

Anticorpos na Diabetes Mellitus Tipo 1

Antibodies in Type 1 Diabetes Mellitus

S. Ramalho¹, R. Nortadas²

1 – Serviço de Medicina do Hospital Garcia de Orta, Almada, Portugal.

2 – Serviço de Medicina do Hospital Garcia de Orta, Coordenadora da Consulta de Medicina/Diabetes do Hospital Garcia de Orta, Almada, Portugal.

Resumo

Os anticorpos contra os ilhéus pancreáticos parecem assumir um papel na fisiopatologia da diabetes *mellitus* tipo 1 e são dos poucos marcadores existentes que traduzem a ocorrência do processo patogénico de autoimunidade. Existem anticorpos contra diferentes antígenos e o processo de seroconversão parece relacionar-se com a genética de cada indivíduo. Os anticorpos utilizados na prática clínica têm como antígenos-alvo a insulina, a descarboxilase do ácido glutâmico 65, a proteína 2 associada ao insulinooma e o transportador 8 do zinco. Podem ser utilizados quer como auxiliares na distinção entre Diabetes tipo 1 e tipo 2 ou no contexto de deteção precoce da Diabetes tipo 1, a fim de prevenir as manifestações mais graves da doença bem como antecipar o ensino sobre as manifestações clínicas e complicações da mesma.

Neste artigo é apresentada uma revisão da literatura sobre o processo de autoimunidade e a utilização dos anticorpos na Diabetes *mellitus* tipo 1.

Palavras-chave: diabetes tipo 1; anticorpos; IAA; GAD65; IA-2; ZnT8; imunologia; deteção precoce.

Abstract

The anti-islet cell antibodies seem to have a function in type 1 diabetes *mellitus* pathogenesis and are some of the few known markers that translate the immune process. There are antibodies against different antigens and the seroconversion process seems to be related with each individual genetics. The antibodies used in clinical practice are the following: anti insulin, anti-glutamic acid decarboxylase 65, anti-insulinoma antigen 2 and anti-zinc transporter 8. They can be used to differentiate between type 1 and type 2 Diabetes. They can also be used for early detection and diagnosis of type 1 Diabetes in order to prevent life-threatening clinical presentations and educate patients about the symptoms and complications of the disease.

The aim of this article is to review the auto-immune process and the use of autoantibodies in type 1 Diabetes *mellitus*.

Keywords: type 1 diabetes; antibodies; IAA; GAD65; IA-2; ZnT8; immunology; early detection.

> INTRODUÇÃO

A Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença cuja patologia se relaciona, entre outros, com um processo autoimune. Esta hipótese foi colocada no início da década de 1960 e a “diabetes juvenil” foi oficialmente listada como uma patologia autoimune em 1963. No entanto, foi apenas em 1974 que se demonstrou a existência de anticorpos contra os ilhéus pancreáticos.⁽¹⁾ Desde então

foram identificados diferentes tipos e realizados estudos populacionais na tentativa de perceber como é que estes anticorpos se relacionam com o processo patológico da Diabetes tipo 1 e qual a sua utilidade clínica.

> FISIOPATOLOGIA DA DIABETES MELLITUS TIPO 1

A DM1 é uma doença crónica em que ocorre perda de função das células beta pancreáticas, o que por sua vez leva a diminuição da secreção de insulina e hiperglicemia. Na maioria dos casos (70-90%)⁽²⁾ é de etiologia autoimune, designando-se de diabetes tipo 1A. Nos restantes casos ocorre uma destruição não autoimune das células beta e designa-se de diabetes tipo 1B.

Esta destruição autoimune de células beta pancreáticas ocorre em indivíduos geneticamente suscetíveis e eventualmente expostos a determinados fatores ambientais desencadeantes do processo patológico.

CORRESPONDÊNCIA/CORRESPONDENCE

Sara Ramalho
Serviço de Medicina
Hospital Garcia de Orta
Av. Torrão da Silva
2805-267 Almada
Portugal
Telef./Phone: 212726797
E-mail: sara.iaramalho@gmail.com

Autoimunidade

O processo patológico autoimune que decorre na diabetes tipo 1A pode ser promovido por múltiplos fatores, não estando estes completamente determinados.

O aparecimento do primeiro anticorpo traduz a interação entre células dendríticas, células B ativadas e células T CD4+ e CD8+. As células dendríticas e células B são células apresentadoras de antigénio, através do complexo major de histocompatibilidade (MHC). A exposição das células B aos antigénios da célula beta resulta na produção de anticorpos específicos para esses antigénios e na ativação de células TCD4+ e CD8+ específicas para o tecido pancreático. ⁽²⁾ Apesar de parecer não restarem dúvidas sobre a participação dos anticorpos na patogénese desta doença, ainda não estão totalmente esclarecidos os mecanismos através dos quais o processo se desenvolve. O fato de determinados anticorpos se relacionarem com perfis genéticos de risco é um indício do seu envolvimento na destruição da célula beta pancreática. Adicionalmente, há outras evidências indiretas como o fato dos anticorpos anti-insulina normalmente estarem presentes e com elevada titulação em grande percentagem de crianças com menos de 5 anos de idade que progridem para doença clínica, bem como a correlação entre o número de anticorpos e a progressão da doença. ⁽³⁾ Por outro lado, os casos raros de indivíduos com anticorpos positivos mas sem doença clínica, vêm questionar a correlação direta e exclusiva do papel imunológico na diabetes tipo 1A.

Os anticorpos anti célula beta funcionam como biomarcadores do processo fisiopatológico antes de existirem manifestações clínicas. Após início de doença clínica, o marcador histológico da DM1 é a *insulinite*, que consiste num processo inflamatório com infiltrado de células imunes nos ilhéus e tecido circundante. Estas alterações são dispersas, apresentam geralmente um padrão em mosaico e não atingem todos os ilhéus. ⁽²⁾

Ainda há muito por esclarecer na fisiopatologia da DM1. Não está completamente determinado se se trata de uma inflamação crónica de baixa intensidade mediada pelas células T nos ilhéus ou pelo contrário de uma perda rápida de células beta devido a um infiltrado inflamatório agudo que ocorre previamente à fase clínica. ⁽²⁾ Adicionalmente também é duvidoso se o comprometimento da secreção de insulina é apenas devida à diminuição de massa de células beta ou se também envolve disfunção destas células. ⁽²⁾ Os modelos animais estudados (mais frequentemente os ratinhos com diabetes não obesos – “NOD mice”), não reproduzem totalmente a patogénese humana, pelo que ainda é necessária mais

investigação para melhor esclarecimento da fisiopatologia da DM1.

Genética

A DM1 é uma doença poligénica, no entanto com baixa penetrância, ⁽²⁾ o que significa que nem todos os indivíduos portadores de determinado genótipo irão expressar o fenótipo correspondente. No entanto, o processo fisiopatológico tem tendência a desenvolver-se em indivíduos com maior predisposição genética. Os genes que conferem maior suscetibilidade para a doença são os do MHC, nomeadamente os da região do antigénio leucocitário humano (HLA) presentes no braço curto do cromossoma 6. Os haplotipos HLA-DR4-DQ8 e HLA-DR3-DQ2 são os que conferem maior risco de desenvolver a doença nas populações ocidentais, e por isso também os mais associados ao desenvolvimento de anticorpos anti célula beta. ⁽²⁾ Mais de 90% das pessoas com DM1 têm um destes dois haplotipos e cerca de 30% têm os dois. ⁽⁴⁾ Existem também alguns alelos que conferem menor risco de desenvolver a doença ou que podem desempenhar um papel protetor. ⁽⁵⁾ Os genes do MHC não são no entanto os únicos identificados em relação com o desenvolvimento de diabetes tipo 1. ⁽⁶⁾ Existem mais de 50 alterações genéticas identificadas que podem contribuir para o desenvolvimento de DM1, nomeadamente polimorfismos do gene da insulina e das proteínas tirosina cinase. ^(7,8) Estes apresentam associações muito mais fracas do que a associação HLA-DQ-DR com o desenvolvimento da doença e apenas alguns estão relacionados com a formação de anticorpos anti célula beta.

Fatores Ambientais

O ambiente onde os indivíduos se desenvolvem parece ter influência na progressão fisiopatológica da DM1. Em estudos com gémeos monozigóticos observou-se que nem todos desenvolvem de igual forma a doença. ⁽⁹⁾ Por outro lado, pessoas que migram para diferentes regiões tendem a apresentar incidência da doença semelhante à da população local. ⁽⁶⁾

Por vezes, alguns eventos como a gravidez, o parto e período perinatal, podem funcionar como catalisadores. O mesmo parece acontecer com algumas infeções virais, fatores dietéticos, entre outros. ⁽⁶⁾

Alguns dos fatores mais estudados são alguns agentes virais, entre os quais os enterovirus, vírus coxsackie e da rubéola, colocando-se a possibilidade de que exista reatividade cruzada das células T por vírus e antigénios dos

ilhéus ou exposição dos antígenos da célula beta à inflamação. ⁽⁶⁾ Outro tipo de possíveis *triggers* ambientais também estudados são fatores dietéticos. Um dos mais destacados é o leite de vaca, sendo que estudos epidemiológicos anteriores apresentaram relação entre a introdução em idade jovem do leite de vaca e consumo de grandes quantidades na infância. ⁽¹⁰⁾ Porém, estudos mais recentes nomeadamente prospetivos não demonstraram esta relação entre o seu consumo e o desenvolvimento do processo autoimune. ^(11,12)

Em resumo, múltiplos fatores ambientais foram propostos como responsáveis por desencadear autoimunidade nas células beta pancreáticas, contudo os resultados dos estudos são ainda inconclusivos pelo que mais investigação é ainda necessária.

> ANTICORPOS E ANTIGÉNIOS

Os anticorpos contra antígenos específicos dos ilhéus pancreáticos são identificados em cerca de 85% de doentes recém-diagnosticados com DM1 ou inclusive antes do diagnóstico. ⁽¹³⁾

A sua relevância na DM1 relaciona-se com o facto de constituírem marcadores da ocorrência do processo fisiopatológico antes do desenvolvimento da doença. Podem ser também utilizados na distinção de diferentes tipos de diabetes.

A sua presença não confere diferente grau de gravidade patológica relativamente à DM1. Verificou-se que crianças com DM1 seguidas desde o nascimento que não tinham anticorpos detetáveis à data do diagnóstico apresentaram graus de descompensação da doença semelhantes às que tinham anticorpos positivos. ⁽¹⁴⁾

Atualmente os anticorpos melhor caracterizados e validados para utilização na prática clínica têm como antígenos-alvo a insulina, a descarboxilase do ácido glutâmico 65, a proteína 2 associada ao insulino-*ma* e o transportador 8 do zinco. Estes antígenos são componentes da via de secreção das células pancreáticas, a maioria são proteínas de membrana e quase todos têm expressão génica específica do tecido pancreático. ⁽¹⁵⁾

Anticorpos Anti Insulina (IAA)

Os anticorpos anti insulina são geralmente os primeiros a surgir nas crianças seguidas desde o nascimento e que vieram a ter diabetes. Formam-se na sequência do reconhecimento de um epítipo na cadeia B da insulina por parte de um clone patológico de células TCD8+. Estes anticorpos têm a desvantagem de deixarem de ser úteis para a deteção precoce após administração de insulina,

uma vez que praticamente todos os indivíduos desenvolvem anticorpos anti insulina cerca de 2 semanas após administração. ⁽¹⁶⁾

Anticorpos Anti Descarboxilase do Ácido Glutâmico 65 (GAD65)

A enzima Descarboxilase do Ácido Glutâmico (GAD) é uma proteína de membrana e está presente nos ilhéus pancreáticos, mas também noutras células como as do sistema nervoso central. ⁽¹⁵⁾ É essencial na síntese de GABA, produzido em altos níveis nas células beta, onde intervém na libertação de insulina, na proliferação das células beta e nos fenómenos anti- apoptóticos. ⁽¹⁷⁾ Estes anticorpos anti GAD estão presentes em 70% dos diabéticos tipo 1 à data do diagnóstico. ⁽¹⁸⁾

Anticorpos Anti Proteína 2 Associada ao Insulino-*ma* (IA-2)

A proteína 2 associada ao insulino-*ma* é também uma proteína de membrana relacionada com a família de proteínas tirosina-fosfatases (PTP). Após clivagem, entra no núcleo celular e participa na regulação da transcrição genética, nomeadamente do gene da insulina. ⁽¹⁹⁾ Os anticorpos contra estas proteínas geralmente surgem após os anticorpos anti insulina e anti GAD, sendo frequente no momento da sua deteção a presença de múltiplos anticorpos, associando-se a uma alta probabilidade de desenvolver diabetes. Estão presentes em 58% dos diabéticos tipo 1 na altura do diagnóstico. ⁽²⁰⁾

Anticorpos Anti Transportador do Zinco (ZnT8)

O zinco é essencial para a formação de hexâmeros de insulina, apresentando transportadores nas membranas das células. O antígeno correspondente a este anticorpo é um desses transportadores e permite transferir cationes de zinco do citoplasma para o interior de vesículas secretórias. ⁽¹⁵⁾ Os anticorpos contra o transportador do zinco 8 são os mais recentemente identificados e por isso menos caracterizados. São específicos para 3 variantes de ZnT8, alternando o aminoácido na posição 325 (triptofano, arginina ou glutamina) ⁽¹⁾ e estão presentes em 60-80% dos diabéticos tipo 1 no momento do diagnóstico. São positivos em cerca de 26% dos diabéticos tipo 1 que apresentam os restantes anticorpos negativos, ^(15 21) pelo que a sua utilização pode ser útil numa fase pré-diagnóstico, permitindo aumentar a percentagem de deteção de indivíduos em risco de desenvolver diabetes.

Novos Anticorpos

Existem outros anticorpos descobertos mais recentemente através da biotecnologia – *Auto-antigénio 69 kDa* (ICA69), *Islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein* (IGRP), *Chromogranin A* (ChgA), Recetor de insulina, *Antigenio jun-B*, CD38 e periferina, *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP), entre outros. No entanto ainda são desconhecidos o papel na fisiopatologia e etiologia da DM1 e a potencial utilidade na monitorização ou tratamento da doença. ^(15,22)

> DETECÇÃO PRECOCE DE ANTICORPOS

Em 2015, Insel *et al.* propuseram uma nova classificação da DM1 com o objetivo de adotar uma taxonomia standardizada e estratificar a população com DM1, que permitisse melhorar o desenvolvimento terapêutico com diversos intuitos: prevenção da progressão da doença para a fase sintomática, desenhar ensaios clínicos dirigidos a perfis de risco, estabelecer *end points* em ensaios clínicos específicos e promover o desenvolvimento de uma Medicina de Precisão com *targets* individuais e concretos para cada estadio da doença. ⁽²³⁾

Na DM1 existe uma fase de pré-seroconversão, onde não há ainda evidência de autoanticorpos em circulação e em que a massa de células beta é 100% funcionante, mantendo uma perfeita homeostasia da glicose com níveis séricos de insulina e glucagon normais. O aparecimento de um fator precipitante em indivíduos geneticamente predispostos, e por vezes também expostos a condições ambientais, dá lugar à formação de autoanticorpos e ao início da perda de massa de célula beta.

Esta fase denominada pré-sintomática divide-se em dois estadios: o estadio 1, em que são doseáveis autoanticorpos séricos, mas ainda sem alteração dos níveis de glicémia, e o estadio 2 em que se torna evidente a diminuição da função da célula beta através do aparecimento de hiperglicemia, no entanto sem sintomas associados. No estadio 3 a progressão da doença mantém-se, com declínio da reserva pancreática para níveis praticamente residuais, sendo a fase em que se dá início à manifestação clínica e à sintomatologia clássica da DM1. ^(1,23)

Da avaliação de 3 *coortes* diferentes – BABYDIAB® na Alemanha (amostra composta por filhos de progenitores com DM1), DIPP® na Finlândia e DAISY® nos Estados Unidos da América (estes 2 últimos ambos com amostragem da população geral) – concluiu-se que 43,5% dos indivíduos com 2 ou mais autoanticorpos positivos desenvolvem sintomas até aos 5 anos de seroconversão, 69,7% até aos 10 anos de seroconversão e 84,2% até aos

15 anos de seroconversão. ⁽²⁴⁻²⁶⁾ Estes resultados foram idênticos nos três estudos, o que demonstra que eventos semelhantes levaram ao surgimento da doença quer em casos esporádicos, quer familiares, e que doentes com seroconversão simultânea desenvolvem manifestações clínicas cronologicamente distantes. Também se torna evidente que à medida que a idade vai avançando, o número de antigénios reconhecidos vai decaindo, a concentração sérica de autoanticorpos no sangue diminui e a sua deteção torna-se mais improvável a partir da idade adulta. ⁽²⁷⁾

O processo de seroconversão decorre com grande variabilidade e heterogeneidade, no entanto parece haver uma relação direta entre a forma como se desenrola e o genótipo do indivíduo. Na maioria das situações, e atendendo a que mais de 90% dos doentes são portadores dos haplotipos HLA-DR4-DQ8 e HLA-DR3-DQ2, os primeiros anticorpos a serem detetados são os anticorpos anti-insulina (IAA), com pico entre 1 e os 2 anos de idade. Nos restantes doentes portadores de outros genótipos, os primeiros anticorpos detetados são os anticorpos anti- GAD65. No estudo TEDDY, ⁽²⁸⁾ que envolveu 6 centros de investigação e em que foi feito o seguimento da população HLA de alto risco desde o nascimento, a incidência de indivíduos com parentesco de primeiro grau com DM1 que desenvolvem IAA até aos 12 meses de idade é de 4% contra 1,5% da população geral. ⁽²⁹⁾ O aparecimento dos IA-2 em 2º ou 3º lugar aumenta o risco

de evoluir para o estadio 3 da doença. O anticorpo anti-ZnT8 aparece normalmente na fase tardia do estadio 1 ou no estadio 2, o que em conjunto com os restantes autoanticorpos aumenta a probabilidade de confirmação serológica para 96%. ⁽¹⁵⁾

> COMO ABORDAR INDIVÍDUOS COM ANTICORPOS POSITIVOS

Fazer Rastreio da DM1: Porquê?

A avaliação da população de risco para DM1 e a identificação de indivíduos numa fase pré- sintomática pode permitir levar a cabo uma intervenção precoce para atrasar a progressão da doença.

O anticorpo anti-CD3 teplizumab foi avaliado em ensaios de fase 2, sendo a terapêutica mais eficaz até ao momento no atraso da progressão para a fase clínica de DM 1. Neste ensaio foi realizada terapêutica de duas semanas com teplizumab em indivíduos sem diagnóstico de DM, com familiares com DM 1, e que tenham alto risco de desenvolvimento da doença: dois ou mais anti-

corpos positivos e alteração de teste de tolerância à glicose oral. ⁽³⁰⁾ Na população estudada obteve-se um atraso medio de diagnóstico de 2 anos no grupo do teplizumab comparativamente ao placebo, no entanto com efeitos adversos a assinalar, ainda que expectáveis, nomeadamente *rash*, linfopenia e reativação de alguns vírus. Como limitações há a referir o fato de se desconhecer o efeito do fármaco numa população sem familiares com diabetes e os seus efeitos a longo prazo, pelo que os resultados não podem ser generalizados. São necessários mais estudos para que este tipo de terapêutica possa transitar para a prática clínica.

Outra vertente da identificação precoce é permitir preparar o aparecimento da doença, tornando-o previsível e minimizando o risco de diagnóstico inaugural como cetoacidose diabética. Na fase de pré-seroconversão tem utilidade o estudo genético aplicado à população de risco para DM1, e na fase pós-seroconversão mas pré-sintomas, pode ser realizado o rastreio serológico.

Neste tipo de intervenção deve ser ponderado o custo-benefício, sendo que os benefícios se prendem com a prevenção de complicações agudas à data de diagnóstico e atraso no aparecimento de manifestações clínicas da doença em contexto de ensaio clínico. Pode ser uma intervenção relevante uma vez que considerando a análise combinada dos três principais estudos em idade pediátrica ^(24,26,28) estima-se que numa coorte de 1.000 crianças de 3 anos com múltiplos anticorpos positivos, seja expectável o desenvolvimento de hiperglicemia em 50% das crianças num período de 6 anos, em mais de 80% num período de 12 anos e 100% aos 60 anos de idade. ⁽³¹⁾ As desvantagens estão relacionadas com provável ansiedade causada a indivíduos com rastreio positivo ou familiares pela inexistência de oferta terapêutica que impeça o curso da doença. O custo-benefício a longo prazo ainda não está bem estabelecido. ⁽³¹⁾

Quem Rastrear?

A estratificação da população de acordo com o risco genético para DM1 permite identificar os indivíduos mais suscetíveis de terem auto-anticorpos positivos, e nesse caso eventuais candidatos a ensaios clínicos com atuação sobre o sistema imunitário com intuito preventivo ou sobre o estilo de vida e fatores ambientais (dieta e vacinas, por exemplo) que possam ter demonstrado influência no desenvolvimento da doença. ^(23,31)

Consideram-se indivíduos de Muito Alto Risco:

- Os gémeos monozigóticos em que um deles tem DM1;
- Os indivíduos com parentesco de primeiro grau com vários membros da família com DM1 e genótipo de alto risco.

São indivíduos de Elevado Risco:

- Os recém-nascidos que tenham relação de parentesco de primeiro grau com um doente com DM1 com genótipo de alto risco;
- Os indivíduos com parentesco de primeiro grau com vários membros da família com DM1 e score genético de alto risco.

Atualmente, a *American Diabetes Association (ADA)* ⁽³²⁾ recomenda rastrear indivíduos de alto risco em contexto de ensaio clínico, sendo que a presença de 2 ou mais anticorpos tem valor preditivo para o estadio 3 da DM1 e pode ter indicação para intervenção. Estes indivíduos devem ainda ser informados sobre o risco de desenvolver DM1, sobre a doença e sintomas no sentido de evitar a cetoacidose diabética como evento inaugural. A recomendação da ADA também sugere que o rastreio possa ser oferecido opcionalmente a familiares de primeiro grau de doentes com DM1 fora de contexto de ensaio. No entanto, neste caso, deve ser explicado que não estão disponíveis terapêuticas atualmente aprovadas para prevenir a doença se o rastreio for positivo.

> CONCLUSÃO

Existem vários aspetos importantes na DM1 que são determinantes para o aparecimento e evolução da doença. A determinação de auto-anticorpos na DM1 é relevante na caracterização do doente, contudo poderá ter também um papel fundamental no estadiamento da doença e no planeamento futuro. O mapeamento genético mostrou ser útil na identificação de grupos de risco para o diagnóstico precoce e educação familiar.

Sabe-se que a velocidade de progressão da DM1 depende da idade em que ocorre a seroconversão, do número de anticorpos detetados, da especificidade e combinação dos anticorpos e da concentração sérica dos mesmos. O estadiamento da DM1 permite desenhar ensaios clínicos dirigidos a cada fase da doença e estudar novos alvos terapêuticos, caminhando para uma Medicina de Precisão.

No entanto, são necessários mais estudos para esclarecer melhor o papel dos anticorpos na fisiopatologia e progressão da doença e a sua relação com os fatores ambientais. <

Agradecimentos/Acknowledgments:

Agradecemos à equipa da consulta de Medicina/Diabetes do Hospital Garcia de Orta por todo o apoio/*We would like to thank the Medicine/Diabetes consultation team of the Garcia de Orta Hospital for their support.*

Conflitos de interesses/Conflicts of Interest:

Os autores declaram a inexistência de conflitos de interesse na realização do presente trabalho/*The authors declare that there are no conflicts of interest concerning this work.*

Patrocínios/Sponsorships:

Os autores declaram a inexistência de patrocínios na realização do presente trabalho/*The authors declare the inexistence of sponsorships for this work.*

BIBLIOGRAFIA

- Atkinson M, Maclaren N. The pathogenesis of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N Engl J Med.* 1994; 331: 1428-1436.
- Katsarou A, Gudbjornsdottir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, et al. Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers.* 2017; Vol 3, article17016.
- Fousteri G, Ippolito E, Ahmed R, Hamad A. Beta-cell specific autoantibodies: Are they just an indicator of type 1 diabetes? *Curr Diabetes Rev.* 2017; 13(3): 322-329.
- Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell.* 1996; 85(3): 291.
- Baschal E, Aly TA, Babu SR, Fernando MS, Yu L, Miao D, et al. HLA-DPB1*0402 protects against type 1A diabetes autoimmunity in the highest risk DR3-DQB1*0201/DR4-DQB1*0302 DAISY population. *Diabetes.* 2007; 56(9): 2405.
- Regnell S, Lernmark A. Early prediction of autoimmune (Type 1) diabetes. *Diabetologia.* 2017; 60: 1370-1881.
- Bell G, Horita S, Karam JH. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes.* 1984; 33(2): 176.
- Bottini N, Musumeci L, Afonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type diabetes. *Nat Genet.* 2004; 36(4): 337.
- Kaprio J, Tuomilehto J, Koskenvuo M, Romanov K, Reunanen A, Eriksson J, et al. Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia.* 1992; 35(11): 1060-7.
- Virtanen SM, Saukkonen T, Savilahti E, Ylonen K, Rasanen L, Aro A, et al. Diet, cow's milk protein antibodies and the risk of IDDM in Finnish children. *Childhood Diabetes in Finland Study Group. Diabetologia.* 1994; 37(4): 381-7.
- Hummel M, Fuchtenbusch M, Schenker M, Ziegler AG. No major association of breast-feeding, vaccinations, and childhood viral diseases with early islet autoimmunity in the German BABYDIAB Study. *Diabetes Care.* 2000; 23(7): 969.
- Couper JJ, Steele C, Beresford S, Powell T, McCaul K, Pollard A, et al. Lack of association between duration of breast-feeding or introduction of cow's milk and development of islet autoimmunity. *Diabetes.* 1999; 48(11): 2145.
- Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1994; 331(21): 1428.
- Sabbah E, Savola K, Kulmala P, Veijola R, Vahasalo P, Karjalainen J, et al. Diabetes-associated autoantibodies in relation to clinical characteristics and natural course in children with newly diagnosed type 1 diabetes. The Childhood Diabetes In Finland Study Group. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84(5): 1534.
- Wenzlau JM, Hutton JC. Novel Diabetes Autoantibodies and Prediction of Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep.* 2013; 13(5): 608-15.
- Achenbach P, Koczwara K, Knopff A, Naserke H, Ziegler AG, Bonifacio E. Mature high-affinity immune responses to (pro) insulin anticipate the autoimmune cascade that leads to type 1 diabetes. *J Clin Invest.* 2004; 114(4): 589.
- Fiorina P. GABAergic system in β -cells: from autoimmunity target to regeneration tool. *Diabetes.* 2013 Nov; 62(11): 3674-6
- Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, et al. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature.* 1990; 347(6289): 151.
- Mziaut H, Trajkovski M, Kersting S, Ehninger A, Altkrüger A, Lemaitre RP, et al. Synergy of glucose and growth hormone signalling in islet cells through ICA512 and STAT5. *Nat Cell Biol.* 2006; 8(5): 435-45.
- Ellis TM, Schatz DA, Ottendorfer EW, Lan MS, Wasserfall C, Salisbury PJ, et al. The relationship between humoral and cellular immunity to IA-2 in IDDM. *Diabetes.* 1998; 47(4): 566.
- Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(43): 17040.
- Winer S, Tsui H, Lau A, Song A, Li X, Cheung RK, et al. Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive. *Nat Med.* 2003; 9(2): 198-205.
- Insel R, Dunne J, Atkinson M, Chiang J, Dabelea D, Gottlieb P, et al. Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society and the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 2015; 38: 1964-1974.
- Ziegler A, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E. Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes.* 1999; 48(3): 460-468.
- Kupila A, Keskinen P, Simell T, Erkkila S, Arvilommi P, Korhonen S. Genetic risk determines the emergence of diabetes-associated autoantibodies in young children. *Diabetes.* 2002; 51: 646-651.
- Barker JM, Barriga KJ, Yu L, Miao D, Erlich H, Norris J. Diabetes Autoimmunity Study in the Young. Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: *Diabetes Au-*

- toimmunity Study in the Young (DAISY). *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 3896-3902
27. Vassilevskaya T, Rolim I, Catarino H, Correia L, Boavida J, Duarte R, et al. Prevalência de Auto-anticorpos e Alterações na Ativação de Células T em Diabéticos Tipo IA Portugueses. *Revista Portuguesa de Diabetes.* 2007; 1: 5-8.
28. Rewers M, Barriga K, Baxter J, Eisenbarth G, Gesualdo P, Hoffman M. The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) Study. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1150: 1-13.
29. Krischer J, Lynch K, Lernmark A, Hagopian W, Rewers M, She J, et al. Genetic and Environmental Interactions Modify the Risk of Diabetes-Related Autoimmunity by 6 Years of Age: The TEDDY Study. *Diabetes Care.* 2017 Sep; 40(9): 1194-1202.
30. Herold KC, Bundy BN, Long SA, Bluestone JA, DiMeglio LA, Dufort MJ, et al. An Anti-CD3 Antibody, Teplizumab, in Relatives at Risk for Type 1 Diabetes. *N Engl J Med.* 2019; 381: 603- 613.
31. Bonifacio E. Predicting Type 1 Diabetes Using Biomarkers. *Diabetes Care.* 2015; 38(6): 989- 996.
32. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes – 2020. *Diabetes Care.* 2020; 43(Suppl. 1): S14-S31.