

## Anticorpos anti-GAD<sup>#</sup> Indicações na prática clínica

### Anti-GAD antibodies

### Indications in clinical practice

M<sup>a</sup> Cristina Esteves\*, Rui Duarte\*\*, Jorge L. Caldeira\*\*\*

### Resumo

A etiopatogenia da diabetes tipo I (caracterizada por défice absoluto em insulina) resulta de um processo auto-imune dirigido contra a célula  $\beta$ . Ocorre num terreno de susceptibilidade genética, sendo despoletado por factores ambientais.

O reconhecimento da diabetes tipo I como doença auto-imune baseia-se, quer no reconhecimento da insulite (infiltrado inflamatório linfocitário do ilhéu) quer na descoberta de numerosos anticorpos dirigidos contra constituintes das células  $\beta$  dos ilhéus de Langerhans. A fase de agressão auto-imune pré-clínica é caracterizada pelo aparecimento de vários anticorpos, dos quais se destacam: ICA, IAA e anti-GAD. Os anticorpos anti-GAD, pela sua especificidade, são actualmente considerados os marcadores de auto-imunidade mais importantes na diabetes tipo I. A sua detecção na fase pré-clínica de doença permite determinar futura insulíndependência, sendo especialmente útil no diagnóstico diferencial da diabetes do adulto jovem não obeso e na diabetes gestacional. A sua determinação poderá também vir a revelar-se importante na prevenção primária da diabetes através da utilização de antigenioterapia específica.

Palavras chave: anticorpos anti-GAD, diabetes tipo I e auto-imunidade

### Abstract

The pathogenesis of type I diabetes (characterized by insulin deficiency) is caused by an auto-

immune process against the pancreatic islet  $\beta$  cells. It occurs when a genetic susceptibility interacts with multiple environmental agents. The evidence for an auto-immune basis comes from the recognition of insulitis and the presence of multiple auto-antibodies to  $\beta$ -cell constituents. In the early pre-clinical phase of type I diabetes, antibodies to islet cell antigens are detected, including: ICA (islet cell antibodies), IAA (insulin auto-antibodies) and anti-GAD (glutamic acid decarboxylase antibodies). The anti-GAD antibody is the main auto-immune marker. When detected in the pre-clinical phase of disease, it allows us to predict future insulin dependency. Its contribution to the classification of type I diabetes in the young non-obese adult and in gestational diabetes is discussed. In the future the utilisation of anti-GAD could be useful in primary prevention with antigen immunotherapy.

Key words: antibodies anti-GAD, type I diabetes, autoimmunity

### Introdução

Nos últimos dez anos, assistiu-se a profundas alterações no conhecimento da etiopatogenia da diabetes tipo I.

Trata-se de uma doença crónica com alteração no metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas, por carência absoluta ou relativa de insulina, que se estabelece progressivamente e ao longo de um período de meses a anos. Este processo de auto-imunidade é desencadeado por factores ambientais em indivíduos geneticamente predispostos<sup>1</sup>. Relativamente aos factores genéticos, é conhecida a associação aos haplótipos HLA DR3 e DR4; quanto aos factores extrínsecos, salientam-se vírus, tóxicos e factores alimentares. Sob o efeito destes factores e perante a expressão de antigénios da classe II do sistema HLA, assiste-se ao despoletar da reacção imunológica dirigida contra a célula  $\beta$  pancreática, com activação de linfócitos  $\beta$  produtores de anticorpos e activação de linfócitos T citotóxicos, culminando na lise da célula  $\beta$ .

A fase de agressão auto-imune é reconhecida pelo aparecimento de vários anticorpos contra constituintes das células do ilhéu, incluindo ICA (anticorpos anti-ilhéus), IAA (anticorpos anti-insulina), anti-GAD (anticorpos anti-descarboxilase do ácido glutâmico) e outros. Nesta fase, de duração variável, e que antecede o aparecimento de sintomas clínicos ou alterações laboratoriais, a detecção de anticorpos constitui o marcador serológico da insulite subjacente. Os anticorpos anti-GAD com elevada sensibilidade e maior especificidade, sendo de fácil detecção, tornam-se especialmente importantes na predição e diagnóstico de futura insulíndependência.

\*Assistente Hospitalar de Medicina Interna

\*\*Assistente Hospitalar de Diabetologia

\*\*\*Assistente Hospitalar Graduado de Diabetologia

Serviço de Medicina IV do Hospital de Santa Maria, Lisboa

<sup>#</sup>Trabalho efectuado no âmbito do Ciclo de Estudos Especiais de Diabetes na Clínica de Diabetes e Nutrição

Recebido para publicação a 10.09.97

## Dados históricos

Em 1960, surgem as primeiras suspeitas de que a diabetes tipo I é uma doença auto-imune, mas só em 1974 esta teoria se confirma ao reconhecerem-se os ICA (anticorpos anti-ilhéus) que foram os primeiros auto-anticorpos detectados<sup>2</sup>. Descobertos por Lernmark, os ICA foram inicialmente isolados no soro de crianças com diabetes tipo I recém-diagnosticada. Mais tarde, em 1982, descobre-se que 80-90% das crianças com diabetes recém-diagnosticada apresentavam ICA dirigidos contra uma proteína com um peso molecular de 64 kilodaltons sendo este antigénio denominado proteína 64 k<sup>3</sup>. É Atkinson o primeiro a suspeitar dos anticorpos anti-proteína 64k como os melhores e mais precoces marcadores de diabetes<sup>4</sup>.

Em 1990, Bakeskov desenvolve técnicas específicas, incluindo a imunoprecipitação, para a detecção desta proteína alvo do sistema imunitário, o que permitiu a identificação deste antigénio como sendo a enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD), enzima reconhecida também como o alvo antigénico da doença auto-imune neurológica correspondente ao síndrome de *stiff-man*<sup>5</sup>. A partir de 1991 e através do trabalho de numerosos biólogas moleculares, foi possível estabelecer a sequência genética do GAD, o que permitiu identificar duas formas distintas de GAD (GAD 65 e GAD 67), codificadas por dois genes também distintos<sup>6,7</sup>. Possuindo sequências de aminoácidos idênticas em 70%, ambas as formas de GAD existem nos ilhéus e no cérebro. No ilhéu, o GAD 65 é a isoforma mais abundante, parecendo ser este o auto-antigénio mais importante<sup>8</sup>. Em 1993, Tobin confirma que o GAD é o alvo inicial da resposta auto-imune, coincidindo a sua detecção com o aparecimento da insulite, e surge a ideia da possibilidade de prevenção da doença por interferência imunológica a este nível

Actualmente, estão a ser efectuados estudos animais com o objectivo da prevenção da diabetes através da inactivação das células T reactivas para GAD.

## Anticorpos anti-GAD

Os auto-anticorpos anti-GAD foram inicialmente reconhecidos no síndrome de *stiff-man*, doença neurológica que se associa frequentemente com a diabetes tipo I<sup>9</sup>.

Nesta doença a existência de anticorpos dirigidos contra a enzima descarboxilase do ácido glutâmico impede a formação do neurotransmissor GABA, interferindo deste modo com a neurotransmissão. Os anticorpos anti-GAD reagem não só com os neurónios, mas também com a célula  $\beta$  pancreática, podendo, assim, explicar-se a as-

Figura 1

### 1- IDDM

Contribuição genética conhecida HLA, DR e DQ  
início agudo  
LADA  
não auto-imune

### 2- NIDDM

Contribuição genética conhecida (raro)  
glucoquinase  
DNA mitocondrial  
receptores de insulina  
gene de insulina

Base genética desconhecida ( maioria dos casos )  
insulinorresistencia  
defeito de secreção de insulina

### 3- DIABETES GESTACIONAL

transitório  
DID  
DNID

### 4- OUTROS TIPOS

pancreático  
endócrino  
relacionado com má nutrição  
induzido por medicamentos  
síndromes genéticas raras

Classificação proposta por Zimmet

sociação desta doença à diabetes<sup>9,10</sup>. Desde há longa data se reconhece que o mecanismo auto-imunitário da diabetes tipo I pode ser despoletado por factores extrínsecos, sendo os mais reconhecidos os vírus<sup>11</sup>. O reconhecimento por Erlander da semelhança de sequência de aminoácidos existente entre o GAD 65 e a proteína P2-C do vírus Cocksackie B4 veio apoiar a teoria do mimetismo molecular<sup>12</sup>. Segundo esta teoria, num indivíduo geneticamente predisposto, a infecção viral por Cocksackie resulta na apresentação do péptido viral P2-C ao sistema imunitário e, em particular, aos linfócitos B e T, desencadeando uma reacção imune antiviral e, posteriormente, por semelhança antigénica, anti-célula  $\beta$ . A resposta imune poderia ser perpetuada na ausência do vírus que iniciou o processo. As células  $\beta$  seriam destruídas, inicialmente pela infecção viral e, posteriormente, por resposta auto-imune, a qual promoveria a libertação da proteína GAD, induzindo resposta linfocitária anti-GAD.

É de salientar ainda que a resposta imune depende da susceptibilidade genética. A positividade dos anti-GAD correlaciona-se com o fenótipo HLA DQ e DR. Assim, verificou-se que 84% dos diabéticos tipo I heterozigóticos para DR3/DR4 apresentam anticorpos anti-GAD versus 48% se heterozigóticos para um alelo diferente dos anteriormente mencionados<sup>13</sup>. O reconhecimento de que a destruição da célula  $\beta$  é mediada por linfócitos T permitiu compreender a importância dos

anticorpos anti-GAD como marcadores imunológicos importantes de insulite.

## Interesse dos anticorpos anti-GAD

### a) Adulto

A classificação de diabetes no adulto não obeso de 35-50 anos coloca frequentes dificuldades diagnósticas. O diabético jovem inclui um grupo heterogêneo de doentes em que coexistem frequentemente a insulino-deficiência, a insulinoresistência e a hiperinsulinemia. A DID (diabetes insulino dependente, ou tipo I) é classicamente caracterizada pelo seu início súbito, pela severidade dos sintomas, pela absoluta dependência de insulina exógena e pela tendência para a cetose<sup>14</sup>. Tratando-se de uma doença auto-imune, pode surgir em qualquer idade<sup>15</sup>. Se na criança o seu início é abrupto, impondo o tratamento imediato com insulina, no adulto o seu início é lento, podendo confundir-se com DNID (diabetes não insulino dependente, ou tipo II). Nestes casos, os doentes podem apresentar-se inicialmente assintomáticos e sem necessidade absoluta de insulina, sendo tratados com dieta e antidiabéticos orais durante um período variável de meses a anos. Este início lento com um período de insulino-independência reflecte a progressiva perda de células B<sup>14,16,17</sup>.

A DNID é uma doença de etiopatogenia heterogênea na qual intervêm uma susceptibilidade genética multifactorial, associada a factores ambientais e estilo de vida. Nela está incluído um largo espectro de variações, desde a hiperinsulinemia à hipoinsulinemia com vários graus de insulinoinsensibilidade e insulinoresistência. Se nos países desenvolvidos se assiste a um aumento de incidência desta entidade com características epidémicas, tal parece resultar da alteração de estilos de vida, do tradicional para o moderno. Estes casos são caracterizados pela hiperinsulinemia e insulinoresistência, com obesidade central e, associadamente, dislipidemia e HTA, integrando o actualmente denominado síndrome pluri-metabólico (ou síndrome X)<sup>18,19</sup>.

No entanto, nos últimos anos, têm vindo a ser reconhecidas outras formas de DNID nas quais o défice de insulinossecção predomina. Algumas destas formas incluem casos de DNID com hiperinsulinemia presente numa fase inicial, com posterior exaustão da célula  $\beta$  pancreática e consequente insulino deficiência. Outras formas estão associadas a mutações genéticas. Tal é o caso de várias formas de MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young). Trata-se de uma forma de DNID do jovem (início antes dos 25 anos), aparentemente transmitida como traço autossómico dominante, não necessitando de tratamento com insulina pelo menos 2 anos após o início clínico. Reconhecem-se três subtipos de MODY, conforme as alterações genéticas subjacentes: MODY2

por mutações do gene da glucoquinase; MODY1 e MODY3 e com alterações genéticas ainda não claramente reconhecidas de genes localizados no cromossoma 20q e 12q, respectivamente<sup>20</sup>. Outras formas incluem DID de início lento. Hagopian e Zimmet mostraram que cerca de 20% da diabetes do adulto progride para insulino dependência, percentagem esta que pode atingir os 50% no caso do jovem adulto não obeso<sup>18,19</sup>.

A progressão para insulino dependência no adulto pode ter início e evolução lentos e constitui uma forma de diabetes insulino dependente, de base auto-imune, de aparecimento tardio<sup>19,21</sup>. Trata-se de jovens adultos com menor IMC, com níveis de péptido C mais baixos e com alta frequência de auto-imunidade para órgãos específicos (tíróide, gástrico).

Tal como na diabetes tipo I, coexistem os marcadores imunológicos (ICA e anti-GAD) com os marcadores genéticos (maior frequência de HLA DR3, DR4). A frequência da positividade dos anticorpos anti-GAD atinge 74% destes casos<sup>22,23</sup>. Zimmet denomina este tipo de diabetes de LADA (latent autoimmune diabetes in adults)<sup>21</sup>. Trata-se de doentes que inicialmente são tratados com dieta e antidiabéticos orais durante meses a anos, mas que progridem inexoravelmente para a insulino dependência. O reconhecimento de marcadores genéticos e imunológicos susceptíveis de identificar estes doentes é fundamental para o seu diagnóstico e tratamento adequados.

Testar os anti-GAD pode constituir um procedimento de rotina para detectar a insulino dependência latente, permitindo a classificação e o tratamento mais adequados (Fig. 1)<sup>23</sup>.

Os anticorpos anti-GAD, dirigidos contra um antigénio bem caracterizado, são actualmente considerados especialmente úteis na predição e diagnóstico de futura insulino dependência<sup>24</sup>. Os anti-GAD possuem a dupla vantagem de ser tão sensíveis como os ICA e mais específicos – apresentam uma sensibilidade de 80% e especificidade superior a 90% na predição de insulino dependência<sup>25</sup>. Estes anticorpos têm elevado valor preditivo, pois, ao contrário dos ICA, podem anteceder o início dos sintomas em 10 anos e persistir até 40 anos após o diagnóstico de diabetes. Possuem ainda outra vantagem, que é a facilidade do seu doseamento através de técnicas de fácil padronização, como a imunoprecipitação. Como desvantagens, apontam-se os factos de estes anticorpos não serem espécies-específicos, nem órgão-específicos, e que factores como a idade e a raça (por exemplo: menor frequência nos asiáticos) influem na sua prevalência.

Em conclusão, o adulto jovem não obeso coloca frequentes dificuldades diagnósticas. Nestes casos, testar os anti-GAD pode ser muito útil para prever insulino dependência. O seu tratamento precoce com insulina

poderá constituir uma forma de intervenção imunoterapêutica importante, preservando um maior número de ilhéus funcionantes e diminuindo o risco de complicações microvasculares tardias da diabetes.

### b) Criança

A diabetes tipo I é rara antes dos 9 meses e sua prevalência apresenta um pico entre os cinco e os quinze anos. A evolução é geralmente rápida nos doentes com menos de 5 anos e mais lenta nos com idade superior a 15 anos. Na criança, outros anticorpos além dos anti-GAD são importantes, particularmente os ICA e IAA. Relativamente aos anticorpos anti-GAD, estes são detectados em 70-80% dos crianças com diabetes recém-diagnosticada<sup>25,26,27</sup>. No entanto, ao contrário dos ICA e IAA, os anticorpos anti-GAD vieram a revelar-se menos sensíveis (especialmente na criança menor de 10 anos do sexo masculino)<sup>27</sup>. Parece também não haver correlação entre os títulos de anti-GAD e o grau de destruição celular  $\beta$  na criança, ao contrário do demonstrado no adulto por Petersen e col.<sup>26,28</sup>.

Estudos populacionais realizados recentemente vieram demonstrar que o rastreio isolado de anticorpos anti-GAD na criança se revelou pouco útil na previsão da diabetes tipo I. Na criança, a máxima sensibilidade e especificidade consegue-se com a utilização de vários marcadores ICA associados a AAI e anti-GAD, conjugados com marcadores de susceptibilidade genética (HLA) e com dados sobre a lesão tecidual<sup>26,27</sup>. Assim, rastreios populacionais vieram demonstrar uma sensibilidade de ICA associados a anti-GAD de 99% na Sardenha e de 75% em Inglaterra e Itália. Quanto aos familiares de diabéticos tipo I, verifica-se que os anticorpos anti-GAD aumentam a sensibilidade e o valor preditivo dos ICA e IAA.

### c) Grávida

A diabetes gestacional inclui diferentes formas de doença, desde diabetes transitória, DNID e um grupo de mulheres com lenta evolução para DID. A DID que surge durante a gravidez caracteriza-se por um prolongado período de remissão após o parto (de meses a anos), que é consequência das elevadas necessidades de insulina durante o período gestacional. Este período de remissão é semelhante à fase pré-diabética e o seu reconhecimento torna-se fundamental<sup>28</sup>.

O valor dos anticorpos anti-GAD como marcadores preditivos de insulinodependência na grávida foi sugerido pelo estudo de Tuomilehto realizado sobre um *screening* retrospectivo para anti-GAD de grávidas diabéticas. A sensibilidade deste estudo na predição de insulinodependência foi de 82% e a especificidade de 100%, verificando-se que a positividade destes anticorpos podia anteceder em 10 anos a insulinodependência<sup>29</sup>.

Petersen e col. demonstraram recentemente que a presença de anticorpos anti-GAD 65 durante a gravidez está associada a alto risco de desenvolver DID. Segundo os mesmos autores, apenas a positividade para estes anticorpos, e não o seu nível, se correlaciona com a rápida perda de função celular  $\beta$ , não havendo relação entre o seu nível e o intervalo de tempo correspondente ao período de remissão<sup>28</sup>.

Em conclusão, também no caso da diabetes gestacional a utilização de anti-GAD de rotina associado a outros marcadores de auto-imunidade (particularmente os ICA) poderá ser útil na selecção de doentes que evoluam para insulinodependência.

## Outras implicações dos anti-GAD

A importância do exacto conhecimento da etiopatogenia da diabetes reside na possibilidade da sua prevenção. O reconhecimento de que a lesão da célula  $\beta$  é progressiva e pode anteceder em anos o aparecimento da diabetes, aliado à pesquisa de anticorpos marcadores, à detecção de marcadores de susceptibilidade genética e a marcadores de reserva funcional (perda do pico precoce de insulinossecção), vieram fomentar múltiplas tentativas de prevenção desta doença. Inúmeros centros têm vindo a desenvolver protocolos imunoterapêuticos visando a inibição do mecanismo imunitário. Inicialmente, foram utilizados imunossuppressores generalizados, como a ciclosporina e a azatioprina, mas todos vieram a falhar na prevenção a longo termo e foram abandonados pelos seus efeitos acessórios. Recentemente, foram também utilizados, sem grande êxito, anticorpos monoclonais dirigidos contra LT e a nicotinamida.

As mais recentes estratégias de prevenção incluem o emprego precoce da insulinoterapia. O emprego precoce de insulinoterapia visando poupar a célula B parece atrazar a progressão para insulite, por diminuir a expressão antigénica<sup>30</sup>. Agora que o GAD foi identificado, clonado e provado como importante no desenvolvimento da diabetes tenta-se utilizá-lo na prevenção. A administração de GAD está actualmente a ser estudada em modelos animais, tendo como objectivo a aquisição de tolerância para esta molécula, impedindo assim o desencadear da reacção auto-imune. Usando o antigénio alvo-GAD, o sistema de células T auto-reactivas torna-se permissivo, podendo constituir uma forma de prevenção efectiva num futuro próximo (vacina?).

## Conclusão

Os anticorpos anti-GAD são actualmente os marcadores de auto-imunidade mais importantes na diabetes tipo I. Possuem a dupla vantagem de apresentar elevada sensibilidade e especificidade e poderem anteceder em anos a diabetes clínica e persistir durante anos após

o seu diagnóstico. São especialmente úteis no diagnóstico diferencial da diabetes do adulto não obeso e na diabetes gestacional. Testar os anti-GAD no adulto não obeso pode ser o procedimento de rotina para detectar

insulinodependência, permitindo a classificação e o tratamento mais adequados. A sua aplicação a grupos de risco permitirá também a utilização de novas formas de intervenção na prevenção desta doença.

## Bibliografia

- Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1994; 331: 1428-1436.
- Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 1974; ii: 1279-1283.
- Baekkeskov S, LandinM, Kristensen JK et al. Antibodies to a 64000 Mr human islet cell antigen precede the clinical onset of insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 1987; 79: 926-934.
- Atkinson MA, Maclaren NK, Sharp DW et al. 64000Mr autoantibodies as predictors of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1990; 335: 1357-1360.
- Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S et al. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA- synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 1990; 347: 151-156.
- Erlander MG, Tillakaratne NJ, Feldblum S et al. Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* 1991; 7: 91-100.
- Bu DF, Erlander MG, Tillakaratne NJ et al. Two glutamate decarboxylases, 65 kDa GAD and 67 kDa GADare each encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2115-2119.
- Hagopian WA, Michelsen B, Karlsen AE et al. Autoantibodies in IDDM primarily recognize the 65000Mr rather than the 67000Mr isoform of glutamic acid decarboxylase. *Diabetes* 1993; 42: 631-636.
- Solimena M, Folli F, Denis-Donini S et al. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in a patient with stiff-man syndrome, epilepsy, and Type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1988; 318: 1012-1020
- Solimena M, Folli F, Aparisi R et al. Autoantibodies to GABAergic neurons and pancreatic beta cells in stiff-man syndrome. *N Engl J Med* 1990; 322: 1555-1560.
- Szopa TM, Titchener PA, Partwood ND et al. Diabetes mellitus due to viruses- some recent developments. *Diabetologia* 1993; 36: 687-695.
- Kaufman DL, Erlander MG, Clare-Salzler M, Atkinson MA, Maclaren NK, Tobin AJ. Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992; 89: 283-292.
- Serjeantson SW, Kohonen-Corish MR, Rowley MJ et al. Antibodies to glutamic acid decarboxylase are associated with HLA-DR genotypes in both Australians and Asians with Type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* 1992; 35: 996-1001.
- National Diabetes Data Group: Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979; 28: 1039-1057.
- Molbac AC, Christau B, Marner B et al. Incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in age groups over 30 years in Denmark. *Diabetic Med* 1994; 11: 650-655.
- Groop LC, Bottazzo GF, Doniach D. Islet cell antibodies identify latent type 1 diabetes in patients aged 35-75 years at diagnosis. *Diabetes* 1986; 35: 237-241.
- Tuomi T, Groop LC, Zimmet PZ et al. Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non-insulin-dependent onset of disease. *Diabetes* 1993; 42: 359-362.
- Zimmet P, MD, PHD. The pathogenesis and prevention of diabetes in adults. *Diabetes Care* 1995; 18; (7): 1050-1064.
- Zimmet P: Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes- an epidemiological overview. *Diabetologia* 1982; 22: 399-411.
- Dussoix P, Vaxillaire M, Patrick B et al. Diagnostic heterogeneity of diabetes in lean young adults- classification based on immunological and genetic parameters. *Diabetes* 1997; 46: 622-631.
- Zimmet PZ, Tuomi T, Mackay IR et al. Latent autoimmune diabetes mellitus in adults ( LADA ): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *DiabeticMed* 1994; 11: 299-303.
- Thivolet CH, Tappaz M, Durand A et al. Glutamic acid decarboxylase autoantibodies are additional predictive markers of Type 1 diabetes mellitus in high risk individuals. *Diabetologia* 1992; 35: 570-576.
- Zimmet PZ, Elliot RB, Mackay IR et al. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and insulin in islet cell antibody positive presymptomatic Type 1 diabetes mellitus: frequency and segregation by age and gender. *DiabeticMed* 1994; 11: 866-871.
- Palmer JP. What is the best way to predict IDDM. *Lancet* 1994; 343, 8910: 1377-1378.
- Rowley MJ, Mackay IR, Chen QY et al. Antibodies to glutamic acid decarboxylase discriminate major types of diabetes mellitus. *Diabetes* 1992; 41: 548-551
- Batstra M, Pina M, Quan J et al. Fluctuations in GAD 65 antibodies after clinical diagnosis of IDDM in young children. *Diabetes Care* 1997; 20 (4): 642-644.
- Chen QY, Rowley MJ, Byrne GC et al. Antibodies to glutamic acid decarboxylase in Australian children with insulin-dependent diabetes mellitus and their first degree relatives. *Pediatr Res* 1993; 34: 785-790.
- Petersen J, Dyrberg T, Damm P et al. GAD65 autoantibodies in woman with gestational or insulindependent diabetes mellitus diagnosed during pregnancy. *Diabetologia* 1996; 39: 1329-1333.
- Tuomilehto J, Zimmet P, MacKay IR et al. Antibodies to glutamic acid decarboxylase as predictors of insulindependent diabetes mellitus before clinical onset of disease. *Lancet* 1994; 343: 1383-1385.
- Keller RJ, Eisenbarth GS, Jackson RA. Insulin prophylaxis in individuals at risk of type 1 diabetes. *Lancet* 1993; 341: 927-928.