA, Ellefson J, Williams M, Savinov AY. Self-Transducible Bimodal PDX1-FOXP3 Protein Lifts Insulin Secretion and Curbs Autoimmunity, Boosting Tregs in Type 1 Diabetic Mice. *Mol Ther*. 2018; 26: 184-98. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.08.014.
- Dwyer CJ, Bayer AL, Fotino C, Yu L, Cabello-Kindelan C, Ward NC, et al. Altered homeostasis and development of regulatory T cell subsets represent an IL-2R-dependent risk for diabetes in NOD mice. *Sci Signa*. 2017; 10. doi: 10.1126/scisignal.aam9563.
- Yu A, Snowwhite I, Vendrame F, Rosenzweig M, Klatzmann D, Pugliese A, et al. Selective IL-2 responsiveness of regulatory T cells through multiple intrinsic mechanisms supports the use of low-dose IL-2 therapy in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2015; 64: 2172-83. doi: 10.2337/db14-1322.
- Seelig E, Howlett J, Porter L, Truman L, Heywood J, Kennet J, et al. The DILfrequency study is an adaptive trial to identify optimal IL-2 dosing in patients with type 1 diabetes. *JCI Insight*. 2018; 3: e99306. doi: 10.1172/jci.insight.99306.
- Rosenzweig M, Churlaud G, Mallone R, Six A, Dérian N, Chaara W, et al. Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients. *J Autoimmun*. 2015; 58: 48-58. doi: 10.1016/j.jaut.2015.01.001.
- Brenu EW, Bartley TJ, Wright CM, et al. CD11a/ICAM-1 blockade combined with IL-2 targeting therapy causes a paradoxical acceleration of type 1 diabetes. *Immunol Cell Biol*. 2017; 95: 803-13. doi: 10.1038/icb.2017.49.
- Trotta E, Bessette PH, Silveria SL, Hamilton-Williams EE. A human anti-IL-2 antibody that potentiates regulatory T cells by a structure-based mechanism. *Nat Med*. 2018; 24: 1005-1014.
- Medicine USNLo. Dose Finding Study of Il-2 at Ultra-low Dose in Children With Recently Diagnosed Type 1 Diabetes (DFIL2-Child). [accessed march 14 2020] Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01862120?term=regulatory+T+cells&cond=Type+1+Diabetes&draw=1&rank=6>
- Medicine USNLo. Low-dose rhIL-2 in Patients With Recently-diagnosed Type 1 Diabetes (DIABIL-2). [accessed march 14 2020] Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02411253?term=regulatory+T+cells&cond=Type+1+Diabetes&draw=1&rank=15>
- Medicine USNLo. Low-dose IL-2 in Established T1D - The "PROREG" Study. [accessed march 14 2020] Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03243058?term=regulatory+T+cells&cond=Type+1+Diabetes&draw=1&rank=21>
- Vazquez-Mateo C, Collins J, Fleury M, Dooms H. Broad induction of immunoregulatory mechanisms after a short course of anti-IL-7/Ralpha antibodies in NOD mice. *BMC Immunol*. 2017; 18: 18. doi: 10.1186/s12865-017-0201-4.
- Vazquez-Mateo C, Collins J, Goldberg SJ, Lawson M, Hernandez-Escalante J, Dooms H. Combining anti-IL-7/Ralpha antibodies with autoantigen-specific immunotherapy enhances non-specific cytokine production but fails to prevent Type 1 Diabetes. *PLoS One*. 2019; 14: e0214379. doi: 10.1371/journal.pone.0214379.
- U. S. National Library of Medicine. T1DM Immunotherapy Using Polyclonal Tregs + IL-2 (TILT). [accessed march 14 2020] Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02772679?term=regulatory+T+cells&cond=Type+1+Diabetes&draw=1&rank=5>
- Vecchione A, Di Fonte R, Gerosa J, Jofra T, Cicalese MP, Napoleone V, et al. Reduced PD-1 expression on circulating follicular and conventional FOXP3(+) Treg cells in children with new onset type 1 diabetes and autoantibody-positive at-risk children. *Clin Immunol*. 2019; 211: 108319. doi: 10.1016/j.clim.2019.108319.
- Marek-Trzonkowska N, Mysliwiec M, Iwaszkiewicz-Grzes D, Gliwiński M, Derkowska I, Żalińska M, et al. Factors affecting long-term efficacy of T regulatory cell-based therapy in type 1 diabetes. *J Transl Med*. 2016; 14: 332. doi: 10.1186/s12967-016-1090-7.