

# Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1

C. A. BALDA, A. PACHECO-SILVA

Disciplina de Nefrologia da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP.

UNITERMOS: Diabetes. Imunologia. Antígenos. Prevenção.

KEYWORDS: Diabetes. Immunology. Antigens. Prevention.

## INTRODUÇÃO

O diabetes melito tipo 1 (classificação publicada em 1997<sup>1</sup>) é uma doença metabólica crônica caracterizada por uma deficiência de insulina, a qual é determinada pela destruição das células produtoras de insulina do pâncreas. Este processo, mediado pelo sistema imunológico, ocasiona um quadro permanente de hiperglicemia o qual é característico da patologia. Invariavelmente há necessidade de reposição insulínica exógena.

Nesta doença existem alterações no metabolismo de hidratos de carbono, lipídios e proteínas, assim como alterações estruturais em diversos sistemas orgânicos incluindo microangiopatia (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macroangiopatia (doença coronariana, insuficiência arterial periférica, etc.).

## Epidemiologia

O diabetes tipo 1 apresenta uma distribuição racial pouco uniforme com uma frequência menor em indivíduos negros e asiáticos e uma frequência maior na população européia, principalmente nas populações provenientes de regiões do norte da Europa<sup>2</sup>. A incidência do diabetes tipo 1 é bastante variável, de 1 a 2 casos por 100.000 ao ano no Japão até 40 por 100.000 ao ano na Finlândia<sup>3</sup>. Nos Estados Unidos a prevalência do diabetes tipo 1 na população geral é em torno de 0,4%<sup>4</sup>.

A incidência do diabetes tipo 1 vem aumentando nas últimas décadas em alguns países como Finlândia, Suécia, Noruega, Áustria e Polônia, e em trabalho publicado em 1993, Michaelis *et al.*<sup>5</sup> descrevem o mesmo fenômeno na população da antiga Alemanha Oriental, porém apenas nas populações mais jovens. As explicações para estas diferenças regionais e étnicas baseiam-se em diferenças genéticas e ambientais. No Brasil temos poucos estudos epidemiológicos sobre o diabetes tipo 1, porém

em estudo recente, abrangendo três cidades do interior paulista, constatou-se uma incidência de 7,6/100.000 habitantes nesta população<sup>6</sup>.

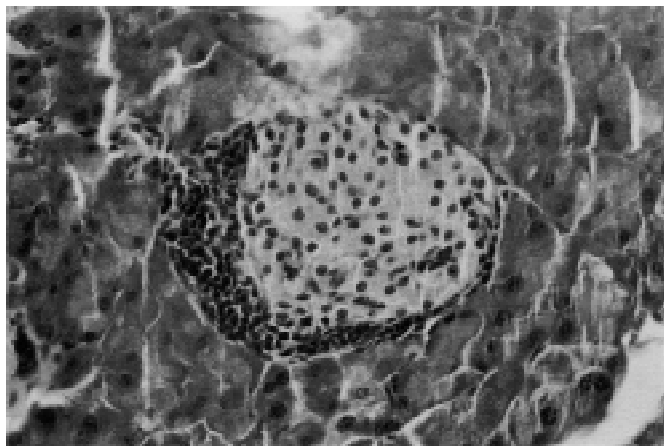
## Aspectos genéticos

Genes de diversos locus vêm sendo estudados quanto a sua participação no desenvolvimento do diabetes tipo 1, entre os quais podemos citar genes do locus MHC classe I (HLA locus A, B e C), classe II (HLA locus DR, DQ e DP) e classe III, além de genes não-MHC. O conjunto de genes presentes no locus MHC (complexo principal de histocompatibilidade) vem sendo estudado através de métodos moleculares, por exemplo, com a utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR), permitindo com isto a determinação das seqüências de aminoácidos de seus constituintes. Alguns alelos suspeitos de participação no desenvolvimento do diabetes tipo 1 estão sendo encontrados. Como exemplo, podemos citar HLA-DQA1\*0301 e HLA-DQB1\*0302 na população Caucásioide. Outros alelos dos locus DR3 e DR4 também podem estar envolvidos<sup>7</sup>. Genes não-MHC também podem ter participação como por exemplo, o polimorfismo no gene da insulina situado no cromossomo 11<sup>8</sup>, e mais recentemente a relação entre a suscetibilidade genética para diabetes tipo 1 e os genes para o TAP (transportador envolvido na apresentação de antígenos)<sup>9</sup>. O envolvimento de algumas dezenas de locus genéticos no desenvolvimento do diabetes tipo 1 estão em processo de estudo e o projeto de mapeamento do genoma humano deve auxiliar em tais investigações.

As informações disponíveis sugerem que o diabetes tipo 1 é uma doença com característica multifatorial, com grande importância dos fatores ambientais, além dos genéticos. Sabemos que 90% dos indivíduos com diabetes tipo 1 diagnosticado não têm parentes de primeiro grau que apresentem a doença e a chance de gêmeos idênticos terem diabetes tipo 1 é de somente 33%<sup>2</sup>.

## Patogênese

Ao contrário do que se imaginava, a evolução da doença não é aguda e sim um processo de auto agressão de evolução lenta que provavelmente se desenvolve durante anos numa fase pré clínica. No período de manifestação da doença, com a



**Fig. 1** - Início do processo de insulite com infiltrado inflamatório mononuclear acometendo uma ilhota pancreática de camundongo NOD. Este processo inflamatório promoverá a destruição das células beta secretoras de insulina.

presença de hiperglicemia e cetose, as células secretoras de insulina já estão em número muito diminuído ou praticamente ausentes.

A presença de infiltrado inflamatório do tipo linfomononuclear e a ausência de células secretoras de insulina, as células beta, caracteriza o quadro histológico do diabetes tipo 1. As células secretoras de outros hormônios, como glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático, também presentes nas ilhotas pancreáticas são poupadas, porém como as células que secretam insulina são em maior número as ilhotas pancreáticas acabam se tornando atrofiadas.

O processo de destruição das células  $\beta$  pancreáticas, denominado insulite, ocorre pela agressão imunológica mediada por células linfocitárias, macrófagos e células “natural killer”, sendo portanto um processo dependente da imunidade celular (Figura 1).

Os linfócitos são as células responsáveis pela resposta imune específica; são as únicas células do corpo capazes de reconhecer e distinguir determinantes antigênicos específicos. Os linfócitos se dividem em duas classes ou subtipos principais; linfócitos B (responsáveis pela produção de anticorpos) e linfócitos T (medeiam e participam da resposta celular específica). Os linfócitos T são divididos em duas populações distintas, os linfócitos T auxiliares (CD-4 ou “Helper”) e os linfócitos T citotóxicos (CD-8).

Os linfócitos T só reconhecem, como antígenos, peptídeos associados à proteínas de seu MHC (complexo principal de histocompatibilidade). Desta forma, os linfócitos T se comportam como células cuja ativação é antígeno específica e MHC restrita. Uma terceira classe de linfócitos é o “Natural

Killer”, ou célula NK, que não apresenta marcadores de linfócitos T ou B e que é capaz de lisar células tumorais ou infectadas por vírus sem que haja estímulo antigênico específico.

Os linfócitos T CD8+ (citotóxicos) são as células linfocitárias predominantes no processo de insulite, mas pode-se detectar também a presença de linfócitos T CD4+ (“helper”) e linfócitos B. O processo de insulite parece ocorrer com maior intensidade em ilhotas onde existam células beta metabolicamente ativas, ou seja, que secretam insulina. Ao longo do tempo as células beta vão diminuindo em número, assim como a intensidade do processo inflamatório<sup>10</sup>.

Pesquisadores têm demonstrado, em tecido pancreático de animais diabéticos, o aumento da expressão de moléculas apresentadoras de antígeno (MHC) tanto da classe I, que apresentam antígenos preferencialmente aos linfócitos CD8+ citotóxicos, quanto da classe II, que apresentam antígenos preferencialmente aos linfócitos CD4+. As células onde as moléculas do MHC se expressam de maneira mais intensa ainda é motivo de pesquisas; aparentemente o MHC classe I está expresso nas células beta das ilhotas de maneira mais evidente, enquanto que a expressão do MHC classe II é mais evidente em endotélio vascular e macrófagos infiltrantes, sendo sua presença também detectada nas células beta<sup>11, 12</sup>.

Na migração das células inflamatórias para o local afetado ocorre a importante participação das moléculas de adesão. Estas podem ter sua expressão aumentada nas células endoteliais e linfocitárias o que facilita o processo de marginação nos capilares sanguíneos e posterior migração, para o tecido, de células linfocitárias e outras células constituintes do mecanismo de inflamação. As selectinas e as integrinas formam os dois grandes grupos de moléculas de adesão. As integrinas LFA-1 (“lymphocyte function-associated antigen-1”) presentes na superfície dos linfócitos e as ICAMs (“intercellular adesion molecule”) presentes na superfície das células endoteliais são exemplos de moléculas de adesão envolvidas. Em estudo recente, demonstrou-se duas moléculas de adesão, aparentemente mais importantes no processo de marginação e migração de células inflamatórias na insulite, que são a integrina  $\alpha 4\beta 7$  encontrada na superfície de linfócitos e a MadCAM-1 (“mucosal addressin”) expressa na superfície dos vasos<sup>13</sup>.

O linfócito T CD-4 ou “helper”, após sua ativação produz várias citocinas cuja principal ação é promover a proliferação e diferenciação de linfócitos T e outras células, incluindo linfócitos B e macrófagos.

Citocinas são mediadores protéicos de baixo

peso molecular que servem para a comunicação entre duas ou mais células da resposta imune ou inflamatória. As citocinas são divididas em vários grupos, como a família dos interferons (IFN  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), fator de necrose tumoral (TNF), hematopoeínas (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, IL-15, GM-CSF),<sup>2</sup> do TGF-beta e outras. Os efeitos das citocinas podem ser sinérgicos ou antagonísticos entre si. Um exemplo deste antagonismo é a dicotomia no padrão de produção de citocinas, T helper do tipo 1 (Th1) e T helper do tipo 2 (Th2). Quando os linfócitos T produzem citocinas de padrão T helper 1, isto é, IL-2 e  $\gamma$ -IFN é induzida uma resposta predominante do tipo celular; ao contrário quando há predomínio de padrão T helper 2, isto é, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 a resposta induzida é preferencialmente humoral.

Antes da resposta ser desviada para um padrão Th1 ou Th2 os linfócitos passam por uma fase inicial na qual produzem citocinas Th1 e Th2, denominado Th0 (T helper zero); durante esta fase, dependendo do tipo de interação com a célula apresentadora do antígeno, e do micro ambiente local (predomínio de IL-4 induz resposta Th2 e IL-12 induz resposta Th1) um ou outro padrão irá predominar. É importante ressaltar que os dois padrões distintos Th1 e Th2 tendem a uma inibição mútua, isto é, quando a resposta é desviada para o tipo Th1, as citocinas produzidas inibem a resposta do tipo Th2, e vice-versa. Um exemplo da importância deste tipo de desvio no padrão de secreção de citocinas é o que ocorre na Leishmaniose experimental em camundongos, na qual animais infectados que desenvolvem resposta do padrão Th1 tendem a se curar da infecção, enquanto que os que desenvolvem um padrão Th2 evoluem para óbito. O tipo de resposta, Th1 ou Th2, tende a ocorrer de maneira uniforme em cepas isogênicas, por exemplo, camundongos Balb/c são mais suscetíveis à infecção pela leishmania por apresentarem um padrão de secreção preferencial do tipo Th2, enquanto que animais C57BL/6 são resistentes por apresentarem preferencialmente resposta Th1 frente a leishmania. Animais suscetíveis podem tornar-se resistentes se tratados com anticorpos anti-IL-4, enquanto que animais resistentes podem tornar-se suscetíveis se tratados com IL-4 na fase inicial da infecção. Em humanos, um exemplo claro desta dicotomia Th1/Th2 é o que ocorre em pacientes com hanseníase, onde os indivíduos com formas pauci bacilares têm uma resposta predominante Th1, enquanto os indivíduos com formas mais graves tem seu padrão de produção de citocinas pelos linfócitos desviado para o padrão Th2.

O melhor modelo animal para estudos dos mecanismos patogênicos do diabetes tipo 1 é uma linhagem de camundongos que se torna espontaneamente diabética, denominada NOD ("non-obese diabetic"). Estudos utilizando estes animais têm demonstrado que o perfil de secreção de citocinas durante o desenvolvimento do diabetes tipo 1 é de padrão Th1 onde temos como principais constituintes a interleucina 2, o fator de necrose tumoral (TNF) e os interferons. Estudos tentando alterar o perfil para Th2 (T "helper" do tipo 2), com a secreção predominante de IL-4 e IL-10, tentam bloquear a evolução do diabetes nestes animais<sup>14,15</sup>.

A participação dos radicais livres na lesão do pâncreas e desencadeamento do diabetes tipo 1 também é um aspecto importante sendo o principal exemplo o óxido nítrico (NO), molécula sintetizada por dois grupos de enzima a partir do amino-ácido L-arginina, um de forma constitutiva e outro na forma induzida. A forma induzida da sintase do óxido nítrico (iNOS) está presente em diversos tipos de células, entre elas os macrófagos, já foi encontrada em tecido pancreático de camundongos NOD e parece ser estimulada por citocinas de perfil Th1 como o interferon-gama<sup>16</sup>.

A correlação entre os setores celular e humoral na resposta imune ainda é motivo de especulações. A apresentação de determinados antígenos, a ativação de células produtoras de citocinas e a ativação de moléculas de adesão facilitando a adesão e migração celular e a posterior produção de radicais livres e novas citocinas, as quais promovem a amplificação da resposta imunológica pode ter alguma correlação com a produção de anticorpos e portanto com o setor humoral da imunidade. Em trabalho recente, utilizando modelo de glomerulonefrite lúpica, descreveu-se que os receptores Fc $\gamma$  presentes em células linfocitárias, macrófágicas e apresentadoras de antígenos, são capazes de ativar o setor celular a partir da ligação com a porção Fc das imunoglobulinas. A ausência dos receptores Fc $\gamma$  inibe a atividade inflamatória nos glomérulos, mesmo quando há deposição evidente de imunoglobulinas e de fatores do complemento<sup>17</sup>. Talvez este seja mais um caminho a ser tentado com o intuito de se conseguir evitar processos de auto imunidade através da inibição de constituintes da cascata imunológica.

### **Antígenos das ilhotas pancreáticas**

Uma variedade de antígenos presentes nas ilhotas pancreáticas foram identificados e a presença de anticorpos contra tais antígenos são pesquisados para esclarecimento do mecanismo fisiopatogênico e como possíveis marcadores precoces da

doença diabetes tipo 1. Alguns exemplos destes antígenos são a insulina, a descarboxilase do ácido glutâmico (GAD), a carboxipeptidase H, os peptídeos de 37, 38, 40, 52 e 69-kd, além do ICA-512 e IA-2 (o ICA512 é uma fração do IA2)<sup>2, 18, 19</sup>.

Um aspecto interessante da participação destes antígenos na fisiopatogenia do diabetes tipo 1 é que a expressão mais tardia de determinados antígenos das ilhotas pancreáticas coincide com o desencadeamento da resposta agressora auto imune. Em trabalho recente utilizando modelo animal de rato diabético (BB- bio-breeding rat), observou-se que a expressão do antígeno de 37 kd ocorreu tardiamente (aproximadamente 30 dias de vida), sugerindo que a sua expressão possa ser responsável pelo desencadeamento do diabetes neste modelo<sup>20</sup>.

Outro aspecto importante no mecanismo de desenvolvimento do diabetes tipo 1 em estudo é a existência de reações cruzadas entre respostas contra antígenos exógenos e antígenos das ilhotas, uma teoria interessante é a de possível reação cruzada entre proteína do leite de vaca e um antígeno protéico de 69 kd presente nas ilhotas<sup>21</sup>. Estudos que comprovem a validade de tais teorias no mecanismo de destruição das ilhotas pancreáticas no diabetes tipo 1 ainda são necessários.

A pesquisa de anticorpos contra antígenos pancreáticos, em indivíduos sadios, tem sido realizada com o objetivo de detectar indivíduos predispostos ao desenvolvimento do diabetes tipo 1. A presença de dois auto anticorpos tem despertado maior interesse; anticorpos contra antígenos citoplasmáticos da célula da ilhota pancreática e anticorpos contra a insulina. O risco de desenvolvimento do diabetes tipo 1 na presença de tais anticorpos parece variar na dependência do título de anticorpos e da idade do indivíduo pesquisado, havendo maior risco em indivíduos de faixa etária mais baixa e com títulos altos de anticorpos<sup>22</sup>.

Estudos demonstram que em indivíduos nos quais se quer avaliar o risco de desenvolvimento do diabetes tipo 1, a detecção de mais de um tipo de anticorpo pode levar a uma melhora no valor preditivo destes testes<sup>23</sup>.

### **A prevenção do diabetes tipo 1 humano**

Um dos problemas no desenvolvimento de terapias para o diabetes tipo 1 é a diferença entre os modelos animais e o diabetes humano. As principais diferenças entre o diabetes tipo 1 no homem e no camundongo NOD são a incidência de diabetes tipo 1 dependente do sexo no animal e a possibilidade de tratamento prévio ao desenvolvimento da doença no mesmo.

No camundongo NOD a ocorrência de diabetes

tipo 1 é desproporcional entre machos e fêmeas, com incidência evidentemente maior no sexo feminino, o que nos sugere uma participação de hormônios sexuais na tendência ao desenvolvimento do diabetes tipo 1. Tal fato não é observado no ser humano onde tendências a um predomínio em relação a um sexo não ocorrem. Nos modelos animais temos a possibilidade de interferir na evolução da doença em períodos variáveis, uma vez que o processo de insulite e desenvolvimento da doença diabetes ocorrem em idades pré determinadas, o que não acontece nos seres humanos.

Estudos recentes, descreveram a possibilidade de se detectar uma população de risco para o desenvolvimento do diabetes tipo 1 utilizando para isto a presença de auto anticorpos contra múltiplos antígenos pancreáticos. Estes estudos encontraram correlação significativa entre a presença de dois ou mais auto anticorpos e o desenvolvimento de diabetes em indivíduos com parentes diabéticos previamente diagnosticados<sup>24</sup>, e mesmo em indivíduos onde não havia nenhum caso familiar de diabetes tipo 1<sup>25</sup>. Devemos lembrar que o último caso corresponde a 90% dos casos de diagnóstico de diabetes tipo 1. Tais trabalhos permitem, portanto, que possamos tentar realizar intervenções terapêuticas antes da doença se manifestar.

Considerando o diabetes tipo 1 uma doença auto imune, e portanto passível de tratamento imunossupressor, foram utilizadas drogas com efetividade imunossupressora comprovada em outras patologias e em transplantes como a azatioprina, os corticoesteróides e a ciclosporina. Os resultados destes estudos são inconclusivos; alguns estudos esporádicos demonstram efeitos benéficos em pacientes com início recente do diabetes tipo 1, com a diminuição da dose necessária de reposição insulínica e, em alguns casos, períodos nos quais o paciente não necessitou de reposição insulínica<sup>26,27</sup>. Os principais problemas observados na tentativa de tratamento do diabetes tipo 1 com a utilização de imunossupressores são devidos a pouca efetividade a longo prazo deste tratamento e a recidiva freqüente do quadro após a suspensão do imunossupressor.

Acredita-se que o diabetes tipo 1 é uma doença crônica e que a melhor fase para tentarmos qualquer tipo de intervenção seja no período que antecede o quadro clínico. Isto nos leva a um problema ético importante em relação à utilização de imunossupressores, devido aos seus efeitos colaterais em indivíduos teoricamente sadios. Assim métodos alternativos de intervenção foram elaborados a partir de estudos nos animais diabéticos.

A observação de que a terapia profilática previne a ocorrência do diabetes tipo 1 em modelos

animais, levou pesquisadores a iniciarem protocolos com a utilização profilática de insulina em indivíduos com alto risco de desenvolverem diabetes tipo 1 (parentes próximos de indivíduos diabéticos, nos quais são acompanhados os níveis de anticorpos contra insulina e ilhota pancreática). Em estudo piloto, utilizando a insulina profilática, os autores tiveram boa resposta terapêutica sendo que no grupo de cinco pacientes tratados, somente um desenvolveu diabetes tipo 1, enquanto que no grupo controle os sete indivíduos não tratados desenvolveram diabetes tipo 1. Apesar destes resultados iniciais animadores, não está claro o mecanismo pelo qual os pacientes foram protegidos e um estudo randomizado com a insulina profilática está em andamento<sup>28</sup>.

A observação da evolução de alguns experimentos realizados com animais diabéticos levou a estudos piloto com outros tipos de fármacos, como por exemplo a administração, em indivíduos com diabetes tipo 1 de início recente, de uma vitamina hidrossolúvel a nicotinamida, um inibidor da ativação da enzima poli-ADP-ribose sintetase que evita uma queda na concentração de nicotinamida adenina difosfato (NAD) no ambiente intracelular e, além disto, a nicotinamida atua como um protetor contra a ação de radicais livres, entre os quais o óxido nítrico. Entretanto, estudos utilizando a nicotinamida em pacientes com diabetes tipo 1 de início recente não mostraram resultados significativos<sup>29</sup>.

### PERSPECTIVAS

O achado de alguns antígenos das ilhotas pancreáticas, possivelmente responsáveis pela iniciação do processo de auto agressão, levou pesquisadores a tentar induzir tolerância imunológica a tais antígenos e bloquear o aparecimento do diabetes em modelos animais, como é o caso do camundongo NOD.

O antígeno GAD (descarboxilase do ácido glutâmico) é um dos principais antígenos pesquisados até o presente momento. A reação contra este antígeno, mediada por linfócitos T e também pela imunidade humoral, já foi detectada em animais ao redor da quarta semana de vida<sup>30</sup>. A tentativa de induzir-se tolerância através de injeções intratímicas do GAD foi realizada com boa resposta, isto é, animais tratados desta forma demonstraram menor incidência de insulite e de diabetes<sup>31</sup>.

Outra forma de administração de antígenos, utilizada na tentativa de indução de tolerância, é a via oral. A chamada indução de tolerância por via oral é assim uma forma de induzirmos tolerância

periférica, diferente da chamada tolerância central induzida no timo. É postulado que tal tipo de tolerância se deva a ativação de dois mecanismos imunológicos principais: a geração de supressão ativa, através da secreção de citocinas inibitórias como a IL-4 e o TGF- $\beta$ , e a anergia clonal (não responsividade mediada por linfócitos). Estudos levam a crer que o principal mecanismo envolvido depende da quantidade de antígeno administrada, onde doses baixas favorecem supressão ativa de células auto-agressoras e altas doses favorecem a indução de anergia em tais células<sup>32</sup>. O principal local envolvido no desenvolvimento da tolerância oral é a mucosa intestinal, sendo que o estudo de seus aspectos imunológicos é motivo de pesquisas recentes<sup>33</sup>. Tentativas de indução de tolerância oral em camundongos NOD administrando-se insulina como antígeno demonstraram resultados significativos<sup>34</sup>.

Outro antígeno utilizado, na tentativa de indução de tolerância oral no camundongo NOD, foi o GAD. Tal antígeno foi administrado através da oferta de plantas transgênicas (tabaco e batata) para a proteína GAD. O resultado foi bastante animador, com redução na incidência de diabetes tipo 1 nos animais tratados<sup>35</sup>. Em nosso laboratório realizamos um estudo piloto na tentativa de induzir tolerância oral em animais NOD administrando, por gavagem, pâncreas murino macerado, porém não obtivemos sucesso no sentido de diminuir a taxa de incidência de diabetes tipo 1 (dados não publicados).

### CONCLUSÕES

A importância da doença diabetes tipo 1 do ponto de vista social e econômico é inegável devido às altas taxas de morbidade, mortalidade e de incapacitação para o trabalho. Desta forma, fica evidente que tal doença merece especial cuidado no sentido de uma detecção precoce dos indivíduos susceptíveis para que haja possibilidade de intervenção profilática nos mesmos. O entendimento dos aspectos imunológicos constitui assim a base para a detecção e prevenção do diabetes tipo 1.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20: 1.183-95.
2. Atkinson MA, MacLaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus (review article). *N Engl J Med* 1994; 331: 1.428-36.
3. Green A, Gale EAM, Patterson CC. Incidence of childhood-onset insulin-dependent diabetes mellitus: the EURODIAB

- ACE study. *Lancet* 1992; 339: 905-9.
4. LaPorte RE, Cruickshanks KJ. Incidence and risk factors for insulin-dependent diabetes. National Diabetes Data Group. Diabetes in America: diabetes data compiled 1984. *NIH publication* 85-1468.
  5. Michaelis D, Jutzi E, Vogt L. Epidemiology of insulin-treated diabetes mellitus in East-German population: differences in long-term trends between incidence and prevalence rates. *Diabetes & Metabolism* 1993; 19:110-15.
  6. Ferreira SRG, Franco LJ, Vivolo MA, et al. Population-based incidence of IDDM in the state of São Paulo, Brazil. *Diabetes Care* 1993; 16: 701-704.
  7. Auwera BVD, Schuit F, Lyaruu I, et al and The Belgian Diabetes Registry. Genetic susceptibility for insulin-dependent diabetes mellitus in Caucasians revisited: the importance of diabetes registries in disclosing interactions between HLA-DQ and insulin gene-linked risk. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 2.567-73.
  8. Julier C, Hyer RN, Davies J, et al. Insulin-IGF<sub>2</sub> region on chromosome 11p encodes a gene implicated in HLA-DR4 dependent diabetes susceptibility. *Nature* 1991; 354: 155-9.
  9. Faustman D, Li X, Lin HY, et al. Linkage of faulty major histocompatibility complex class I to autoimmune diabetes. *Science* 1991; 254: 1.756-61.
  10. Foulis AK, Little CN, Farquharson MA, Richmond JÁ, Weir RS. The histopathology of pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia* 1986; 29: 267-74.
  11. Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM, et al. In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in the diabetic insulinitis. *N Engl J Med* 1985; 313: 353-60.
  12. Hänninen A, Jalkanen S, Salmi M. Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. 1992; 90: 1.901-10.
  13. Yang Xiao-Dong, Michie AS, Mebius RE, et al. The role of cell adhesion molecules in the development of IDDM. Implications for pathogenesis and therapy. *Diabetes* 1996; 45: 705-10.
  14. Rabinovitch A. Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes* 1994; 43: 613-21.
  15. Pennline KJ, Roque-Gaffney E, Monahan M. Recombinant human IL-10 prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 71:169-75.
  16. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Sorensen O, Bleackley RC. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in pancreatic islets of nonobese diabetic mice: identification of iNOS-expressing cells and relationships to cytokines expressed in the islets. *Endocrinology* 1996; 137: 2.093-99.
  17. Clynes R, Dumitru C, Ravetch JV. Uncoupling of immune complex formation and kidney damage in autoimmune glomerulonephritis. *Science* 1998; 279: 1.052- 4.
  18. Roep BO. T-cell responses to autoantigens in IDDM. The search for the Holy Grail. *Diabetes* 1996; 45: 1.147-56.
  19. Rabin DU, Pleasic SM, Shapiro JA, Yoo-Warren H et al. Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. *J Immunol* 1994; 152: 3.183- 8.
  20. Jun HS, Yoon JW. Initiation of autoimmune type I diabetes and molecular cloning of a gene encoding for islet cell-specific 37 kd autoantigen. *Adv Exp Med Biol* 1994; 347: 207-20.
  21. Karjalainen J, Martin JM, Knip M, et al. A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1992; 327: 302-7.
  22. Krischer JP, Schatz D, Riley WJ, et al. Insulin and islet cell autoantibodies as time-dependent covariates in the development of insulin-dependent diabetes: a prospective study in relatives. *J Clin Endoc Metab* 1993; 77: 743-49.
  23. Bonifacio E, Genovese S, Bragui S, et al. Islet autoantibody markers in IDDM: risk assessment strategies yielding high sensitivity. *Diabetologia* 1995; 38: 816-22.
  24. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, et al. Prediction of type 1 diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 1996; 45: 926- 32.
  25. Bingley PJ, Bonifacio E, Williams AJK, et al. Prediction of IDDM in the general population. Strategies based on combinations of autoantibody markers. *Diabetes* 1997; 46: 1.701- 10.
  26. Silverstein J, MacLaren N, Riley W, et al. Immunosuppression with azathioprine and prednisone in recent-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1988; 319: 599-604.
  27. Bougneres PF, Carel JC, Castano L, et al. Factors associated with early remission of type I diabetes in children treated with cyclosporine. *N Engl J Med* 1988; 318: 663-70.
  28. Keller R, Eisenbarth GS, Jackson RA. Insulin prophylaxis in individuals at high risk of type I diabetes. *Lancet* 1993; 341: 927-28.
  29. Chase HP, Butler-Simon N, Garg S, et al. A trial of nicotinamide in newly diagnosed patients with type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1990; 33: 444-46.
  30. Kaufman DL, Clare-Salzier M, Tian J, et al. Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* 1993; 366: 69-72.
  31. Tisch R, Yang X, Singer SM et al. Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature* 1993; 366: 72- 75.
  32. Weiner HL, Friedman A, Miller A et al. Oral tolerance: Immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 809-37.
  33. Kagnoff MF. Mucosal immunology: new frontiers. *Immunol Today* 1996; 17: 57- 59.
  34. Zhang ZJ, Davidson L, Eisenbarth G, Weiner HL. Suppression of diabetes NOD mice by oral administration of porcine insulin. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 1.0252-56.
  35. Ma S.-W, Zhao D.-L, Yin Z.-Q, et al. Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral immune tolerance. *Nature* 1997; 3: 793-6.