

MARIANA DEZOTTI RÜEGGER

*Centro Universitário Lusíada, UNILUS,
Santos, SP, Brasil.*

ERICO PAULO HEILBRUN

*Centro Universitário Lusíada, UNILUS,
Santos, SP, Brasil.*

MAURO CESAR DINATO

*Centro Universitário Lusíada, UNILUS,
Santos, SP, Brasil.*

EDGAR MATIAS BACH HI

*Centro Universitário Lusíada, UNILUS,
Santos, SP, Brasil.*

*Recebido em junho de 2024.
Aprovado em junho de 2024.*

ALÉM DA GLICEMIA: USO DE ANTICORPOS PARA DIAGNÓSTICO DE DIABETES TIPO 1

RESUMO

A diabetes mellitus do tipo 1 (DM1) consiste no quadro de hiperglicemia devido à baixa ou à ausência de produção do hormônio insulina. Essa queda hormonal é consequência da destruição das células beta pancreáticas, produtoras de insulina, por autoanticorpos (autoimune) ou por causa idiopática. Existem apresentações atípicas de DM1 que dificultam seu diagnóstico. Devido a esse fato diversos estudos foram presentes na literatura realizaram a mensuração dos anticorpos que atacam as células pancreáticas como indicadores do possível desenvolvimento dessa doença autoimune, mostrando uma ferramenta para diagnóstico diferencial na prática clínica. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo analisar a eficiência do uso desses marcadores imunológicos na prática clínica. Este trabalho consistiu em uma revisão bibliográfica abordando as particularidades e o uso dos anticorpos anti-descarboxilase (anti-GAD), anti-ilhota pancreática (anti-ICA), anti-insulina (anti-IAA), antitirosina-fosfatase (anti-IA2) e anti-Znt8 para avaliação da destruição das células beta pancreáticas e na mensuração da severidade da doença.

Palavras-Chave: diabetes mellitus tipo 1; diabetes autoimune; diagnóstico diferencial; anti-descarboxilase (anti-gad); anti-ilhota pancreática (anti-ica); anti-insulina (anti-iaa); antitirosina-fosfatase (anti-ia2); anti-znt8.

BEYOND BLOOD GLUCOSE: USE OF ANTIBODIES FOR DIAGNOSING TYPE 1 DIABETES

ABSTRACT

Type 1 diabetes mellitus (DM1) consists of hyperglycemia due to low or absence of production of the hormone insulin. This hormonal drop is a consequence of the destruction of pancreatic beta cells, which produce insulin, by autoantibodies (autoimmune) or by idiopathic causes. There are atypical presentations of DM1 that make its diagnosis difficult. Due to this fact, several studies in the literature measured antibodies that attack pancreatic cells as indicators of the possible development of this autoimmune disease, demonstrating a tool for differential diagnosis in clinical practice. Therefore, the present study aimed to analyze the efficiency of using these immunological markers in clinical practice. This work consisted of a bibliographical review addressing the particularities and use of anti-decarboxylase (anti-GAD), anti-pancreatic islet (anti-ICA), anti-insulin (anti-IAA), anti-tyrosine phosphatase (anti-IA2) antibodies and anti-Znt8 to evaluate the destruction of pancreatic beta cells and measure the severity of the disease.

Keywords: type 1 diabetes mellitus (t1dm); autoimmune diabetes; differential diagnosis; glutamic acid decarboxylase; cytoplasmic islet cell antibodies (ica); insulin autoantibodies (iaa); tyrosine phosphatase-2 autoantibodies (anti-ia2); zinc transporter 8 autoantibodies (anti-znt8).

INTRODUÇÃO

Diabetes foi um termo utilizado para descrever inicialmente a enfermidade relacionada a alta produção de urina. Essa condição foi relatada pela primeira no Papiro Erbers, no qual as observações de médicos egípcios se juntaram para formar um dos tratados médicos mais antigos e importantes em torno de 1550 a.C. Todavia, foi somente entre 80 d.C. e 138 d.C., na Grécia, que o termo diabetes passou a ser utilizado como nome de uma doença, pois o médico Aretaeus passou a correlacionar os sintomas de poliúria, polidipsia, polifagia e astenia nos enfermos diabéticos, além de ressaltar o gosto adocicado da urina. Em 1776, Matthew Dobson aqueceu a urina até seu ressecamento e observou a formação de resíduos açucarados e possibilitou, assim, a confirmação da concentração de glicose na urina dos pacientes. Por isso, Dobson foi responsável por dar o primeiro passo em direção ao entendimento da fisiopatologia da diabetes e, a partir da compreensão de sua causa, criou base de conhecimento para iniciar a pesquisa e desenvolvimento de um tratamento, evitando a morte rápida daqueles que sofriam desse mal (TSCHIEDEL, 2014).

Atualmente, a Diabetes Mellitus (DM) é uma doença crônica na qual o corpo não produz insulina ou não consegue utilizá-la adequadamente após sua síntese, gerando um quadro característico de altos níveis de glicose no sangue. Sendo assim, os pacientes DM são identificados através de sintomas como hiperglicemia, cetoacidose e poliúria adocicada. Ademais, essa comorbidade pode ser causada por diferentes mecanismos fisiopatológicos e de acordo com essa origem, ela pode ser classificada em 4 principais categorias; tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2), gestacional e associada a outros fatores. Contudo, apesar de todos os tipos de diabetes serem doenças graves, o seguinte trabalho utiliza como objeto de estudo a tipo 1, caracterizada por ser autoimune, estar associada a jovens e causar dependência de insulina exógena (GOLBERT; VASQUES; FARIA *et al.*, 2019).

O Diabetes Mellitus Tipo I (DM1) é uma doença crônica que ocorre de forma autoimune ou idiopática. Em ambos os casos ocorre diminuição do número de células β , diminuindo ou anulando a produção de insulina. Nos casos de DM1 autoimune é verificada uma infiltração de células mononucleares nas glândulas endócrinas pancreáticas (POZZILLI; DI MARIO, 2001). A descoberta da histopatologia da DM1 foi feita em 1901 por Opie e, posteriormente, por Gepts, cujos estudos denominaram a lesão das ilhotas pelas células autoimunes de 'insulite' em 1965. Gepts relatou, também, que a insulite estava presente em 70% dos pacientes com DM1 de início agudo, concluindo que essa doença era causada por um processo autoimune específico das células β (KAWASAKI, 2014).

Após diversos anos de pesquisas a DM1 foi classificada como uma enfermidade de evolução lenta, pois a infiltração linfocitária e destruição das células beta-pancreáticas, as quais são secretoras de insulina, ocorrem gradualmente ao longo da vida do paciente desde sua infância. Consequentemente a isso, ela se desenvolve durante anos numa fase pré-clínica onde os anticorpos (Ac) responsáveis pela insulite já são detectáveis, porém a diminuição de insulina ainda não é significativa para gerar os sintomas necessários no diagnóstico clínico. Logo, quando o paciente apresentava a manifestação da doença (a presença de hiperglicemia e outros problemas metabólicos) as células secretoras de insulina já estavam em número muito diminuído ou praticamente ausentes, ou seja, o paciente já se encontrava em um estágio avançado e com pior prognóstico (FABRIS; ZAGO; LIGUORI *et al.*, 2015; KAWASAKI, 2014).

Atualmente o diagnóstico diferencial entre os tipos DM1 e DM2 é realizado considerando apenas as características clínicas como apresentação clínica abrupta com propensão à cetose e cetoacidose, com necessidade plena de insulino-terapia desde o diagnóstico (RODACKI; TELES; GABBAY *et al.*, 2022). Porém, em alguns casos, este diagnóstico é dificultado por apresentações atípicas. Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) em casos onde a apresentação clínica não seja clara como presença de obesidade infantil ou apresentação abrupta em adultos é necessário fazer uso de

biomarcadores autoimunes para elucidar se aquele paciente é portador de DM1 ou DM2 (RODACKI; TELES; GABBAY *et al.*, 2022).

Por isso, embora não estejam diretamente envolvidos na destruição de células beta, os Ac passaram a ser um meio de mensurar a destruição das células beta e a severidade da doença. Sendo assim, pesquisas sobre os biomarcadores da DM1 se tornaram essenciais. Neste cenário os principais anticorpos detectados são Ac antidescarboxilase de ácido glutâmico (anti-GAD), o anti-ilhota (ICA), o anti-insulina (anti-IAA), o antitirosina-fosfatase (anti-IA2) e o anti-Znt8 (Anti-ZnT8), todos eles presentes no sangue. Vários estudos foram desenvolvidos a fim de aprimorar a aplicabilidade dessa ferramenta e desenvolver um diagnóstico precoce fiel (RAMALHO; NORTADAS, 2021).

Foi comprovado que ao menos um dos anticorpos citados estão presentes em cerca de 95% dos pacientes de DM1, possibilitando, assim, seu diagnóstico. Porém, vale ressaltar que cada um desses anticorpos (Ac) possuem um período em que se encontram mais presentes conforme dois fatores: o início da doença e a duração da mesma. Por isso é importante entender como cada anticorpo funciona para interpretar o avanço e estado da DM1, baseado na disposição e prevalência de cada anticorpo. Logo, conhecer tal detalhadamente dos biomarcadores permite que o rastreio seja esquematizado de maneira mais eficiente, a fim de baratear a prática e, assim, possibilitar sua inclusão nos exames rotineiros em ampla escala. O anti-GAD, por exemplo, é um marcador muito importante para indicar a autoimunidade geral de DM1, pois está presente anos antes e após o diagnóstico, sendo encontrado em cerca de 80% dos pacientes com instalação recente e em 50% dos pacientes após 10 anos de diagnóstico (BASU; PANDIT; BANERJEE *et al.*, 2020; KAWASAKI; OIKAWA; OKADA *et al.*, 2021; SOUZA; KRAEMER; KOLISKI *et al.*, 2019; THEWJITCHAROEN; KRITTIYAWONG; VONGTERAPAK *et al.*, 2020; WITT; PACHECO; BRATZ *et al.*, 2011).

Essa capacidade preditora dos biomarcadores para o desenvolvimento futuro da DM1, antes da manifestação do quadro clínico grave, é essencial na prática médica, visto que, segundo a International Diabetes Federation (IDF), o diagnóstico tardio ou o mal gerenciamento da doença são os principais aspectos que determinam um grande potencial de provocar complicações a saúde e mortalidade da DM1. Entretanto, os pacientes com DM1 podem ter uma longa expectativa de vida semelhante à população em geral se aderirem ao gerenciamento do auto diabetes e tiverem um bom sistema de apoio. Atitudes como planejamento de hábito alimentar e prática de exercício físico regular podem ser implantadas de maneira precoce, a fim de melhorar o quadro clínico por meio da atenuação das alterações metabólicas e aumento da sensibilidade a insulina (IDF, 2019; MARASCHIN, 2007; THEWJITCHAROEN; KRITTIYAWONG; VONGTERAPAK *et al.*, 2020).

Por fim são necessários estudos mais aprofundados sobre os marcadores de DM1, sendo um problema de saúde relevante na população brasileira devido a sua cronicidade, a sua perigosa progressão metabólica e a sua elevada prevalência, a qual atinge aproximadamente mais de 95 mil brasileiros com idade entre 0 e 19 anos, segundo dados da IDF 2019 (IDF, 2019). Além disso, a DM1 frequentemente está correlacionada com outras doenças autoimunes. A doença autoimune órgão-específica coexistente mais comum é a doença autoimune da tireoide, e sua frequência é estimada em > 90% entre pacientes com DM1. Essa correlação não é somente relevante para o acompanhamento e prognósticos daqueles afetados, mas também é um importante aspecto a ser considerado para formular uma conduta de rastreio clínico estratégico na diabetes por meio da pesquisa de Ac, passando a priorizar os grupos de risco (KAWASAKI, 2014).

BIOMARCADORES DE AUTOIMUNIDADE

Marcadores biológicos são estruturas, como proteínas, hormônios e/ou anticorpos, que podem ser mensurados de modo a indicar a presença ou gravidade de alguma doença. No caso da Diabetes Mellitus tipo 1, esses biomarcadores são autoanticorpos

produzidos pelo paciente anos antes da manifestação da comorbidade. Os principais estudados até hoje consistem no ICA, no anti-GAD, no anti-IA2 e no anti-IAA, sendo que alguns contribuem para a progressão patológica da DM1 e outros são consequência da destruição prévia das células secretoras pancreáticas (KAWASAKI; OIKAWA; OKADA *et al.*, 2021).

Foi comprovado que ao menos um dos anticorpos citados estão presentes em cerca de 95% dos pacientes de DM1, possibilitando, assim, seu diagnóstico. Porém, vale ressaltar que cada um desses Ac possuem um período em que se encontram mais presentes conforme dois fatores: o início da doença e a duração da mesma. Por isso é importante entender como cada anticorpo funciona para interpretar o avanço e estado da DM1, baseado na disposição e prevalência de cada anticorpo (BASU; PANDIT; BANERJEE *et al.*, 2020; KAWASAKI; OIKAWA; OKADA *et al.*, 2021; THEWJITCHAROEN; KRITTIYAWONG; VONGTERAPAK *et al.*, 2020).

Anticorpo contra ilhotas pancreáticas (ICA)

O anticorpo anti-ilhotas pancreáticas (ICA) foi o primeiro biomarcador a ser relacionado a DM1, sendo descrito pela primeira vez em 1974, por meio de exame de imunofluorescência indireta. O ICA consiste em um grupo heterogêneo de anticorpos que possuem como antígeno alvo várias estruturas citoplasmáticas e da membrana da ilhota, reagindo, assim, com grande parte das células endócrinas pancreáticas (DALZOCHIO; BERLESE, 2015; WITT; PACHECO; BRATZ *et al.*, 2011). Devido ao amplo espectro, sua presença pode indicar a perda da função da célula beta pancreática e possível necessidade de utilização de insulina, porém é necessário avaliar os demais marcadores para confirmar tal suspeita (MARASCHIN, 2007).

Em diversos estudos retrospectivos comprovou-se que a presença desse anticorpo é transitória, testando positivo, normalmente, durante a fase pré-diabética e possui rápida queda de titulação após o diagnóstico da doença. Isso sugere que o ICA pode estar mais intimamente relacionado com os danos às células do que o anti-GAD, porém, como sua positividade ocorre após a detecção do segundo e permanece por menos tempo, cada vez mais a dosagem de ICA cai em desuso e é substituída pelo anti-GAD, associado com anti-IA2, no rastreamento do DM1 (BELHIBA; AADAM; JEDDANE *et al.*, 2020; DALZOCHIO; BERLESE, 2015; KAWASAKI; OIKAWA; OKADA *et al.*, 2021; MARASCHIN, 2007). Um estudo coorte retrospectivo com 213 pacientes pediátricos italianos demonstrou que a dosagem de ICA é menos eficaz que a pesquisa específica e individual de cada um dos demais marcadores, visto que um percentual significativo (78,6 %) dos pacientes classificados como ICA negativo foram positivos para pelo menos um dos outros biomarcadores autoimunes (FABRIS; ZAGO; LIGUORI *et al.*, 2015). A presença de anticorpos anti-GAD e ICA podem indicar uma doença de evolução lenta, como a LADA (diabetes latente autoimune do adulto) por exemplo (SEISSLER; DE SONNAVILLE; MORGENTHALER *et al.*, 1998).

Anticorpo contra descarboxilase de ácido glutâmico (Anti-GAD)

O anticorpo para descarboxilase de ácido glutâmico (anti-GAD) é considerado o marcador mais importante para DM1, atualmente, por ser dos primeiros a aparecer na fase pré-clínica e o último a desaparecer, sendo um sinal de autoimunidade geral. O antígeno alvo desse anticorpo é uma proteína enzimática descarboxilase do ácido glutâmico com peso molecular de 65 kDa (GAD65) essencial para catalisar a formação de 7-aminobutírico (GABA) nas células pancreáticas, além de estar presente também no cérebro, no estômago e na glândula tireoide em sua forma de dois isômeros: GAD65 e GAD67. Por estar presente em outros órgãos, a positividade desse autoanticorpo pode estar relacionada a outras doenças autoimunes, assim, é necessário a comprovação da DM1 com a dosagem de outros anticorpos. No pâncreas, o GABA exerce efeitos anti-diabéticos agindo em ambas as ilhotas β células e no sistema imunológico, além de suprimir a

insulite e a produção sistêmica de citocinas inflamatórias. O anti-GAD é um potencial marcador da função celular β pancreática prejudicada, sendo observado altos índices em pacientes com deficiência de insulina. Contudo, sua presença não necessariamente implica progressão rápida para doença. Ele pode ser detectado vários anos após o diagnóstico de DM1, por isso é o marcador de autoimunidade ideal na investigação de pacientes com doença de longa duração para classificação etiológica adequada (BELHIBA; AADAM; JEDDANE *et al.*, 2020; DALZUCHIO; BERLESE, 2015; DELIC-SARAC; MUTEVELIC; KARAMEHIC *et al.*, 2016; DERROU; EL GUENDOZ; BENABDEFEDIL *et al.*, 2021; MARASCHIN, 2007).

A presença do anti-GAD é mais prevalente em pacientes mais velhos, sendo considerado o melhor marcador para pacientes com DM1 há muito tempo e já tratados com insulina ou pacientes portadores de LADA (DERROU; EL GUENDOZ; BENABDEFEDIL *et al.*, 2021; SEISSLER; DE SONNAVILLE; MORGENTHALER *et al.*, 1998; WURAGIL; SUSANTO; HERAWATI *et al.*, 2022). É encontrado em cerca de 80% dos pacientes com instalação recente de DM1 e em cerca de 50% naqueles diagnosticados a mais de 10 anos. Apesar de a longa duração da positividade do anti-GAD ser uma característica do AC, estudos mostraram que a persistência dele por muitos anos após o diagnóstico da DM1 pode indicar predisposição a desenvolver outras comorbidades autoimunes, como tireoidite de Hashimoto, doença de Addison, doença celíaca e gastrite autoimune (WITT; PACHECO; BRATZ *et al.*, 2011). Por isso, a dosagem do anti-GAD é muito importante no diagnóstico precoce e acompanhamento dos pacientes diabéticos.

Anticorpo contra insulina (IAA)

O anticorpo contra insulina (IAA) está associado principalmente a queda na secreção de insulina e prediz a necessidade de uso desse hormônio exógeno. Esse biomarcador predomina em crianças e deve ser dosado antes de iniciar o tratamento com insulina, pois a terapia de insulina exógena pode gerar uma resposta imune que mascara o valor preditivo positivo, pois não há como diferenciar aqueles anticorpos contra insulina endógena e exógena, sendo o segundo presente na maioria dos pacientes com DM1 e DM2, que começam a usar insulina. Por esse motivo, esse marcador tem baixa sensibilidade em adultos e possui relevância clínica somente na doença pré-clínica em crianças, porém, mesmo com sensibilidade em prever a queda da secreção de insulina em jovens, sua dosagem para rastreamento, atualmente, foi substituída pelo uso de anti-GAD, anti-IA-2 e anti-ZnT8, os quais se demonstraram mais eficientes para prever a doença mais precocemente (DALZUCHIO; BERLESE, 2015; DELIC-SARAC; MUTEVELIC; KARAMEHIC *et al.*, 2016; MARASCHIN, 2007; WITT; PACHECO; BRATZ *et al.*, 2011).

Anticorpo contra anti-tirosina fosfatase (anti-IA2)

O autoanticorpo anti-tirosina fosfatase (IA2) tem como alvo uma proteína tirosina-fosfatase transmembrana, cuja função está relacionada à recepção e sinalização intracelular nas células das ilhotas, localizada dentro dos grânulos secretores de insulina (BELHIBA; AADAM; JEDDANE *et al.*, 2020; KAWASAKI; OIKAWA; OKADA *et al.*, 2021; MARASCHIN, 2007). O anti-IA2 é um marcador mais específico para destruição de células beta, indicando rápida progressão da DM1, durante o processo da doença subclínica. Sua positividade é mais frequente em pacientes jovens, menores de 16 anos, e está associado a pacientes de início infantil e agudo da doença, sendo detectados em cerca de 60-70% dos pacientes jovens, segundo a maioria dos estudos (BELHIBA; AADAM; JEDDANE *et al.*, 2020; DALZUCHIO; BERLESE, 2015; FABRIS; ZAGO; LIGUORI *et al.*, 2015; KAWASAKI, 2014; KAWASAKI; OIKAWA; OKADA *et al.*, 2021; MARASCHIN, 2007).

Um estudo coorte realizado em 78 crianças marroquinas menores de 16 anos com DM1 mostrou que o anti-IA2 foi encontrado em 78% delas no momento do diagnóstico e que metade de todas as crianças IA2 positivas permanecem assim 12 anos após o diagnóstico (BELHIBA; AADAM; JEDDANE *et al.*, 2020). Esse estudo marroquina, assim como outros

realizados, demonstraram o poder preditivo desse marcador em jovens, além de instigarem uma análise aprofundada do possível foco estratégico para sua utilização na prática clínica durante a predição da DM1 em crianças classificadas de alto risco para essa doença.

Anticorpo contra proteína transportadora de zinco 8 (Anti-ZnT8)

O anticorpo voltado para identificar a proteína transportadora de zinco 8 (anti-ZnT8) consiste no biomarcador mais recente no estudo para identificação de DM1 precoce (AMON; HI, 2021). Essa proteína transmembrana localiza-se dentro dos grânulos secretores de insulina e exerce a função de regular o efluxo de zinco do citoplasma para a matriz extracelular ou em vesículas intracelulares, ou seja, são importantes para permitir o acúmulo desse metal nos grânulos e, assim, garantir a maturação da insulina e o processo do seu armazenamento nas células beta pancreáticas (AMON; HI, 2021; FABRIS; ZAGO; LIGUORI *et al.*, 2015; KAWASAKI; OIKAWA; OKADA *et al.*, 2021). Portanto, anticorpos contra ZnT8 podem afetar vários processos importantes, como síntese de insulina, armazenamento, secreção, e podem prejudicar a comunicação parácrina das células ilhotas também.

Anteriormente, pensava-se que o ZnT8 em grânulos secretores de insulina era um autoantígeno intracelular reconhecido por anticorpo de ZnT8 após destruição de células β . Porém, os estudos mais recentes comprovaram que, na verdade, a proteína ZnT8 é traficado para a membrana superficial após secreção de insulina (AMER; ABD EL BAKY; NASR *et al.*, 2018). Em síntese, o anticorpo ZnT8 está voltado principalmente para os antígenos superficiais das células da ilhota, tendo um papel patogênico na disfunção e destruição dessas proteínas durante o desenvolvimento da doença. Esse biomarcador, assim como o anti-IA2, é mais frequente em pacientes jovens e tem sua prevalência diminuída conforme o aumento da idade de início do diabetes (FABRIS; ZAGO; LIGUORI *et al.*, 2015; KAWASAKI, 2014; KAWASAKI; OIKAWA; OKADA *et al.*, 2021; THEWJITCHAROEN; KRITTIYAWONG; VONGTERAPAK *et al.*, 2020). Apesar de a positividade de anti-ZnT8 não ser maior que a feita com anti-GAD e anti-IA-2, foi comprovado que a utilização do primeiro permite aumentar a sensibilidade dos demais marcadores de forma significativa durante o rastreamento de DM1. No estudo coorte multicêntrico retrospectivo italiano realizado em 213 crianças foi demonstrado que ao adicionar o anti-ZnT8, além de dosar IA2 e anti-GAD, 8,6% de pacientes que anteriormente eram classificados como todos negativos, passaram a ser positivos e considerados portadores de DM1 (FABRIS; ZAGO; LIGUORI *et al.*, 2015). Nesse mesmo estudo, a sensibilidade para identificar DM1 aumentou de 85,9% para 90,6% ao introduzir a dosagem do autoanticorpo de transportados de zinco. Logo, adicionar o anti-ZnT8 como complemento dos biomarcadores atuais anti-GAD e anti-IA2 pode aumentar significativamente o desempenho diagnóstico geral dos testes sorológicos; excluindo, portanto, a dosagem de IAA e de ICA no rastreamento sem perder sensibilidade de diagnóstico.

Contudo, vale ressaltar que, apesar da importância diagnóstica, mais estudos são necessários para entender tais anticorpos, pois na seguinte revisão notou-se uma carência de grandes coortes voltados para o entendimento e comparação da prevalência de cada um dos biomarcadores nas diferentes faixas etárias e efeito no diagnóstico. Até os dias de hoje, pode-se perceber que a duração do diabetes se correlaciona positivamente com o número de anticorpos GAD e negativamente com IAA, anti-IA-A2 e anti-ZnT8A, estabelecendo, assim, um papel limitado na investigação de pacientes para os AC do segundo grupo, que desaparecem da circulação periférica depois de um tempo. Em um estudo feito com uma população de DM1 de longa duração (mais de 25 anos), as prevalências de anti-GAD, anti-IA2 e anti-ZnT8 foram de 65%, 20% e 10%, respectivamente (THEWJITCHAROEN; KRITTIYAWONG; VONGTERAPAK *et al.*, 2020).

Tanto o IA-2A quanto o ZnT8A são mais frequentemente observados em pacientes mais jovens (2-8 anos), enquanto os autoanticorpos de GAD são mais comuns em pacientes mais velhos; IA-2A e ZnT8A aparecem mais tarde, em geral, durante o processo de doença

subclínica e para anunciar progressão mais rápida para diabetes tipo 1 do que GADA. Ou seja, a resposta anti-GAD pode ser um sinal de autoimunidade geral, enquanto IA-2A e ZnT8A podem ser um indicador substituto de massa residual de células β (AMON; HI, 2021; THEWJITCHAROEN; KRITTIYAWONG; VONGTERAPAK *et al.*, 2020).

Apesar da enorme variação nos parâmetros dos diversos biomarcadores, é indubitável sua relevância no diagnóstico, visto que em todos os estudos feitos as taxas de pacientes diabéticos tipo 1 que negativam para os anticorpos são sempre baixas: 12,82% dos pacientes são negativos para anti- IA2 e anti-GAD (BELHIBA; AADAM; JEDDANE *et al.*, 2020) e 3,2% foram negativos para todos os anticorpos (BASU; PANDIT; BANERJEE *et al.*, 2020). Estudo realizado por Hameed *et al* (HAMEED; ELLARD; WOODHEAD *et al.*, 2011) relatou que autoanticorpo negativo persistentes em DM1 ocorre em menos de 5% dos indivíduos.

DETERMINAÇÃO LABORATORIAL DOS BIOMARCADORES

Como descrito acima os biomarcadores são na verdade autoanticorpos contra proteínas da célula beta pancreática. Desta forma, para sua identificação e quantificação, devem ser utilizadas metodologias imunoquímicas para este fim. Desta forma a metodologia de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) é a mais utilizada no momento devido a sua alta sensibilidade e especificidade. A metodologia de radioimunoensaio (RIA) era muito utilizada no passado, mas está sendo substituída pelo ELISA sistema avidina-biotina por ter a mesma sensibilidade e também por promover riscos menores quanto a contaminação com materiais radioativos (BROOKING; ANANIEVA-JORDANOVA; ARNOLD *et al.*, 2003; RAHMATI; LERNMARK; BECKER *et al.*, 2008). A amostra utilizada para detecção destes biomarcadores é o soro, sendo assim considerado uma determinação minimamente invasiva pois depende apenas da coleta de material sanguíneo venoso. O Quadro 1 mostra os marcadores e as metodologias utilizadas atualmente com base no fabricante RSR (*RSR Limited - UK*) (LIMITED, 2010; 2013; 2014; 2021a; b).

Quadro 1: Características da determinação laboratorial dos biomarcadores de DM1 (LIMITED, 2010; 2013; 2014; 2021a; b).

ANTICORPO	METODOLOGIA	VALOR DE CORTE (<i>cut-off</i>)	LIMITE INFERIOR DE DETECÇÃO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE
Anti-Znt8	ELISA	10 U/mL	5,0 U/mL	72%	97%
Anti- GAD	ELISA	5 U/mL	0,57 U/mL	92%	98%
Anti- IA2	ELISA	7,5 U/mL	1,25 U/mL	76%	98%
Anti- IAA	RIA	0,4 U/mL	0,03 U/mL	32%	99%
ICA	ELISA	4 U/mL	0,17 U/mL	96%	98%

Abreviaturas: ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*); RIA (*Radioimmunoassay*); U/mL (unidades internacionais por mililitro).

USO DOS MARCADORES NA PRÁTICA CLÍNICA

Durante os últimos 40 anos, a relação entre a diabetes mellitus tipo 1 e anticorpos das ilhotas pancreáticas é conhecida. Em 1970, Nerup (NERUP; ANDERSEN; BENDIXEN, 1970) demonstrou a autoimunidade celular em pacientes com DM1 usando o teste de migração leucocitária e especulou que a hipersensibilidade celular era consequência da infiltração linfocitária nas ilhotas. Em 1974, Bottazzo e MacCuish (BOTTAZZO; FLORIN-CHRISTENSEN; DONIACH, 1974) descreveram pela primeira vez a presença de autoanticorpos anti-ilhotas em pacientes com síndrome poliendócrina autoimune por uma técnica de imunofluorescência indireta. Na década de 1990, muitos pesquisadores tentaram encontrar autoantígenos alvo contra ICA, e foram identificados a descarboxilase do ácido glutâmico (GAD), o antígeno-2 associado ao insulinoma (IA-2) e, mais recentemente, o transportador de zinco 8 (ZnT8) (KAWASAKI, 2014; SINGLA; HOMKO; SCHEY *et al.*, 2015).

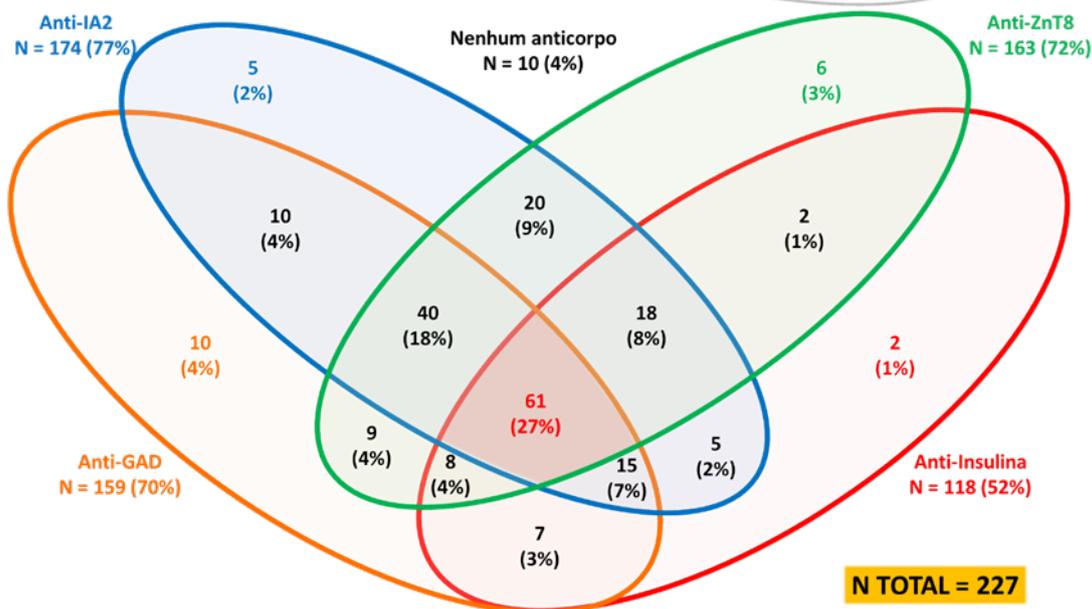
O diagnóstico diferencial entre DM1 e DM2 por vezes não é muito claro. Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (RODAKI; TELES; GABBAY *et al.*, 2022) o diagnóstico diferencial deve ser apenas realizado com bases clínicas. Em casos de dúvidas, quando se tem apresentações atípicas, exames complementares devem ser solicitados. Dentre estas apresentações atípicas podemos citar crianças e adolescentes com obesidade e/ou *acantosis nigricans*, apresentação abrupta de DM em adultos sem sinais/sintomas prévios, necessidade de utilização de insulina nos primeiros anos após diagnóstico, dentre outros. Nestes casos a determinação de Ac é indicada para ter um diagnóstico diferencial e, assim, conduzir o tratamento da melhor forma possível. Vale ressaltar aqui que a determinação de alguns anticorpos (como IAA) devem ser realizados antes de se iniciar uma insulino terapia, evitando-se um falso positivo.

Atualmente, muitos estudos objetivam descrever a relação entre o aparecimento dos autoanticorpos com o surgimento e progressão da DM, a fim de entender a causa dessa doença e aperfeiçoar a qualidade de vida de seus pacientes ao oferecer tratamentos precoces e mais especializados conforme a prevalência de anticorpos.

Os marcadores, sozinhos ou combinados, estão presentes em cerca de 85-90% dos pacientes diabéticos tipo 1 após a detecção de hiperglicemia, sendo que tanto baixos quanto altos títulos de autoanticorpos, podem indicar o progresso rápido da destruição celular e prever a manifestação clínica da diabetes, ou seja, quando cerca de 80% das células B foram destruídas (DALZUCHIO; BERLESE, 2015). Durante a fase pré-clínica assintomática, vários anticorpos já presentes na corrente sanguínea podem ajudar no rastreamento precoce. Esse rastreamento da DM1 é uma conduta almejada em alguns países em que essa comorbidade é considerada um problema público, o Ministério da Saúde da Indonésia, por exemplo, financiou uma pesquisa sobre o uso de anti-GAD e novos kits de teste com preços mais acessíveis, a fim de viabilizar a introdução de um biomarcador para a detecção precoce da doença (WURAGIL; SUSANTO; HERAWATI *et al.*, 2022).

Objetivando essa melhor compreensão dos Ac como biomarcadores da DM1, um estudo transversal retrospectivo realizado em 227 crianças diagnosticadas com DM1, em torno dos 8 anos de idade, estudou a prevalência do anti-ZnT8 e a sua dinâmica durante sua evolução em 10 anos (PETRUZELKOVA; ANANIEVA-JORDANOVA; VCELAKOVA *et al.*, 2014). Nesse estudo 72% das crianças com DM1 positivaram para o Ac de ZnT8 (Figura 1), devido a isso, acrescentar o teste desse novo Ac fez com que os resultados de crianças diabéticas sem presença de autoanticorpos (resultados falsos negativos) diminuíssem de 7% para 4,4%, demonstrando assim a importância de incluí-lo no rastreamento dessa comorbidade para aumentar a sensibilidade. O poder de predição também aumentou no âmbito do número de pacientes positivos para pelo menos 2 anticorpos, que passou de 72% para 85%. No mesmo estudo, foi comprovado que o Ac mais prevalente entre as crianças analisadas com DM1 foi o anti-IA2 (77%), seguido por anti-GAD (70%) e IAA (52%) (Figura 1). Porém, a combinação de três anticorpos mais comum observada é a anti-IA2, anti-GAD e anti-ZnT8 (26,9%); já a combinação de dois AC mais prevalentes foi a dupla anti-IA2 e anti-ZnT8 (8,8%). O estudo também verificou que 27% possuíam todos os anticorpos estudados. Isto demonstra a importância da dosagem desses três biomarcadores mais prevalentes na DM1 em crianças e adolescentes nos exames de rastreamento. Contudo, é importante esclarecer que a prevalência do anti-ZnT8, assim como do anti-IA2, diminuiu consideravelmente depois dos 20 anos de idade (PETRUZELKOVA; ANANIEVA-JORDANOVA; VCELAKOVA *et al.*, 2014).

Figura 1: Determinação de Ac em 227 crianças tchecas testadas para anti-ZnT8, anti-GAD, anti-IA2, anti-Insulina (PETRUZELKOVA; ANANIEVA-JORDANOVA; VCELAKOVA *et al.*, 2014).



Um outro estudo realizado por Carr *et al* (CARR; PERRY; LYNAM *et al.*, 2020) demonstrou que o uso combinado de anticorpos, índice de massa corpórea, idade e determinação de peptídeo C é essencial para uma perfeita classificação do tipo de DM que o paciente possui. Lynam *et al* (LYNAM; MCDONALD; HILL *et al.*, 2019) complementam que a determinação de anticorpos melhora a precisão da classificação do DM, além de serem testes com custo mais acessível do que os testes que utilizam técnicas de biologia molecular.

CONCLUSÃO

A DM1 possui evolução silenciosa e o seu diagnóstico frequentemente se dá quando o paciente se torna sintomático, geralmente apresentando cetoacidose. Porém, em alguns casos, apresentações atípicas de DM1 e DM2 podem dificultar o diagnóstico clínico, exigindo utilização de ferramentas diagnósticas para diferenciar e realizar o tratamento adequado.

Por isso, a pesquisa de autoanticorpos específicos para DM autoimune é essencial na prática clínica. Atualmente o uso do marcador ICA caiu em desuso, sendo substituído pelas dosagens de Anti-GAD, IAA, Anti-IA2 e Anti-Znt8. Estes anticorpos não só podem ser utilizados para diferenciação entre DM1 e DM2, mas também podem ser utilizados para detecção precoce da doença, em alguns casos antes até da fase clínica.

Por fim vale ressaltar que o custo na realização destes marcadores é justificável, tendo em vista que outra possibilidade de diferenciação entre DM1 e DM2 com utilização de testes genéticos (uso de técnicas de biologia molecular) são mais dispendiosos.

REFERÊNCIAS

AMER, H. M.; ABD EL BAKY, R. S.; NASR, M. S.; HENDAWY, L. M. *et al.* Anti-islet cell antibodies in a sample of Egyptian females with gestational diabetes and its relation to development of type 1 diabetes mellitus. *Current Diabetes Reviews*, 14, n. 4, p. 389-394, 2018. <https://doi.org/10.2174/1573399813666170502110559>,

- AMON, R. L. R.; HI, E. M. B. USO DE ANTICORPOS ANTI-TRANSPORTADOR DE ZINCO (ANTI-ZNT8) PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE DA DIABETES MELLITUS TIPO 1. *UNILUS Ensino e Pesquisa*, 18, n. 52, p. 44-57, 2021. <http://revista.unilus.edu.br/index.php/ruep/article/view/1470>.
- BASU, M.; PANDIT, K.; BANERJEE, M.; MONDAL, S. A. et al. Profile of auto-antibodies (disease related and other) in children with type 1 diabetes. *Indian Journal of Endocrinology Metabolism*, 24, n. 3, p. 256, 2020. https://doi.org/10.4103%2Fijem.IJEM_63_20,
- BELHIBA, O.; AADAM, Z.; JEDDANE, L.; SAILE, R. et al. Research of anti-GAD and anti-IA2 autoantibodies by ELISA test in a series of Moroccan pediatric patients with diabetes type 1. *African Health Sciences*, 20, n. 3, p. 1337-1343, 2020. <https://doi.org/10.4314%2Fahs.v20i3.40>,
- BOTTAZZO, G.; FLORIN-CHRISTENSEN, A.; DONIACH, D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *The Lancet*, 304, n. 7892, p. 1279-1283, 1974. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(74\)90140-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(74)90140-8),
- BROOKING, H.; ANANIEVA-JORDANOVA, R.; ARNOLD, C.; AMOROSO, M. et al. A sensitive non-isotopic assay for GAD65 autoantibodies. *Clinica Chimica Acta*, 331, n. 1-2, p. 55-59, 2003. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(03\)00088-3](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(03)00088-3),
- CARR, A.; PERRY, D.; LYNAM, A.; CHAMALA, S. et al. Histological validation of a type 1 diabetes clinical diagnostic model for classification of diabetes. *Diabetic Medicine*, 37, n. 12, p. 2160-2168, 2020. <https://doi.org/10.1111/dme.14361>,
- DALZUCHIO, T.; BERLESE, D. B. A Importância dos Marcadores Imunológicos no Diabetes Mellitus do Tipo. *NewsLab*, 122, 2015. <https://periodicos.feevale.br/seer/index.php/revistaconhecimentoonline/article/download/171/1681/3272>.
- DELIC-SARAC, M.; MUTEVELIC, S.; KARAMEHIC, J.; SUBASIC, D. et al. ELISA test for analyzing of incidence of type 1 diabetes autoantibodies (GAD and IA2) in children and adolescents. *Acta Informatica Medica*, 24, n. 1, p. 61, 2016. <https://doi.org/10.5455%2Faim.2016.24.61-65>,
- DERROU, S.; EL GUENDOZ, F.; BENABDELFEDEL, Y.; CHAKRI, I. et al. The profile of autoimmunity in type 1 diabetes patients. *Annals of African Medicine*, 20, n. 1, p. 19, 2021. https://doi.org/10.4103/aam.aam_8_20,
- FABRIS, M.; ZAGO, S.; LIGUORI, M.; TREVISAN, M. T. et al. Anti-zinc transporter protein 8 autoantibodies significantly improve the diagnostic approach to type 1 diabetes: an Italian multicentre study on paediatric patients. *Autoimmunity Highlights*, 6, n. 1, p. 17-22, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13317-015-0068-4>,
- GOLBERT, A.; VASQUES, A. C. J.; FARIA, A.; LOTTENBERG, A. M. P. et al. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020. São Paulo: Clannad, p. 1-491, 2019. <https://portaldeboaspraticas.iff.fiocruz.br/biblioteca/diretrizes-da-sociedade-brasileira-de-diabetes-2019-2020/>.
- HAMEED, S.; ELLARD, S.; WOODHEAD, H. J.; NEVILLE, K. A. et al. Persistently autoantibody negative (PAN) type 1 diabetes mellitus in children. *Pediatric diabetes*, 12, n. 3pt1, p. 142-149, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5448.2010.00681.x>,
- IDF. IDF Diabetes Atlas. International Diabetes Federation, 2019. https://diabetesatlas.org/idfawp/resource-files/2019/07/IDF_diabetes_atlas_ninth_edition_en.pdf.
- KAWASAKI, E. Type 1 diabetes and autoimmunity. *Clinical pediatric endocrinology*, 23, n. 4, p. 99-105, 2014. <https://doi.org/10.1297%2Fcpe.23.99>,

- KAWASAKI, E.; OIKAWA, Y.; OKADA, A.; KANATSUNA, N. et al. Different interaction of onset age and duration of type 1 diabetes on the dynamics of autoantibodies to insulinoma-associated antigen-2 and zinc transporter 8. *Journal of diabetes investigation*, 12, n. 4, p. 510-515, 2021. <https://doi.org/10.1111/jdi.13370>,
- LIMITED, R. ELISA RSR 2 Screen ICA Technical Information. 2021a. <https://www.rsrltd.com/pdf%20tech/2%20SCREEN%20ICA%20ELISA.pdf>.
- LIMITED, R. ELISA RSR Fast ZnT8 Ab Technical Information. 2021b. <https://www.rsrltd.com/pdf%20tech/TI%20RSRElisa%20ZnT8%20Ab%20Fast%20Rev1.pdf>.
- LIMITED, R. ELISA RSR GADAb Technical Information. 2014. <https://www.rsrltd.com/pdf%20tech/GADAb%20ELISA.pdf>.
- LIMITED, R. ELISA RSR IA-2 Ab Version 2 Technical Information. 2010. <https://www.rsrltd.com/pdf%20tech/IA-2%20Ab%20ELISA.pdf>.
- LIMITED, R. RIA RSR IAA Technical Information. 2013. <https://www.rsrltd.com/pdf%20tech/IAA%20RIA.pdf>.
- LYNAM, A.; MCDONALD, T.; HILL, A.; DENNIS, J. et al. Development and validation of multivariable clinical diagnostic models to identify type 1 diabetes requiring rapid insulin therapy in adults aged 18-50 years. *BMJ open*, 9, n. 9, p. e031586, 2019. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-031586>,
- MARASCHIN, J. d. F. Acurácia diagnóstica do anticorpo anti-descarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD) como marcador de auto-imunidade no diabetes melito. 2007. 52 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado) - Ciências Médicas: Endocrinologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/13426>.
- NERUP, J.; ANDERSEN, V.; BENDIXEN, G. Anti-adrenal cellular hypersensitivity in Addison's disease. IV. In vivo and in vitro investigations on the mitochondrial fraction. *Clinical Experimental Immunology*, 6, n. 5, p. 733, 1970. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1712730/>.
- PETRUZELKOVA, L.; ANANIEVA-JORDANOVA, R.; VCELAKOVA, J.; VESELY, Z. et al. The dynamic changes of zinc transporter 8 autoantibodies in Czech children from the onset of Type 1 diabetes mellitus. *Diabetic medicine*, 31, n. 2, p. 165-171, 2014. <https://doi.org/10.1111/dme.12308>,
- POZZILLI, P.; DI MARIO, U. Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (latent autoimmune diabetes of the adult) definition, characterization, and potential prevention. *Diabetes care*, 24, n. 8, p. 1460-1467, 2001. <https://doi.org/10.2337/diacare.24.8.1460>,
- RAHMATI, K.; LERNMARK, A.; BECKER, C.; FOLTYN-ZADURA, A. et al. A comparison of serum and EDTA plasma in the measurement of glutamic acid decarboxylase autoantibodies (GADA) and autoantibodies to islet antigen-2 (IA-2A) using the RSR radioimmunoassay (RIA) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kits. *Clinical laboratory*, 54, n. 7-8, p. 227-235, 2008. <https://www.clin-lab-publications.com/article/22>.
- RAMALHO, S.; NORTADAS, R. Anticorpos na diabetes mellitus tipo 1. *Revista Portuguesa de Diabetes*, 16, n. 2, p. 73-79, 2021. http://www.revportdiabetes.com/wp-content/uploads/2021/07/RPD_Junho_2021_ARTIGO-DE-REVISAO_73-79.pdf.
- RODACKI, M.; TELES, M.; GABBAY, M.; MONTENEGRO, R. et al. Classificação do diabetes. *Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes* (2022), 2022.10.29327/557753.2022-1,

SEISSLER, J.; DE SONNAVILLE, J. J.; MORGENTHALER, N. G.; STEINBRENNER, H. et al. Immunological heterogeneity in type I diabetes: presence of distinct autoantibody patterns in patients with acute onset and slowly progressive disease. *Diabetologia*, 41, n. 8, p. 891-897, Aug 1998. <https://doi.org/10.1007/s001250051004>,

SINGLA, R.; HOMKO, C.; SCHEY, R.; PARKMAN, H. P. et al. Diabetes-related autoantibodies in diabetic gastroparesis. *Digestive Diseases*, 60, n. 6, p. 1733-1737, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3690-0>,

SOUZA, L. C. V. F. d.; KRAEMER, G. d. C.; KOLISKI, A.; CARREIRO, J. E. et al. Diabetic ketoacidosis as the initial presentation of type 1 diabetes in children and adolescents: epidemiological study in Southern Brazil. *Revista Paulista de Pediatria*, 38, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/1984-0462/2020/38/2018204>,

THEWJITCHAROEN, Y.; KRITTIYAWONG, S.; VONGTERAPAK, S.; NAKASATIEN, S. et al. Clinical characteristics, residual beta-cell function and pancreatic auto-antibodies in Thai people with long-standing type 1 diabetes mellitus. *Journal of the ASEAN Federation of Endocrine Societies*, 35, n. 2, p. 158, 2020. <https://doi.org/10.15605/jafes.035.02.02>,

TSCHIEDEL, B. A história do diabetes. *Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia*. 2014.

WITT, A. R. S.; PACHECO, A. M.; BRATZ, F.; LAZZARINI, M. B. et al. IMMUNOLOGICAL MARKERS IN TYPE 1 DIABETES MELLITUS - REVIEW *Revista Conhecimento Online*, 2, 2011. <https://periodicos.feevale.br/seer/index.php/revistaconhecimentoonline/article/download/171/1681/3272>.

WURAGIL, D. K.; SUSANTO, H.; HERAWATI, A.; NUGROHO, Y. M. et al. The early detection of type 1 diabetes mellitus and latent autoimmune diabetes in adults (LADA) through rapid test reverse-flow immunochromatography for glutamic acid decarboxylase 65 kDa (GAD65). *Heliyon*, 8, n. 1, p. e08695, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08695>,