

FATORES IMUNOGENÉTICOS ASSOCIADOS AO *DIABETES MELLITUS* DO TIPO 1

Ana Paula Moraes Fernandes¹

Ana Emilia Pace¹

Maria Lúcia Zanetti²

Milton Cesar Foss³

Eduardo Antonio Donadi⁴

Fernandes APM, Pace AE, Zanetti ML, Foss MC, Donadi EA. Fatores imunogenéticos associados ao *diabetes mellitus* do tipo 1. Rev Latino-am Enfermagem 2005 setembro-outubro; 13(5):743-9.

O diabetes mellitus do tipo 1 tem sido considerado uma doença auto-imune órgão-específica, decorrente da destruição seletiva das células betapancreáticas. Apresenta patogenia complexa, envolvendo a participação de vários fatores, dentre esses a susceptibilidade imunogenética com forte associação aos genes de histocompatibilidade (HLA), eventos ambientais e resposta auto-imune com presença de auto-anticorpos e/ou linfócitos auto-reativos, culminando em anormalidades metabólicas. Neste estudo, a revisão da literatura descreve os mecanismos pelos quais determinados fatores conferem susceptibilidade para o seu desencadeamento e, adicionalmente, as inovações na predição dessa desordem que, certamente, contribuirão para a assistência de enfermagem aos pacientes portadores do diabetes tipo 1.

DESCRITORES: *diabetes mellitus tipo 1; imunogenética; enfermagem*

IMMUNOGENETIC FACTORS ASSOCIATED WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS

Type 1 diabetes mellitus has been considered an organ-specific autoimmune disease derived from the selective destruction of pancreatic beta cells. It presents a complex pathogenesis, involving the participation of several factors, including the immunogenetic susceptibility with strong association to histocompatibility genes (HLA), environmental events and autoimmune response with the presence of autoantibodies and/or autoreactive lymphocytes, culminating in metabolic abnormalities. In this study, the literature review describes mechanisms through which some factors cause susceptibility to its appearance and, additionally, prediction innovations regarding this disorder, which will certainly contribute to nursing care for patients with type 1 diabetes.

DESCRIPTORS: *type 1 diabetes mellitus; immunogenetics; nursing*

FACTORES INMUNOGENÉTICOS ASOCIADOS A LA *DIABETES MELLITUS* TIPO 1

La Diabetes Mellitus tipo 1 ha sido considerada una enfermedad autoinmune órgano-específica debido a la destrucción selectiva de las células beta pancreáticas. Presenta una patogenia compleja, involucrando la participación de varios factores, entre esos la susceptibilidad inmunogenética con fuerte asociación a los genes de histocompatibilidad (HLA), eventos ambientales y respuesta autoinmune con presencia de auto-anticuerpos y/o linfocitos auto-reativos, culminando en anormalidades metabólicas. En este estudio, la revisión de la literatura describe los mecanismos por los cuales determinados factores resultan en susceptibilidad para su desarrollo y, adicionalmente, las innovaciones en la predicción de ese desorden que, por cierto, van a contribuir para la atención de enfermería a los pacientes portadores de la diabetes tipo 1.

DESCRIPTORES: *diabetes mellitus tipo 1; inmunogenética; enfermería*

¹ Professor Doutor, e-mail: anapaula@eerp.usp.br; ² Professor Associado, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, Centro Colaborador da OMS para o desenvolvimento da pesquisa em enfermagem; ³ Professor Titular; ⁴ Professor Associado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo

INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* do tipo 1 (DM1), considerada doença auto-imune órgão-específica, resulta da destruição seletiva das células betapancreáticas, produtoras de insulina, pela infiltração progressiva de células inflamatórias, particularmente por linfócitos T auto-reativos. As manifestações clínicas do distúrbio metabólico surgem quando cerca de 80% das células beta tenham sido destruídas⁽¹⁾.

Considerada como uma das doenças crônicas mais comuns entre crianças e adultos jovens, o DM1 pode se desenvolver em qualquer faixa etária, sendo mais freqüente antes dos 20 anos de idade. Acomete cerca de 0,3% das populações caucasianas, com pico de início da doença entre os 11 e 12 anos de idade⁽¹⁾.

Embora a etiologia do DM1 seja extensamente estudada, os mecanismos precisos envolvidos na iniciação, progressão e destruição auto-imune das células beta permanecem não totalmente elucidados. Diversos fatores estão implicados, dentre esses, fatores genéticos, imunológicos e ambientais. Corroborando esse aspecto, estudos epidemiológicos realizados entre gêmeos monozigóticos revelaram concordância para a doença em cerca de 50% dos casos, sugerindo que, além de fatores genéticos, os ambientais e os imunológicos também estão presentes⁽²⁾.

Dada a complexidade da etiologia do DM1, o presente estudo tem como objetivo descrever, com base na literatura disponível sobre o tema, os mecanismos pelos quais determinados fatores imunogenéticos conferem susceptibilidade para o desencadeamento da doença e informações adicionais sobre as novas perspectivas para sua predição e prevenção.

FONTE DE DADOS E MÉTODO DE SELEÇÃO

Foi realizada pesquisa eletrônica da literatura utilizando, as bases de dados MEDLINE, LILACS, NLM, NCBI e COCHRANE LIBRARY. Utilizou-se os seguintes termos: HLA (antígenos leucocitários humano), *diabetes mellitus*, IDDM - *diabetes mellitus* insulino dependente, DM *type 1* - *diabetes mellitus* tipo 1, *prediction* - predição. Os pesquisadores fizeram uma seleção a partir dos títulos dos artigos encontrados inicialmente e, quando disponíveis, dos resumos a

partir da busca eletrônica. Os critérios de inclusão foram artigos originais, procedência internacional, publicação em periódicos indexados; autores que são referências internacionais no assunto investigado; publicados até o mês de agosto de 2004, nas línguas inglesa e portuguesa, e que avaliassem as associações entre os diversos fatores associados no desencadeamento do DM1 tais como os ambientais, imunológicos e genéticos, além das estratégias utilizadas para a predição e prevenção. Os critérios de exclusão foram estudos que investigassem *diabetes mellitus* do tipo 2, diabetes gestacional e intolerância à glicose. Em relação ao *diabetes mellitus* do tipo 1, os pesquisadores excluíram as publicações na forma de comunicação breve, relatos de caso, comentários de artigos científicos, cartas ao editor e editorial. Identificou-se inicialmente 83 artigos (n=83). Desses foram selecionados 15 artigos (n=15) que atenderam os critérios de inclusão. Cabe ressaltar que esses artigos estavam indexados em mais de uma base de dados. Desse modo, os pesquisadores, após discussão e consenso final, optaram pela base de dados MEDLINE, considerando que é uma base de dados ampla em relação a outras bases de dados da ciência biológica, que esse tema tem sido objeto de investigações intensas na última década pelos pesquisadores da área das ciências biológicas, e que conhecimentos inovadores têm sido disponibilizados nessa base de dados⁽³⁾. Em seguida os pesquisadores procederam a seleção dos artigos a partir da leitura e registravam os dados obtidos em formulário próprio construído pelos pesquisadores visando a síntese e a análise dos dados.

SÍNTESE DOS DADOS

Fatores ambientais como indutores de respostas auto-imunes

Agentes ambientais como infecções virais, especialmente pelos enterovírus, em particular pelo Coxsackie B, estão associados com o processo auto-imune de lesão das células beta. Estudos realizados para detecção do RNA viral no sangue periférico de pacientes diabéticos, recentemente diagnosticados, revelam que de 42 a 64% desses pacientes possuem o genoma viral para Coxsackie B4 ou B3⁽⁴⁾.

Embora o mecanismo de lesão tecidual não esteja esclarecido, o papel do mimetismo molecular

tem sido proposto. A hipótese está baseada em evidências epidemiológicas, clínicas e experimentais da associação entre a presença do agente infeccioso com o surgimento da doença e, ainda, com a reação cruzada entre antígenos próprios e os determinantes antigênicos microbianos. Um provável mecanismo de destruição tecidual é a geração de linfócitos T citotóxicos (CTL) auto-reativos e de auto-anticorpos que reconhecem, de maneira cruzada, os determinantes próprios sobre as células-alvo⁽⁴⁾.

Outro mecanismo que pode induzir a resposta auto-imune é a própria infecção viral local, causando destruição direta das células das ilhotas e conseqüente liberação de auto-antígenos, capazes de estimular linfócitos T auto-reativos. Esse mecanismo revela a forte associação da infecção pelo vírus Coxsackie B4 com o desenvolvimento do DM1 em humanos. Além de infecções pelos enterovírus, outros vírus também têm sido associados ao surgimento do DM1, como o da rubéola, o da parotidite e o citomegalovírus⁽⁴⁾.

Fatores imunológicos

Vários mecanismos imunológicos, tanto celulares quanto humorais, têm sido relatados na patogenia do DM1. Dos mecanismos celulares, as participações de várias células constituintes do sistema imune, tais como os linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺), os linfócitos B e as células apresentadoras de antígenos (APC), como macrófagos e células dendríticas, têm sido definidas. Dentre os mecanismos humorais, a participação de auto-anticorpos, específicos para antígenos das ilhotas pancreáticas, e as citocinas pró-inflamatórias são as mais relevantes. Adicionalmente, as moléculas de histocompatibilidade (HLA) e as moléculas co-estimulatórias também participam na patogenia do DM1. A seguir, são relatados os principais achados referentes a esses fatores imunológicos.

Mecanismos celulares

O processo auto-imune, que resulta no DM1, pode ser visto como uma falha no desenvolvimento e/ou manutenção da tolerância aos auto-antígenos, expressos nas células beta, das ilhotas de Langerhans do pâncreas. Normalmente, durante o desenvolvimento e maturação dos linfócitos T no timo, as células reativas aos auto-antígenos sofrem depleção ou anergia clonal, com posterior remoção

dessas células do conjunto de linfócitos T maduros e circulantes.

Em modelos animais, camundongos NOD (*nonobese diabetic*) são usados para estudar a patogenia do DM1, pois a doença nesses animais mimetiza aquela observada em humanos⁽⁵⁾. Assim, análises imuno-histoquímicas de tecido pancreático revelam que os primeiros tipos celulares a infiltrarem nas ilhotas de Langerhans, promovendo a insulinite, são as células dendríticas e os macrófagos⁽⁴⁾. A apresentação de auto-antígenos, específicos das células betapancreáticas, pelos macrófagos e/ou células dendríticas para os linfócitos T CD4⁺, em associação com as moléculas de histocompatibilidade de classe II, constitui-se como o primeiro evento no desenvolvimento da auto-imunidade no DM1.

Macrófagos ativados secretam substâncias que conferem a resposta pró-inflamatória, que induzem a migração e estimulam vários tipos celulares a secretarem radicais livres que são extremamente tóxicos para as células betapancreáticas. Durante esse processo, os linfócitos T-CD8⁺ são considerados o tipo celular mais importante envolvido na destruição auto-imune. Tais linfócitos, após reconhecimento do auto-antígeno pancreático ligado à molécula HLA de classe I, realizam a destruição das células beta por citólise, através da liberação de perforina e granzima e, adicionalmente, por induzir apoptose celular. Dessa maneira, macrófagos, linfócitos T-CD4⁺ e linfócitos T-CD8⁺ atuam sinergicamente na destruição das células betapancreáticas⁽⁶⁾.

Linfócitos B também participam da patogenia do DM1, apresentando auto-antígenos, preferencialmente do auto-antígeno ácido glutâmico descarboxilase (*glutamic acid decarboxylase*-GAD) ou, ainda, como plasmócitos, secretores de auto-anticorpos⁽⁷⁾.

Mecanismos humorais

A detecção de auto-anticorpos denota o desenvolvimento da reação auto-imune, efetivamente utilizada como marcador da presença da auto-imunidade contra as ilhotas pancreáticas. Ampla variedade de auto-anticorpos, específicos contra os antígenos das células beta das ilhotas de Langerhans, tem sido relatada e confirmada por vários investigadores.

Auto-anticorpos anti-insulina (*insulin autoantibodies*-IAA) são detectados em cerca de 50%

dos pacientes diabéticos, recentemente diagnosticados, sendo mais comuns entre crianças do que entre jovens e adultos. O papel da insulina como auto-antígeno ainda não é conhecido, tampouco o local ou como a insulina é processada e apresentada⁽¹⁾.

Ácido glutâmico descarboxilase (GAD), principal auto-antígeno na patogenia do DM1, é uma enzima que cataliza a formação do ácido gama amino butírico (GABA), transmissor neuroinibidor do sistema nervoso central, a partir do L-glutamato. Duas formas são reconhecidamente expressas nos tecidos humanos: GAD65 e GAD67. Anticorpos anti-GAD65 são detectados em cerca de 50 a 80% dos pacientes recentemente diagnosticados⁽⁵⁾.

Outros auto-anticorpos, detectados nos pacientes diabéticos com diagnóstico recente, são as anticélulas das ilhotas, que reconhecem receptores de membrana do tipo PTP (*protein tyrosine phosphatases*) das células beta, ou seja, o antígeno ICA512 (*islet cell antigen 512*) ou IA-2 (*islet antigen 2*). A detecção desses auto-anticorpos pode ser realizada após o aparecimento do anticorpo anti-GAD65 e praticamente confirma o diagnóstico da doença auto-imune, ocorrendo em cerca de 50 a 70% dos pacientes. O auto-antígeno IA-2 beta (*islet antigen 2 beta*) ou IAR (*islet antigen receptor*), receptor de membrana das células betapancreáticas, pode ser reconhecido por auto-anticorpos anti-ilhotas e detectado em cerca de 50% dos pacientes^(5,7).

A liberação local de citocinas pró-inflamatórias, decorrentes de infecção viral, constitui papel central na perda da tolerância funcional aos auto-antígenos e na ativação de linfócitos auto-reativos, induzindo o início da reação auto-imune. A associação entre os processos de inflamação e auto-imunidade tem sido estudada por meio da identificação de citocinas pró-inflamatórias liberadas no local da lesão e, também, pela capacidade dessas citocinas em recrutar e ativar APC e linfócitos T auto-reativos⁽⁸⁾.

Estudos anatomopatológicos do pâncreas, de crianças que foram a óbito por ocasião do diagnóstico da doença, revelam que o evento imunológico inicial no desenvolvimento da doença parece ser a produção de interferon-gama (IFN- γ) pelas células beta produtoras de insulina. A secreção dessa citocina está associada à hiperexpressão das moléculas HLA de classe I e à expressão aberrante das moléculas HLA de classe II na superfície de células beta. A partir desses eventos, a apresentação de auto-antígenos

pelas células betapancreáticas aos linfócitos T auto-reativos pode ocorrer, induzindo a auto-imunidade. Além do mais, tem sido descrito que a produção inicial de IFN- γ pode ser decorrente da infecção viral nessas células pancreáticas com conseqüente início da cascata de processos inflamatórios culminando na insulinite⁽⁸⁾.

Moléculas de superfície celular

As moléculas HLA de classe I e II têm papel central na indução e regulação das respostas imunes contra infecções microbianas, envolvidos na apresentação de peptídeos antigênicos aos linfócitos T-CD8⁺ e -CD4⁺, respectivamente. Relativo ao padrão de expressão, o das moléculas HLA de classe I é constitutiva e ampla e, em contrapartida, o das moléculas HLA de classe II tem sua expressão constitutiva restrita, primariamente, as APC, ou seja, linfócitos B, células dendríticas e macrófagos. No entanto, vários tipos celulares podem ser induzidos a expressar as moléculas HLA de classe II, após a exposição de determinadas citocinas⁽⁹⁾, especialmente os interferons (IFN).

Fatores genéticos

A alta incidência familiar do DM1, particularmente entre parentes de primeiro grau, bem como a maior concordância para o aparecimento da doença entre gêmeos monozigóticos, em relação aos dizigóticos, indicam que os fatores genéticos têm grande importância na patogenia do DM1⁽²⁾.

Considerada doença com herança poligênica complexa, o DM1 apresenta cerca de 20 grupos de genes associados à susceptibilidade à doença, mas apenas 13 grupos apresentam evidências estatisticamente significantes de associação. A maior contribuição vem da região onde estão localizados os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH), situados no cromossomo 6p21, contribuindo em cerca de 40% na susceptibilidade à doença (genes IDDM1- *insulin-dependent diabetes mellitus group 1*). Contribuições de menor relevância são conferidas por genes alocados fora do CPH^(2,10).

Genes IDDM2 contribuem em cerca de 10% para a susceptibilidade ao DM1. Estão localizados no cromossomo 11p15.5, logo abaixo do gene que codifica a tirosina hidrogenase e acima do gene que

codifica a insulina. Identificados como regiões de números variáveis de repetições de nucleotídeos em tandem (*variable number of tandem repeats-VNTR*) ricos em C e G, apresentam 3 classes de VNTR. A VNTR de classe I tem o menor número de repetições e está associada com a predisposição ao DM1, em contraste, a de classe III tem o maior número de repetições e confere resistência à doença. Uma hipótese que tem sido aventada é que a proteção seja devida ao aumento dos níveis do RNA mensageiro de insulina no timo, em quantidades suficientes para induzir a seleção negativa dos linfócitos T auto-reativos, resultando na tolerância à insulina⁽²⁾.

Presente no cromossomo 2q33, região codificadora para os genes CTLA-4 (proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico) e CD28, o marcador IDDM12 também mostra associação com a doença devido à regulação negativa da ativação dos linfócitos T⁽²⁾.

Outros marcadores gênicos associados a diabetes, do IDDM3 ao IDDM13, estão localizados em diversos cromossomos, muitos deles são polimórficos, com graus variáveis de associação com a doença⁽²⁾. Estudos familiares, entre irmãos afetados pela doença, confirmam que alguns desses marcadores estão em desequilíbrio de ligação, ou seja, são herdados em conjunto, como no caso dos IDDM12 (região cromossômica 2q33), IDDM7 (2q31-q33), IDDM6 (18q), IDDM10 (10p13-q11) e IDDM13 (2q33)⁽²⁾.

O papel dos genes da região do CPH (IDDM1) na susceptibilidade ao DM1 foi primeiro indicado pelas associações com os antígenos HLA-B8 e HLA-B15. Posteriormente, foi observado que os genes DRB1, da região do CPH de classe II, que codificam os antígenos HLA-DR3 e HLA-DR4 estavam, consistentemente, associados com a doença. O antígeno HLA-DR3 está em desequilíbrio de ligação com HLA-B8 e, adicionalmente, o antígeno HLA-DR4 com o HLA-B15. Atualmente, os genes HLA-DR são considerados regulatórios na susceptibilidade à doença, e em desequilíbrio de ligação com os genes principais, os HLA-DQB1 e -DQA1⁽²⁾. O HLA-DR*04 está em desequilíbrio de ligação com o HLA-DQB1*0302 que, atualmente, é considerado o principal gene de susceptibilidade à doença^(2,10). Estudos realizados em pacientes brasileiros com DM1, da região nordeste do Estado de São Paulo, mostram que as especificidades HLA-DRB1*03, -DRB1*04 e HLA-DQB1*0302 também conferem susceptibilidade

ao desenvolvimento da doença nessa população⁽¹¹⁾.

Outrossim, têm sido descritos genes que conferem resistência ao DM1, como HLA-DRB1*1501 (DR2), *11 (DR5), *13 e -DQB1*0602 e *0301. O alelo HLA-DQB1*0301, que confere resistência, tem o resíduo ácido aspártico (Asp) na posição 57, diferenciando-se do alelo HLA-DQB1*0302, que confere susceptibilidade apenas pela substituição do resíduo da posição 57 pelos aminoácidos alanina (Ala), serina (Ser) ou valina (Val). A simples substituição de um resíduo de aminoácido na molécula HLA de classe II pode alterar a afinidade de ligação ao peptídeo diabetogênico. Cerca de 85-90% de pacientes diabéticos, com menos de 17 anos, possuem na cadeia beta da molécula HLA-DQB1-*0201, -*0302, ou -*0101 um resíduo diferente do ácido aspártico na posição 57. Ademais, a susceptibilidade ao DM1 também está associada à perda do Asp nessa posição nas cadeias betas das moléculas HLA-DR⁽¹²⁾.

Além dos genes de histocompatibilidade clássicos, também foram identificados outros genes secundários associados com a susceptibilidade ao DM1. Os genes LMP2 e LMP7 (*large multifuncional protease 2 e 7*) que codificam duas subunidades do proteassoma, proteínas responsáveis pela degradação das proteínas citosólicas e geração de peptídeos a serem apresentados pelas moléculas HLA de classe I aos linfócitos T-CD8⁺. Nas subunidades LMP2 e LMP7 estão os sítios das proteases que fornecem peptídeos com resíduos carboxiterminais adequados para o ancoramento do peptídeo à molécula HLA de classe I. Tais genes, que codificam essas subunidades do proteassoma, são polimórficos. Desse modo, diferentes alelos podem possuir diferentes especificidades para clivagem de proteínas com conseqüente geração de peptídeos variados. Os alelos LMP2-R/R e LMP7-A/B estão associados com a susceptibilidade à diabetes, e em desequilíbrio de ligação com o haplotipo HLA-B15/DRB1*04/DQB1*0302⁽²⁾.

Os genes TAP1 e TAP2 (*transporter-associated antigen processing*) também fazem parte dos marcadores IDDM1. São polimórficos e codificam as subunidades de que translocam os peptídeos citosólicos, gerados pelo complexo proteassoma, para o interior do retículo endoplasmático, a serem acoplados às moléculas de HLA de classe I e posterior apresentação aos linfócitos T-CD8⁺. O polimorfismo desses genes, com a conseqüente variação na seqüência de aminoácidos, pode conferir diferentes

afinidades de ligação aos peptídeos gerados, e resultar na seleção de peptídeos a serem apresentados⁽¹²⁾. O gene TAP1-C está associado com susceptibilidade à doença, e em desequilíbrio de ligação com os genes LMP2-R/R, LMP7-A/B, HLA-DR*04, HLA-DQB1*0302 e HLA-B15. O gene TAP2-B está em desequilíbrio de ligação com HLA-DR*03 e HLA-B8, e também associado com a susceptibilidade ao DM1^(2,10).

Estratégias utilizadas para a predição e prevenção

O entendimento dos fatores etiopatogênicos, associados ao desenvolvimento da auto-imunidade do DM1, oferece perspectivas futuras para intervenções que subsidiam medidas curativas e preventivas às pessoas susceptíveis a doença, ou seja, portadores de marcadores imunogenéticos, como alelos HLA de susceptibilidade e auto-anticorpos.

A predição para o desenvolvimento do DM1 em humanos e sua prevenção em modelos animais já é uma realidade. Assim, a detecção de determinados alelos HLA, principais marcadores imunogenéticos associados com a susceptibilidade ao DM1, pode ser realizada para avaliar o risco de desenvolvimento do DM1, principalmente em indivíduos que apresentam história familiar da doença. Modelos matemáticos baseados em estudos familiares e entre gêmeos têm indicado que os alelos HLA são os principais componentes genéticos responsáveis em até 30 a 60% de associação com a doença⁽¹³⁾.

Otimismo acerca da prevenção e cura do DM1 tem sido descrito por vários autores. Nesse sentido,

triagens de pacientes apresentando alto risco para o desenvolvimento do DM1, ou seja, portadores de alelos HLA associados com a susceptibilidade à doença e presença de auto-anticorpos circulantes, têm sido implementadas em alguns países. Protocolos de pesquisas têm utilizado insulina ou peptídeos da insulina, ou ainda remoção de componentes da dieta, como proteínas do leite de vaca, para a prevenção da DM1 e retardo/inibição na progressão da destruição das células betapancreática, em pessoas recentemente diagnosticadas⁽¹⁴⁻¹⁵⁾.

Indubitavelmente, o entendimento dos mecanismos imunogenéticos associados à morte celular no DM1 é fundamental para estabelecer possíveis estratégias imunoterapêuticas para predição, prevenção e cura da doença e, acima de tudo, constitui importante instrumento para fundamentar a assistência aos portadores dessa desordem.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste contexto, é relevante investigar a produção do conhecimento de fatores imunogenéticos associados ao desencadeamento do DM1, das estratégias utilizadas para a predição e prevenção, a fim de servir como parâmetros para o desenvolvimento de novas pesquisas e como possibilidade de intercâmbio científico entre os pesquisadores e as diferentes áreas do conhecimento em diversas localidades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Liu E, Eisenbarth GS. Type 1A diabetes mellitus-associated autoimmunity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2002;31:391-410.
2. Onengut-Gumuscu S, Concannon P. Mapping genes for autoimmunity in humans: type 1 diabetes as a model. *Immunol Rev* 2002;190:182-94.
3. Jenuwine ES, Floyd JA. Comparison of Medical Subject Headings and text-word searches in MEDLINE to retrieve studies on sleep in healthy individuals. *J Med Libr Assoc* 2004;92:349-53.
4. Salminen KK, Vuorinen T, Oikarinen S, Helminen M, Simell S, Knip M, et al. Isolation of enterovirus strains from children with preclinical Type 1 diabetes. *Diabet Med* 2004;21:156-64.
5. Woo W, LaGasse JM, Zhou Z, Patel R, Palmer JP, Campus H, et al. A novel high-throughput method for accurate, rapid, and economical measurement of multiple type 1 diabetes autoantibodies. *J Immunol Methods* 2000;244:91-103.

6. Kulmala P, Savola K, Reijonen H, Veijola R, Vahasalo P, Karjalainen J, et al. Genetic markers, humoral autoimmunity, and prediction of type 1 diabetes in siblings of affected children. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetes* 2000;49:48-58.
7. Barker JM, Barriga KJ, Yu L, Miao D, Erlich HA, Norris JM, et al. Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3896-902.
8. Obayashi H, Hasegawa G, Fukui M, Kamiuchi K, Kitamura A, Ogata M, et al. Tumor necrosis factor microsatellite polymorphism influences the development of insulin dependency in adult-onset diabetes patients with the DRB1*1502-DQB1*0601 allele and anti-glutamic acid decarboxylase antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3348-51.
9. Durinovic-Bello I, Maisel N, Schlosser M, Kalbacher H, Deeg M, Eiermann T, et al. Relationship between T and B cell responses to proinsulin in human type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1005:288-94.

10. Kulmala P. Prediabetes in children: natural history, diagnosis, and preventive strategies. *Paediatr Drugs* 2003;5:211-21
11. Fernandes APM, Louzada-Jr P, Foss MC, Donadi EA. HLA-DRB1, DOB1 and DQA1 allele profile in brazilian patients with tipe-1 Diabetes Mellitus. *Ann N Y Acad Sci* 2002;958:305-8.
12. Pociot F, McDermott MF. Genetics of type 1 diabetes mellitus. *Genes Immun* 2002;3:235-49.
13. Kupila A, Muona P, Simell T, Arvilommi P, Savolainen H, Hamalainen AM, et al. Feasibility of genetic and immunological prediction of DM1 in a population-based birth cohort. *Diabetologia* 2001;44:290-7.
14. LaGasse JM, Brantley MS, Leech NJ, Rowe RE, Monks S, Palmer JP, et al. Successful prospective prediction of type 1 diabetes in schoolchildren through multiple defined autoantibodies: an 8-year follow-up of the Washington State Diabetes Prediction Study. *Diabetes Care* 2002;25:505-11.
15. Kupila A, Muona P, Simell T, Arvilommi P, Savolainen H, Hamalainen AM, et al. Feasibility of genetic and immunological prediction of type I diabetes in a population-based birth cohort. *Diabetologia* 2001;44:290-7.