

Margarida Silvina Freitas Vieira

O papel das células T reguladoras na diabetes mellitus tipo 1

The role of regulatory T cells in type 1 diabetes

março, 2020

Margarida Silvina de Freitas Vieira

O papel das células T reguladoras na diabetes mellitus tipo 1

The role of regulatory T cells in type 1 diabetes

Mestrado Integrado em Medicina

Área: Medicina Clínica

Tipologia: Monografia

Trabalho efetuado sob a Orientação de:

Doutor Manuel Celestino Silva Neves

Trabalho organizado de acordo com as normas da revista:

Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo

Março, 2020

FMUP

Eu, Margarida Silvana Freitas Vieira, abaixo assinado, nº mecanográfico 201403455, estudante do 6º ano do Ciclo de Estudos Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste projeto de opção.

Neste sentido, confirmo que **NÃO** incorri em plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 20/03/2020

Assinatura conforme cartão de identificação:

Margarida Silvana Freitas Vieira

NOME

Margarida Silveira Freitas Vieira

NÚMERO DE ESTUDANTE

201403455

E-MAIL

margarida_v_18@hotmail.com

DESIGNAÇÃO DA ÁREA DO PROJECTO

Ciências Médicas e da Saúde - Medicina Clínica

TÍTULO DISSERTAÇÃO/MONOGRAFIA (riscar o que não interessa)

O papel das células T reguladoras no diabetes mellitus tipo 1

ORIENTADOR

Dr. Manuel Celestino Silva Neves

COORDENADOR (se aplicável)

ASSINALE APENAS UMA DAS OPÇÕES:

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA OBRA APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.	☒
É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA OBRA (INDICAR, CASO TAL SEJA NECESSÁRIO, Nº MÁXIMO DE PÁGINAS, ILUSTRAÇÕES, GRÁFICOS, ETC.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.	☐
DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (INDICAR, CASO TAL SEJA NECESSÁRIO, Nº MÁXIMO DE PÁGINAS, ILUSTRAÇÕES, GRÁFICOS, ETC.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA OBRA.	☐

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 20/03/2020

Assinatura conforme cartão de identificação: Margarida Silveira Freitas Vieira

O papel das células T reguladoras na diabetes mellitus tipo 1

The role of regulatory T cells in type 1 diabetes

Margarida Vieira¹, Celestino Neves^{1,2,3}, João Sérgio Neves^{1,2}, Davide Carvalho^{1,2,3}

1. Faculdade de Medicina de Universidade do Porto, Porto, Portugal

2. Departamento de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, Centro Hospitalar Universitário de São João, Porto, Portugal

3. Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Porto, Portugal

Resumo

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, consequentemente, 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.

Abstract

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 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.

Palavras-chave

Diabetes tipo 1, células T reguladoras, fatores imunológicos, expansão celular.

Key-words

Type 1 diabetes, regulatory T cells, immunologic factors, cell expansion.

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, sabe-se que um aumento descontrolado de células Treg leva ao aparecimento de tumores, por supressão da resposta imune antitumoral fisiológica do organismo ⁵.

Sabe-se também 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 os valores clínicos recomendados para evitar

complicações agudas e lesões de órgão alvo crônicas ⁶. Torna-se, portanto, cada vez mais emergente a necessidade de um tratamento eficaz, idealmente curativo, para a DM1.

Os tratamentos das doenças autoimunes podem ser mais ou menos específicos, tendo em conta se atingem particularmente um mecanismo celular ou se provocam imunossupressão em todo o sistema imune, respetivamente ⁷. Evidentemente, um tratamento dirigido ao mecanismo de base da doença será mais eficaz e terá um leque de efeitos adversos muito mais reduzido do que um tratamento imunossupressor. Como tal, estudos mais recentes têm-se focado no restabelecimento do equilíbrio das células T, utilizando seletivamente células Treg pancreáticas ou os seus marcadores, em terapêuticas específicas ou combinadas, para travar a destruição autoimune das células beta pancreáticas ^{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, trabalhos nesta área têm-se debruçado em um de 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 dirigido 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. Contêm ainda o fator de transcrição *forkhead box P3* (FOXP3), que é essencial para o seu desenvolvimento e função imunossupressora (Fig. 1) ⁹.

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}, com autores a demonstrar alterações no número de células ¹⁰, e outros a refutar esta ideia ¹¹. Atualmente, pensa-se que a principal 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}.

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 um 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 ¹². Ratinhos com déficit 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* mostrou 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 ¹¹. Isto sugere que a administração de FOXP3 poderá ser determinante na resolução da DM1.

Nesta linha de pensamento, em 2015 Amatya C. *et al* usou 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 restauração 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 próinflamatórias 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) ¹³. Contudo, estudos acerca da administração deste fator em doentes diabéticos são escassos, pelo que estes resultados carecem de corroboração.

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, 14}. 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, 14, 15}. 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 ¹⁶. 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 ^{14, 15}.

Desta forma, 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-dependente¹⁷. 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 leva ao agravamento da doença^{8,15}. Brenu E.W. *et al* mostrou, porém, que a combinação de IL-2 com inibidores da migração de células T autorreativas para o pâncreas, ao contrário do que se podia pensar, também acelera a progressão da DM1, por levar à ativação de células T CD8+ e células NK residentes no pâncreas¹⁸.

Assim, tornou-se importante perceber como se poderia usar a IL-2 para ativar as células Treg sem interferir com os restantes grupos de células. Seelig E. *et al* propôs um regime terapêutico com Aldesleukin, uma proteína IL-2 recombinante, numa dose 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 relevo¹⁶. Por outro lado, Trotta E. *et al* testou 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)¹⁹.

Existem de momento vários estudos de fase 1 e 2 a ser conduzidos acerca do uso da IL-2 para o tratamneto 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^{20, 21}. 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 América²². 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 inteleucina-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 possibilidade deste tratamento causar imunodeficiência. Assim, 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 Treg²³.

Recentemente, num estudo de 2019, os mesmos autores usaram uma combinação de anticorpos anti-IL-7RA com uma vacina específica para antígenos dos ilhéus, com poucos resultados positivos até ao momento. No entanto, os resultados indicaram que os anticorpos anti-IL-7RA reduziram a eficácia da vacina e não mostraram retardar o avanço da doença em ratinhos ²⁴. 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 PD-1 na DM1

O PD-1 é uma proteína expressa à superfície das células, que regula o sistema imune através da ativação da apoptose de células T não reguladoras e inibição da apoptose de células Treg. Um estudo de 2019 procurou 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 ²⁵. Apesar de existirem atualmente poucos estudos acerca desta proteína em doentes diabéticos, o PD-1 parece ser um potencial biomarcador da progressão da DM1, sendo que também não deve ser descartado o seu possível uso no tratamento da patologia.

A expansão *in vitro* de células Treg na DM1

Para além da potenciação da eficácia das células Treg *in vivo*, através da suplementação com fatores que promovem a sua função, surgiram nos últimos anos vários trabalhos na área da expansão de células Treg autólogas *in vitro* e reintrodução na corrente sanguínea, de *NOD mice* e doentes com DM1, com resultados promissores (Fig. 2) ^{5, 26}. Teoriza-se 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.

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 com DM1, 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 ocorrência de efeitos secundários de relevo ^{26, 27}.

Um ensaio clínico de fase 1 realizado mais tarde, com 14 doentes, 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 ²⁸. 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 inespecíficas e introduzidas na corrente sanguínea, o que não garante a sua chegada ao pâncreas, o local de ação pretendido ⁸. Por esta razão, tem-se procurado estratégia para identificar e isolar células Treg que atuam especificamente nos ilhéus pancreáticos, de modo a garantir uma terapêutica mais dirigida e eficaz ^{5, 29}. Porém, 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 ^{30, 31}. 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 ^{30, 32}. 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 no tempo. Este avanço é algo que poderá favorecer bastante a transição desta técnica terapêutica para a prática clínica ⁶.

O futuro da DM1

Os estudos mencionados, com foco nas terapêuticas celulares dirigidas 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 ^{24, 28}. Já em 2015, 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 com cada um das terapêuticas isoladamente ²⁹. 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 ³³. 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.

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, 32}. 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 heterogénea, 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.

Referências

1. Schuster C, Jonas F, Zhao F, *et al.* Peripherally induced regulatory T cells contribute to the control of autoimmune diabetes in the NOD mouse model. *Eur J Immunol* 2018; 48: 1211-1216.
2. Wang Z, Xie Z, Lu Q, *et al.* Beyond Genetics: What Causes Type 1 Diabetes. *Clin Rev Allergy Immunol* 2017; 52: 273-286.
3. Yu H, Paiva R and Flavell RA. Harnessing the power of regulatory T-cells to control autoimmune diabetes: overview and perspective. *Immunology* 2018; 153: 161-170.

4. Visperas A and Vignali DA. Are Regulatory T Cells Defective in Type 1 Diabetes and Can We Fix Them? *J Immunol* 2016; 197: 3762-3770.
5. ElEssawy B and Li XC. Type 1 diabetes and T regulatory cells. *Pharmacol Res* 2015; 98: 22-30.
6. Gitelman SE and Bluestone JA. Regulatory T cell therapy for type 1 diabetes: May the force be with you. *J Autoimmun* 2016; 71: 78-87.
7. Gomez-Tourino I, Arif S, Eichmann M, *et al.* T cells in type 1 diabetes: Instructors, regulators and effectors: A comprehensive review. *J Autoimmun* 2016; 66: 7-16.
8. Spence A and Tang Q. Restoring regulatory T cells in type 1 diabetes. *Curr Diab Rep* 2016; 16: 110.
9. Holohan DR, Van Gool F and 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.
10. Khamechian T, Irandoust B, Mohammadi H, *et al.* 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 Neurophilin-1. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2018; 17: 151-157.
11. Aghili B, Amirzargar AA, Rajab A, *et al.* Altered suppressor function of regulatory T cells in type 1 diabetes. *Iran J Immunol* 2015; 12: 240-251.
12. Bacchetta R, Barzaghi F and Roncarolo MG. From IPEX syndrome to FOXP3 mutation: a lesson on immune dysregulation. *Ann N Y Acad Sci* 2018; 1417: 5-22.
13. Amatya C, Radichev IA, Ellefson J, *et al.* Self-transducible bimodal PDX1-FOXP3 protein lifts insulin secretion and curbs autoimmunity, boosting Tregs in type 1 diabetic mice. *Mol Ther* 2018; 26: 184-198.
14. Dwyer CJ, Bayer AL, Fotino C, *et al.* Altered homeostasis and development of regulatory T cell subsets represent an IL-2R-dependent risk for diabetes in NOD mice. *Sci Signal* 2017; 10.
15. Yu A, Snowwhite I, Vendrame F, *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: 2172-2183.
16. Seelig E, Howlett J, Porter L, *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.
17. Rosenzweig M, Churlaud G, Mallone R, *et al.* Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients. *J Autoimmun* 2015; 58: 48-58.
18. 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: 803-813.
19. Trotta E, Bessette PH, Silveria SL, *et al.* A human anti-IL-2 antibody that potentiates regulatory T cells by a structure-based mechanism. *Nat Med* 2018; 24: 1005-1014.
20. Medicine USNLo. Dose finding study of IL-2 at ultra-low dose in children with recently diagnosed type 1 diabetes (DFIL2-Child), <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01862120?term=regulatory+T+cells&cond=Type+1+Diabetes&draw=1&rank=6> (accessed march 14 2020).
21. Medicine USNLo. Low-dose rhIL-2 in patients with recently-diagnosed type 1 diabetes (DIABIL-2), <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02411253?term=regulatory+T+cells&cond=Type+1+Diabetes&draw=1&rank=15> (accessed march 14 2020).
22. Medicine USNLo. Low-dose IL-2 in established T1D - The "PROREG" study, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03243058?term=regulatory+T+cells&cond=Type+1+Diabetes&draw=1&rank=21> (accessed march 14 2020).
23. Vazquez-Mateo C, Collins J, Fleury M, *et al.* Broad induction of immunoregulatory mechanisms after a short course of anti-IL-7Ralpha antibodies in NOD mice. *BMC Immunol* 2017; 18: 18.

24. Vazquez-Mateo C, Collins J, Goldberg SJ, *et al.* Combining anti-IL-7R α antibodies with autoantigen-specific immunotherapy enhances non-specific cytokine production but fails to prevent Type 1 Diabetes. *PLoS One* 2019; 14: e0214379.
25. Vecchione A, Di Fonte R, Gerosa J, *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.
26. Marek-Trzonkowska N, Mysliwiec M, Dobyszek A, *et al.* Administration of CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ regulatory T cells preserves beta-cell function in type 1 diabetes in children. *Diabetes Care* 2012; 35: 1817-1820.
27. Marek-Trzonkowska N, Mysliwiec M, Dobyszek A, *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.
28. Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, *et al.* Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med* 2015; 7: 315ra189.
29. Manirarora JN and 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: 5203-5214.
30. Spence A, Purtha W, Tam J, *et al.* Revealing the specificity of regulatory T cells in murine autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115: 5265-5270.
31. Krishnamurthy B, Selck C, Chee J, *et al.* Analysis of antigen specific T cells in diabetes - Lessons from pre-clinical studies and early clinical trials. *J Autoimmun* 2016; 71: 35-43.
32. Akbarpour M, Goudy KS, Cantore A, *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.
33. U. S. National Library of Medicine. T1DM Immunotherapy using polyclonal Tregs + IL-2 (TILT), <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02772679?term=regulatory+T+cells&cond=Type+1+Diabetes&draw=1&rank=5> (accessed march 14 2020).
34. Marek-Trzonkowska N, Mysliwiec M, Iwaszkiewicz-Grzes D, *et al.* Factors affecting long-term efficacy of T regulatory cell-based therapy in type 1 diabetes. *J Transl Med* 2016; 14: 332.

Figuras

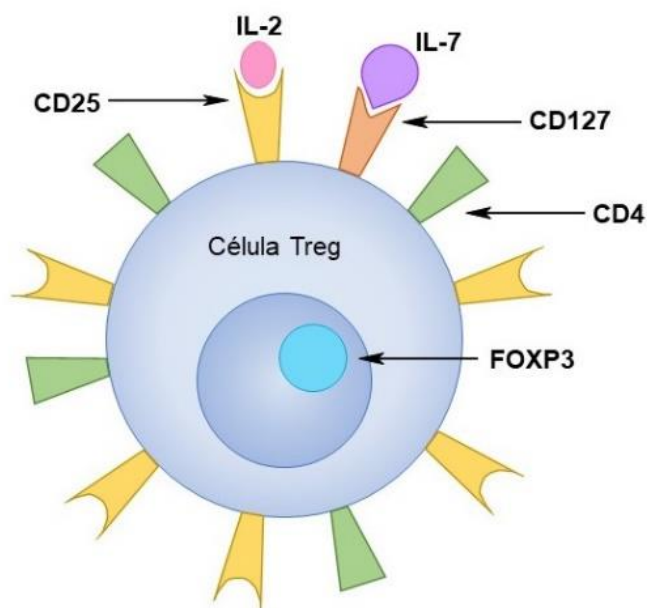


Figura 1. Marcadores celulares expressos pelas células T reguladoras.

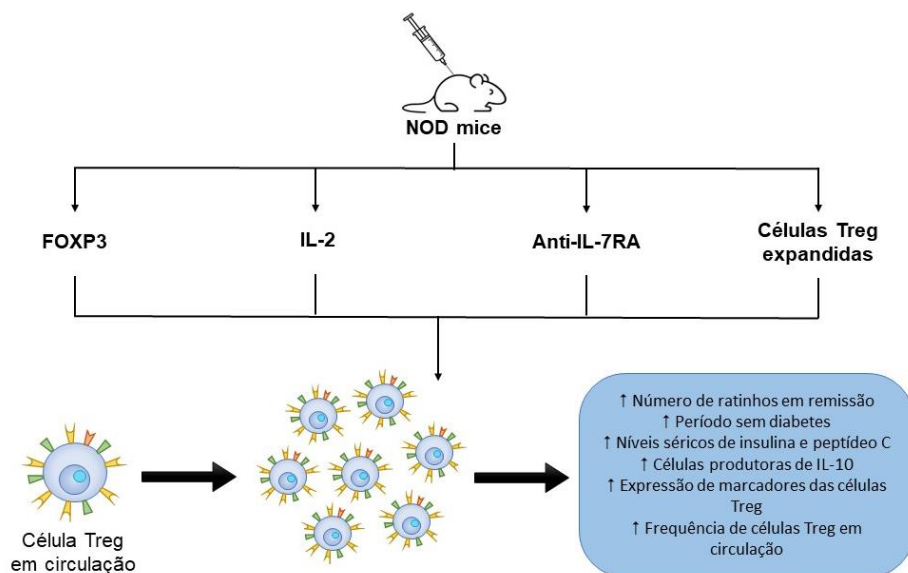


Figura 2. Resumo dos estudos mencionados realizados em NOD mice. Os estudos concluídos até à data em modelos de ratinhos diabéticos focaram-se no uso de FOXP3, IL-2, anti-IL-7RA ou células Treg expandidas, tendo apresentado, em conjunto, os resultados descritos na figura.

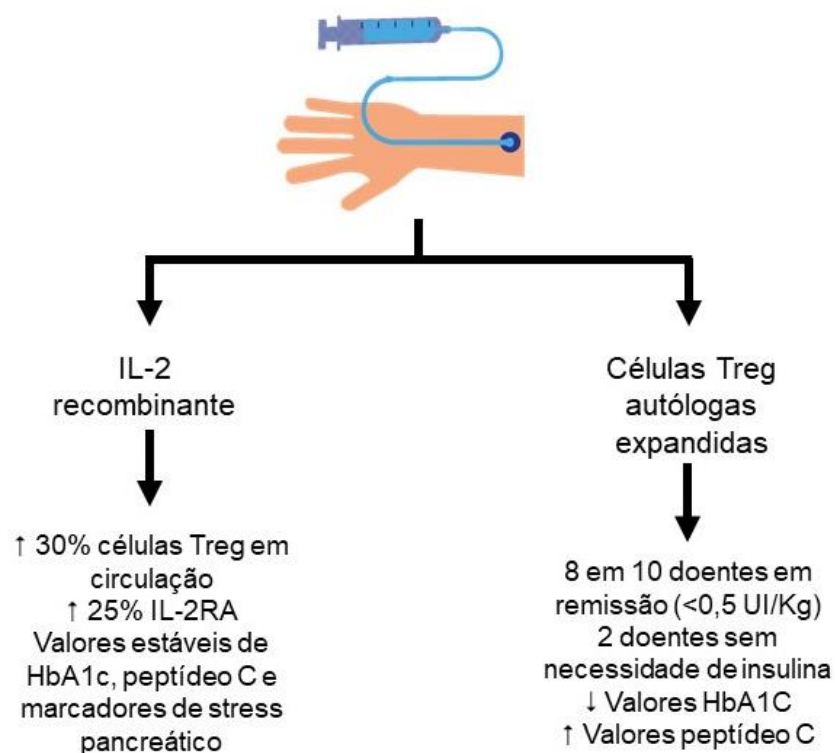


Figura 3. Resumo dos estudos mencionados realizados em doentes diabéticos. Os estudos concluídos até à data focaram-se no uso de IL-2 recombinante e células Treg autólogas expandidas, tendo apresentado os resultados descritos na figura.

Agradecimentos

Num trabalho deste tipo, conta-se, inevitavelmente, com o apoio e incentivo de diversas pessoas e entidades. Neste sentido, gostaria de expressar um sincero agradecimento a todos os que tornaram possível a sua concretização.

Ao Dr. Celestino Neves, orientador deste projeto e um exemplo de médico e professor a seguir, pelos ensinamentos que me suscitaram o interesse nesta área, e por toda a atenção, enorme disponibilidade e trabalho. Os seus conselhos e sugestões, bem como a permanente valorização do trabalho, foram determinantes para a realização deste projeto.

Ao Dr. João Sérgio Neves, pela amabilidade e apoio prestado, pela elevada acessibilidade que sempre demonstrou e pela pertinência de todas as suas críticas e sugestões.

À minha prima Cátia Carvalho, para mim um modelo na investigação em ciência e na saúde, pela inspiração constante, pela alegria pela vida, pelos conselhos, pela leitura crítica do trabalho e, sobretudo, pela amizade incondicional ao longo de todos estes anos.

Aos meus pais, professores da escola da vida, porque sem eles nada disto seria possível, e à minha irmã, que diz ter-me ensinado tudo o que eu sei hoje e, se assim for, devo-lhe muito.

Aos meus amigos, por todas as aventuras durante estes 6 anos, e em especial à Joana Neto, à Joana Azevedo e à Pilar Ferreira, amigas com um papel único no meu desenvolvimento pessoal e académico, e que foram uma grande ajuda no decorrer deste projeto.

Agradecer ainda à AEFMUP, que me formou para lá do que o curso consegue, dando-me competências únicas, em diversas áreas, e amigos para a vida.

A estas e a todas as outras pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para o sucesso deste trabalho, o meu expresso e sincero obrigada.

ANEXO

Normas de submissão na Revista Portuguesa de
Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo

Submission Preparation Checklist

As part of the submission process, authors are required to check off their submission's compliance with all of the following items, and submissions may be returned to authors that do not adhere to these guidelines.

- I declare that all authors had a substantial contribution for this manuscript.
- I declare that all authors approve the final version of the manuscript.
- I declare that the manuscript is not under review of any other journal, and that it has not been published complete or partially in any other journal.
- I declare that the manuscript has not been previously presented.
- If it has been presented in a conference, indicate name, place, and dates of the conference.
- I declare that the article is an original contribution, that all the statements presented as facts are resulting from authors' research, who are responsible for them.
- I declare that the manuscript, complete or in parts, does not infringe any copyright and does not violate any privacy rights.
- I declare that any authors' conflict of interest regarding statements presented into the manuscript does not exist.
- The authors declare that the procedures were followed according to the regulations established by the Clinical Research and Ethics Committee and to the Helsinki Declaration of the World Medical Association.
- The authors declare having followed the protocols in use at their working center regarding patient's data publication.

Author Guidelines

GUIDE FOR AUTHORS

Language

The title (and abstract and key words if applicable) must be submitted in both English and Portuguese.

Articles submitted to the Journal should be clearly written in Portuguese (from Portugal) and/or English of a reasonable standard.

Submissions that do not conform to these instructions may be returned for reformulation and resubmission.

Copyright

All articles in this journal are Open Access and meet the requirements of funding bodies or academic institutions.

Each article published in the Journal is published under the Creative Commons

Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License (CC BY-NC-ND 4.0). Articles can be read, downloaded, printed, and shared.

Submission of an article for publication implies the authors' consent to publication under the applicable Creative Commons license and the terms and conditions of the Publisher's Licensing Agreement.

It is the author's responsibility to obtain permission to reproduce illustrations, tables, etc. from other publications.

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement'. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Author rights: As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work.

The Journal reserves the right to use plagiarism detection software on any submitted material.

Article Processing Charge (APC)

There is no Article Processing Charge (APC).

Self-Archiving

It is permitted to authors of Open Access articles to post the final, published version of their article in Open Access repositories or on other websites, in accordance with the Creative Commons license.

Ethical Considerations

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [EU Directive 2010/63/EU](#) for animal experiments; Uniform Requirements for manuscripts submitted to [Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with Human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Publication of patient data and photographs must not enable the institution or individuals involved to be identified unless accompanied by written permission for their use from the individuals concerned.

For studies involving patients, a statement must be included to the effect that the study was conducted in accordance with the amended Declaration of Helsinki, that the local institutional review board or independent ethics committee approved the protocol, and that written informed consent was obtained from all patients. The name of the committee, the name of the chairperson of the committee (or the person who approved the protocol), the date of approval and the approval number should follow this statement in the Methods section. For multicentre studies, a list of the relevant approvals may be provided in a separate document to be published as supplementary material.

Privacy

The text, tables, figures, and supplementary data of submitted manuscripts must not contain any details identifying patients or study participants, including names, initials, date of birth, Social Security numbers, dates, or medical record numbers, unless written informed permission has been obtained from the patient, guardian, or next of kin and copies provided to the Journal prior to publication.

If photographs of patients are used, they must be accompanied by written permission for reproduction or must not enable the patient to be identified. Identifying details should be omitted if they are not essential, but patient data should never be altered or falsified in an attempt to attain anonymity.

Informed Consent and Patient Details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided. Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Permissions

All previously published and copyrighted material, including illustrations, diagrams and tables, must be accompanied by written permission for reproduction from the copyright holders.

Conflict of Interest

A conflict of interest exists when professional judgement concerning a primary interest may be influenced by a secondary interest (such as financial gain). Financial relationships are easily identifiable, but conflicts can also occur because of personal relationships or rivalries, academic competition, or intellectual beliefs (examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding). All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. All authors must disclose, in the cover letter, any actual or potential conflict of interest.

If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'.

Failure to disclose conflicts might lead to publication of a correction or even to retraction.

Clinical Trial Results

J SPEDM supports initiatives to improve reporting of clinical trials. This includes prospective registration of clinical trials in suitable publicly available databases. In line with [ICMJE guidelines](#), J SPEDM requires registration of all clinical trials that are reported in manuscripts submitted to its journals.

The ICMJE uses the World Health Organization (WHO) definition of a clinical trial, which is *"any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes"*. This definition includes phase I to IV trials. The ICMJE defines health-related interventions as *"any intervention used to modify a biomedical or health-related outcome"* and health-related outcomes as *"any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants"*.

Registration of Clinical Trials

Registration in a public trials registry is a condition for publication of clinical trials in this journal in accordance with International Committee of Medical Journal Editors ([ICMJE](#)) recommendations. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. A clinical trial is defined as any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects of health outcomes. Health-related interventions include any intervention used to modify a biomedical or health-related

outcome (for example drugs, surgical procedures, devices, behavioral treatments, dietary interventions, and process-of-care changes). Health outcomes include any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events. Purely observational studies (those in which the assignment of the medical intervention is not at the discretion of the investigator) will not require registration.

The trial registration number (TRN) and date of registration should be included as the last line of the manuscript abstract.

Registration of Systematic Reviews

J SPEDM supports the prospective registration of systematic reviews and encourages authors to register their systematic reviews in a suitable registry (such as [PROSPERO](#)). Authors who have registered their systematic review should include the registration number as the last line of the manuscript abstract.

Availability of Data

J SPEDM strongly encourages that all datasets on which the conclusions of the paper rely should be available to readers. We encourage authors to ensure that their datasets are either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main manuscript or additional supporting files, in machine-readable format (such as spreadsheets rather than PDFs) whenever possible. We require a data sharing statement at the end of every research manuscript. For trials of drugs or devices the statement must state, at a minimum, that the relevant anonymized patient level data are available on reasonable request from the authors.

Options for formatting the statement are suggested here:

"Data sharing: patient level data [and/or] full dataset [and/or] technical appendix [and/or] statistical code [and/or] available at [/doi] [with open access/with these restrictions] [from the corresponding author at]. Participants gave informed consent for data sharing [or ... consent was not obtained but the presented data are anonymized and risk of identification is low ... or consent was not obtained but the potential benefits of sharing these data outweigh the potential harms because ...]"

If no such further data are available, please use this wording: "Data sharing: no additional data available."

This option is not available for trials of drugs or devices.

Authors may be required to provide the raw data for research papers when they are under review and up to 10 years after publication.

Submission

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically).

All manuscripts must be accompanied by a cover letter. Assurance should be given in the cover letter that the manuscript is not under simultaneous consideration by any other publication. In the cover letter, the authors should declare their potential conflicts of interest and provide a statement on authorship.

To verify originality, your article may be checked by the originality detection service.

Submit your article

Please submit your article via <http://spedmjournl.com/>

Manuscript Preparation

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Publication Types

SPEDM J accepts the following publication types:

- a) Original articles reporting clinical or basic research;
- b) Review articles (including systematic reviews and meta-analyses) of clinical or basic-science topics;
- c) Clinical Case Studies/Case Reports;
- d) Images in Endocrinology;
- e) Editorials, which are written at the invitation of the Editor and consist of commentary on articles published in the journal or on subjects of particular relevance;
- f) Letters to the Editor, which consist of concise opinions on recently published articles;
- g) Current Perspective
- h) Guidelines. Please ensure that you select the appropriate article type from the list of options when making your submission.

Authors should indicate in the cover letter which manuscript type is being submitted for publication

Title page information

- **Title**

The title should be given in both Portuguese and English and should be concise, informative, contain no abbreviations and not exceed 120 characters. The title may include a subtitle with a maximum of 40 characters (including spaces).

- **Author names and affiliations**

Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Sponsors**

All entities that sponsored the work should be listed.

- **Corresponding author.**

Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

Present/permanent address. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's

name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

- **Abstract and Keywords**

A concise and factual abstract is required. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. The abstract must be written in both Portuguese and English. It should not contain abbreviations, references, or footnotes.

At the end of the abstract, a maximum of six keywords must be included, using the terminology appearing in “Medical Subject Headings ([MeSH](#))”.

- **Structured Abstract**

A structured abstract, by means of appropriate headings, should provide the context or background for the research and should state its purpose, basic procedures (selection of study subjects or laboratory animals, observational and analytical methods), main findings (giving specific effect sizes and their statistical significance, if possible), and principal conclusions. It should emphasize new and important aspects of the study or observations. The Introduction, Methods, Results and Conclusions will be followed.

- **Ethical disclosures**

The authors will also include in this title page, under the heading “Ethical disclosures” their statement on the Protection of human and animal subjects, the Confidentiality of Data, and the Right to privacy and informed consent.

The authors will mandatorily include one of the texts shown below for each one of the sections, depending on the characteristics of their article/research.

PROTECTION OF HUMAN SUBJECTS AND ANIMALS IN RESEARCH:

Protection of human and animal subjects. The authors declare that no experiments were performed on humans or animals for this investigation.

or

Protection of human and animal subjects. The authors declare that the procedures followed were in accordance with the regulations of the responsible Clinical Research Ethics Committee and in accordance with those of the World Medical Association and the Helsinki Declaration.

PATIENTS’ DATA PROTECTION:

Confidentiality of Data. The authors declare that they have followed the protocols of their work center on the publication of patient data and that all the patients included in the study have received sufficient information and have given their informed consent in writing to participate in that study.

or

Confidentiality of Data. The authors declare that no patient data appears in this article.

RIGHT TO PRIVACY AND INFORMED CONSENT:

Right to privacy and informed consent. The authors have obtained the informed consent of the patients and/or subjects mentioned in the article. The author for correspondence is in possession of this document.

or

Right to privacy and informed consent. The authors declare that no patient data appears in this article

Text

Original Articles

Original articles are fully documented reports of original clinical or basic research that must describe full sets of interesting, original experiments in current research. Original articles should include the following sections: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and Conclusions, Acknowledgements (if applicable), References, Tables and Figures.

Original articles should not exceed 4 000 words, excluding up to 6 tables or figures and up to 60 references. Structured abstract up to 350 words.

Article structure

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Review Articles

Review Articles are comprehensive papers that synthesize older ideas and suggest new ones. They cover broad areas. They may be clinical, investigational, or basic science in nature. Although usually commissioned, we do occasionally accept unsolicited review articles on important and topical subjects with a particular focus on recent advances. Before submitting a review, we ask that you send the editors a brief outline (no more than 500 words) indicating the importance and novelty of the subject, and why you are qualified to write it. An invitation to submit does not guarantee acceptance.

Review articles should not exceed 4 000 words, excluding up to 6 tables or figures and up to 100 references. Unstructured abstract up to 350 words.

Systematic Reviews

Systematic Reviews can be presented in the Introduction, Methods, Results, Discussion format. The subject must be clearly defined. The objective of a systematic review should be to produce an evidence-based conclusion. The Methods should give a clear indication of the literature search strategy, data extraction, grading of evidence and analysis. We strongly encourage authors to comply with the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses ([PRISMA](#)) guidelines.

Systematic review articles should not exceed 4 000 words, excluding up to 6 tables or figures and up to 100 references. Structured abstract up to 350 words.

Clinical Case Studies/Case Reports

Clinical Case Reports should include the following sections: Introduction, Clinical Case, and Discussion. Clinical case studies should not exceed 2 000 words excluding up to 25 references.

We strongly encourage authors to comply with the [CARE](#) guidelines.

Unstructured abstract up to 150 words.

Editorials

Editorials are normally written at the invitation of the Editor and consist of commentary on articles published in the journal or on subjects of particular relevance. Editorials should not exceed 1 500 words and 20 references and may include 1 table and 1 figure. Abstract is not required.

Letters to the Editor

Letter to the Editor should consist of critical comments on an article published in the Journal or a short note on a particular topic or clinical case. Letters to the Editor should not exceed 600 words and 10 references and may contain one figure or table. Abstract is not required.

Images in Endocrinology

This section is intended for the publication of clinical, radiological, histological, and surgical images related to endocrinology, diabetes or metabolism cases.

Title should be no more than eight words. Authors should be no more than four. Images should be of high quality and educational value. Up to four figures will be published. Captions should be brief and informative. Arrows or other symbols should be included as needed to facilitate understanding of the images. The text should not exceed 500 words, up to five references, and should include a short clinical history and relevant data from the physical examination, laboratory tests, and clinical progression as appropriate. Abstract is not required.

Current Perspective

This is the type of manuscript that is submitted upon invitation by the Editorial Board. It may cover a broad diversity of themes focusing on endocrinology, diabetes, metabolism and healthcare: current or emergent problems, management and health policies, history of medicine, society issues and epidemiology, among others. An Author that wishes to propose a manuscript in this section is requested to send an abstract to the Editor-in-Chief including the title and Author list for evaluation. The text should not exceed 1200 words, up to 10 references, two tables or two figures are allowed. Abstract is not required.

Guidelines

In general, published statements intended to guide clinical care (e.g. guidelines, practice parameters, recommendations, consensus statements and position papers) should describe:

- The clinical problem to be addressed,
- The mechanism by which the statement was generated,
- A review of the evidence for the statement (if available),

- The statement on practice itself.

To minimize confusion and to enhance transparency, such statements should begin with the following bulleted phrases, followed by brief comments addressing each phrase:

- What other guideline statements are available on this topic?
- Why was this guideline developed?
- How does this statement differ from existing guidelines?
- Why does this statement differ from existing guidelines?

Guidelines should not exceed 4 000 words, excluding up to 6 tables or figures and up to 100 references. Abstract up to 350 words.

Article type	Abstract	Keywords	Main text structure	Max. words	Tables/figures	References
Original Article	Max. 350 words; structured (Introduction and Objectives, Methods, Results and Conclusion(s)) Portuguese and English	Up to 6 Portuguese and English	Introduction; Methods; Results; Discussion; Conclusion(s); Acknowledgments, if any; References; and figure legends, if any	4000	Total up to 6	Up to 60
Review Article	Max. 350 words; unstructured Portuguese and English	Up to 6 Portuguese and English	Introduction; thematic sections at the discretion of the authors; Conclusion(s); Acknowledgments, if any; References; and	4000	Total up to 6	Up to 100

			figure legends, if any			
Systematic Review	Max. 350 words; structured Portuguese and English	Up to 6 Portuguese and English	PRISMA	4000	Total up to 6	Up to 100
Case Report	Max. 150 words; unstructured Portuguese and English	Up to 6 Portuguese and English	Introduction; Case report; Discussion; Conclusion(s) (optional); References; and figure legends, if any	2000	Total up to 4	Up to 25
Images in Endocrinology	None	Up to 6 Portuguese and English	Unstructured	500	Total up to 4	Up to 5
Editorial	None	None	Unstructured	1500	Total up to 2	Up to 20
Letter to the Editor	None	Up to 6 Portuguese and English	Unstructured	600	Total up to 1	Up to 10
Current Perspectives	None	Up to 6 Portuguese and English	Unstructured	1200	Total up to 2	Up to 10

Guidelines	Max. 350 words; unstructured Portuguese and English	Up to 6 Portuguese and English	Introduction; thematic sections at the discretion of the authors; Conclusion(s); Acknowledgments, if any; References; and figure legends, if any	4000	Total up to 6	Up to 100
------------	---	--------------------------------	--	------	---------------	-----------

References

• Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). The references should be listed using Arabic numerals in the order in which they are cited in the text.

References to personal communications and unpublished data should be made directly in the text and should not be numbered. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication. Journal names should be abbreviated according to Medline style.

References to articles published in journals should include the first author's name (surname and given name) followed by the names of the remaining authors, the article title, the journal name, and the publication year, volume, and pages.

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. Please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors.

The references list should be added as part of the regular text, never as a footnote. Specific codes from reference-management software are not acceptable.

• Format

A detailed description of the formats of different reference types can be found in the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Selected examples are given below.

List all authors if there are six or fewer; et al. should be added if there are more than six authors. Article title, journal name, year, volume, and pages.

Reference Management Software: The use of EndNote is recommended to facilitate formatting of citations and reference lists. The journal output style can be downloaded from <http://endnote.com/downloads/styles>.

• Reference style

Text: Indicate references by number(s) in superscript in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

- Isidori AM, Sbardella E, Zatelli MC, Boschetti M, Vitale G, Colao A, et al. Conventional and nuclear medicine imaging in ectopic Cushing's syndrome: a systematic review. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100:3231-44.

Reference to a book:

- Ware JE, Kosinski M, Dewey JE. How to score version 2 of the SF-36 Health Survey (standard & acute forms. Lincoln: Quality Metric Incorporated; 2000.

Reference to a book chapter:

- Castellano Barca G, Hidalgo Vicario M, Ortega Molina M. Transtorno del comportamiento alimentário. In: Castellano Barca G, Hidalgo Vicario M, Redondo Romero A, editores. *Medicina de la adolescência – atención integral*. 1ª ed. Madrid: Ergon; 2004. p.415-29.

Web references:

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to '[Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals](#)'.

Footnotes

Footnotes should be avoided. When essential, they should be numbered consecutively and appear at the foot of the appropriate page.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Abbreviations

Abbreviations (with the exception of those clearly well-established in the field) should be explained when they are first used.

Define all abbreviations except those approved by the International System of Units for length, mass, time, temperature, amount of substance, etc. Do not create new abbreviations for drugs, procedures, experimental groups, etc.

Abbreviations or acronyms should not be used in the title and abstract, but only in the text and in a limited way. Abbreviations should be defined at first use, in full, followed by the abbreviation in parentheses. Excessive and unnecessary use of acronyms and abbreviations should be avoided. ((All this is checked by our copy editors))

Units of measurement

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI).

Temperatures should be given in degrees Celsius (°C) and blood pressure in millimeters of mercury (mm Hg).

Drug names

Use generic names of drugs (first letter: lowercase) whenever possible. Registered trade names (first letter: uppercase) should be marked with the superscript registration symbol ® or ™ when they are first mentioned.

Tables and illustrations

Tables and figures must be numbered (e.g. Figure 1, Figure 2, Table 1) and submitted as separate files.

Captions should be numbered using Arabic numerals in the order in which they appear in the text (e.g., Table 1, Figure 1) and must provide sufficient information to enable their interpretation without consulting the text.

Ensure that each illustration and table has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Color illustrations are reproduced free of charge.

General points:

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

Formats:

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 500 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

Multimedia files

Multimedia files should be submitted in a separate file with the original manuscript and with all subsequent submissions. Multimedia material must meet production quality standards for publication without the need for any modification or editing. Acceptable files are MPEG, AVI or QuickTime formats.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Style and Usage

SPEDM J follows the American Medical Association Manual of Style¹ (10th ed) in matters of editorial style and usage. All accepted manuscripts are subject to copyediting for conciseness, clarity, grammar, spelling, and GE style. The corresponding author will receive page proofs to review before publication. If requests for changes are made after the authors have returned corrected proofs. Care should be exercised in this stage of review so as to avoid publication of errata or retractions.

Last revision 10 December 2016

Copyright Notice

The authors, when submitting this paper for publication, transfer to “Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo” the rights and copyrights of the article.