

## DIABETES MELLITUS TIPO I (INSULINO DEPENDIENTE): NUEVAS PERSPECTIVAS DE PROTECCION A LA CELULA BETA DEL PANCREAS\*

DECIO LAKS EIZIRIK

*"Professor Doutor, Disciplina de Endocrinología, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Brasil".*

### RESUMEN

La mejor comprensión de los factores etiológicos envueltos en la diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) trajo consigo la busca de agentes terapéuticos capaces de modificar la génesis de la diabetes, protegiendo y/o recuperando las células beta. Las tentativas hasta ahora realizadas, especialmente en modelos animales, pero también en pacientes humanos, incluyen: terapia antiviral, inmunoterapia, barredores de radicales libres y quelantes de hierro, inhibidores de la enzima poli (ADP-ribosa) sintetasa y dietas ricas en proteínas. (Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (Quito), 10: 29, 1985).

La diabetes tipo I (insulino dependiente DMID) representa cerca del 20o/o de todos los casos de diabetes mellitus, siendo caracterizado por la presencia de necrosis de las células beta del páncreas y deficiencia casi absoluta en la producción endógena de insulina (1).

La terapéutica convencional de la diabetes tipo I, envolviendo insulino terapia, dieta y ejercicios, consigue casi siempre controlar los signos y síntomas agudos de la enfermedad. Esta terapia, sin embargo, no consigue evitar que luego de 15 a 20 años de enfermedad, un gran número de pacientes presenten las llamadas complicaciones crónicas de la diabetes, micro y macroangiopáticas (2,3). Si consideramos que el pico de incidencia de la DMID ocurre alrededor de los 11-12 años (4), tendremos pacientes que con 30 años de edad corren serios riesgos de déficit visuales y manifestaciones de neuropatía periférica y central.

En los últimos años se afirma en la literatura el concepto de que un mejor control metabólico de la diabetes podría prevenir o retardar el apareamiento de estas complicaciones (2,5,6,7). Estos datos estimularon la busca de

un control cada vez mejor de la diabetes, teniendo como meta el retorno del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas a los niveles fisiológicos.

Esta búsqueda de un control óptimo de la DMID resultó en dos grandes líneas de investigación. La primera de ellas parte de la aceptación de la irreversibilidad de la lesión de las células beta y busca substituir la producción endógena de la insulina de una forma más fisiológica, con el uso de varias dosis diarias de insulina, bombas de infusión continua de insulina y trasplante de páncreas total o islotes aislados (8, 9, 10).

La segunda línea de investigación a ser sumariamente revisada en el presente artículo

*Dirección para correspondencia:*

*Prof. Dr. Décio L. Eizirik*

*Departamento de Clínica Médica H.C. - F.M. R.P. - Campus USP, 14.100 - Ribeirão Preto, SP, Brasil.*

*\* Basada en la conferencia dictada en el Curso Internacional "Avances Bioquímicos Aplicados en la Clínica" organizado por la Facultad de Ciencias Médicas, Quito, Ecuador, Mayo de 1984.*

lo, envuelve la tentativa de proteger los islotes de Langerhans de las agresiones que culminan en la DMID (11). Esta posibilidad de un tratamiento "etiológico" de la diabetes tipo I, aumentó mucho en los últimos años por tres factores básicos: 1) una mejor comprensión de la(s) etiología(s) de la DMID; 2) la comprobación de que la DMID puede no ser una patología de inicio súbito, existiendo la posibilidad de un largo período de latencia precediendo el inicio clínico de la enfermedad, detectable por la presencia de anticuerpos antiislotes en la circulación (13,14,15); 3) la existencia, en muchos casos de DMID, de un período transitorio de remisión de la diabetes (16), con recuperación parcial de la función de las células beta (17,18), lo que sugiere que inclusive después del diagnóstico clínico de la diabetes, todavía restan muchas células beta viables (19).

El beneficio potencial de esta intervención terapéutica precoz en la diabetes tipo I es la cura de la enfermedad, o por lo menos, una mejora de la reserva secretoria de insulina, facilitando el control metabólico de la diabetes y reduciendo el riesgo de las complicaciones crónicas (20,21). En estas investigaciones ha sido fundamental la existencia de modelos de diabetes insulino-dependiente en animales, inducidos por drogas, o del surgimiento espontáneo (22).

Las tentativas de tratamiento "etiológico" de la diabetes tipo I fueron, hasta el momento:

#### a. TERAPIA ANTIVIRAL

El eventual papel de patologías virales en la génesis de la diabetes tipo I, ya sea como causa directa o ya sea como iniciador de una reacción autoinmune, es sospechada a partir de observaciones en animales, datos clínicos y epidemiológicos (23, 24).

En animales, la administración de Interferón inmediatamente antes de la inoculación de virus lesivos a las células beta protegió el páncreas endócrino contra esta agresión (25,26). Curiosamente, ratones privados de timo (27) o

tratados con radioterapia sistemática (28) también mostraron resistencia a la acción diabético-génica de estos virus, sugiriendo que la diabetes sea parcial o totalmente dependiente de una reacción inmune inducida por las partículas virales, y no sólo el resultado de una infección pancreática directa.

En seres humanos fueron realizadas tres tentativas envolviendo la administración de interferón en las etapas iniciales de la DMID (29,30,31). En los tres experimentos no fue constatado ninguna mejora en la secreción endógena de insulina o en el control glicémico. Estos datos corroboran la idea de que la infección viral tenga eventual importancia en fases más precoces de la génesis de la diabetes, anteriores a la manifestación clínica de la enfermedad.

#### b. INMUNOSUPRESION

La hipótesis de que la DMID es una enfermedad con un importante componente auto-inmune es sugerida por la presencia de anticuerpos antiislotes, por la asociación entre ciertos antígenos HLA y la enfermedad, por la infiltración linfomonocitaria en los islotes de pacientes con diabetes recientes (insulinitis), por la asociación con otras patologías autoinmunes y por la presencia de modificaciones en las subpoblaciones linfocitarias en el inicio del cuadro (12,32,33).

Estos datos indujeron inicialmente tentativas de inmunosupresión en animales con diabetes autoinmune: los ratones BB Wistar y ratones sometidos a múltiples dosis de estreptozotocina (22). En los ratones BB Wistar, tratamiento con suero antilinfocitario, radioterapia sistémica, timentomía (34) y ciclosporina (35) fueron capaces de prevenir o reducir la severidad de la diabetes. En los ratones con diabetes e insulinitis secundaria a la estreptozotocina, el tratamiento con sueros antilinfocitario también se mostró capaz de prevenir el apareamiento de la enfermedad (36).

Las primeras tentativas de inmunosupresión en las fases iniciales de la diabetes humana involucraron el uso de levamisole (37), prednisona (38), plasmáferesis (39) y ciclo-

porina (40). Exceptuándose el tratamiento con levamisole (37), todos los otros indujeron alguna mejora en la secreción endógena de insulina. Los mejores resultados ocurrieron con el uso de ciclosporina, con 50o/o de los pacientes manteniéndose libres de la necesidad de insulino-terapia por meses (40). Estos efectos positivos de la ciclosporina fueron confirmados recientemente por otros autores (90). A pesar de estos resultados animadores, el uso de inmunosupresión en la diabetes fue blanco de severas críticas. Investigadores de la categoría de Rossini (41) y Bottazzo (32) consideran que las evidencias a favor de una etiología autoinmune para la mayoría de los casos de DMID no son todavía suficientes para justificar el uso de medidas inmunosupresoras, que traen consigo el riesgo de efectos colaterales tan o más lesivos que la propia diabetes. Más todavía, considerando la posible etiología viral en algunos casos, habría el riesgo teórico de agravamiento o deseminación de la virosis. Sin embargo, el asunto permanece polémico, y hay consenso entre los investigadores del área (42) que el uso de inmunosupresión en la diabetes tiene todavía carácter estrictamente experimental, y no se justifica su empleo en casos aislados, fuera de protocolos amplios de investigación.

Recientemente surgió una alternativa más promisoría de inmunoterapia en la DMID. Estudios de poblaciones linfocitarias en ratones BB Wistar mostraron que inmediatamente antes del inicio clínico de la diabetes, había linfocitopenia periférica (43,44), interesando especialmente linfocitos T supresores (45). A partir de estos datos, Rossini y cols, utilizando substitución de sangre total (46) o transfusión de linfocito T de ratones sin carga génica para la diabetes (47), consiguieron evitar el surgimiento de diabetes en los ratones BB Wistar.

Varios estudios en diabetes tipo I humana han mostrado imbalance y disminución en los niveles circulantes de linfocitos en el inicio del cuadro, especialmente de linfocitos T supresores (48,49,50). Estos datos abren la perspectiva de un ejemplo de lo ocurrido con los ratones BB Wistar, la posibilidad de una localización más

precisa de los defectos inmunológicos envueltos en la génesis de la diabetes, trayendo consigo un tratamiento específico, con substitución o complementación de las subpoblaciones linfocitarias comprometidas. Esa inmunomodulación substituiría con gran ventaja a la inmunosupresión amplia e inespecífica actualmente en uso.

### c. BARREDORES DE RADICALES LIBRES Y QUELANTES DEL HIERRO

Uno de los objetivos de las investigaciones sobre etiología de la DMID es la busca de los mecanismos moleculares por los cuales las células beta son lesionadas. En esta investigación, ha sido muy estudiada la acción de dos drogas diabotogénicas que actúan destruyendo selectivamente las células beta: aloxana y estreptozotocina (51). Si fuera posible demostrar una vía molecular común de acción de estas dos drogas, estructuralmente distintas, sería posible proponer un modelo más amplio, abarcando otras formas de diabetes.

El mecanismo de acción de aloxana envuelve la captación de la droga por la célula beta y, probablemente, la generación de radicales libres ( $H_2O_2$ ,  $O\cdot$  y  $OH\cdot$ ) tóxicos en reacciones catalizadas por el hierro (52,53,54). Estos radicales son también generados en reacciones inflamatorias, y posiblemente una reacción inflamatoria de los islotes de Langerhans está presente en el inicio de la diabetes tipo I humana (55). Estos datos llevaron a varios autores a investigar el efecto protector de barredores de radicales libres y quelantes del hierro (al quelar el hierro, sería bloqueada la catálisis de la reacción generadora de  $OH\cdot$ , el radical libre más tóxico para la célula) contra la acción diabotogénica de aloxana. Varios de estos barredores de radicales libres, como dimetil urea (53), superóxido dismutasa (56) y catalasa (57); y quelantes de hierro, como DETAPAC (58) y 1,10 fenantrolina (59) fueron capaces de proteger islotes de Langerhans "in vivo" e "in vitro", contra la acción citotóxica de la aloxana.

En relación a estreptozotocina, a pesar

que ha sido propuesto también la generación de radicales libres como el principal mecanismo de acción (60,61), no hay unanimidad en la literatura (62). Las tentativas de protección contra estreptozotocina con el uso de barredores de radicales libres, también han proporcionado resultados contradictorios (62,63,64,65,66).

Más recientemente, experimentos envolviendo la comparación de los mecanismos de acción de aloxana y estreptozotocina, en islotes aislados (67), fibroblastos humanos en cultivo (Hoffmann y Eizirik, comunicación personal) y ratones (59) sugirieron fuertemente que barredores de radicales libres y quelantes de hierro, protegen solamente contra la acción tóxica de aloxana, sin mostrar el mismo efecto en relación a estreptozotocina. Estos datos refuerzan la hipótesis de que no es la generación de radicales libres una vía final común de acción de las dos drogas.

En el único experimento que envolvió el uso de barredores de radicales libres en diabetes autoinmune, en ratones, la inyección de superóxido dismutasa no fue capaz de proteger al animal contra el desarrollo de diabetes (65).

#### d. INHIBIDORES DE LA ENZIMA POLI (ADP-RIBOSA) SINTETASA

La pregunta siguiente sería sobre donde actúan los radicales libres generados por aloxana. Estos radicales inducen quiebra en el DNA nuclear, con activación de la enzima reparadora poli (ADP-ribosa) sintetasa (62,68,69,70).

La estreptozotocina, talvez por acción alquilante (62), también produce quiebra en el DNA y activación de la misma enzima reparadora. Esta enzima utiliza NAD como sustrato, trayendo como consecuencia baja de los niveles de NAD intracelular (71,72). Con la baja de los niveles de NAD, hay disminución acentuada de la respiración celular, menor producción de ATP, parada en la síntesis proteica y, por fin, pérdida del balance iónico normal y muerte de la célula beta (60).

El bloqueo de la enzima poli (ADP-ribosa) sintetasa con agentes como la picolinamida

(62,68), nicotinamida y 3-aminobenzamida (67) fue capaz de proteger islotes de ratas "in vitro" contra la acción tóxica de aloxana y estreptozotocina, sugiriendo que la vía final común de la acción tóxica de las dos drogas talvez esté en los fenómenos que ocurren posteriormente a la quiebra del DNA nuclear.

Además, la nicotinamida se reveló también capaz de evitar el desarrollo de diabetes insulino-dependiente espontánea en ratones genéticamente susceptibles a la enfermedad (73). Estos resultados parecen bastante promisorios, y talvez en los próximos años tengamos los primeros resultados del efecto de estas drogas protectoras en la diabetes humana.

#### e. DIETAS HIPERPROTEICAS

Todos los procedimientos discutidos hasta el momento envuelven el uso de drogas, muchas de ellas tóxicas o con efectos secundarios todavía desconocidos. Además las tentativas se refieren siempre a la protección de las células beta todavía viables en el momento del diagnóstico clínico de la diabetes. A partir de esto se buscó estudiar efectos nutricionales que pudieran disminuir la sensibilidad de la célula beta a la agresión diabetogénica o, más todavía, estimular la recuperación funcional de las células beta remanentes.

Estudios recientes mostraron que islotes de ratas adaptadas a dietas ricas en proteínas, libre de carbohidratos (HP) (caseína, 70o/o; carbohidratos, 0o/o; lípidos, 8o/o) presentan protección contra la acción diabetogénica de estreptozotocina (STZ) "in vivo" (74) e "in vitro". Esta protección no es exclusiva de la caseína, pudiendo ocurrir también con dieta hiperproteica a base de soya (76) y se mantiene inclusive con reducción discreta en el contenido proteico e introducción de 20o/o de carbohidratos (77). En estas ratas HP inyectadas con STZ, además de mantener los niveles glicémicos e insulínicos prácticamente normales, hay preservación de la arquitectura de los islotes de Lagerhans, con conservación de la producción normal entre células beta y alfa (78). Efecto

protector similar de la dieta HP fue también observado en ratones portadores de diabetes espontánea (79).

Esta protección inducida por la administración de la dieta HP previamente a la inyección de STZ, probablemente se relaciona con los altos niveles de aminoácidos de cadena ramificada presentes en el plasma de estos animales (80).

Además de la protección previa, la administración de la dieta HP solamente después de la inducción de la diabetes por STZ también induce marcada mejora del cuadro de diabetes (81, 82, 83), inclusive con aumento en las reservas de insulina pancreática y mejora en la morfología de los islotes (80, 81). Sin embargo, el efecto de la dieta parece limitada a situaciones en que todavía persiste un número mínimo de células beta viables, pues en ratas BB Wistar, con diabetes espontánea severa de más de 5 semanas, la administración de dieta HP no fue capaz de aumentar las reservas pancreáticas de insulina, a pesar de haber alguna mejora en el control de la diabetes (80, 84).

Estos efectos protectores y recuperadores de la dieta HP parece que no se restringue a la acción diabetogénica de la STZ, pues ya ha sido referido el hecho de que animales carnívoros (por tanto naturalmente en una dieta HP) son resistentes a la acción diabetogénica de aloxana (85).

En seres humanos, dietas ricas en proteínas inducen mejora del control metabólico de la diabetes en casos de diabetes tipo II, no insulino dependientes (86, 87).

Estas dietas, sin embargo, son de difícil aceptación por pacientes de nuestro medio cultural (Eizirik, comunicación personal) y traen pesada carga metabólica para el riñón: hay aumento de 8 a 10 veces en la excreción urinaria de urea y aumento de 50 por ciento en el peso renal en ratas mantenidas por 15 días en dieta HP (88). A largo plazo este efecto podría, teóricamente, contribuir para la disfunción renal de la diabetes (89).

De esta forma, el paso siguiente en esta línea de investigación comprende una mejor

comprensión de la acción de la dieta y la búsqueda de el (los) componente (s) de la dieta HP envueltos en los efectos de protección y recuperación. Una vez aislados esos componentes, tendremos en las manos un tratamiento teóricamente capaz de funcionar como un adyuvante a la terapia inicial de la DMID, contribuyendo para la preservación y recuperación funcional de las células beta remanentes.

Estas tentativas de terapia precoz de la diabetes tipo I, a pesar del carácter todavía estrictamente experimental, están abriendo nuevas perspectivas para el tratamiento de la DMID. A medida que el conocimiento de la etiología de la DMID aumente, aumentarán en paralelo las posibilidades de curar o prevenir esta enfermedad.

Al momento, la mejor opción terapéutica para la DMID sigue siendo el meticuloso control de la diabetes, a través de insulinoterapia, dieta y ejercicios. Sin embargo, es bastante probable que en los años venideros terapias como "Inmunomodulación precoz de la diabetes", "Dietas ricas en aminoácidos" o "transplantes de islotes aislados" pasen a ser parte actuante de nuestro arsenal terapéutico.

## BIBLIOGRAFIA

1. National Diabetes Data Group: Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*, 28: 1039-1057, 1979.
2. Pirart, J.: Diabetes mellitus and its degenerative complications: a prospective study of 4400 patients observed between 1947 and 1983. *Diabetes Care*, 1: 168-188, 252-263, 1978.
3. Gross, J.L., Eizirik, D.L. and Kruter, R.H.E.: Duracao do diabete melito e complicacoes microangiopáticas. *Rev. Ass. Med. Brasil*, 28: 140-142, 1982.
4. Zimmet, P.: Epidemiology of Diabetes Mellitus. In: Ellenberg, M. and Rifkin, H. (eds.): *Diabetes Mellitus: Theory and practice*, 3a. ed., New York, Excerpta Medica Co, 1983, pp. 451-468.

5. West, K. M., Ahuja, M. M. S., Bennet, P. H., Grab, B., Grabauskas, V., Acosta, O. M., Fuller, J. H., Jarret, R. J., Keen, H., Kosaka, K., Krolewski, K. S., Miki, W., Schliack, V. and Teuscher, A.: Interrelationships of microangiopathy, plasma glucose and other risk factors in 3583 diabetic patients: a multinational study. *Diabetologia*, 22: 412-420, 1982.
6. Steno Study Group.: Effect of months of strict metabolic control on eye and kidney function in insulin-dependent diabetics with background retinopathy. *Lancet*, 1: 121-124, 1982.
7. Spiro, R. G.: Search for a biochemical basis of diabetic microangiopathy. *Diabetologia*, 12: 1-14, 1976.
8. Dupré, J., Chamption, M. and Rodger, N. W.: Advances in insulin delivery in the management of diabetes mellitus. *Clin. Endocrinol. Metab.*, 11: 525-548, 1982.
9. Prowse, S. J., Lafferty, K. J., Simeonovic, C. J., Agostino, M., Bowen, K. M. and Steele, E. J.: The reversal of diabetes by pancreatic islet cell transplantation. *Diabetes*, 31 (suppl. 4): 30-37, 1982.
10. Sutherland, D. E. R.: Report of international human pancreas and islet transplantation registry cases through 1981. *Diabetes*, 31 (suppl. 4): 112-116, 1982.
11. Elmirik, D. L. and Migliorini, R. H.: New trends in diabetes research: the search for an etiologically oriented treatment for type I diabetes mellitus. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 16: 381-383, 1983.
12. Cahlli, G. F. and McDevitt, H. O.: Insulin-dependent diabetes mellitus: the initial lesion. *N. Engl. J. Med.*, 304: 1454-1465, 1982.
13. Gorsuch, A. N., Spencer, K. N., Lister, J., Dean, B. M., McNally, J. M., Bottazzo, G. F. and Cudworth, A. G.: Evidence for a long pre-diabetic period in type I (insulin dependent) diabetes mellitus. *Lancet*, 2: 1363-1365, 1985.
14. Srikanta, S., Ganda, O. P., Elsenbarth, G. S. and Soeldner, J. S.: Islet-cell antibodies and beta-cell function in monozygotic triplets and twins initially discordant for type I diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, 308: 322-325, 1983.
15. Srikanta, S., Ganda, O. P., Jackson, R. A., Gleason, R. E., Kaldany, A., Garovoy, M. P., Milford, E. L., Carpenter, C. B., Soeldner, J. S. and Elsenbarth, G. S.: Type I diabetes mellitus in monozygotic twins: chronic progressive beta cell dysfunction. *Ann. Inter. Med.*, 99: 320-326, 1983.
16. White, P.: The child with diabetes. *Med. Clin. North. Amer.*, 49: 1069-1079, 1965.
17. Heinze, E., Belsher, W., Keller, L., Winkler, G., Toller, W. H. and Pfeiffer, E. F.: C-peptide secretion during the remission phase of juvenile diabetes. *Diabetes*, 27: 670-676, 1978.
18. Ludvigsson, J. and Heding, L. G.: Beta cell function in children with diabetes. *Diabetes*, 27 (suppl. 1): 230-234, 1978.
19. Foulis, A. K. and Stewart, J. A.: The pancreas in recent-onset type I (insulin dependent) diabetes mellitus: insulin content of islets, insulinitis and associated changes in the exocrine acinar tissue. *Diabetologia*, 26: 456-461, 1984.
20. Binder, C. and Faber, O. K.: Residual beta-cell function and its metabolic consequences. *Diabetes*, 27 (suppl. 1): 226-229, 1978.
21. Lutterman, J. A., Benraad, T. J. and Laar, A. V.: The relationship between residual insulin secretion and metabolic stability in type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*, 21: 99-102, 1981.
22. Mordes, J. P. and Rossini, A. A.: Animal models of diabetes. *Am. J. Med.*, 70: 353-360, 1981.
23. Rayfield, E. J. and Seto, Y.: Viruses and the pathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes*, 27: 1126-1140, 1978.
24. Toniolo, A. and Onodera, T.: Viruses and diabetes. In: Andreani, D., Di Mario, U., Federlin, K. F. and Heding, L. G. (eds.): *Immunology in diabetes*, London, Kimp-ton Medical Publications, pp. 71-93, 1984.

25. Wilson, G. L., Bellomo, S. C. and Craighead, J. E.: Effect of interferon on encephalomyocarditis virus infection of cultured mouse pancreatic B cell. *Diabetologia*, 24: 38-41, 1983.
26. Vialettes, B., Baume, D., Charpin, C., Mayer-Guignard, D. I. and Vaque, P. H.: Assessment of viral and immune factors in EMC virus induced diabetes: effects of cyclosporin A and interferon. *J. Clin. Lab. Immunol.*, 10: 35-40, 1983.
27. Buschard, K., Hastrup, N. and Rygaard, J.: Virus induced diabetes mellitus in mice and the thymus-dependent immune system. *Diabetologia*, 24: 42-46, 1983.
28. Jansen, F. K., Munterfering, H. and Schmidt, W. A. K.: Virus induced diabetes and the immune system. Suggestion that appearance of diabetes depends on the immune reactions. *Diabetologia*, 13: 545-549, 1977.
29. Rand, R. H., Rosenbloom, A. L., MacLaren, N. K., Silverstein, J. H., Riley, W. J., Butterworth, B. E., Yoon, J. W., Rubenstein, A. H. and Merigan, T. H.: Human leukocyte interferon treatment of two children with insulin-dependent diabetes. *Diabetologia*, 21: 116-119, 1981.
30. Pelkonen, R., Aro, A., Cantell, K., Haataja, M., Huttunen, J., Koivisto, V., Mustajoki, P. and Seppala, F.: Remissions in type I (insulin-dependent) diabetes: influence of interferon and continuous subcutaneous insulin infusion. *Diabetologia*, 23: 190, 1982.
31. Koivisto, V. A., Aro, A., Cantell, K., Haataja, M., Huttunen, J., Karonen, S. L., Mustajoki, P., Pelkonen, R. and Sepala, P.: Remissions in newly diagnosed type I (insulin-dependent) diabetes: influence of interferon as an adjunct to insulin therapy. *Diabetologia*, 27: 193-197, 1984.
32. Bottazzo, G. F.: Beta cell damage in diabetic insulinitis: are we approaching a solution? *Diabetologia*, 26: 241-249, 1984.
33. Galluzzo, A., Giordano, C., Rubino, G. and Bompiani, G. D.: Immunoregulatory T-lymphocyte subset deficiency in newly diagnosed type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 26: 426-430, 1984.
34. Like, A. A., Butler, L., Williams, R. M., Appel, M. L., Weringer, E. J. and Rossini, A. A.: Spontaneous autoimmune diabetes mellitus in the BB rat. *Diabetes*, 31 (suppl. 1): 7-13, 1982.
35. Laupacis, A., Stiller, C. R., Gardell, G., Keown, R., Dupre, J., Wallace, A. C. and Thibert, P.: Cyclosporin prevents diabetes in BB Wistar rats. *Lancet*, 1: 10-12, 1983.
36. Rossini, A. A., Williams, R. M., Appel, M. C. and Like, A. A.: Complete protection from low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Nature*, 276: 182-184, 1978.
37. Cobb, W. E., Mollitch, M. and Reichlin, S.: L-namisolone in insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, 303: 1065-1066, 1980.
38. Elliot, R. B., Crossley, J. R., Berryman, C. C. and James, A. G.: Partial preservation of pancreatic beta-cell function in children with diabetes. *Lancet*, 2: 1-4, 1981.
39. Ludvigsson, J., Lise, H. and Gudrun, L.: Plasmapheresis in the initial treatment of juvenile diabetes. *Acta Endocrinol.*, 98 (suppl. 254): 40, 1981.
40. Stiller, C. R., Dupré, J., Gent, M., Jenner, M. R., Keown, P. A., Laupacis, A., Martell, R., Rodger, N. W., Graffernried, B. V. and Wolfe, B. M. J.: Effects of cyclosporine immunosuppression in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. *Science*, 223: 1162-1367, 1984.
41. Rossini, A. A.: Immunotherapy for insulin-dependent diabetics?. *N. Engl. J. Med.*, 308: 333-335, 1983.
42. Diabetes Research program, N.I.H.: Summary of a workshop on immunosuppression in the management of type I diabetes mellitus (IDDM). *N. Engl. J. Med.*, 309: 1199-1200, 1983.
43. Poussier, P., Nakhouda, A. F., Falk, J. A., Lee, C. and Marliss, E. B.: Lymphopenic and abnormal lymphocyte subsets in the "BB" rat: relationships to the diabetes syndrome. *Endocrinology*, 110: 1825-1827, 1982.
44. Jackson, R., Rassi, N., Crump, T., Haynes, B. and Eisenbarth, G. S.: The BB diabetic rat:

- profound T-cell lymphocytopenia. *Diabetes*, 30: 887, 889, 1981.
45. Naji, A., Silvers, W. K., Kimura, H., Bellgran, D., Markman, J. F. and Barber, C. F.: Analytical and functional studies on the T cell of untreated and immunologically tolerant diabetes-prone BB rats. *J. Immunol.*, 130: 2168-2172, 1983.
  46. Rossini, A. A., Mordes, J. P., Pelletier, A. M., and Like, A. A.: Transfusions of whole blood prevent spontaneous diabetes mellitus in the BB/W rats. *Science*, 219: 975-977, 1983.
  47. Rossini, A. A., Faustman, D., Woda, B. A., Like, A. A., Szymanski, I. and Mordes, J. P.: Lymphocyte transfusions prevent diabetes in the Bio-Breeding/Worcester rat. *J. Clin. Invest.*, 74: 39-46, 1984.
  48. Gupta, S., Fikring, S. M., Khana, S. and Orti, E.: Deficiency of suppressor T-cells in insulin-dependent diabetes mellitus. *Immunol. Lett.*, 4: 289-294, 1982.
  49. Pozzili, P., Zuccarini, O., Iavicoli, M., Andreani, D., Sensi, M., Spencer, K. M., Bottazzo, G. F., Beverley, P. C. L., Kyner, J. R. and Cudworth, A. G.: Monoclonal antibodies defined abnormalities of T-lymphocytes in type I diabetes. *Diabetes*, 32: 91-94, 1983.
  50. Quinon-Debrie, M. C., Debray-Sachs, M., Dardenne, M., Czernichow, P., Assan, R. and Bach, J. F.: Anti-islet cellular and humoral immunity, T-cell subsets and thymic function in type I diabetes. *Diabetes*, 34: 373-379, 1985.
  51. Rerup, C. C.: Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol. Rev.*, 22: 485-518, 1970.
  52. Heikkila, R. E., Wiston, B., Cohen, G. and Barden, H.: Alloxan-induced diabetes-evidence for a hydroxyl radical as a cytotoxic intermediate. *Biochem. Pharmacol.*, 25: 1085-1092, 1976.
  53. Heikkila, R. E. and Cabbat, F. A.: Protection against alloxan-induced diabetes in mice by the hydroxyl radical scavenger dimethyl-urea. *Eur. J. Pharmacol.*, 52: 57-60, 1978.
  54. Grankvist, K., Marklund, S., Sehlin, J. and Taljedal, J. B.: Superoxide dismutase, catalase and scavengers of hydroxyl radicals protect against the toxic action of alloxan on pancreatic islet cells in vitro. *Biochem. J.*, 182: 17-25, 1979.
  55. Grankvist, K., Marklund, S. and Taljedal, I. B.: Studies on the prophylactic effect of superoxide dismutase against alloxan diabetes. *Acta Endocrinol.*, 98 (suppl. 245): 22, 1981.
  56. Grankvist, K., Marklund, S. and Taljedal, I. B.: Superoxide dismutase is a prophylactic agent against alloxan diabetes. *Nature*, 294: 158-160, 1981.
  57. Fischer, I. J. and Hamburger, S. A.: Inhibition of alloxan action in isolated pancreatic islets by superoxide dismutase, catalase and a metal chelator. *Diabetes*, 29: 213-216, 1980.
  58. Grankvist, K. and Marklund, S. L.: Opposite effects of two metal-chelators on alloxan induced diabetes in mice. *Life Sciences*, 33: 2535-2540, 1983.
  59. Fizirik, D. L., de Lucio, M. A., Boschero, A. C. and Hoffmann, M. E.: 1,10 Phenantroline a metal chelator, protects against alloxan but not streptozotocin induced diabetes. *Life Sciences*, Sometido a publicación, 1985.
  60. Sandler, S. and Swenne, J.: Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets in vitro. *Diabetologia*, 25: 444-447, 1983.
  61. Sandler, S., Welsh, M. and Andersson, A.: Streptozotocin induced impairment of islet beta-cell metabolism and its prevention by a hydroxyl radical scavenger and inhibitors of poly (ADP-ribose) synthetase. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 53: 392-400, 1983.
  62. Uchigata, Y., Yamamoto, H., Kawamura, A. and Okamoto, H.: Protection by superoxide dismutase, catalase and poly (ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan- and Streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J. Biol. Chem.*, 257: 6084-6088, 1982.

63. Robbins, M. J., Sharp, R. A., Slonim, A. E. and Burr, I. M.: Protection against streptozotocin-induced diabetes by superoxide dismutase. *Diabetologia*, 18: 55-58, 1980.
64. Sandler, S. and Andersson, T.: The partial protective effect of the hydroxyl radical scavenger dimethyl urea on streptozotocin-induced diabetes in the mouse in vivo and in vitro. *Diabetologia*, 23: 374-378, 1982.
65. Gold, G., Manning, M., Heldt, A., Nowlain, R., Pettit, J. R. and Grodsky, G. M.: Diabetes induced with multiple subdiabetogenic doses of streptozotocin. Lack of protection by exogenous superoxide dismutase. *Diabetes*, 30: 634-638, 1981.
66. Gandy, S. M., Buse, M. G. and Crouch, R. K.: Protective role of superoxide dismutase against diabetogenic drugs. *J. Clin. Invest.*, 70: 650-658, 1982.
67. Wilson, G. L., Patton, N. J., McCord, J. M., Mullins, D. W. and Mossman, B. T.: Mechanisms of streptozotocin and alloxan-induced damage in rat B cells. *Diabetologia*, 27: 587-581, 1984.
68. Yamamoto, H., Uchigata, Y. and Okamoto, H.: DNA strand breaks in pancreatic islets by "in vivo" administration of alloxan or streptozotocin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 103: 1014-1020, 1981.
69. Okamoto, H.: Regulation of proinsulin synthesis in pancreatic islets and a new aspect to insulin-dependent diabetes. *Mol. Cell. Biochem.*, 37: 43-61, 1981.
70. Yamamoto, H., Uchigata, Y. and Okamoto, H.: Streptozotocin and alloxan induced DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*, 294-286, 1981.
71. Lazarus, S. S. and Shapiro, S. H.: Influence of nicotinamide and pyridine nucleotides on streptozotocin and alloxan-induced beta-cell toxicity. *Diabetes*, 24: 499-506, 1973.
72. Akpan, J. O., Wright, P. H. and Dulin, W. E.: Effect of diabetogenic nitrosourea on the activity of the pentose phosphate shunt in isolated islets. *Acta Diabetol. Lat.*, 19: 37-47, 1982.
73. Yamada, K., Nonaka, K., Hanafusa, T., Miyazaki, A., Toyoshima, H. and Tarui, S.: Prevention and therapeutic effects of large-dose nicotinamide injections on diabetes associated with insulinitis. *Diabetes*, 31: 749-753, 1982.
74. Eizirik, D. L. and Migliorini, R. H.: Reduced diabetogenic effect of streptozotocin in rats previously adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet. *Diabetes*, 33: 383-388, 1984.
75. Eizirik, D. L., Boschero, A. C. and Migliorini, R. H.: Previous adaptation to a high protein diet protects against streptozotocin-induced inhibition of insulin release by isolated rat islets. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 18: 233-235, 1985.
76. Eizirik, D. L. and Migliorini, R. H.: Protection against diabetes by high protein diets: effect of a vegetable protein source (soya). *Nutr. Rep. Inter.*, "in press", 1985.
77. Eizirik, D. L. and Migliorini, R. H.: Protection against streptozotocin diabetes by high-protein-diets: influence of protein source and carbohydrate content. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 17: 467, 1984.
78. Eizirik, D. L., Haddad, A. and Migliorini, R. H.: Reduced diabetogenic effect of streptozotocin in rats adapted to a high protein diet: studies of serum and pancreas insulin and of islet immunocytochemistry. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 16: 499, 1983.
79. Leiter, E. H., Coleman, D. L., Einsenstein, A. B. and Strack, I.: Dietary control of pathogenesis in C 57 BL/KSJ db/db diabetic mice. *Metabolism*, 30: 554-562, 1981.
80. Eizirik, D. L.: Ação de dieta ricas em proteína sobre o surgimento e evolução do diabete experimental em ratos. *Tese de Doutorado*, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, São Paulo, Brasil, 1984.
81. Eizirik, D. L. and Migliorini, R. H.: Reduced diabetogenic effect of streptozotocin in rats adapted to a high protein diet: immediate protection versus subsequent recovery. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 16: 497, 1983.
82. Siegel, E. G., Trapp, V. E., Wolheim, C. B., Renold, A. E. and Schmidt, F. H.: Bene-

- fical effects of low-carbohydrate-high-protein diets in long term diabetic rats. *Metabolism*, 29: 421-428, 1980.
83. Schmidt, F. H., Siegel, E. G. and Trapp, V. F.: Metabolic and hormonal investigation in long term streptozotocin rats on different diet regimens. *Diabetologia*, 18: 161-168, 1980.
84. Eizirik, D. L., Tze, W. J., Tai, J. and Migliorini, R. H.: Efeito de uma dieta rica em proteínas (HIP) na evolução do diabetes espontâneo em rato "BB" Wistar. *Arg. Brasil. Endocrinol. Metab.*, 29: 4, 1985.
85. Migliorini, R. H., Linder, C., Veiga, J. A. S., Moura, J. L., Kettelhut, I. C., Roselino, J. E. S., Petenusci, S. O. and Eizirik, D. L.: Resistência a drogas diabetogênicas em animais carnívoros ou submetidos a dietas hiperprotéicas. *Rev. Ciência e Cult.*, 36: 1750-1754, 1984.
86. Seino, Y., Seino, S., Ikeda, M., Matsukura, S. and Imura, H.: Beneficial effects of high protein diet in treatment of mild diabetes. *Human. Nutr. Appl. Nutr.*, 37: 226-230, 1983.
87. O'Dea, K.: Marked improvement in carbohydrate and lipid metabolism diabetic Australian Aborigenes after temporary reversion to traditional lifestyle. *Diabetes*, 33: 596-603, 1984.
88. Eizirik, D. L. and Migliorini, R. H.: Water and urea excretion in normal and diabetic rats fed a high protein diet. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 15: 293, 1982.
89. Brenner, B. M., Meyer, T. W. and Hostetter, T. H.: Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease. *N. Engl. J. Med.*, 307: 652-659, 1982.
90. Assan, R., Debray-Sachs, M., Laborie, C., Chatenoud, L., Feutren G., Quiniou-Debrie, M. C., Thomas, G. and Bach, J. F.: Metabolic and immunological effects of cyclosporin in recently diagnosed type I diabetes mellitus. *Lancet*, 1: 67-71, 1985.