

---

**Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Biologia  
Departamento de Microbiologia e Imunologia**

**Aparecida Celli de Almeida Said**

**Estudo do Provável Papel do Vírus Coxsackie B4 na Diabetes  
Mellitus Dependente de Insulina**

Tese apresentada ao Departamento de  
Microbiologia e Imunologia do Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual de Campinas  
para obtenção do título de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro  
Depto. de Microbiologia e Imunologia  
IB - UNICAMP

Orientador no Exterior: Nando K. Chatterjee, PhD  
Wadsworth Center for Laboratories and Research  
New York State Department of Health, Albany,  
NY, USA

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato(a)  
Aparecida Celli de  
Almeida Said  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

13/03/97



UNIVERSIDADE	-BC
CHAMADA:	Unicamp
Assinatura	a 21e
NUMERO	21/30208
ANO	286/97
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	13/06/97
N.º CPD	

M-00098389-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Said, Aparecida Celli de Almeida

Sa21e      Estudo do provável papel do vírus Coxsackie B4 na diabetes Mellitus dependente de insulina/Aparecida Celli de Almeida  
Said. -- Campinas, SP: [s.n.], 1996.  
83p.: ilus.

Orientadores: Antonio Fernando Pestana de Castro e  
Nando K. Chatterjee.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Biologia.

1. Pesquisa imunológica - Reatividade. 2. Diabetes. 3. Vírus.  
I. Castro, Antonio Fernando Pestana de. II. Chatterjee, Nando K.  
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.  
IV. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 13 de março de 1997.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

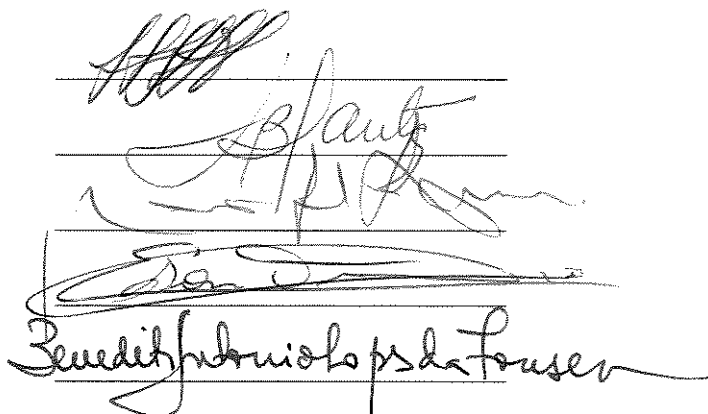
Prof.Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro

Profa.Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Prof.Dr. Laercio Joel Franco

Prof.Dr. Edison Luiz Durigon

Prof.Dr. Benedito Antonio Lopes da Fonseca

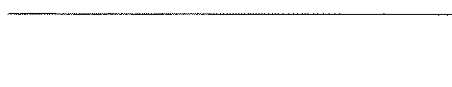


The image shows five handwritten signatures, each written on a horizontal line. From top to bottom, the signatures correspond to the names listed in the adjacent text: Antonio Fernando Pestana de Castro, Leonilda Maria Barbosa dos Santos, Laercio Joel Franco, Edison Luiz Durigon, and Benedito Antonio Lopes da Fonseca. The signature for Benedito Antonio Lopes da Fonseca is notably larger and more stylized than the others.

SUPLENTES:

Profa.Dra. Maria Silvia Viccari Gatti

Prof.Dr. Tomomasa Yano



Two horizontal lines are provided for the signatures of the substitute members, corresponding to the names listed to the left.

## ABREVIATURAS

<b>Sigla</b>	<b>Descrição</b>
<b>DMDI</b>	Diabetes mellitus dependente de insulina
<b>GAD</b>	Glutamic acid decarboxylase
<b>GABA</b>	$\gamma$ -aminobutiric acid
<b>ICA</b>	Islet cell antibodies
<b>CB</b>	Vírus Coxsackie do grupo B
<b>CB4 E2</b>	Vírus Coxsackie do grupo B tipo 4 linhagem E2

# ÍNDICE

<b>1 INTRODUÇÃO</b> . . . . .	<b>1</b>
1.1 Diabetes Mellitus Dependente de Insulina (DMDI) . . . . .	2
1.2 Vírus e Diabetes Mellitus Dependente de Insulina . . . . .	4
1.3 Mecanismo de Ação dos Vírus Diabetogênicos . . . . .	5
1.4 Vírus Coxsackie e Diabetes Mellitus Dependente de Insulina . . . . .	7
1.5 Mimetismo Molecular . . . . .	11
1.6 Objetivos . . . . .	13
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> . . . . .	<b>14</b>
2.1 Animais . . . . .	15
2.2 Vírus . . . . .	15
2.3 Cultivo do Vírus . . . . .	15
2.4 Infecção dos Camundongos . . . . .	17
2.5 Determinação da Concentração de Glicose no Sangue dos Camundongos	17
2.6 Antígenos . . . . .	18
2.6.1 Peptídeos Sintéticos . . . . .	18
2.6.2 Glutamato Descarboxilase . . . . .	19
2.7 Anticorpos . . . . .	19
2.8 Obtenção dos Antissoros Anti-peptídeos . . . . .	20
2.9 Purificação de GAD . . . . .	21
2.9.1 Preparo dos Extratos de Cérebro e de Pâncreas para Cromatografia	21
2.9.2 Purificação de GAD por Cromatografia de Afinidade . . . . .	22
2.10 Ensaio Imunoenzimático . . . . .	23
2.10.1 ELISA . . . . .	23

2.10.2	Immunoblotting . . . . .	25
2.10.3	Immunoblotting Direto . . . . .	26
2.11	Experimentos de Inibição da Reatividade dos Antissoros . . . . .	28
2.11.1	Absorção dos Antissoros . . . . .	28
2.11.2	Eluição dos Anticorpos com Glicina . . . . .	29
2.12	Análise Estatística . . . . .	29
<b>3</b>	<b>RESULTADOS . . . . .</b>	<b>30</b>
3.1	Análise das Reações entre os Peptídios Sintéticos e seus Antissoros Específicos . . . . .	31
3.2	Análise das Reações entre GAD Purificado e Antissoros Anti-peptídios	36
3.3	Avaliação da Especificidade das Reações Cruzadas entre os Peptídios Sintéticos e seus Antissoros Específicos . . . . .	41
3.4	Detecção de Anticorpos Anti-GAD e Anti P2-C nos Antissoros de Camundongos, Utilizando-se como Antígenos os Peptídios Sintéticos	44
3.5	Detecção de Anticorpos Anti-GAD e Anti-P2-C nos Antissoros de Camundongos, Utilizando-se como Antígeno GAD Purificado . . . . .	46
3.6	Avaliação da Especificidade das Reações entre os Peptídios Sintéticos e os Antissoros de Camundongos . . . . .	48
3.7	Detecção de Anticorpos Anti-GAD e Anti P2-C nos Soros de Pacientes Diabéticos . . . . .	48
3.8	Avaliação da Especificidade das Reações entre os Peptídios Sintéticos e os Soros de Pacientes Diabéticos . . . . .	51
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO . . . . .</b>	<b>52</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES . . . . .</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS . . . . .</b>	<b>63</b>

# ÍNDICE DE TABELA E FIGURAS

<b>Tabela 1.</b> Purificação de GAD .....	38
<b>Figura 1.</b> ELISA dos antissoros anti-peptídios com os peptídios homólogos .....	33
<b>Figura 2.</b> ELISA dos antissoros anti-peptídios com os peptídios heterólogos .....	34
<b>Figura 3.</b> Immunoblotting direto dos antissoros anti-peptídios com os peptídios homólogos e heterólogos .....	35
<b>Figura 4.</b> Immunoblotting dos antissoros anti-peptídios com GAD total purificado de cérebro de camundongo .....	39
<b>Figura 5.</b> ELISA dos antissoros anti-peptídios com GAD total purificado de cérebro e pâncreas de camundongo .....	40
<b>Figura 6A.</b> Immunoblotting direto dos antissoros anti-peptídios antes e após absorção com os peptídios heterólogos .....	42
<b>Figura 6B.</b> Immunoblotting direto dos antissoros anti-peptídios eluídos com glicina.....	43

<b>Figura 7.</b> ELISA dos soros de camundongos com os peptídios sintéticos .....	45
<b>Figura 8.</b> ELISA dos soros de camundongos com GAD total purificado de cérebro e pâncreas de camundongos .....	47
<b>Figura 9.</b> ELISA dos soros de pacientes diabéticos com os peptídios sintéticos .....	50



**Resumo**

## **Estudo do Provável Papel do Vírus Coxsackie B4 na Diabetes Mellitus Dependente de Insulina**

A similaridade entre a proteína P2-C do vírus Coxsackie B4 e GAD humano e o possível papel dessa homologia de epítomos no desenvolvimento de uma resposta imune específica na diabetes mellitus dependente de insulina (DMDI) foi investigada.

Foram produzidos anticorpos contra os peptídios sintéticos P2-C, GAD<sub>65</sub> e GAD<sub>67</sub> e sua imunoreatividade frente a GAD total purificado de cérebro e pâncreas de camundongos foi analisada através do ELISA e Immunoblotting.

Além disso, anticorpos anti-P2-C e anti-GAD foram pesquisados de camundongos infectados com vírus Coxsackie B4 e nos soros de pacientes com diabetes mellitus dependente de insulina.

Os antissoros anti-peptídios (anti-P2-C , anti-GAD<sub>65</sub> e anti-GAD<sub>67</sub>) reagiram fortemente com os respectivos peptídios homólogos; o antissoro anti-P2-C reagiu cruzadamente com GAD<sub>65</sub> tão eficientemente quanto anti-GAD<sub>65</sub> com P2-C, porém não foi detectada reação cruzada entre P2-C e GAD<sub>67</sub>, embora a reação entre os dois GADs tenha sido bastante intensa.

O antissoro P2-C formou imunocomplexo com GAD<sub>65</sub> purificado de cérebro e pâncreas de camundongo, enquanto que anti-GAD<sub>65</sub> e anti-GAD<sub>67</sub> também mostraram capacidade de formar imunocomplexos com GAD dessas duas fontes.

A maioria dos soros de camundongos infectados foram reativos a GAD purificado de cérebro e pâncreas de camundongo e ao peptídeo P2-C, enquanto que somente alguns soros reagiram ao peptídeo GAD<sub>65</sub> e muito poucos ao peptídeo GAD<sub>67</sub>.

Muitos soros diabéticos reagiram com GAD<sub>65</sub> purificado e também com os peptídeos P2-C e GAD<sub>65</sub> mas somente muito poucos reagiram com o peptídeo GAD<sub>67</sub>. A imunoreatividade dos soros de camundongos e dos soros humanos foi bloqueada por absorção com GAD purificado de cérebro de camundongo.

Os resultados sugerem que o mimetismo molecular deve ter um papel na patogênese da Diabetes mellitus dependente de insulina (DMDI).

**Abstract**

The possible role of amino acid sequence and epitope homologies between a protein P2-C of Coxsackie virus B4 and human GAD in the development of host-specific immune response in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) (molecular mimicry) was investigated. Peptide antibodies to the P2-C protein, GAD<sub>65</sub> and GAD<sub>67</sub> were raised to analyze their immunoreactivity by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting with GAD purified from the brain and pancreas of mice that develop hyperglycemia after the infection. Additionally, antibody reactivity to these peptide antigens was assessed in sera from the virus-infected mice and IDDM patients. All three peptide antisera reacted very strongly with homologous peptides; P2-C antiserum cross-reacted with GAD<sub>65</sub> as efficiently as GAD<sub>65</sub> antiserum with P2-C, but no cross-reaction was detected between P2-C and GAD<sub>67</sub> although cross-reaction between the two GADs was quite pronounced. P2-C antiserum immunocomplexed with GAD<sub>65</sub> from mouse brain or pancreas, whereas GAD<sub>65</sub> and GAD<sub>67</sub> antisera both immunocomplexed with the two GADs from these sources. Most of the sera from virus-infected mice were reactive to brain and pancreas GAD<sub>65</sub> and also to P2-C peptide, whereas some reacted to GAD<sub>65</sub> and a few to GAD<sub>67</sub> peptides. A number of IDDM sera reacted with mouse GAD<sub>65</sub> and also with P2-C and GAD<sub>65</sub> peptides, whereas only a few reacted with GAD<sub>67</sub> peptide. The immunoreactivity of the mouse and IDDM sera to P2-C and GAD<sub>65</sub> peptides was blocked by pre-adsorption with mouse GAD. The results suggest that molecular mimicry may play a role in the pathogenesis of the disease.

## **1. Introdução**

## 1.1 Diabetes Mellitus Dependente de Insulina (DMDI)

A diabetes mellitus dependente de insulina (DMDI), ou diabetes tipo I, é uma desordem autoimune que ocorre em indivíduos geneticamente suscetíveis, como resultado da destruição das células  $\beta$ , das ilhotas de Langerhans do pâncreas, que são as secretoras de insulina [4, 27].

O processo autoimune que leva à destruição das ilhotas começa frequentemente antes da idade adulta e é altamente seletivo, pois afeta somente as células  $\beta$  resultando na deficiência da produção de insulina, enquanto que as demais células que fazem parte das ilhotas permanecem intatas. Uma outra característica desse processo é a lentidão com que o mesmo se desenvolve, podendo levar anos até o aparecimento de sintomas como hiperglicemia e cetose, que só acontecem quando aproximadamente 80% das células  $\beta$  já estão destruídas.

A primeira grande evidência do envolvimento do sistema imune na DMDI é a presença de uma lesão específica, denominada *insulitis* [145], observada em modelos experimentais e em tecido pancreático da necrópsia de indivíduos que morreram logo após o aparecimento clínico da diabetes. Essa lesão é caracterizada por infiltrados de células mononucleares dentro e ao redor das ilhotas de Langerhans e inúmeros trabalhos relatam o aparecimento de *insulitis* em pacientes com DMDI recém diagnosticada [23, 56, 85].

O fato de muitos pacientes apresentarem além da DMDI outras doenças autoimunes [22, 62, 79], assim como a presença de anticorpos circulantes contra antígenos naturais das ilhotas em indivíduos diabéticos recém diagnosticados também são evidências que sugerem o envolvimento da autoimunidade na DMDI.

Um número cada vez maior de antígenos presentes nas células das ilhotas vem sendo identificados [6, 24]. São eles: sialoglicolípido (um dos autoantígenos para *islet-cell antibody* - ICA), 64-kD, insulina, receptor de insulina, 38-kD, proteína 69-kD (alvo para os anticorpos anti-soroalbumina bovina), transportador de glicose, *heat shock protein 65* (hsp 65); carboxipeptidase H, 52-kD, ICA12, ICA512 (tirosina fosfatase), 150-kD e antígeno polar RIN.

A relevância desses antígenos como alvo do reconhecimento imune na DMDI ainda está sendo estabelecida, mas dentre eles, um dos mais importantes e bem caracterizados, é 64-kD, uma proteína que só é encontrada na membrana das células  $\beta$ , e que recebeu esta denominação de acordo com o seu peso molecular [8]. Recentemente descobriu-se que esta proteína é a enzima glutamato descarboxilase (GAD) [10], a responsável pela conversão de ácido glutâmico em ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), o principal neurotransmissor inibitório no SNC [50].

GAD possui duas formas isoméricas denominadas GAD<sub>65</sub> e GAD<sub>67</sub>, de acordo com seus pesos moleculares de 65.000 e 67.000, respectivamente, e que são codificadas por genes diferentes [49]. A homologia entre as duas formas moleculares é de aproximadamente 70%, sendo que ambas estão presentes no cérebro e nas ilhotas e não apresentam diferenças qualitativas entre si [34, 49].

Os anticorpos anti-64-kD ou anti-GAD parecem ter uma participação secundária na destruição das células  $\beta$ , uma vez que essa destruição é mediada principalmente por linfócitos T, embora linfócitos B e macrófagos também participem do processo [19]. Sendo assim, é difícil atribuir a esses autoanticorpos um papel patogênico na diabetes, no entanto, não deve ser esquecido que eles indicam a presença de linfócitos B com receptores



específicos para GAD, que juntamente com outras células apresentadoras de antígeno, devem apresentar GAD para os linfócitos T auxiliares, que são essenciais na manutenção da autoreatividade contra as células  $\beta$ .

É característica não só da diabetes, como também de outras doenças autoimunes, a presença de autoanticorpos no soro dos pacientes. No caso específico da DMDI, anti-64-kD, anti-insulina e anti-ICA (islet cell antibody) atuam como marcadores pré diabéticos, pois podem ser detectados no soro, meses e até mesmo anos antes do aparecimento dos sintomas da doença [5, 9, 42, 115, 120, 135].

Ainda não se conhece o agente responsável pela iniciação do processo autoimune que destrói as células  $\beta$ , mas certamente a patogênese da DMDI envolve fatores genéticos e ambientais. Os fatores genéticos são críticos no desenvolvimento da diabetes, porém sozinhos não são suficientes para produzi-la, uma vez que a taxa de concordância para o desenvolvimento da DMDI entre gêmeos idênticos é de 50% [14, 106, 110]. A natureza do componente ambiental ainda não está bem estabelecida, mas agentes infecciosos (a maioria virais) [132] e agentes químicos (a maioria dietéticos) [21, 47, 71, 72, 88, 94, 99] também têm participação no processo de destruição das células  $\beta$ .

## **1.2 Vírus e Diabetes Mellitus Dependente de Insulina**

Um aspecto importante na patogenia da DMDI é sua associação com infecções virais. Estudos sobre a possibilidade desse envolvimento tiveram início ainda no século passado, através de notificações feitas sobre pacientes que desenvolveram diabetes logo após infecção pelo vírus da caxumba [100, 67]. Desde então, trabalhos que documentam

uma relação temporal entre o aparecimento de certas infecções virais e o desenvolvimento de diabetes tem sido uma constante [11, 55, 60, 73, 103, 124].

Muitos vírus diferentes, pertencentes a inúmeras famílias, têm potencial para danificar as células  $\beta$  do pâncreas, porém é bastante difícil se demonstrar *in vivo* que eles realmente causam diabetes.

Embora um grande número de vírus estejam implicados com o desenvolvimento de diabetes, mais notadamente caxumba e rubéola [11, 59, 60, 73, 103, 124], são os picornavírus que exibem uma estreita associação com casos da doença [12, 15, 132], sendo que o melhor modelo experimental de diabetes induzida por vírus é conseguido com o vírus da encefalomiocardite (EMC), um picornavírus.

Além dos vírus já mencionados, já existem algumas evidências mais sólidas da associação de citomegalovírus e retrovírus com a diabetes. Em trabalho recente, Pak *et al.*, mostraram que citomegalovírus de origem humana podem induzir o aparecimento de anticorpos ICA que reagem com o autoantígeno 38-kD das ilhotas pancreáticas do homem [112]. Com relação às retrovíroses, Suenaga *et al.* verificaram que a administração de ciclofosfamida em camundongos NOD (non obese diabetic) deve aumentar a expressão de partículas endógenas “retroviruslike” pelas células  $\beta$ , e isto está associado com desenvolvimento de *insulitis* severa e diabetes [128].

### **1.3 Mecanismo de Ação dos Vírus Diabetogênicos**

Os vírus diabetogênicos podem levar à DMDI por inúmeros mecanismos, mas principalmente causando infecções citolíticas ou infecções persistentes [134, 153].

Na infecção citolítica, a replicação dos vírus nas células  $\beta$  resulta na lise das mesmas, que são então destruídas por ataque direto do vírus, independentemente da autoimunidade.

Quando o processo é persistente o vírus aciona a autoimunidade, que gradualmente leva à destruição das células  $\beta$ . Esse tipo de mecanismo pode ser exemplificado pela síndrome da rubéola congênita, quando a infecção se dá ainda no útero e a diabetes só aparece 5 a 20 anos mais tarde em aproximadamente 12 a 20% dos indivíduos afetados pela síndrome [15].

No que diz respeito aos picornavírus, eles não são exclusivamente líticos, podendo também causar infecções persistentes [20, 25, 123], preferencialmente em crianças, porque seu sistema imune imaturo favorece esse tipo de infecção.

Qual o exato papel dos vírus na indução da autoimunidade e porque ela persiste, são questões ainda sem resposta, porém alguns possíveis mecanismos de como isso deve ocorrer têm sido sugeridos [132, 153].

Cogita-se que os vírus poderiam acionar a autoimunidade:

- Induzindo alterações nos tecidos do hospedeiro para os quais são trópicos
- Induzindo alterações nas células do sistema imune
- Mimetizando antígenos do hospedeiro (mimetismo molecular)

Na primeira hipótese, as alterações seriam causadas por modificação ou exposição pelo vírus dos antígenos da própria célula hospedeira ou então inserção de antígenos virais nessas mesmas células. Um outro mecanismo seria a indução da expressão inapropriada de antígenos do MHC.

Na segunda hipótese, os vírus destruiriam ou estimulariam determinadas subpopulações de linfócitos levando a um desequilíbrio do sistema imune.

Cada um desses mecanismos agindo separadamente ou em conjunto podem levar indivíduos, que já apresentem uma predisposição genética, ao desenvolvimento da diabetes.

## **1.4 Vírus Coxsackie e Diabetes Mellitus Dependente de Insulina**

Os picornavírus que são vírus muito pequenos, de RNA de fita simples, não envelopados e com simetria icosaédrica pertencem à família *Picornaviridae*. Esta é dividida em quatro gêneros ou grupos genotípicos [113] que são: *Aphthovirus* (grupo I), *Cardiovirus* (grupo II), *Enterovirus* (grupos III e IV) e *Rhinovirus* (grupo IV). Todos esses gêneros estão associados com diabetes nos animais [13, 20, 38, 130, 132, 133, 143, 152], mas somente alguns enterovírus, especialmente vírus Coxsackie e possivelmente vírus Echo parecem estar relacionados com diabetes no homem [1, 3, 28, 51, 61, 83, 87, 105, 107, 108, 129, 148, 151].

Os vírus Coxsackie que receberam esse nome porque o primeiro isolamento se deu na cidade de Coxsackie, New York, EUA, são divididos em 2 grupos patogênicos para o homem: A e B. O grupo A apresenta 23 sorotipos (CA1 - CA22, CA24) e o grupo B seis sorotipos (CB1 a CB6).

Eles são encontrados no mundo inteiro e a maioria das infecções ocorrem na infância, sendo muitas vezes intra-uterinas, mas as reinfecções podem acometer tanto crianças como adultos. A transmissão se dá principalmente pela via oro-fecal, mas também existe a possibilidade de transmissão por gotículas respiratórias.

Um número muito grande de doenças podem ser causadas por Coxsackie dos grupos A e B, e essa variedade reflete um amplo espectro de tropismo desses vírus para órgãos e tecidos do hospedeiro [102].

Dentre as inúmeras doenças causadas por vírus Coxsackie do grupo B (CB) está provavelmente a DMDI, por isso vírus pertencentes a esse grupo, especialmente CB4, tem sido extensivamente estudados [1, 3, 87, 106, 107, 108, 148, 151].

A associação de CB4 com DMDI está baseada em estudos sorológicos e epidemiológicos [43, 44, 54, 55, 93], em casos que documentam o isolamento do vírus de pacientes que morreram logo após uma descompensação diabética aguda [1, 3, 28, 61, 87, 106, 107, 108, 148], e em estudos em modelos animais [12, 33].

Um grande número de trabalhos tem detectado um aumento dos níveis de anticorpos anti-CB4 em pacientes diabéticos recém diagnosticados, constatando-se que aproximadamente 1/3 desses pacientes apresentam esses anticorpos [16, 17, 39, 97, 114, 118, 122].

No primeiro estudo soropidemiológico que utilizou como controle soros de indivíduos não diabéticos, Gamble *et al.* [53] constataram que pacientes recém-diabéticos apresentavam um título de anticorpos anti-CB mais alto que os dos soros controle e que dos indivíduos diabéticos há mais de três meses, porém esses achados não foram confirmados por outros autores [45, 74, 77]. Paralelamente a esse estudo, esse mesmo autor verificou que havia uma relação entre a incidência de DMDI e a de CB4, mas não com outros tipos de vírus [54].

A utilização de novas técnicas tem facilitado a pesquisa de anticorpos anti-enterovírus nos soros de diabéticos, como no trabalho de Clements *et al.* [36] que

detectaram RNA de enterovírus, através de PCR, em 64% das amostras de soro examinadas, sendo que as seqüências de algumas amostras positivas mostraram homologia com CB3 e CB4, e também com as seqüências comumente encontradas em crianças diabéticas infectadas.

De qualquer maneira, os estudos soroepidemiológicos em geral são muito controversos para permitir conclusões mais definitivas, sendo que os relatos de casos de pacientes nos quais foi comprovada uma associação direta entre a infecção viral e o desenvolvimento subsequente de diabetes, através do isolamento do vírus, são bem mais convincentes do envolvimento de CB com DMDI.

Em 1976, Gladish *et al.* [61] relataram o caso de uma criança de 5 anos que apresentou miocardite e diabetes 2 a 3 semanas após uma cirurgia cardíaca. Na necrópsia as ilhotas de Langerhans apresentaram infiltrado linfocítico, células  $\beta$  necrosadas e antígenos virais, assim como altos níveis de anticorpos anti-Coxsackie no soro.

Em 1979, Yoon *et al.* [151] realizaram o mais significativo desses trabalhos isolando vírus Coxsackie B4 do pâncreas de uma criança de 10 anos que morreu após o início abrupto de cetoacidose diabética, que se seguiu a uma infecção semelhante à gripe. Na necrópsia foram observadas *insulitis* e necrose das células  $\beta$ , e o vírus isolado do pâncreas do paciente foi capaz de causar diabetes quando inoculado em camundongos SJL.

Em 1980, Champsaur *et al.* [28] publicaram o estudo do caso de uma criança de 16 meses de idade que apresentou diabetes após uma infecção por Coxsackie B5. O vírus foi isolado das fezes e quando inoculado em camundongo causou sintomas de intolerância à glicose.

Inúmeros casos semelhantes aos já mencionados [3, 82, 87, 106, 107, 108, 129, 148], têm sido publicados, mas a prova final do envolvimento das viroses, especialmente CB4, na DMDI, ainda está faltando.

Dentro de um mesmo tipo de vírus podem ocorrer variantes que muitas vezes exibem diferentes tropismos e graus de virulência [69].

Os vírus Coxsackie atacam preferencialmente o tecido acinar do pâncreas, mas também podem danificar as ilhotas de Langerhans [26, 68, 142]. Em 1974, Coleman *et al.* [37] verificaram que camundongos CD-1 quando infectados por CB4 apresentavam uma elevação transitória da glicose 15 a 20 dias após a infecção. Porém, esses resultados não puderam ser reproduzidos nem pelos próprios autores, e uma explicação plausível para esse fato é que, em camundongos, a maioria das linhagens de Coxsackie são muito pouco  $\beta$  trópicas, e uma maneira de aumentar o tropismo desse vírus para célula  $\beta$  é através de passagens seriadas do vírus em cultura destas células [111, 127, 140].

Com relação a CB4, nem todas as variantes são diabetogênicas, esse potencial depende não só da linhagem de vírus selecionada como também da estrutura genética do hospedeiro. Em estudo realizado em camundongos, verificou-se que somente certas linhagens desses animais desenvolvem diabetes quando expostas a CB4 e também que camundongos machos desenvolvem diabetes mais severa do que as fêmeas [150].

Variantes diabetogênicas podem se originar das não diabetogênicas devido à elevada taxa de mutação de CB4 ( $10^{-4}$  mutações/base) [116] o que gera uma grande heterogeneidade de partículas virais dentro de uma mesma linhagem. Esse fato pode ser exemplificado pela linhagem E2 de CB4 (CB4 E2) que apresenta duas populações distintas de partículas, sendo que a menos infectante é a mais diabetogênica [33].

Estudos genéticos vêm sendo realizados para determinar a sequência de algumas linhagens diabetogênicas ou pancreatrópicas de picornavírus [81, 86, 117, 139].

Em 1987 Jenkins *et al.* determinaram a sequência completa do genoma da linhagem protótipo de CB4, JBV (Van Barscholten), não diabetogênica, e o compararam com o genoma de alguns outros membros da família *Picornaviridae* [81]. Em 1994, Kang *et al.* [86] clonaram e sequenciaram o genoma da linhagem diabetogênica E2 de CB4, e o compararam com o genoma de JBV. Esses autores verificaram oito substituições na região P2-C da linhagem E2 e sugeriram que as substituições de aminoácidos tanto nas proteínas capsídicas como nas não capsídicas devem estar envolvidas na diabetogenicidade das amostras.

## 1.5 Mimetismo Molecular

O termo mimetismo molecular foi formalmente definido por Damian em 1964 como sendo o compartilhamento de determinantes antigênicos entre hospedeiro e parasita [40]. Mais recentemente, o mimetismo molecular foi reconhecido como sendo um importante mecanismo de patogênese viral mediador da autoimunidade [109], que só ocorre quando os determinantes do microrganismo e hospedeiro são similares o bastante para reagir cruzadamente, ainda que diferentes o bastante para quebrar a tolerância imunológica.

Esse fenômeno parece ser mais comum do que se suspeitava originalmente [52, 80,101] e inúmeros são os exemplos de mimetismo que ocorrem na natureza .



No que diz respeito à DMDI e ao provável papel de alguns vírus na indução do processo autoimune de destruição das células  $\beta$ , trabalhos recentes têm sugerido que o mimetismo molecular pode ser o mecanismo que aciona esse processo.

Em 1993, Karounos *et al.* [89], utilizando anticorpos monoclonais demonstraram que uma proteína do capsídio do vírus da rubéola reage cruzadamente com o autoantígeno 52-kD das células  $\beta$ , o que explicaria a alta incidência de DMDI em indivíduos portadores da síndrome da rubéola congênita.

Com relação ao vírus Coxsackie, particularmente CB4, que como visto anteriormente apresenta uma forte associação com a DMDI, Kaufman *et al.* [90] descobriram uma grande similaridade entre  $GAD_{65}$ , e a proteína P2-C desse vírus. Essa proteína, composta por 329 aminoácidos e com peso molecular de 27.000 a 37.000 é uma proteína altamente conservada entre os vírus Coxsackie, principalmente B3 e B4, e parece estar envolvida na síntese de RNA [102].

A similaridade entre  $GAD_{65}$  e P2-C reside num segmento de 6 aminoácidos (PEVKEK) idêntico em ambas as proteínas, sendo que esta sequência corresponde aos resíduos 260-266 em  $GAD_{65}$  e aos resíduos 37-43 em P2-C.

A notável homologia entre  $GAD_{65}$ ,  $GAD_{67}$  e P2-C sugere que o mimetismo molecular deve ter um papel na patogênese da DMDI e, embora outros vírus apresentem similaridades com  $GAD_{65}$  [84], somente o vírus Coxsackie B4 exhibe homologia com GAD na região PEVKEK.

## 1.6. Objetivos

O objetivo maior desse trabalho foi testar a hipótese do mimetismo molecular vírus/GAD analisando-se:

1. A imunoreatividade dos antissoros de coelho anti-peptídios (anti P2-C, anti-GAD<sub>65</sub> e anti-GAD<sub>67</sub>) com os peptídios homólogos e heterólogos e com GAD total purificado de cérebro e pâncreas de camundongos.
2. A imunoreatividade dos soros de camundongos infectados com CB4 E2 frente aos peptídios P2-C, GAD<sub>65</sub> e GAD<sub>67</sub> e frente a GAD total purificado de cérebro e pâncreas de camundongos.
3. A imunoreatividade dos soros de pacientes com DMDI recém diagnosticada frente aos peptídios P2-C, GAD<sub>65</sub> e GAD<sub>67</sub> e frente a GAD total purificado de cérebro e pâncreas de camundongos.

## **2. Material e Métodos**

## 2.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem CD-1 machos, livres de vírus, de 5 a 6 semanas de idade, adquiridos do laboratório Charles River (Wilmington, M.A., USA) e também coelhos Chinchilla gigante, fêmeas de 3 a 4 Kg, cedidos pelo laboratório Griffin (New York State Health Department, Guilderland, N.Y., USA).

Os camundongos CD-1 foram escolhidos por serem suscetíveis à diabetes, induzida por vírus Coxsackie B4.

## 2.2 Vírus

A linhagem diabetogênica E2 do vírus Coxsackie B4 (CB4 E2) nos foi cedida pelo Dr. S.R. Webb (Dept. of Biology, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA, USA). Essa linhagem foi obtida através da purificação por plaqueamento [69], de uma amostra humana de vírus Coxsackie (Edwards), que foi originalmente isolada do tecido miocárdico de uma criança com infecção generalizada por vírus Coxsackie, necrose focal e inflamação do pâncreas [92].

## 2.3 Cultivo do Vírus

Os vírus foram cultivados em células BGM (Buffalo Green Monkey Kidney Cells) de acordo com metodologia já descrita [146]. As células foram mantidas em meio mínimo

essencial (MME) de Eagle (GIBCO, New York, NY, USA), acrescido de soro fetal bovino (10%) e gentamicina (50  $\mu\text{g/ml}$ ) e incubadas a 37°C em presença de 5% de CO<sub>2</sub>, por aproximadamente cinco dias, ou pelo tempo suficiente para a monocamada celular tornar-se 100% confluenta.

A infecção das células foi realizada com uma multiplicidade de infecção (*MOI*) de 0,5 unidades formadoras de placa (*PFU*), e após 24 horas a 37°C, quando mais de 90% das células mostraram efeito citopático, os vírus foram liberados por três ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento. A cultura foi centrifugada a 2000g por 10 minutos e o título viral no sobrenadante foi determinado através de plaqueamento [30]. Para o “plaque assay” as células (BGM) foram cultivadas em placas de Petri (60mm) e após a monocamada celular tornar-se totalmente confluenta, elas foram infectadas com diferentes concentrações do vírus, diluído em salina de Dulbecco (GIBCO, New York, NY, USA) livre de cálcio e magnésio. As placas foram incubadas por 1 hora a 37° C com 5% de CO<sub>2</sub> sendo então recobertas com 8ml de agarose (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) a 0,95% em meio mínimo essencial de Eagle (GIBCO, New York, NY, USA) acrescido de 5% de soro fetal bovino. Após a solidificação, as placas foram novamente incubadas por 4 dias a 37°C e coradas por 12 horas a 37°C com 4ml da mesma suspensão de agarose já descrita, porém contendo 0,02% de vermelho neutro.

Após a determinação do título a suspensão viral foi dividida em pequenas alíquotas que foram mantidas a -70°C até o momento do uso.

## **2.4 Infecção dos Camundongos**

Seis grupos de 15 camundongos cada foram inoculados intraperitonealmente com aproximadamente  $2 \cdot 10^6$  (PFU) do vírus/camundongo.

Para a obtenção de soro, cada grupo de animais foi sangrado em períodos diferentes após a infecção, isto é, após 72 horas, 1, 2, 4, 6 e 8 semanas. O sangue foi coletado por punção cardíaca, e ocasionalmente, os animais de cada grupo foram selecionados para monitoração da glicose sanguínea através do teste de tolerância à glicose (GTT) [32].

Um grupo de 22 animais não inoculados, da mesma linhagem, idade e sexo tiveram seus soros coletados e utilizados como controles. Os grupos infectados e não infectados foram mantidos completamente separados, a fim de se prevenir qualquer exposição acidental dos controles ao vírus.

## **2.5 Determinação da Concentração de Glicose no Sangue dos Camundongos**

A determinação da glicose no sangue total dos camundongos foi realizada através do teste de 60 minutos de tolerância à glicose (GTT) [32].

Os animais foram deixados em jejum por uma noite com água “ad libitum”, sendo inoculados após esse período com uma solução aquosa de glicose à 20% (2 mg/g/peso). Após 55 a 70 minutos, os animais, sob anestesia geral com éter, foram sangrados através de uma pequena incisão feita na cauda e uma gota de sangue foi coletada diretamente em fitas

“Glucostix” AMES (Miles, Elkhart, IN, USA). A glicose no sangue foi quantificada utilizando-se um glucômetro II AMES (Miles, Elkhart, IN, USA). Antes da realização de cada experimento o aparelho foi calibrado com soluções padrão de concentrações variadas, incluídas no “kit” para essa finalidade.

Foram considerados hiperglicêmicos aqueles animais cuja concentração de glicose sanguínea foi maior que a média da concentração de glicose dos animais não infectados (158mg/dl) mais três vezes o desvio padrão. Por esse critério nós detectamos hiperglicemia em aproximadamente 90% dos camundongos de 6 e 8 semanas.

## **2.6 Antígenos**

### **2.6.1 Peptídios Sintéticos**

Nos experimentos foram utilizados como antígenos quatro peptídios sintéticos. Dois deles correspondentes a uma seqüência de aminoácidos homóloga entre GAD<sub>65</sub> e GAD<sub>67</sub>, um terceiro correspondente a uma seqüência da proteína P2-C de CB4 E2 que também exibe uma região de homologia com GAD<sub>65</sub>, e o último correspondente a uma região de P2-C não homóloga a GAD [86].

As seqüências sintetizadas, de cada um dos peptídios, estão discriminadas abaixo:

<b>Peptídios</b>	<b>Resíduos</b>	
GAD <sub>65</sub>	256-268	...YKMF <u>PEVKEK</u> GMA...
GAD <sub>67</sub>	264-276	...YFYF <u>PEVKTK</u> GMA...
P2-C	1133-1144	...KIL <u>PEVKEK</u> HEF...
P2-C (não homólogo)	1303-1315	...ALEEK <u>GILFTSPF</u> ...

A síntese dos três primeiros peptídios acima citados foi realizada pelo Laboratório de Síntese de Peptídios do “Wadsworth Center for Laboratories and Research”, New York State Health Department (Albany, N.Y., U.S.A.).

O peptídio correspondente a uma região da proteína viral P2-C, não homóloga a GAD, nos foi enviado pelo Dr. Ji- Won Yoon (Julia Mc Farlane Diabetes Research Centre, University of Calgary, Alberta, CA).

### **2.6.2 Glutamato Descarboxilase (GAD)**

GAD proveniente do cérebro e pâncreas de camundongos, purificado por cromatografia de afinidade [63], também foi utilizado como antígeno.

## **2.7 Anticorpos**

Os antissoros contra os peptídios sintéticos GAD<sub>65</sub>, GAD<sub>67</sub> e P2-C foram produzidos em coelhos (ver item 2.8).



Os antissoros de camundongo infectados com CB4 E2 foram obtidos conforme descrito no item 2.4.

Os soros humanos (15 amostras) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Å. Lernmark (University of Washington Medical School, Seattle, WA, USA). Eles foram coletados de pacientes com DMDI recém-diagnosticada e eram todos 64 K positivos e, com exceção de dois, eram também ICA positivos. Soros de indivíduos não diabéticos (11 amostras), sem antecedentes familiares de DMDI e negativos para 64 K e ICA foram utilizados como controles.

O anticorpo monoclonal GAD-6 [29], que reconhece GAD<sub>65</sub>, nos foi fornecido pelo “Developmental Studies Hybridoma Bank” (Yowa City, CA, USA), e o antissoro W887 [125] contra os resíduos 570-585 de GAD<sub>65</sub> e 578-593 de GAD<sub>67</sub> pelo Dr. D. Martin (N.Y. State Health Department, Albany, N.Y., USA).

## **2.8 Obtenção dos Antissoros Anti-peptídios**

Primeiramente os peptídios sintéticos GAD<sub>65</sub>, GAD<sub>67</sub> e P2-C foram acoplados à hemocianina do Keyhole Limpet (KLH), utilizando-se L-etil-3 (3-dimetilaminopropil) carbodiimida HCl (EDAC) como ligante, de acordo com metodologia já conhecida [149].

Os peptídios foram diluídos em água destilada na concentração de 1 mg/ml e EDAC foi acrescentada até atingir uma concentração final de 10 mg/ml. O pH foi ajustado para 5,0 e a reação incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. A hemocianina foi então adicionada numa proporção molar final de 100:1:200 correspondendo a peptídio:hemocianina:EDAC, incubando-se novamente por 4 horas a temperatura ambiente.

A reação foi interrompida com acetato de sódio 100 mM, pH 4,2, e o conjugado proteína/peptídeo separado dos peptídios livres através de diálise em PBS.

Os coelhos foram então inoculados com seis doses de 1 ml (0,5 ml conjugado/0,5 ml adjuvante) do conjugado peptídeo/hemocianina/EDAC emulsificado em adjuvante incompleto de Freund. As inoculações foram realizadas por via subcutânea, em múltiplas áreas da região posterior do dorso, obedecendo-se intervalos de três semanas entre as inoculações. Após a última dose os animais foram sangrados por punção cardíaca, e o soro obtido foi distribuído em alíquotas de 1 ml mantidas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . A alíquota em uso foi sempre mantida a  $4^{\circ}\text{C}$  a fim de se evitar o processo de congelamento e descongelamento que poderia acarretar a queda do título.

## **2.9 Purificação de GAD**

### **2.9.1 Preparo dos Extratos de Cérebro e de Pâncreas para Cromatografia**

Os extratos foram preparados de acordo com a metodologia já descrita [63].

Camundongos não infectados e infectados com CB4 E2 e que desenvolveram hiperglicemia após a infecção foram sacrificados por exposição a  $\text{CO}_2$  e, dependendo da fonte de GAD desejada, tiveram seus cérebros ou pâncreas removidos para preparação dos extratos. Cérebro ou pâncreas, mantidos constantemente em banho de gelo, foram então suspensos em água destilada (6,6 ml/g) contendo brometo de 2-amino-etilisotironium 1

mM (AET), piridoxal 5'-fosfato 20  $\mu$ M (PLP) e Nonidet P-40 (Octilfenoxipolietoxietanol) 0,5%, e a suspensão foi homogeneizada por 30 segundos utilizando-se um homogeneizador elétrico (Brinkman Polytron).

O homogenato foi centrifugado a 12.000 g por 30 minutos a 4°C para permitir a sedimentação das membranas, sendo o sobrenadante removido e mantido a 4°C até o momento do uso. Uma pequena alíquota (10  $\mu$ l) foi reservada para determinação da concentração proteica.

### **2.9.2 Purificação de GAD por Cromatografia de Afinidade**

A purificação de GAD foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando-se o anticorpo monoclonal GAD-1, de acordo com técnica descrita por Gottlieb *et al.* [63].

Primeiramente a IgG de líquido ascítico GAD-1, precipitada com sulfato de amônia, foi acoplada à resina de agarose Affi-Gel 10 (Bio Rad, Richmond, CA, USA), que foi colocada em colunas descartáveis de poliestireno de 1,8 x 12 cm (Isolab, Akron, OH, USA). A seguir, a coluna foi lavada e equilibrada para remoção das proteínas não covalentemente ligadas. A lavagem foi realizada com tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50mM, pH 7,2, acrescido de brometo de 2-aminoetilisotiuonium (AET) 1mM e piridoxal 5' fosfato (PLP) 20  $\mu$ M.

Os extratos de cérebro ou pâncreas (4 ml extrato/0,5 ml resina) foram então aplicados, e para permitir que estes se misturassem uniformemente à resina, a coluna foi agitada por 60 minutos a 4°C, em agitador rotatório (Roto-Torque) a 4 rpm, sendo a seguir novamente lavadas para remoção de proteínas não aderentes.

O GAD foi eluído em duas frações de 1 ml cada, com tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50mM, pH 11,0, acrescido de AET 1 mM, PLP 20  $\mu\text{M}$ , dietilamina 10 mM e glutamato de sódio 20 mM.

As frações foram neutralizadas com 0,5 ml de fosfato de sódio 500mM, pH 6,5, e tiveram seu conteúdo proteico e enzimático analisado.

A concentração proteica foi determinada utilizando-se o “kit” comercial Bio-Rad Protein Micro Assay (Richmond, CA, USA), e a atividade enzimática foi medida pela liberação de  $^{14}\text{CO}_2$  do glutamato marcado com  $\text{C}^{14}$  de acordo com a técnica de Albers & Brady [2] como previamente descrito por Miller *et al.* [104].

As frações foram mantidas a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento do uso.

## **2.10 Ensaios Imunoenzimáticos**

### **2.10.1 ELISA (Enzyme linked immunoabsorbent assay)**

Esse teste foi realizado de acordo com procedimento já publicado [48], porém com algumas modificações descritas a seguir.

Microplacas com 96 cavidades, fundo plano (Polysorp, NUNC, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas separadamente com 5 diferentes antígenos (100  $\mu\text{l}$ /cavidade), diluídos em tampão carbonato 50 mM, pH 9,6.

Foram utilizados na sensibilização: os peptídeos sintéticos GAD<sub>65</sub>, GAD<sub>67</sub> e P2-C (100µg/ml), GAD purificado de cérebro de camundongo (4 µg/ml) e GAD purificado de pâncreas de camundongo (8 µg/ml).

Após 18 horas a 4°C, as placas foram lavadas automaticamente (Immunowash Microplate Washer, Bio Rad, Richmond, CA, USA) com PBS 0,15 M, pH 7,4 (contendo Tween 20 0,05%), por 3 vezes consecutivas, deixando-se o tampão em contato com as cavidades durante pelo menos 3 minutos. O processo de lavagem repetiu-se sempre antes de cada nova etapa da reação.

A seguir, com a finalidade de se prevenirem ligações inespecíficas, as placas foram expostas a tampão bloqueador Super Block (Pierce Chemicals, Rockford, IL, USA) seguindo-se as instruções do protocolo do fabricante (200 µl/cavidade).

Após bloqueio e lavagem, foram adicionados em duplicata ou triplicata os antissoros (100µl/cavidade) diluídos em tampão PBS 0,15 M, pH 7,4, contendo EDTA 1 mM. Os antissoros utilizados foram: soros de coelho anti-GAD<sub>65</sub>, anti-GAD<sub>67</sub> e anti-P2-C, soros de camundongos infectados com CB4 E2 (1:100) e soros de pacientes diabéticos (1:500). A reação foi incubada por 3-4 horas a 37°C. As diluições dos soros de coelho anti-peptídeos estão indicadas nas Figuras 1 e 2.

Nos vários experimentos que se seguiram, cada antígeno foi analisado frente a todos os soros acima mencionados.

Na etapa seguinte, IgG de cabra anti-humano ou anti-coelho ou ainda IgG de cavalo anti-camundongo (Vector, Burlingame, CA, USA), conjugados com biotina e diluídos a 1:2.000 em PBS com Tween 20 a 0,05% foram adicionadas às placas por mais duas horas a temperatura ambiente.

A reação foi revelada com o sistema ABC (complexo avidina-biotina-peroxidase, Vector, Burlingame, CA, USA), seguindo-se as instruções do fabricante. Após a adição do substrato ( $H_2O_2$ ) (Pierce Chemicals, Rockford, IL, USA) e do cromógeno (OPD - ortofenilenodiamina) (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) esperou-se aproximadamente 10 minutos até o desenvolvimento da cor.

As reações foram interrompidas com  $H_2SO_4$  2N (50 $\mu$ l/cavidade) e as densidades óticas lidas a 490 nm em espectrofotômetro (Dynatech, Microreader II, Chantilly, VA).

Todos os testes foram repetidos 3 vezes. Os controles da reação consistiram de cavidades não recobertas com o antígeno, porém com todos os outros reagentes, assim como de cavidades recobertas com o antígeno e sem adição dos anticorpos primários, mas com os demais reagentes. Os títulos do ELISA foram corrigidos de acordo com as leituras do *background*.

O “cut off” para reatividade significativa foi definido como sendo maior do que a média aritmética dos soros controles mais duas vezes o desvio padrão.

Foram utilizados como controles o soro dos animais não infectados e o de pacientes não diabéticos.

### **2.10.2 Immunoblotting**

GAD de cérebro e pâncreas de camundongo, purificados por cromatografia de afinidade, foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5% com 0,38% de metileno bis-acrilamida, utilizando-se metodologia proposta por Laemmli [95]. As proteínas foram transferidas para a membrana de fluoreto de polivinilideno (Immobilon-P, Millipore

Corp.), segundo metodologia descrita por Towbin *et al.* [141] utilizando-se o equipamento de transferência Bio Rad Transblot Cell (Bio Rad, Richmond, CA, USA) a 100V por 45 minutos.

Completada a transferência, a membrana foi bloqueada com 0,1% de Tween 20 diluído em tampão Tris 10 mM, pH 7,5.

Para a identificação de GAD na membrana, a mesma foi colocada em um dispositivo fechado com canaletas (Immunetics Miniblotter 45, Integrated Separation Systems, Natick, MA, USA), e incubada com os antissoros: anti-GAD<sub>65</sub> (1:2), anti-GAD<sub>67</sub> (1:2), anti-P2-C (1:2), W887 (1:4.000) e GAD-6 (1:100), por duas horas a temperatura ambiente e com agitação.

A seguir a membrana foi lavada com tampão Tris 10 mM, pH 7,5, contendo Tween 20 a 0,05% e incubada com os anticorpos secundários conjugados com biotina por mais uma hora a temperatura ambiente e com agitação

Utilizamos como anticorpos secundários: IgG de cabra anti-humano, IgG de carneiro anti-coelho e IgG de cavalo anti-camundongo diluídos 1:600. Tanto os anticorpos primários como os secundários foram diluídos em tampão Tris 10 mM, pH 7,5.

A reação foi visualizada com o sistema ABC (Vector, Burlingame, CA, USA), seguindo-se as instruções do produto.

Em alguns experimentos, após a incubação com os anticorpos primários, a membrana foi incubada com a proteína G marcada com <sup>125</sup>I, por duas horas, sendo depois autoradiografada.

### 2.10.3 Immunoblotting “Direto”

Essa técnica foi denominada direta porque as etapas de separação eletroforética e transferência para a membrana foram eliminadas, uma vez que estávamos trabalhando com peptídeos sintéticos.

Primeiramente, a membrana foi imersa em metanol 100% por 30 segundos, e depois lavada com tampão PBS 0,15 M, pH 7,4, por duas vezes consecutivas, sendo de 10 minutos o tempo de duração de cada lavagem.

A seguir a membrana foi colocada no Miniblotter 45 (Integrated Separation Systems, Natic, MA, USA) e incubada com os peptídeos GAD<sub>65</sub>, GAD<sub>67</sub> e P2-C, por 18 horas à temperatura ambiente e com agitação (3 rpm). Os peptídeos utilizados na sensibilização foram diluídos a 5 mg/ml em tampão Carbonato, pH 9,6.

Após as etapas usuais de bloqueio e lavagem, que foram realizadas como já descrito anteriormente, a membrana foi transferida para o Miniblotter 30 (mesmo dispositivo acima citado, porém com canaletas mais estreitas) efetuando-se uma rotação de 90° com relação a sua posição anterior, e foi incubada com os antissoros: anti-GAD<sub>65</sub>, anti-GAD<sub>67</sub> e anti-P2-C, diluídos 1:2 em tampão Tris 10 mM, pH 7,5, por 30 minutos à temperatura ambiente. A mudança de posição da membrana assegurou com que um mesmo peptídeo pudesse reagir com mais de um antissoro.

Na etapa seguinte a membrana foi novamente lavada e incubada com IgG de cabra anti-coelho (Vector, Burlingame, CA, USA) conjugado com biotina e diluído 1:600 em tampão Tris 10 mM, pH 7,5, por 30 minutos à temperatura ambiente.



A reação foi revelada com peroxidase utilizando-se o sistema ABC conforme descrito no item 2.10.2..

## **2.11 Experimentos de Inibição da Reatividade dos Soros**

### **2.11.1 Adsorção dos Antissoros**

Em alguns experimentos, os antissoros anti-peptídios, de camundongo, e os soros humanos, foram adsorvidos com os antígenos apropriados, com o objetivo de se bloquear a reatividade desses soros, e dessa maneira se certificar da especificidade das reações obtidas no ELISA e immunoblotting.

GAD<sub>65</sub> purificado de cérebro de camundongo não infectado foi o antígeno utilizado na adsorção dos antissoros de camundongo, e dos soros humanos. Para isso, um volume de 4 ml de GAD<sub>65</sub> purificado foi concentrado no “Speed Vacuum” por 12 horas a temperatura ambiente, até redução do volume para 1 ml.

Os soros de camundongo e humanos foram então diluídos 1:50 e 1:100, respectivamente, em tampão PBS 0,15 M, pH 7,4, contendo EDTA a 1 mM. Um volume de 100 µl de cada antissoro foi adsorvido com 10 µl do antígeno concentrado. A mistura antissoro/antígeno foi então incubada a 37°C por 18 horas com agitação (4 rpm), após o que foi centrifugada a 16.000 g por 60 minutos. Os sobrenadantes foram utilizados no ELISA e Immunoblotting.

Quanto aos antissoros anti-peptídios, estes foram diluídos 1:100 em PBS 0,15 M, pH 7,4, com EDTA 1 mM, e adsorvidos com 10 µl de uma solução dos peptídios heterólogos

diluídos a 2-5 mg/ml em tampão Carbonato, pH 9,6. As etapas seguintes do procedimento de adsorção foram iguais as já anteriormente descritas para os outros antissoros.

### **2.11.2 Eluição dos Anticorpos com Glicina**

Essa técnica foi realizada segundo metodologia já conhecida [66].

Microplacas, 96 cavidades, de fundo chato (Polisorp-Nunc Roskilde-Dernmark) foram sensibilizadas com os peptídios P2-C e GAD<sub>65</sub> da mesma maneira já descrita para o ELISA (item 2.10.1). Após a sensibilização as placas foram lavadas com tampão TRIS/HCl 100 mM, pH 8,0, por 6 vezes consecutivas, e com agitação a 2 rpm (Thomas Clinical Rotator).

Os antissoros homólogos, diluídos 1:50 no tampão acima mencionado, foram então adicionados (100 µl/cavidade) às placas, e a reação foi incubada por 5 horas a 37°C.

Os anticorpos ligados foram eluídos com uma solução de glicina a 10 mM, pH 3,0 (150 µl/cavidade). O eluato foi neutralizado com tampão TRIS/HCl 100 mM, pH 8,0, e posteriormente utilizado no ELISA e Immunoblotting.

## **2.12. Análise Estatística**

O tratamento estatístico dos resultados foi realizado através do teste exato de Fisher e distribuição t de Student, utilizando-se o programa EPI INFO.

### **3. Resultados**

### 3.1 Análise das Reações entre os Peptídios Sintéticos e seus Antissoros Específicos

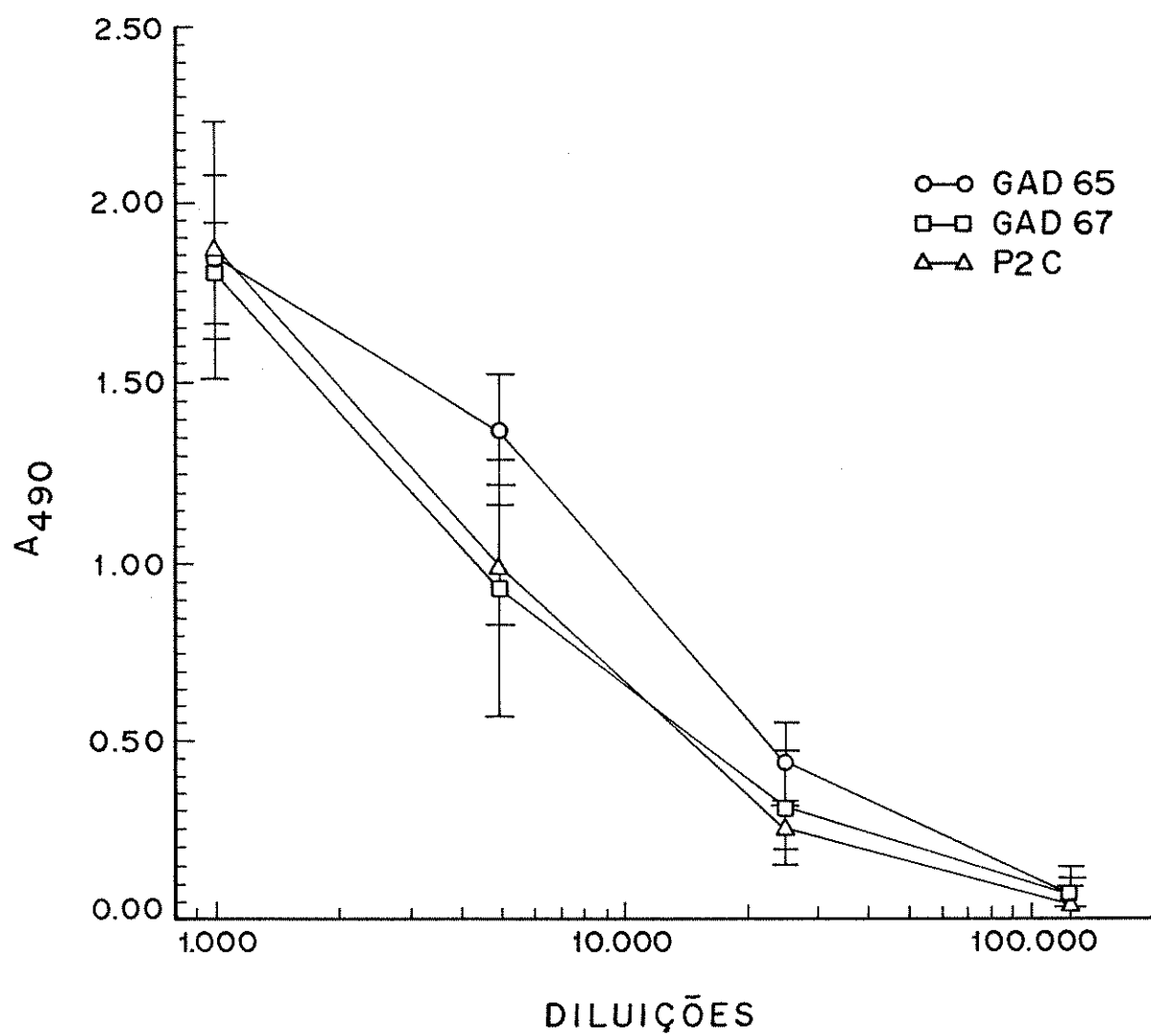
Com o objetivo de se analisar se anticorpos produzidos diretamente contra a proteína P2-C de CB4 poderiam reagir cruzadamente com GAD, isso devido à grande similaridade existente entre certas sequências de aminoácidos dessas duas proteínas, os antígenos peptídicos P2-C, GAD<sub>65</sub> e GAD<sub>67</sub> foram colocados frente a seus antissoros homólogos e heterólogos correspondentes e a reatividade destes foi determinada através do ELISA e Immunoblotting.

No ELISA, os antissoros anti-GAD<sub>65</sub>, anti-GAD<sub>67</sub> e anti-P2-C reagiram com seus peptídios homólogos apresentando absorvâncias ( $A_{490}$ ) significativas, a saber:  $0,25 \pm 0,06$  para anti-P2-C,  $0,44 \pm 0,11$  para anti-GAD<sub>65</sub> e  $0,31 \pm 0,16$  para anti-GAD<sub>67</sub>, quando diluídos a 1:25.000 (Figura 1).

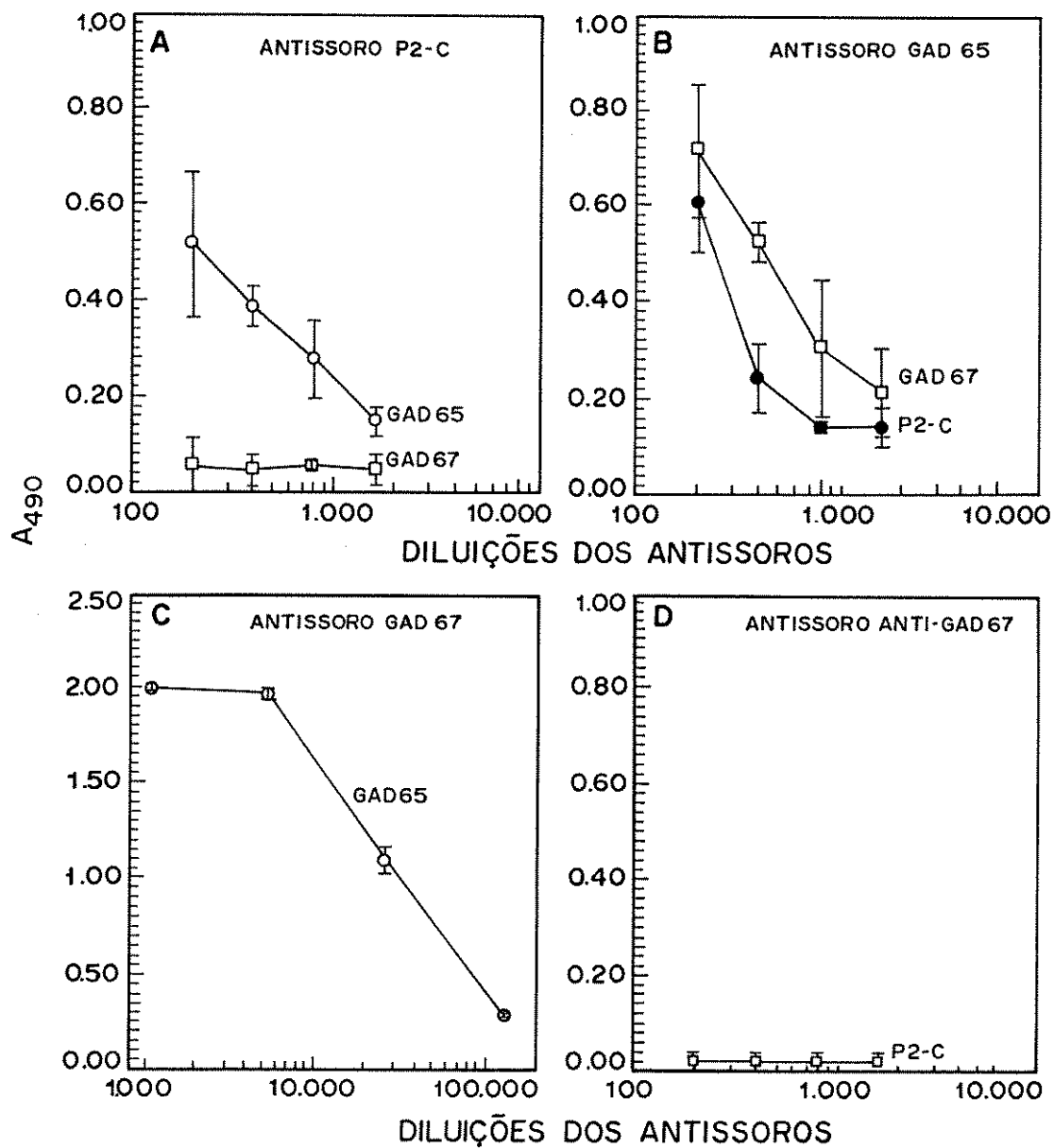
Com relação às reações heterólogas, o antissoro anti-P2-C reagiu cruzadamente com o peptídeo GAD<sub>65</sub> assim como o antissoro anti-GAD<sub>65</sub> com o peptídeo P2-C (Figuras 2A e 2B). Também o antissoro GAD<sub>65</sub> reagiu com GAD<sub>67</sub> e vice versa (Figuras 2B e 2C). Porém não detectamos reação cruzada entre o antissoro anti-P2-C e o peptídeo GAD<sub>67</sub>, ou entre o antissoro anti-GAD<sub>67</sub> e o peptídeo P2-C (Figuras 2A e 2D).

A reação cruzada entre os antígenos peptídicos e seus antissoros específicos também foi analisada através de "Immunoblotting direto" e como podemos observar na Figura 3B ocorreu formação de imunocomplexo entre o antissoro anti-P2-C e o peptídeo GAD<sub>65</sub>, assim como o inverso, porém as bandas apresentadas pelas reações homólogas foram mais intensas que as das reações heterólogas. O antissoro anti-GAD<sub>67</sub>

também reconheceu o seu antígeno correspondente assim como GAD<sub>65</sub>, mas não reagiu com o antígeno P2-C (Figura 3A).

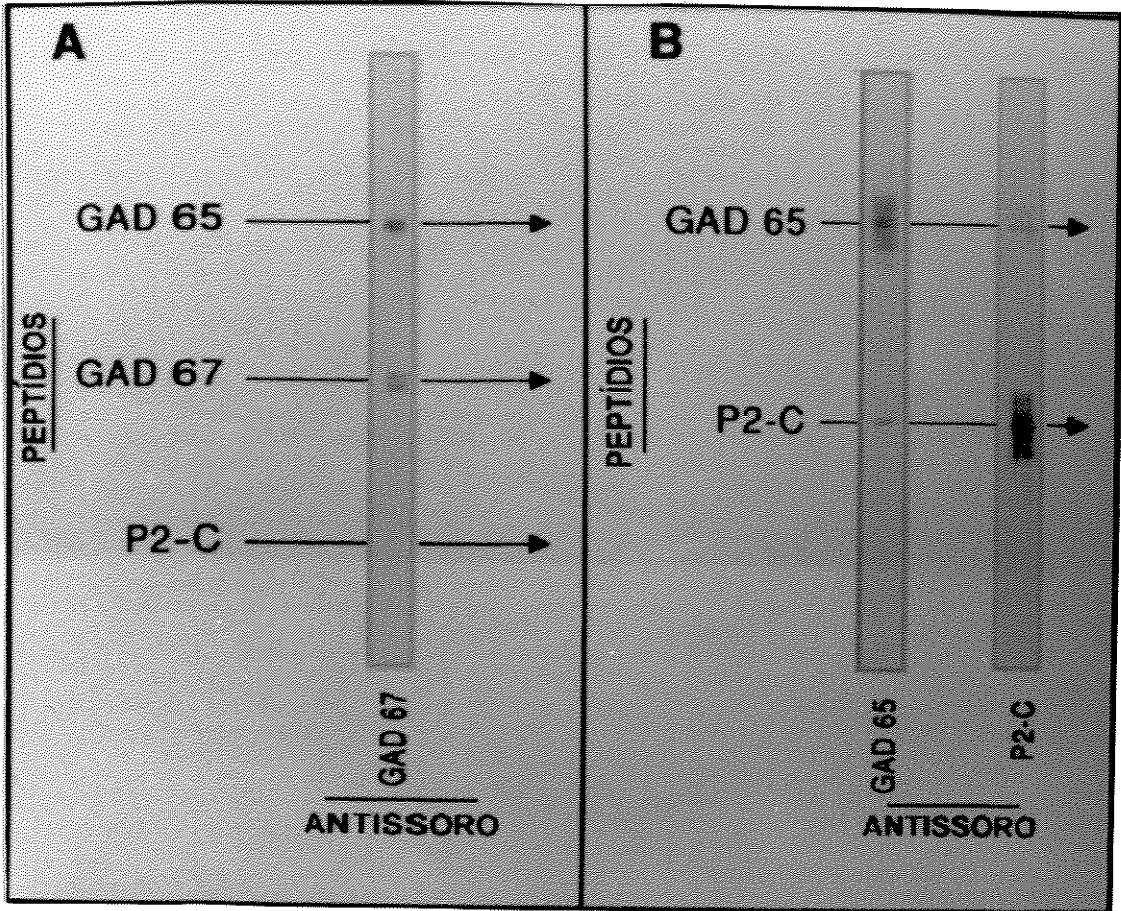


**Figura 1.** Determinação da reatividade dos antissoros anti-peptídios com os peptídios homólogos através do ELISA  
Os três peptídios foram utilizados na concentração de 100µg/ml



**Figura 2.** Determinação da reatividade dos antissoros anti-peptídios com os peptídios heterólogos através do ELISA

Os três peptídios foram utilizados na concentração de 100 $\mu$ g/ml



**Figura 3.** Reação cruzada entre os peptídios sintéticos e seus antissoros específicos. Em A, a membrana Immobilon-P foi sensibilizada com os peptídios  $GAD_{65}$  e  $GAD_{67}$  e os antissoros anti-P2-C e  $GAD_{67}$  foram utilizados na detecção desses peptídios. Em B, a membrana foi sensibilizada com  $GAD_{65}$  e P2-C, que foram detectados com os antissoros anti- $GAD_{65}$  e anti-P2-C



## 3.2 Análise das Reações entre GAD Purificado e Antissoros Anti-peptídios

A tabela 1 mostra o resultado da purificação de GAD<sub>65</sub> de extratos de cérebro e pâncreas de camundongo por cromatografia de afinidade.

A fração 1 é a que contém mais atividade enzimática tanto de GAD extraído de pâncreas como de cérebro. A atividade específica da enzima purificada de cérebro foi significativamente mais alta do que da enzima purificada de extrato de pâncreas ( $P < 0,001$ ) confirmando as observações feitas por outros autores [76, 137] em extratos brutos desses tecidos. A purificação aumentou a atividade enzimática de GAD proveniente de cérebro acima de 130 vezes e a atividade enzimática de GAD de pâncreas em aproximadamente 55 vezes, quando comparada com a atividade de GAD nos extratos brutos. Aparentemente o GAD de cérebro contém muito mais atividade enzimática do que o de pâncreas, o que pode ser ocasionado pela baixa recuperação de GAD de pâncreas (14%) contra GAD de cérebro (40%).

A imunoreatividade dos antissoros anti-peptídios também foi avaliada frente a GAD purificado das duas fontes, cérebro e pâncreas, no ELISA e no Immunoblotting.

Como estávamos trabalhando com a proteína nativa, ou seja, a molécula inteira de GAD, esta foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5% e as proteínas foram transferidas para a membrana Immobilon-P. A reação foi revelada com imunoperoxidase e com proteína G marcada com <sup>125</sup>I.

Quando utilizamos GAD purificado de cérebro de camundongo (Figuras 4A e 4B) na análise pelo immunoblot, o antissoro anti-P2-C detectou GAD<sub>65</sub>, porém não detectou GAD<sub>67</sub>, enquanto que anti GAD<sub>65</sub> e anti-GAD<sub>67</sub>, ambos detectaram GAD<sub>65</sub> e

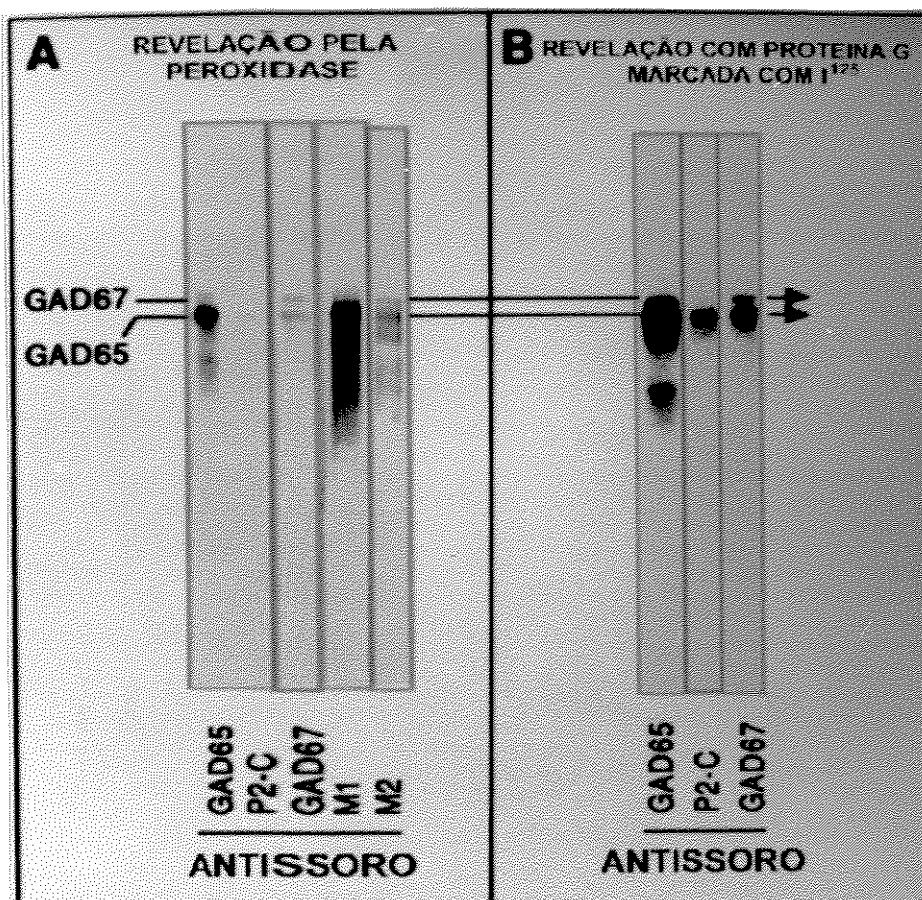
GAD<sub>67</sub>. Nas Figuras 4A e 4B podemos observar que algumas proteínas de baixo peso molecular foram detectadas, a natureza dessas bandas não está clara, sendo talvez produtos de degradação de GAD, porém sua presença não interfere com a interpretação dos resultados. Os resultados obtidos com GAD de pâncreas foram parecidos com os de cérebro (dados não mostrados).

No ELISA todos os três antissoros reagiram com GAD de ambas as fontes, porém as reações com GAD de cérebro apresentaram títulos mais altos e anti-GAD<sub>67</sub> reagiu mais fracamente, especialmente com GAD de pâncreas (Figuras 5A e 5B).

Tabela 1. Purificação de GAD de cérebro e pâncreas de camundongo por cromatografia de afinidade

Frações	Proteína Total (mg)		Atividade Específica*		Enriquecimento da Atividade Enzimática		Recuperação da Atividade Enzimática (%)	
	Cérebro	Pâncreas	Cérebro	Pâncreas	Cérebro	Pâncreas	Cérebro	Pâncreas
Sobrenadante	35.52	35.58	3.2	0.024	1	1	100	100
Fase móvel	34.0	27.76	0.85	0.016	0.26	0.67	26.9	37.5
Lavagem	1.40	0.38	15.3	0.43	4.74	17.92	18.7	49.6
Fração 1	0.083	0.11	425.7	1.35	131.8	56.25	40.5	14.1
Fração 2	0.072	0.052	16.3	0.48	5.03	20	1.3	5.8

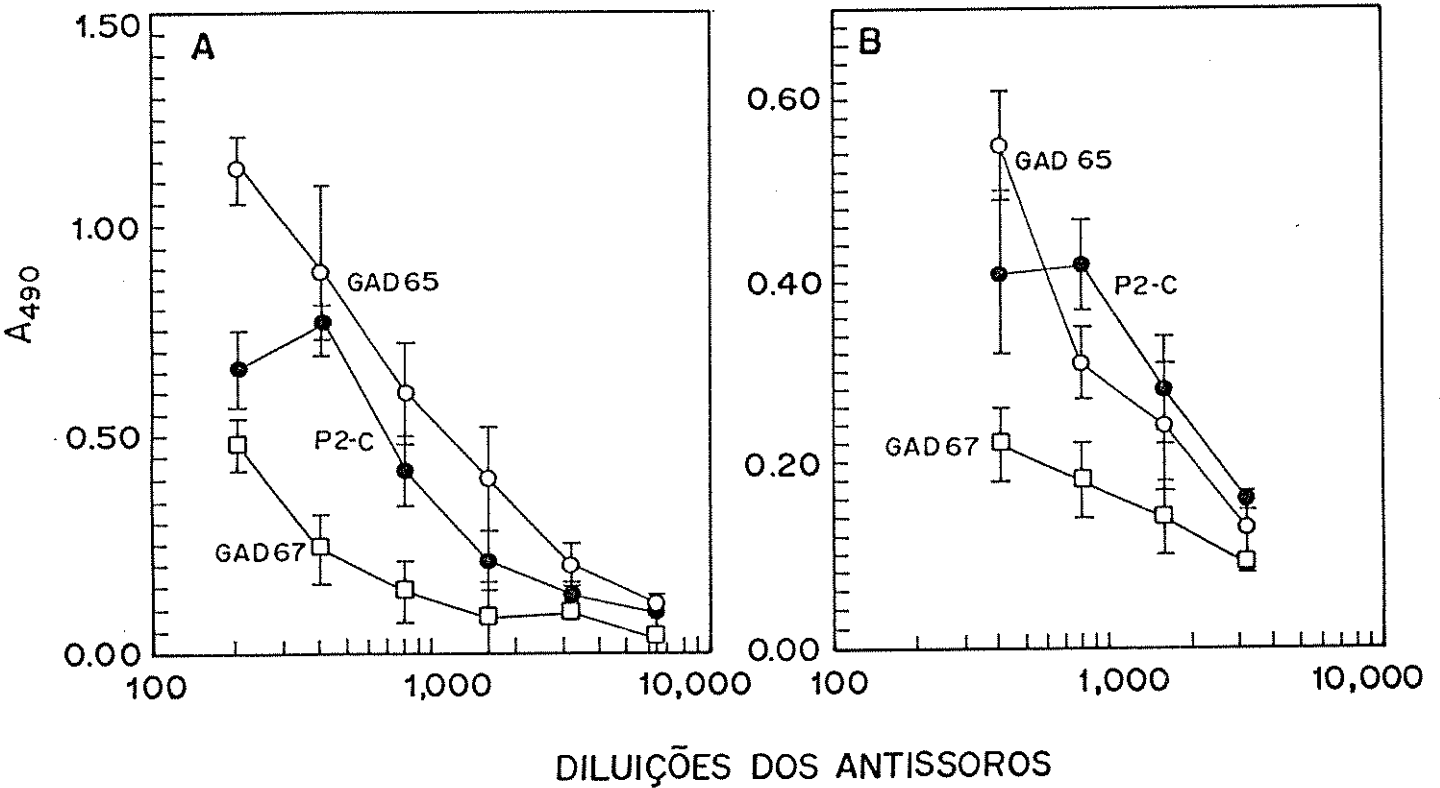
\* Atividade específica em nmol CO<sub>2</sub>/mg proteína/hora



**Figura 4.** Immunoblotting dos antissoros anti-peptídios com GAD purificado de cérebro de camundongos. GAD purificado por cromatografia de afinidade foi submetido à eletroforese em gel de poliácridamida e transferido para a membrana Immobilon-P.

Em A, a reação foi visualizada com imunoperoxidase e em B, com a proteína G marcada com I<sup>125</sup>.

O anticorpo monoclonal GAD-6 e o antissoro W887 foram designados como marcador 1(M1) e marcador 2(M2).



**Figura 5.** Determinação da reatividade dos antissoros anti-peptídeos com GAD purificado de cérebro (A) e de pâncreas (B) de camundongo através do ELISA. GADs de cérebro e pâncreas foram utilizados na concentração de 4 e 8  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente.

### **3.3. Avaliação da Especificidade das Reações Cruzadas entre Peptídios Sintéticos e seus Antissoros Específicos**

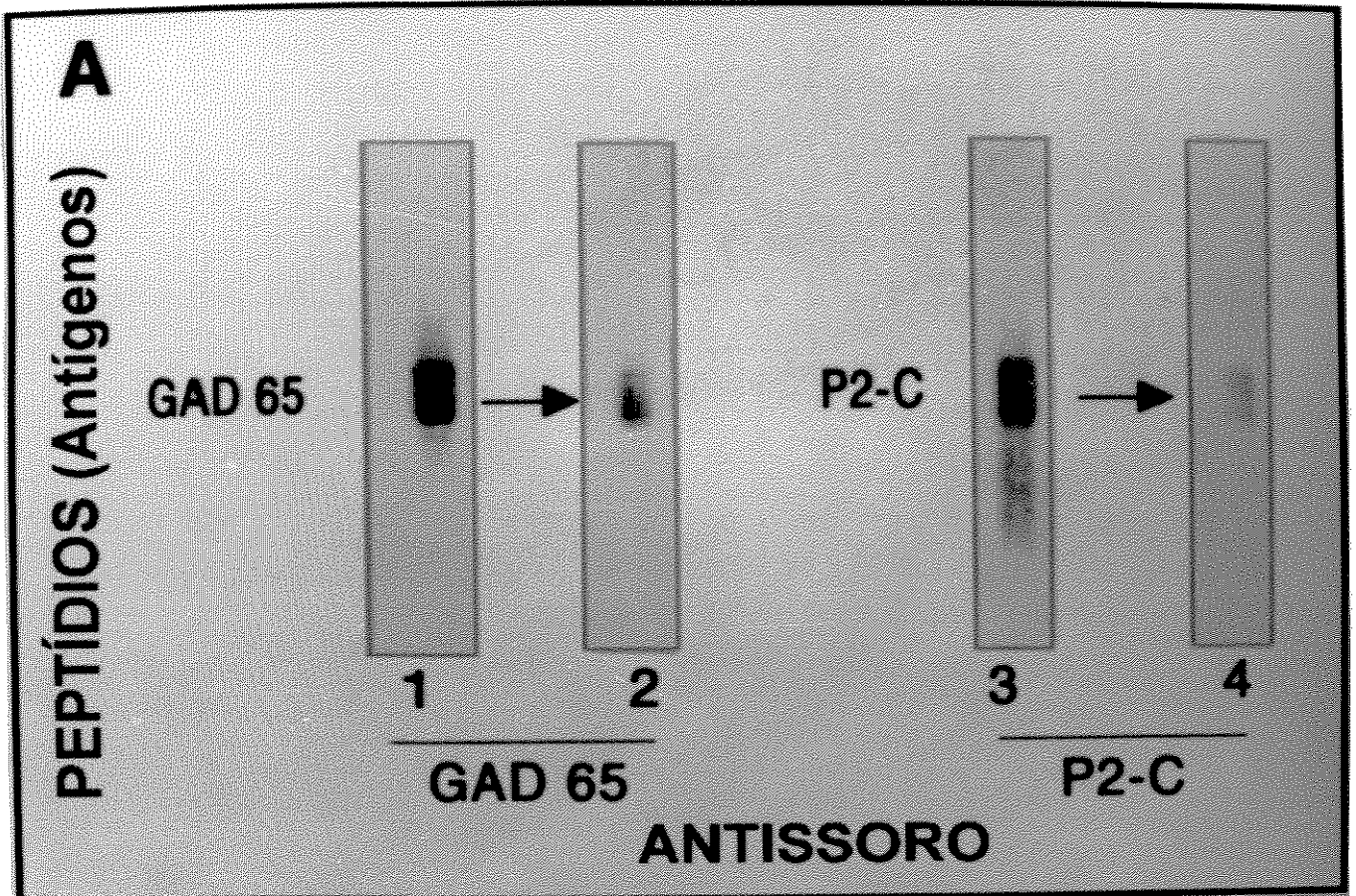
A especificidade das reações cruzadas entre os peptídios e seus antissoros específicos foi avaliada através de dois experimentos diferentes. No primeiro experimento os antissoros anti-GAD<sub>65</sub> e anti-P2-C foram adsorvidos com os peptídios heterólogos, ou sejam: P2-C e GAD<sub>65</sub>, respectivamente. Os antissoros, adsorvidos e não adsorvidos foram então colocados frente aos seus peptídios homólogos no Immunoblotting direto.

A Figura 6A mostra que uma inibição considerável da reação Ag/Ac ocorreu após a absorção dos antissoros. Nas fitas 1 e 3 temos as bandas correspondentes as reações entre os antissoros não absorvidos e seus peptídios homólogos, e nas fitas 2 e 4 as reações depois da absorção dos antissoros.

No segundo experimento, anticorpos contra os peptídios GAD<sub>65</sub> e P2-C foram eluídos de placas de microtítulo sensibilizadas com esses mesmos peptídios e então colocados frente aos seus peptídios heterólogos no ELISA e no Immunoblotting direto.

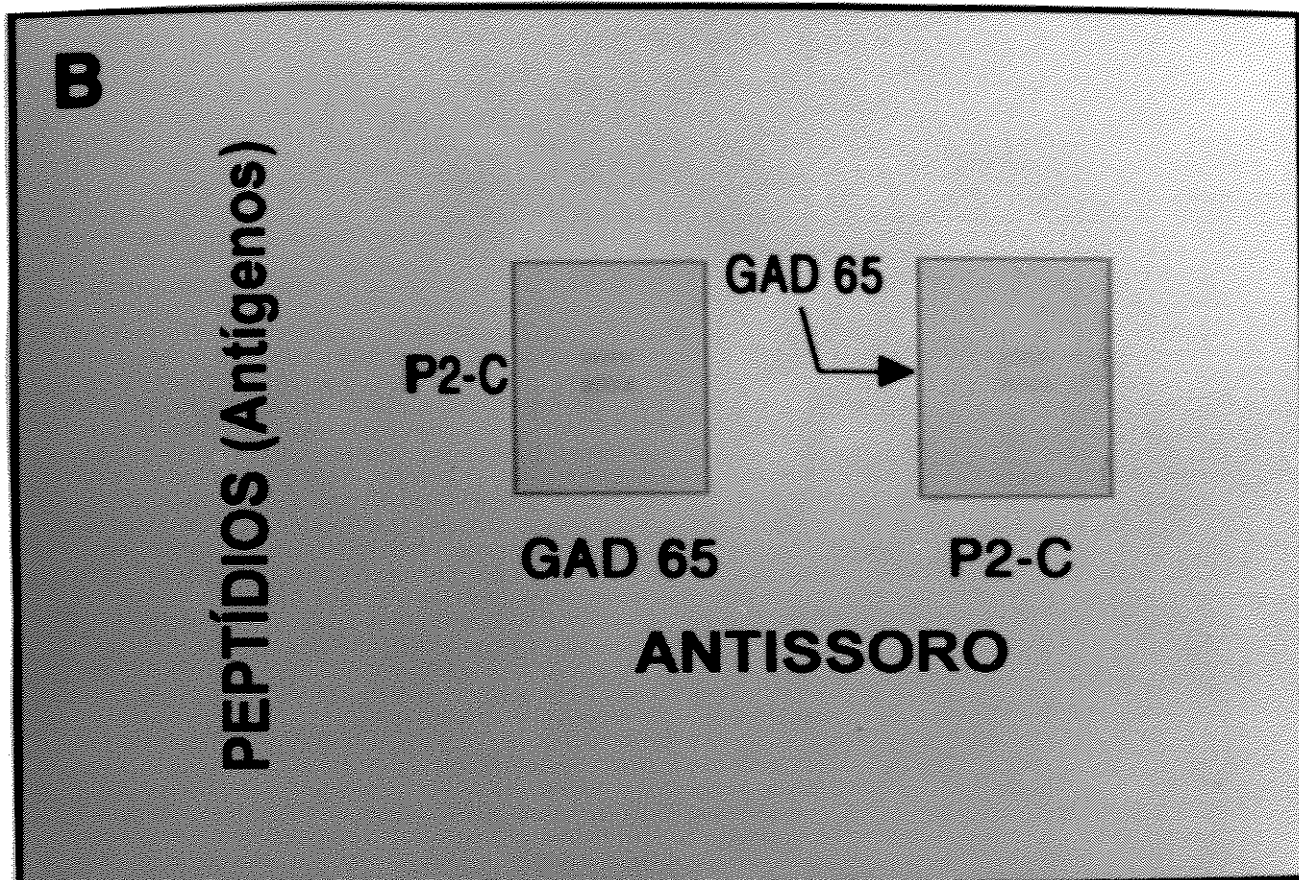
Como pode ser visto na Figura 6B, os anticorpos eluídos tanto das placas sensibilizadas com P2-C como com GAD<sub>65</sub> reagiram com seus peptídios heterólogos, porém as bandas obtidas nessas reações apresentaram-se bem mais fracas que aquelas obtidas nas reações originais (anticorpos não eluídos), especialmente à banda correspondente à reação entre anti-GAD<sub>65</sub> e o peptídio P2-C.

O ELISA comprovou esses resultados com absorbâncias ( $A_{490}$ ) de  $0,30 \pm 0,05$  para os anticorpos eluídos de GAD<sub>65</sub>, e de  $0,17 \pm 0,06$  para os eluídos de P2-C (dados não mostrados).



**Figura 6A.** Immunoblotting direto dos antissoros anti-peptídios com os peptídios homólogos. Os antissoros anti-GAD<sub>65</sub> e anti-P2-C foram adsorvidos com seus peptídios heterólogos P2-C e GAD<sub>65</sub>, respectivamente, e o sobrenadante foi utilizado no Immunoblotting frente aos peptídios homólogos.

As fitas 1 e 3 mostram as reações com os antissoros não adsorvidos, e as fitas 2 e 4 mostram as reações com os antissoros adsorvidos.



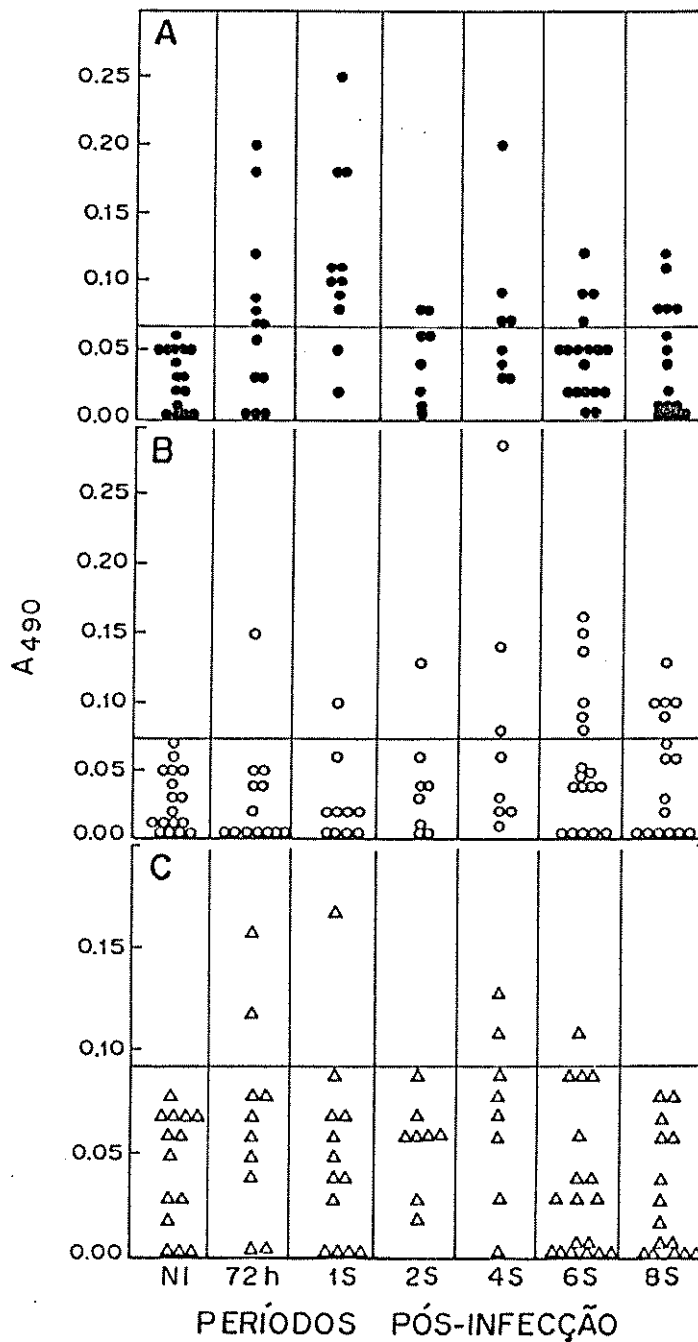
**Figura 6B.** Immunoblotting direto dos antissoros anti-peptídios com os peptídios heterólogos. Anticorpos anti-P2-C e anti-GAD<sub>65</sub> foram eluídos das placas de microtítulo sensibilizadas com os antígenos homólogos e utilizados para detectar os antígenos heterólogos em membranas sensibilizadas com esses antígenos.



### **3.4 Detecção de Anticorpos Anti-GAD e Anti P2-C nos Antissoros de Camundongos, Utilizando-se como Antígenos os Peptídios Sintéticos**

Os antissoros de camundongos de diferentes períodos após a infecção foram examinados no ELISA frente aos antígenos peptídicos P2-C, GAD<sub>65</sub> e GAD<sub>67</sub>. Na Figura 7A podemos observar que um grande número de soros coletados após 72 horas e 1 semana foram reativos à P2-C. O mesmo não ocorreu com relação à GAD<sub>65</sub>, nesse caso só foram detectados anticorpos anti-GAD<sub>65</sub> nos soros coletados tardiamente, i.e., nas 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas (Figura 7B). Quanto à GAD<sub>67</sub>, poucos soros apresentaram reatividade com 72 h e 1 semana e somente um soro foi reativo na 6<sup>a</sup> semana (Figura 7C).

Quando esses resultados foram analisados comparativamente, através de análise estatística, utilizando-se o teste exato de Fisher, verificamos que o número de soros reativos à P2-C na primeira semana é significativo quando comparado àqueles reativos à GAD<sub>65</sub> e GAD<sub>67</sub> no mesmo período. O mesmo acontece com os soros reativos à P2-C e GAD<sub>65</sub> na 8<sup>a</sup> semana quando comparados com aqueles positivos com GAD<sub>67</sub> nesse mesmo período. As demais diferenças não foram significativas.



**Figura 7.** Reatividade dos soros de camundongos não infectados (NI) e infectados com CB4 E2 aos peptídios sintéticos P2-C (A), GAD<sub>65</sub> (B) e GAD<sub>67</sub> (C). Os soros de camundongos diluídos 1:100 foram examinados no ELISA quanto à presença de anticorpos anti-P2-C, anti-GAD<sub>65</sub> e anti-GAD<sub>67</sub> utilizando-se como antígenos os peptídios sintéticos P2-C, GAD<sub>65</sub> e GAD<sub>67</sub>. Cada símbolo representa o valor em A<sub>490</sub> de um antissoro e a linha divisória entre os soros positivos e negativos representa a média aritmética dos valores de 15 soros de animais não infectados mais duas vezes o desvio padrão. Os peptídios foram utilizados na concentração de 100µg/ml.

### **3.5 Detecção de Anticorpos Anti-GAD e Anti-P2-C nos Antissoros de Camundongos, Utilizando-se como Antígeno GAD Purificado**

Nos experimentos em que utilizamos como antígenos, no ELISA, GAD purificado de cérebro (Figura 8A) e pâncreas (Figura 8B) verificamos que o aparecimento de anticorpos anti-GAD ocorre numa fase precoce da infecção (72 horas e 1ª semana) com um grande número de soros positivos, e também numa fase tardia (6ª e 8ª semanas) porém, com um número muito pequeno de antissoros positivos. Os resultados obtidos quando utilizamos GAD purificado de pâncreas foram bastante similares aos que obtivemos quando utilizamos GAD purificado proveniente de cérebro (dados não mostrados).

Quando analisados estatisticamente através do teste exato de Fisher, verificamos que as diferenças de resultados entre GAD de cérebro e GAD de pâncreas, nos diferentes estágios da infecção, não são significativas ( $P > 0,05$ ).

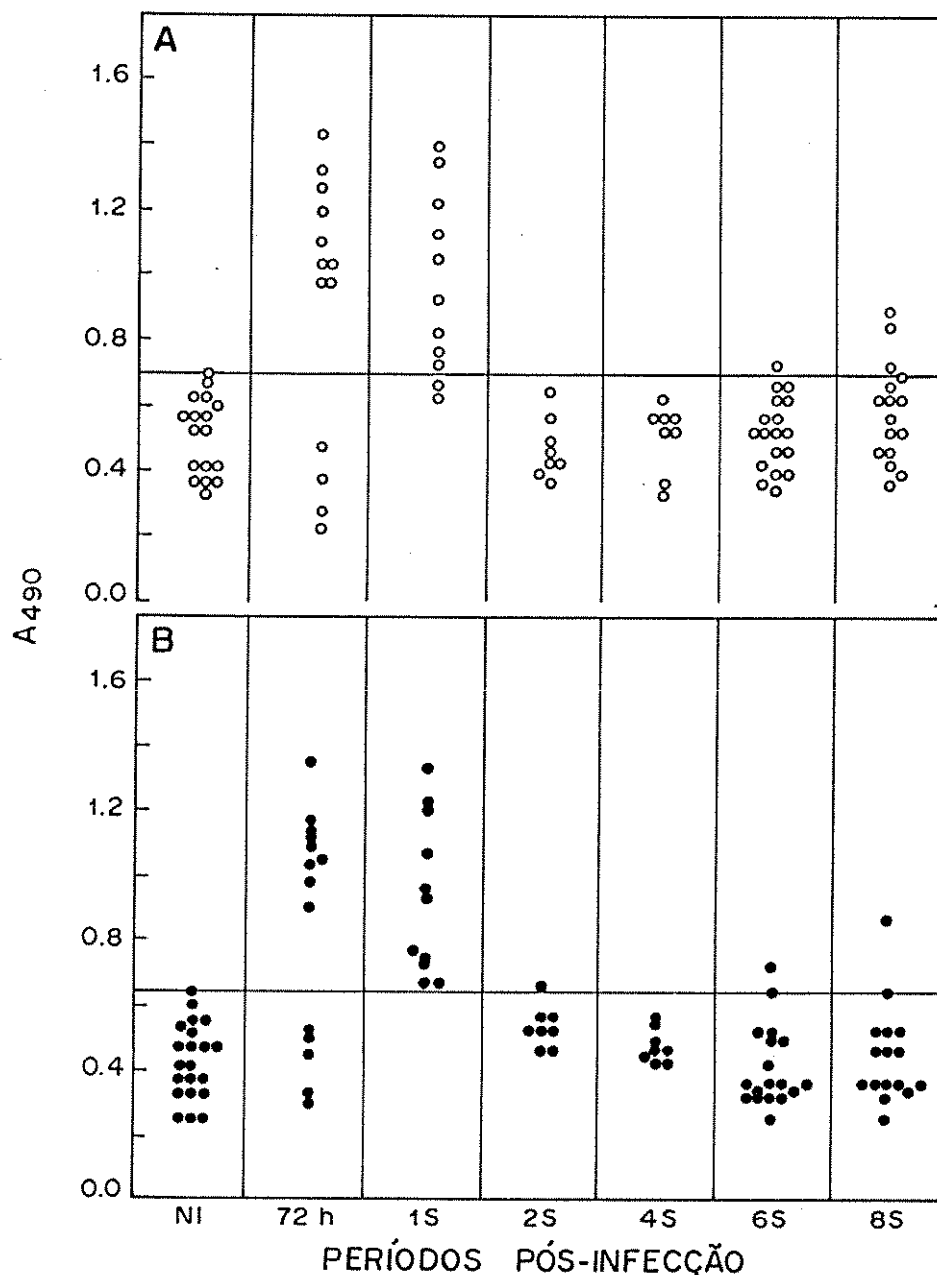


Figura 8. Reatividade dos soros de camundongos não infectados (NI) e infectados com CB4 E2 a GAD purificado de cérebro (A) e pâncreas (B) de camundongos. Os soros de camundongos diluídos 1:100 foram examinados no ELISA quanto à presença de anticorpos anti-GAD utilizando-se como antígenos GAD purificado de cérebro e de pâncreas de camundongo. Cada círculo representa o valor de A490 de um antissoro. A linha divisória entre os soros considerados positivos e negativos representa a média dos valores de 17-21 soros de camundongos não infectados mais duas vezes o desvio padrão. Os extratos de cérebro e pâncreas foram utilizados nas concentrações de 4 e 8 $\mu$ g/ml, respectivamente

### **3.6 Avaliação da Especificidade das Reações entre os os Peptídios Sintéticos e Antissoros de Camundongos**

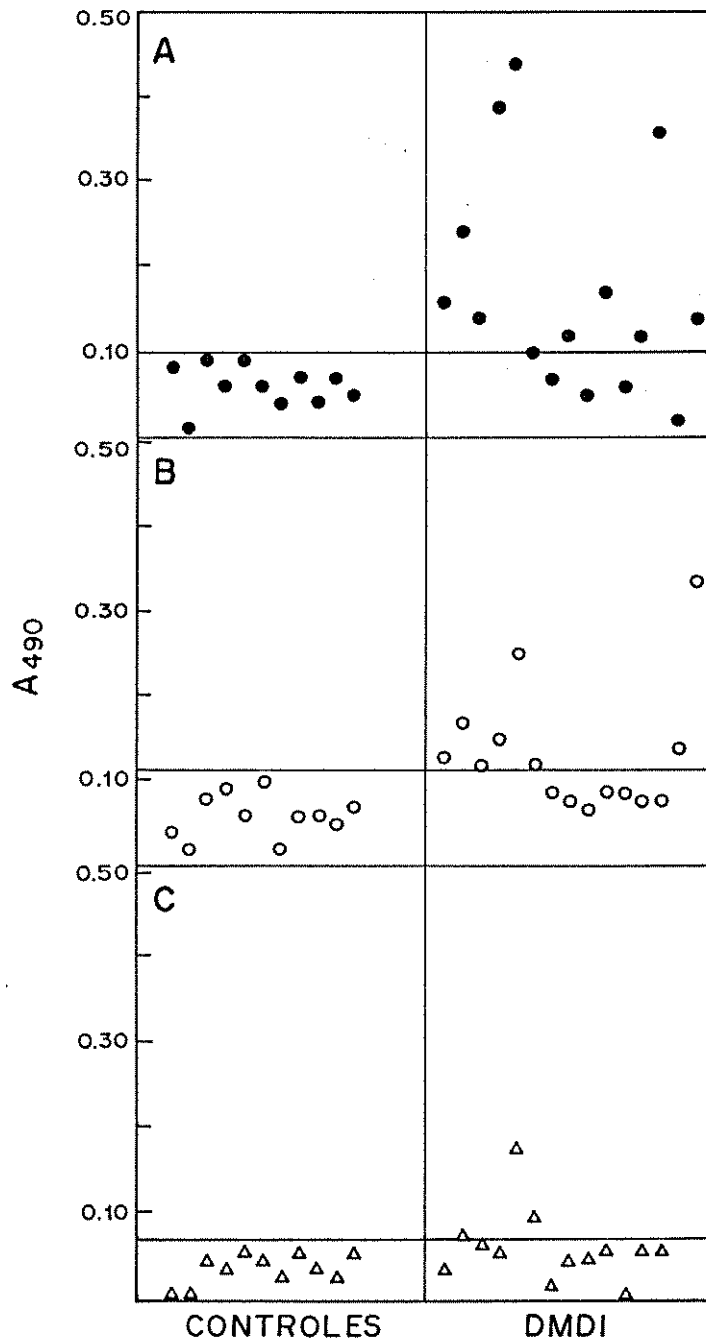
Os antissoros de camundongos infectados, positivos para P2-C e GAD<sub>65</sub> foram absorvidos com GAD<sub>65</sub> purificado de cérebro de camundongo e avaliados no ELISA frente à P2-C e GAD<sub>65</sub> para determinar se as reatividades haviam sido eficientemente bloqueadas. Verificou-se que a absorção reduziu significativamente ( $P < 0.05$  ou  $0.001$ ) em 70-90% a reatividade dos soros quando frente a P2-C e em 60-90% quando analisados frente a GAD<sub>65</sub>.

### **3.7 Detecção de Anticorpos Anti-GAD e Anti P2-C nos Soros de Pacientes**

A reatividade dos soros de pacientes diabéticos recém-diagnosticados e também dos soros de indivíduos não diabéticos aos antígenos peptídicos P2-C, GAD<sub>65</sub> e GAD<sub>67</sub> é mostrada nas Figuras 9A, 9B e 9C, respectivamente, onde podemos observar que 66% dos soros foram reativos a P2-C, 53% a GAD<sub>65</sub> e 23% a GAD<sub>67</sub>. De todos os soros que se mostraram positivos com P2-C, 80% foram os mesmos que depois se mostraram positivos com GAD<sub>65</sub>.

Os soros dos indivíduos não diabéticos não apresentaram reatividade a nenhum dos três peptídios.

Na análise estatística destes resultados, utilizando-se o teste exato de Fisher, verificamos que a diferença existente entre o número de soros reativos a P2-C e a GAD65 não é significativa.



**Figura 9.** Reatividade dos soros de pacientes diabéticos (DMDI) recém-diagnosticados aos peptídeos sintéticos P2-C (A), GAD<sub>65</sub> (B) e GAD<sub>67</sub> (C). Os soros humanos foram examinados no ELISA quanto à presença de anticorpos anti-P2-C, anti-GAD<sub>65</sub> e anti-GAD<sub>67</sub>, utilizando-se como antígenos P2-C, GAD<sub>65</sub> e GAD<sub>67</sub>. Cada círculo representa o valor em A<sub>490</sub> de um soro. A linha divisória entre os soros positivos e negativos representa a média aritmética de 11 soros de indivíduos não diabéticos (negativos para 64K e ICA) mais duas vezes o desvio padrão.

Os três peptídeos foram utilizados na concentração de 100µg/ml.

### **3.8 Avaliação da Especificidade das Reações entre os Peptídios Sintéticos e os Soros de Pacientes Diabéticos**

Os soros de pacientes diabéticos (8 amostras) que apresentaram no ELISA os resultados mais fortemente positivos frente aos antígenos GAD<sub>65</sub> e P2-C, foram adsorvidos com GAD<sub>65</sub> purificado de cérebro de camundongo. Posteriormente, esses soros adsorvidos foram examinados novamente no ELISA frente aos antígenos P2-C e GAD<sub>65</sub> e verificou-se que a reatividade dos mesmos foi reduzida de 46 a 87%, quando analisados frente a P2-C, e em 60-90% quando analisados frente a GAD<sub>65</sub> ( $P < 0.05$  ou  $0.001$ ).

Ainda na tentativa de se certificar da especificidade das reações entre os antissoros humanos e os antígenos peptídicos, foi incluído como antígeno no ELISA, além do peptídeo P2-C homólogo à GAD<sub>65</sub>, um outro P2-C não homólogo à GAD<sub>65</sub>, (ALEEKGILFTSPF), proveniente de uma região diferente da proteína viral P2-C. Nenhum dos soros de pacientes diabéticos foram reativos a esse antígeno, o mesmo acontecendo com os soros controles.



## **4. Discussão**

Duas descobertas relativamente recentes reforçam a possibilidade de que a diabetes mellitus dependente de insulina (DMDI) seja desencadeada por ação viral.

A primeira delas demonstrou que o antígeno 64-K é a enzima glutamato descarboxilase [10]. A outra, empregando tecnologia de DNA recombinante, identificou na proteína P2-C do vírus Coxsackie B4 (CB4) uma sequência de seis aminoácidos (PEVKEK) que também está presente em GAD<sub>65</sub>, uma das formas moleculares da enzima glutamato descarboxilase (GAD), sendo que essa sequência difere em um só aminoácido (PEVKTK) em GAD<sub>67</sub>, a outra forma molecular de GAD [90]

Essa similaridade entre P2-C e GAD reforça a hipótese do mimetismo molecular que é bastante atrativa, pois poderia explicar: a associação epidemiológica de CB4 com a DMDI, a detecção precoce de autoanticorpos anti-GAD no soro de indivíduos diabéticos e a razão da discordância de gêmeos idênticos para a DMDI. De acordo com esta hipótese, a proteína viral P2-C atuaria como um agente iniciador da resposta imune que reagiria cruzadamente com um antígeno próprio do hospedeiro (GAD) similar a P2-C.

Os vírus Coxsackie que causam preferencialmente infecção citolíticas também podem causar infecções persistentes [134] e o envolvimento desses vírus na DMDI se daria principalmente através desse tipo de infecção. As infecções persistentes serviriam como um estímulo contínuo para o sistema imune e uma resposta inicialmente contra P2-C poderia em indivíduos geneticamente suscetíveis (com MHC adequado) reagir com GAD na superfície das células  $\beta$ , por causa da homologia de epítomos entre as duas proteínas.

São poucos os estudos que mostram alguma evidência favorecendo a hipótese do mimetismo. Em 1988, Gerling et al. [57], trabalhando com linhagens de camundongos que são suscetíveis à diabetes induzida por vírus, mostraram pela primeira vez que a infecção por

CB4 E2 deve acionar o processo autoimune que destrói as células  $\beta$  causando nos animais uma síndrome diabética que se assemelha a DMDI no homem.

Esses autores verificaram que em camundongos infectados com CB4 E2 ocorria um aumento da expressão do autoantígeno 64-K nas ilhotas, assim como a produção subsequente de anti-64K e hiperglicemia [58], sendo que esta última parecia resultar da destruição autoimune das ilhotas, pois os camundongos infectados quando comparados aos não infectados produziam duas a três vezes mais autoantígeno e desenvolviam anticorpos anti-64K antes de se tornarem hiperglicêmicos. Esses resultados sugerem que a infecção por CB4 deve atuar como um agente iniciador da doença.

Possivelmente a “super expressão” de 64K (agora conhecido como GAD) e o desenvolvimento de anticorpos anti-64K detectados em camundongos infectados resultariam do mimetismo molecular, sendo que a proteína P2-C (que está presente em grandes quantidades nas células infectadas) provocaria uma resposta imune que reagiria cruzadamente com um epítipo similar em GAD.

Porém, antes que o mimetismo molecular possa ser considerado como um mecanismo etiológico da DMDI, é necessário que sejam detectados anticorpos e/ou linfócitos que reajam cruzadamente durante o processo autoimune.

O presente trabalho, teve como meta principal demonstrar a ocorrência de reatividade cruzada entre anticorpos anti-P2-C e anti-GAD, e embora a resposta humoral não seja a responsável direta pela destruição das células  $\beta$ , ela está associada com o processo autoimune, pois a presença dos anticorpos (que atuam como marcadores da doença) reflete a destruição destas células.

Para esse estudo foram sintetizados três peptídios de 12 e 13 aminoácidos, que continham a sequência comum entre P2-C e GAD<sub>65</sub> (PEVKEK) e também a sequência PEVKTK de GAD<sub>67</sub>.

Nos dois GADs alguns dos aminoácidos que ladeiam PEVKEK e PEVKTK, ou sejam, YKMF no NH<sub>2</sub> terminal e GMA no COOH terminal são idênticos, com exceção de um aminoácido no NH<sub>2</sub> terminal: resíduo 258 (Met em GAD<sub>65</sub>) e resíduo 266 (Tyr em GAD<sub>67</sub>). Já em P2-C, esses aminoácidos adjacentes a PEVKEK são diferentes dos de GAD<sub>65</sub>. Portanto os peptídios sintéticos correspondentes aos dois GADs compartilham onze de treze resíduos, P2-C e GAD<sub>65</sub> sete de doze resíduos e P2-C e GAD<sub>67</sub> seis de doze resíduos.

A partir dos peptídios sintéticos anticorpos foram gerados experimentalmente, e foi investigada a reatividade cruzada entre esses anticorpos de atividade específica pré-determinada e também de anticorpos naturais contra as sequências homólogas em P2-C e GAD<sub>65</sub>, assim como contra a proteína nativa GAD<sub>65</sub>.

As reações Ag/Ac foram detectadas através de ELISA e Immunoblotting, métodos esses já utilizados na detecção de anticorpos anti-GAD [41, 126].

Embora tenham sido utilizados nesse estudo peptídios lineares de 12 a 13 aminoácidos, que são reconhecidos preferencialmente por células T do que por anticorpos, não há dúvida de que a reatividade cruzada foi muito bem demonstrada pelos experimentos realizados, inclusive os antissoros anti-peptídios reagiram contra a molécula inteira de GAD, o que significa que o fragmento sintetizado se aproxima de um epítipo da proteína intata.

Tanto no ELISA como no Immunoblotting, verificou-se que existe uma forte reação cruzada entre P2-C e GAD<sub>65</sub>, assim como entre GAD<sub>65</sub> e GAD<sub>67</sub>, porém P2-C não reage com GAD<sub>67</sub>.

Esses resultados sugerem que 12 a 13 aminoácidos são necessários para induzir uma resposta imune e a ausência de reação entre GAD<sub>67</sub> e P2-C pode ser atribuída à substituição de Glu por Thr que ocorre em GAD<sub>67</sub>.

A reatividade cruzada entre os anticorpos anti-P2-C e anti-GAD<sub>65</sub> foi detectada também quando foi utilizado como antígeno a molécula inteira de GAD, purificada por cromatografia de afinidade e proveniente de duas fontes diferentes: cérebro e pâncreas de camundongo. Os resultados com ambos os GADs foram similares, embora a imunoreatividade dos soros tenha sido mais intensa com GAD de cérebro do que com GAD de pâncreas. Esse fato pode ser explicado pelos altos níveis de enzimas proteolíticas presentes no pâncreas que poderiam afetar a reatividade de GAD, além da quantidade de GAD no cérebro ser bem maior do que no pâncreas.

A detecção de pequena quantidade de GAD<sub>67</sub> nesses experimentos não foi surpreendente, porque em outros trabalhos [63, 98], em que os autores, assim como nós, utilizaram cromatografia de afinidade com o monoclonal GAD-1 para purificação de GAD, eles também detectaram no produto purificado uma maior quantidade de GAD de 59 KDa (presumivelmente GAD<sub>65</sub>) e uma menor quantidade de GAD de 63 Kda (presumivelmente GAD<sub>67</sub>).

A expressão de GAD, assim como sua atividade enzimática no cérebro, pâncreas e ilhotas pancreáticas de camundongos CD-1, antes e depois da infecção com o vírus CB4 E2 foram estudados por Hou et al [76].

Verificou-se que no cérebro de animais infectados, quando comparados aos não infectados, a expressão de GAD permanece inalterada assim como sua atividade enzimática. Nas ilhotas a expressão de GAD<sub>65</sub> é aumentada durante a infecção, porém sua atividade enzimática é reduzida, o que ocorre também no pâncreas. Os autores acreditam que a grande quantidade de GAD<sub>65</sub> produzida nas ilhotas de camundongos infectados teria participação na resposta imune a P2-C, sendo assim utilizamos na purificação de GAD cérebro e pâncreas de animais infectados.

A reatividade cruzada entre P2-C e GAD<sub>65</sub> ficou bem evidenciada através de dois experimentos principais: absorção dos antissoros e eluição dos anticorpos com glicina.

Os resultados desses experimentos demonstraram que não são subpopulações diferentes no “pool” policlonal que distintamente reconhecem P2-C e GAD<sub>65</sub>, mas são os mesmos anticorpos que reconhecem as duas proteínas.

Com o propósito de aprofundar essa pesquisa, resolveu-se investigar a reatividade dos soros de pacientes recém-diabéticos e do soro de camundongos infectados com CB4 E2 aos peptídios P2-C e GAD<sub>65</sub>.

Embora anticorpos anti-GAD<sub>65</sub> e anti-GAD<sub>67</sub> tenham sido detectados no soro de pacientes DMDI recém-diagnosticados [64, 126, 144], pouco sabíamos sobre a sua ocorrência em camundongos com diabetes induzida por vírus sendo que alguns resultados sobre esse modelo experimental vieram dos trabalhos de Gerling et al. [58].

Então a detecção de poucos soros GAD<sub>65</sub> positivos nas últimas semanas após a infecção foi inesperada, pois esses autores anteriormente detectaram anticorpos anti-64K em aproximadamente 90% dos camundongos infectados na 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semanas.

Uma possível explicação para o fato de detectarmos uma baixa resposta anti-GAD nos soros da 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas é que esses animais devem conter duas populações de anticorpos anti-64K, uma que é reativa a GAD<sub>65</sub> e outra reativa à proteína 64K que não é relacionada com GAD.

De acordo com Christie et al. [35] o soro de pacientes diabéticos possui dois tipos de anticorpos com especificidades distintas para a proteína de 64-kD. Existem no soro desses pacientes anticorpos que reconhecem fragmentos de 50-kD e outros que reconhecem os fragmentos de 40 e 37-kD do antígeno. O fragmento de 50-kD parece ser derivado de GAD<sub>65</sub> enquanto que os de 37 e 40-kD parecem ser originários de uma proteína diferente da que gerou o fragmento 50-kD, hoje reconhecidos como proteínas relacionadas a tirosina fosfatase [70].

Nós não temos uma explicação para o fato de detectarmos uma resposta elevada de anticorpos anti-P2-C 3 a 7 dias após a infecção e não detectarmos uma resposta equivalente para GAD<sub>65</sub> no mesmo período, embora a resposta anti-GAD apareça mais tarde, nas 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas. Se os dois anticorpos apresentam reatividade cruzada nós deveríamos esperar um padrão de resposta idêntico para os dois peptídios (P2-C e GAD<sub>65</sub>).

O que nos leva a crer que realmente a reação cruzada aconteceu é o fato de que quando os soros de camundongos positivos para P2-C tiveram a sua reatividade, frente a esse antígeno, grandemente reduzida após adsorção com GAD<sub>65</sub> purificado.

Também alguns animais cujos soros foram analisados com 72 horas e 1 semana quando sangrados posteriormente (na 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas) apresentaram-se positivos para GAD<sub>65</sub>.

No que diz respeito ao soro de pacientes diabéticos recém-diagnosticados, embora tenhamos analisado um pequeno número de amostras, 15 ao todo, a maioria deles foi reativa à P2-C e a GAD<sub>65</sub> e uns poucos a GAD<sub>67</sub>, sendo que os mesmos soros que mostraram-se positivos com P2-C também foram reativos à GAD<sub>65</sub>, com exceção de dois.

Apenas um número muito pequeno de soros humanos detectou GAD<sub>67</sub>, mas inúmeros trabalhos relatam a presença de anticorpos apenas contra GAD<sub>65</sub> em soros de pacientes diabéticos [65, 126, 144].

Uma das evidências de que esses soros humanos possuem anticorpos que reagem cruzadamente com P2-C e GAD<sub>65</sub> é que nenhum deles reagiu quando foi utilizado como antígeno um peptídeo de uma região diferente de P2-C, não homóloga a GAD.

A segunda e maior evidência, foi a queda da reatividade dos soros humanos positivos a P2-C e GAD<sub>65</sub>, quando estes foram absorvidos com GAD<sub>65</sub> purificado de cérebro de camundongo.

Embora estudos soroepidemiológicos relatem a presença de anticorpos anti-CB em aproximadamente 30% dos indivíduos não diabéticos [15], nenhum dos soros controles foi capaz de detectar a proteína P2-C, e talvez isso tenha ocorrido por causa do pequeno número de amostras controle utilizadas no experimento

A elucidação do mecanismo ou mecanismos através dos quais os vírus poderiam levar a DMDI não é tarefa fácil e alguns autores não são favoráveis à hipótese do mimetismo molecular, mas também não descartam essa possibilidade [119].

Os resultados aqui apresentados mostram evidências que respondem pelo menos parcialmente a nossa questão inicial sobre se o mimetismo molecular desempenha ou não um papel na patogênese da DMDI. E embora o nosso trabalho tenha investigado somente a



resposta humoral, outros autores trabalhando com a resposta celular na DMDI têm encontrado resultados que reforçam nossos achado [46, 75, 90, 96, 121, 138].

Especialmente dois trabalhos apresentam resultados notáveis e que são consistentes com os nossos. Em um deles [4], os autores foram capazes de detectar uma resposta celular à região de similaridade existente entre P2-C e GAD, utilizando peptídios sintéticos e células mononucleares de pacientes com DMDI. No outro, Tian et al. inocularam peptídios sintéticos correspondentes as regiões de similaridade entre GAD e P2-C em camundongos NOD, e verificaram que as células T de camundongos inoculados inicialmente com P2-C proliferavam quando estimuladas por GAD e vice-versa, mostrando que os 2 peptídios induziram resposta cruzada das células T.

Em outro trabalho bastante recente [84] a resposta proliferativa de células de indivíduos com DMDI foi analisada frente a treze vírus diferentes, verificando-se que diferenças significativas das respostas positivas ocorriam somente para vírus Coxsackie do grupo B e adenovírus, sendo que dos 13 vírus estudados apenas CB exibiu homologia de sequência com GAD na região PEVKEK [84].

É também de 1995 um estudo prospectivo com mulheres grávidas e crianças com DMDI recém diagnosticada, sugerindo que exposição à infecção por enterovírus, em útero ou na infância são capazes de induzir à destruição das células  $\beta$  e levar à diabetes clínica. Todos esses estudos conjuntamente com nossos resultados sugerem fortemente que o mimetismo molecular deve desempenhar um papel na patogênese da DMDI.

## **5. Conclusões**

Com os resultados que foram obtidos por esse trabalho e levando-se em conta os objetivos propostos, conclui-se que:

1. P2-C reagiu cruzadamente com GAD<sub>65</sub>, mas não com GAD<sub>67</sub>.
2. P2-C e GAD<sub>65</sub> parecem atuar como epítomos principais, e GAD<sub>67</sub> como um epítomo secundário na DMDI.
3. Foi detectada reatividade cruzada, ainda que com poucas amostras, no soro de camundongos infectados com CB4 E2, o modelo experimental de DMDI utilizado nesse trabalho.
4. Foi detectada reatividade cruzada no soro de pacientes diabéticos, embora o número de amostras deva ser ampliado para conclusões mais definitivas.
5. Os experimentos de inibição da reatividade dos soros deixaram bem claro a existência da reação cruzada entre P2-C e GAD.
6. O mimetismo molecular deve desempenhar um papel na patogênese da DMDI.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Ahmad N, Abraham AA: Pancreatic isleitis with Coxsackie virus B5 infection. *Hum Path* 13: 661-662, 1982.
2. Albers WR, Brady RO: The distribution of glutamic decarboxylase in the nervous system of the Rhesus monkey. *J Biol Chem* 234: 926-928, 1959.
3. Asplin CM, Cooney MK, Crossley JR, Dornan TL, Raghu P, Palmer JP: Coxsackie B4 infection and islet cell antibodies three years before overt diabetes. *J Pediatr* 101: 398-400, 1982.
4. Atkinson MA, MacLaren NK: What causes diabetes? *Scientific American*, pp. 66-71, 1990.
5. Atkinson MA, MacLaren NK, Sharp DW, Lacy PE, Riley WJ: 64,000 Mr autoantibodies as predictors of insulin dependent diabetes. *Lancet* 335: 1357-1360, 1990
6. Atkinson MA, MacLaren NK: Islet cell autoantigens in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 92: 1608-1616, 1993.

---

As referências bibliográficas seguiram o padrão do periódico *Diabetes* Editado pela American Diabetes Association.

7. Atkinson MA, Bowman AM, Campbell L, Darrow BL, Kaufman DL, MacLaren NK: Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and Coxsackie virus in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 94: 2125-2129, 1994
8. Baekkeskov S, Nielsen JH, Marnier B, Bilde T, Ludvigsson J, Lernmark Å. Auto antibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature* 298: 167-169, 1982.
9. Baekkeskov S, Landin M, Kristensen J, Srikanta S, Bruning GJ, Mandrup-Poulsen T, de Beaufort C, Soeldnerk , Eisenbarth G, Lindgren F, Sandquist G, Lernmark Å: Antibodies to a Mr 64,000 human islet cell antigen precede the clinical onset of insulin dependent diabetes. *J Clin Invest* 70: 926-934, 1987.
10. 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* 347: 151-156, 1990.
11. Banatvala JE, Schernthaner G, Schober E et al.: Coxsackie B, mumps, rubella and cytomegalovirus specific IgM responses in patients with juvenile-onset insulin dependent diabetes mellitus in Britain, Austria and Australia. *Lancet* I: 1409-1412, 1985.
12. Banatvala, JE: Insulin dependent (juvenile onset, type 1) diabetes mellitus. Coxsackie B viruses revisited. *Progr Med Vir* 34: 33-54, 1987
13. Barboni E, Mannocho I, Asdurbali G: Observations on diabetes mellitus associated with experimental foot and mouth disease in cattle. *Vet Tid* 17: 362-368, 1966.

14. Barnett AH, Eff C, Leslie RDG, Pyke DA: Diabetes in identical twins: a study of 200 pairs. *Diabetologia* 20: 87-93, 1981.
15. Barrett-Connor E: Is insulin - dependent diabetes mellitus caused by Coxsackievirus B infection? A Review of the Epidemiologic Evidence. *Rev Infect Dis* 7 (2): 207-215, 1985.
16. Bartsocas CS, Lab M, Spyrou N, Krikelis N, Serié C, Papadatos CJ: Are viral studies indicated in juvenile-onset diabetes ? *Pediatr und Pädol* 17: 603-606, 1982.
17. Baum JD, Aynsley-Green A, Mac Callum FO: Coxsackie viruses and diabetes mellitus (letter). *Br Med* 3: 172, 1974.
18. Bendelac AC, Carnaud C, Boitard C, Bach JF: Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates: requirements for both L<sub>3</sub>T<sub>4</sub> and LyT<sub>2</sub> + T cells. *J Exp Med* 166: 823-32, 1987.
19. Birk OS, Cohen IR: T-cell autoimmunity in type 1 diabetes mellitus. *Curr Op Immunol* 5: 903-909, 1993.
20. Bocharov EV, Shalaurova BV: Persistence of Coxsackie B1 virus in BALB/c mice. *Acta Virol* 28: 345, 1984.
21. Borch-Johnsen, K, Joner, G, Mandrup-Poulsen et al. Relation between breast-feeding and incidence rates of insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* ii: 1083-1086, 1984.
22. Botazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D: Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiency. *Lancet* II: 1279-1283, 1974.

23. Botazzo GF, Dean BM, Mc Nally JM, Mackay EH: Direct evidence of various immunological phenomena associated with the "insulinitis" process. *Diabetologia* 25: 142 (Abstr.), 1983.
24. Botazzo GF, Genovese S, Bosi E, Dean BM, Christie MR, Bonifacio E: Novel considerations on the antibody/autoantigen system in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Ann Med* 23: 453-461, 1991.
25. Bowles NE, Richardson PJ, Olsen EGJ, Archard LC: Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Lancet* I: 1120-1123, 1986.
26. Burch GE, Tssui C-Y, Harb JM, Colcolough HL: Pathologic findings in the pancreas of mice infected with Coxsackie virus B4. *Arch Intern Med* 128: 40, 1971.
27. Castaño R, Eisenbarth GS: Type-I diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse and rat. *Ann Rev Immunol* 8: 647-679, 1990.
28. Champsaur H, Dussaix E, Samolyk D, Fabre M, Bach C, Assan R: Diabetes and Coxsackie virus B5 infection. *Lancet* I: 251, 1980.
29. Chang Y-C, Gottlieb DI: Characterization of the proteins purified with monoclonal antibodies to glutamic acid decarboxylase. *J Neurosci* 8: 2123-2130, 1988.
30. Chatterjee NK, Tuchowski C: Comparison of capsid polypeptides of group B Coxsackie-viruses and polypeptide synthesis in infected cells. *Arch Virol* 70: 155-269, 1981.



31. Chatterjee NK, Haley TM, Nejman C: Functional alterations in pancreatic  $\beta$  cells as a factor in virus-induced hyperglycemia. *J Biol Chem* 260: 12786-12791, 1986.
32. Chatterjee NK, Nejman C. Insulin m RNA content in pancreatic  $\beta$  cells of Coxsackievirus B4-induced diabetic mice. *Mol Cel Endocrinol* 55: 193-202, 1988.
33. Chatterjee NK, Nejman C, Gerling I: Purification and characterization of a strain of coxsackievirus B4 of human origin that induces diabetes in mice. *J Med Virol* 26: 57-69 1988.
34. Christgau S, Schierbeck H, Aanstoot H.J, Aagaard L, Begley K, Kofod H, Hejnaes K, Baekkeskov S: Pancreatic beta cells express two auto antigenic forms of glutamic acid decarboxylase, a 65-KDa hydrophilic and a 64-KDa amphiphilic from wich can be both membrane-bound and soluble. *J Biol Chem* 266: 21257-21264, 1991.
35. Christie MR, Hollands JA, Brown TJ, Michelsen BK, Delovitch TR: Detection of pancreatic islet 64,000 Mr autoantigens in insulin-dependent diabetes distinct from glutamate decarboxylase. *J Clin Invest* 92: 240-248, 1993
36. Clements GB, Galbraith DN, Taylor KW: Coxsackie B virus infection and onset of childhood diabetes. *Lancet* 346 (8969): 221-223, 1995.
37. Coleman TJ, Taylor KW, Gamble DR: The development of diabetes following Coxsackie B virus infection in mice. *Diabetologia* 10: 755-759, 1974.
38. Craighead JE, Mc Lane MF: Diabetes mellitus: induction in mice by encephalomyocarditis virus. *Science* 162: 913-914, 1968.

39. Cudworth AG, Gamble DR, White GBB, Lendrum R, Woodrow JC, Bloom A: Aetiology of juvenile-onset diabetes. A prospective study. *Lancet* 1: 385-388, 1977.
40. Damian RT: Molecular mimicry: antigen sharing by parasite and host and its consequences. *Am Naturalist* 98: 129-149, 1964.
41. De Aizpurua HJ, Harrison LC, Crom DS: An ELISA for antibodies to recombinant glutamic acid decarboxylase in IDDM. *Diabetes* 41: 1182-1187, 1992.
42. Dean BM, Becker F, Mc Nally JM, Tarn AC, Schwartz G, Gale EAM, Botazzo GF: Insulin autoantibodies in the prediabetic period: correlation with islet cell antibodies and development of diabetes. *Diabetologia* 29: 339-342, 1986.
43. Diabetes Epidemiology Research International Group. Preventing insulin-dependent diabetes mellitus: the environmental challenge. *BMJ* 295: 479-481, 1987.
44. Diabetes Epidemiology Research International Group. Secular trends in the incidence of childhood IDDM in 10 countries. *Diabetes* 39: 858-864, 1990.
45. Dippe SE, Bennett PH, Miller M, Maynard JE, Berquist KR: Lack of causal association between Coxsackie B4 virus infection and diabetes, *Lancet* 1: 1314, 1975.
46. Durinovic-Bello, I; Hummel, M and Ziegler, AG: Cellular immune response to diverse islet cell antigens in IDDM. *Diabetes*. 45: 795-800, 1996.
47. Elliot RB, Martin JM: Dietary protein: a trigger of insulin-dependent diabetes in the BB rat? *Diabetologia* 26: 297-299, 1984.

48. Engvall E, Perlman P: Enzyme-linked immuno assay, ELISA III: quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* 109-135, 1972.
49. Erlander MG, Tillakaratne NJK, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ: Two genes encode distinct glutamate decarboxylase with different responses to pyridoxal phosphate. *Neuron* 7: 91-100, 1991.
50. Erlander MG, Tobin AJ: The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase. A Review. *Neurochemical Research* 16(3): 215-226, 1991.
51. Frisk G, Nilsson E, Tuvemo T, Friman G, Diderholm H: The possible role of coxsackie A and echo virus in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus studied by IgM analysis. *J Infect* 24: 13-22, 1992.
52. Fujinami RS, Oldstone MBA: Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 230: 1043-1045.
53. Gamble DR, Kinsley ML, Fitzgerald MG, Bolton R, Taylor KW: Viral antibodies in diabetes mellitus. *BMJ* 3: 627-630, 1969.
54. Gamble DR, Taylor KW: Seasonal incidence of diabetes mellitus. *BMJ* 3: 631-633, 1969.
55. Gamble DR: Relation of antecedent illness to development of diabetes in children. *Br Med J* 1980; 2: 99-101.

56. Gepts W: Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 14(10): 619-633, 1965.
57. Gerling I, Nezman C, Chatterjee NK: Effect of Coxsackievirus B4 infection in mice on expression of 64,000 - Mr autoantigen and glucose sensitivity of islet before development of hyperglycemia. *Diabetes* 37: 1419-1425, 1988.
58. Gerling I, Chaterjee NK, Nezman C: Coxsackievirus B4-induced development of antibodies to 64,000 Mr islet autoantigen and hiperglycemia in mice. *Autoimmunity* 10: 49-56, 1991.
59. Ginsberg-Fellner F, Witt ME, Yagihashi S: Congenital rubella syndrome as a model for type I (insulin-dependent) diabetes mellitus: Increased prevalence of islet cell surface antibodies. *Diabetologia*. 27: 87-89, 1984.
60. Ginsberg-Fellner F, Witt ME, Fedeen B: Diabetes mellitus and autoimmunity in patients with congenital rubella syndrome. *Rev. Infect. Dis.* 1985, 7 (Suppl. 1) 5170-5175, 1985.
61. Gladisch R, Hofmann W, Waldherr R: Miocarditis and insulitis in Coxsackie virus infection. *Z Kardiol* 65: 873-881, 1976.
62. Goldstein DE, Drash A, Gibbs J, Blizzard RM: Diabetes mellitus: the incidence of circulating antibodies against thyroid, gastric and adrenal tissue. *J Pediat* 77: 304-306, 1970.
63. Gottlieb DI, Chang Y-C, Schwob JE: Monoclonal antibodies to glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 8808-8812, 1986.

64. Hagopian WA, Karlsen AE, Gotsäter A, Landin-Olsson M, Grubin CE, Sundkrist G, Petersen JS, Boel E, Dyrberg T, Lernmark Å: Quantitative assay using recombinant human islet glutamic acid decarboxylase (GAD<sub>65</sub>) shows that 64K autoantibody positivity at onset predicts diabetes type. *J Clin Invest* 91: 368-374, 1993.
65. Hagopian WA, Michelsen B, Karlsen AE, Larsen F, Moody A, Grubin CE, Rowe R, Petersen J, Mc Evoy R, Lernmark Å: Autoantibodies in IDDM primarily recognize the 65,000-Mr rather than the 67,000-Mr isoform of glutamic acid decarboxylase. *Diabetes* 42: 631-636, 1993.
66. Harlow E, Lane D: *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Laboratory, 1988.
67. Harris HF: A case of diabetes mellitus quickly following mumps. *Boston Med Surg J* CXL: 465-69, 1899.
68. Harrison AK, Bauer SP, Murphy FA: Viral pancreatitis: ultrastructural pathological effects of Coxsackie virus B3 infection in newborn mouse pancreas. *Exp Mol Pathol* 17: 206, 1972.
69. Hartig PC, Madge GE, Webb SR: Diversity within a human isolate of Coxsackie B4: Relationship to viral induced diabetes. *J Med Virol* 11: 23-30, 1983.
70. Hawkes JC, Wasmeier C, Christie MR and Hutton JC: Identification of the 37-KDa antigen in IDDM as a tyrosine phosphatase-like protein (phogrin) related to IA-2. *Diabetes*. 45: 1187-1192, 1996.
71. Helgason T, Jonasson MR: Evidence for a food additive as a cause of ketoses-prone diabetes. *Lancet* ii: 716-720, 1981.

72. Helgason T, Ewen SWB, Ross IS, Stowers JM: Diabetes produced in mice by smoked/cured mutton. *Lancet* ii: 1017-1022, 1982.
73. Helmke K, Otten A, Willems W: Islet cell antibodies in children with mumps infection. *Lancet*, 11:211-2, 1980
74. Hierholzer JC, Farris WA: Follow up of children infected in a Coxsackievirus B-3 and B-4 outbreak: no evidence of diabetes mellitus. *J Infect Dis* 129: 741, 1974.
75. Honeyman MC, Crom DS, Harrison LC: Glutamic acid decarboxylase 67-reactive T cells: a marker of insulin-dependent diabetes. *J Exp Med* 177: 535-540, 1993.
76. Hou J, Sheikh S, Martin DL, Chatterjee NK: Coxsackie virus B4 alters pancreatic glutamate decarboxylase expression in mice soon after infection. *J Autoimmun* 6:529-542, 1993.
77. Huff JC, Hierholzer JC, Farris WA: An "outbreak" of juvenile diabetes mellitus. Consideration of a viral etiology. *Am J Epidemiol* 100: 277, 1974.
78. Hyöty H, Hiltunen M, Knip M, Laakkonen M, Vähäsalo P, Karjalainen J, Koskela P, Roivainen M, Leinikki P, Hovi J, Ekerblom HK, & the Childhood Diabetes in Finland (DiME) Study Group. A prospective study of the role of Coxsackie B and other enterovirus infections in the pathogenesis of IDDM, *Diabetes* 44: 652-657, 1995.
79. Irvine WJ, Clark BF, Scarth R, Cullen DR, Duncan JP: Thyroid and gastric autoimmunity in patients with diabetes mellitus. *Lancet* ii: 163-168, 1970.

80. Jahnke U, Fisher EH, Alvord EC Jr: Sequence homology between certain viral proteins and proteins related to encephalomyelitis and neuritis. *Science* 229: 282-284, 1985.
81. Jenkins O, Booth JD, Minor PD, Almond JW: The complete nucleotide sequence of Coxsackievirus B4 and its comparison to other members of the Picornaviridae. *J Gen Virol* 68: 1835-1848, 1987.
82. Jenson AB, Rosenberg RS, Notkins AL: Pancreatic islet cell damage in children with fatal viral infections. *Lancet* II 354-8, 1980.
83. John HJ: The diabetic child ethiologic factors. *Ann Intern Med* 8: 198-213, 1934.
84. Jones DB, Armstrong NW: Coxsackievirus and diabetes revisited. *Nature Med* 1(4): 284, 1995.
85. Junker K, Egeberg J, Kromann H, Nerup J: An autopsy study of the islet of Langerhans in acute-onset juvenile diabetes mellitus. *Acta Pathol Microbiol Scand* 85-699, 1977.
86. Kang Y, Chatterjee NK, Nodwell MJ, Yoon J-W: Complete nucleotide sequence of a strain of Coxsackie B4 virus of human origin that induces diabetes in mice and its comparison with nondiabetogenic Coxsackie B4 JBV strain. *J of Med Virol* 44: 353-361, 1994.
87. Kaplan MH, Klein SW, Mc Phee J, Harpen RG: Coxsackievirus infections in infants younger than 3 months of age: a serious childhood illness. *Rev Infect Dis* 5: 1019-1032, 1983.

88. Karjalainen J, Martin JM, Knip M, Ilonen J, Robinson BH, Savilahti Åkerblom HK, Dosch HM: A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 327: 302-307, 1992.
89. Karounos DG, Wolinsky JS, Thomas JW: Monoclonal antibody to rubella virus capsid protein recognizes a  $\beta$ -cell antigen. *J Immunol* 150: 3080, 1993.
90. 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* 89: 283-292, 1992.
91. Kaufman DL, Clare-Salzler M, Tian J, Forsthuber T, Ting GSP, Robinson P, Atkinson MA, Sercarz EE, Tobin AJ, Lehmann PV: Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin dependent diabetes. *Nature* . 366: 69-72, 1993.
92. Kibrick S, Benirschke K.: Severe generalizes disease (encephalohepatomyocarditis) occurring in the newborn period and due to infection with Cocksackievirus, group B. *Pediatrics* 22: 857-875, 1958.
93. King ML, Shaikh A, Bidwell D, Voller A, Banatvala JE: Cocksackie-virus-specific IgM responses in children with insulin dependent diabetes mellitus. *Lancet* I: 1397-1399, 1983.
94. Kostraba JN, Cruickshanks KJ, Lawlwer-Heavner J, et al.: Early exposure to cow's milk and solids foods in infancy, genetic predisposition, and risk of IDDM. *Diabetes* 42: 288-295, 1993.



95. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
96. Lohmann T, Leslie RDG, Hawa M, Geysen M, Rodda S, Londei M: Immunodominant epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet*. 343: 1607-1608, 1994.
97. Lozovskaya LS, Lavrova IK, Svetlyshev SD, Desyatskova RG, Smirnov VV, Mazvina NA, Bayakina TN, Shigina OM: Antibodies to certain viruses in children in the time course of diabetes mellitus. *Vopr Virusol* 28: 103-108, 1983.
98. Martin DL, Wu SJ, Martin SB: Glutamate-dependent active-site labeling of brain glutamate decarboxylase. *J Neurochem* 55: 524-532, 1990.
99. Martin JM, Trink B, Daneman D, Dosh H-M, Robinson B: Milk proteins in the etiology of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Ann Med* 23: 447-452, 1991.
100. Maugh TH: Diabetes: Epidemiology suggests a viral connection. *Science* 188: 347-351, 1975.
101. Mc Laughlin GL, Benedik MJ, Campbell GH: Repeated immunogenic amino acid sequences of *Plasmodium* species share sequence homologies with proteins from humans and human viruses. *Am J Trop Med Hyg* 37: 258-262, 1987.
102. Melnick JL: Enteroviruses, polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In *Virology* pp. 739-794. Edited by B.M. Fields, DM Knipe, RM 89-89 - Chanok, JL Melnick, B Roijman, RE Shope. New York, Raven Press, 1985.

103. Menser MA, Forrest JM, Bransby RD: Rubella infection and diabetes mellitus. *Lancet* I: 57-60, 1978
104. Miller LP, Martin DL, Mazumder A, Walters JR: Studies on the regulation of GABA synthesis: substrato-promoted dissociation of pyridoxal 5'- phosphate from GAD. *J Neurochem* 30: 361-369, 1978.
105. Nelson PG, Pyke DA, Gamble DR.: Viruses and the aetiology of diabetes a study in identical twins. *BMJ* 4: 249, 1975.
106. Nelson PG, Arthur LJH, Gurling KJ, Gamble DR, Taylor KW: Familial juvenile-onset diabetes. *BMJ* 2: 1126-1127, 1977.
107. Nigro G, Pacella ME, Patanè E, Midulla M: Multi-system Coxsackievirus B-6 infection with findings suggestive of diabetes mellitus. *Cur. J. Paediatr.* 145: 557-553, 1986.
108. Nihalani KD, Pethani RR, Menon PS, Mehtalia SD: Coxsackie B4 virus causing insulin dependent diabetes mellitus, myopericarditis and encephalitis - a case report. *JAPI* 30: 107-109, 1982.
109. Oldstone MBA: Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 50: 819-820, 1987.
110. Olmos P, A'Hern RA, Heaton DA, Millward BA, Risley D, Pyke DA, Leslie RDG: The significance of the concordance rate for type 1 (insulin-dependent) diabetes in identical twins. *Diabetologia* 31: 747-50, 1988.

111. Onodera T, Jenson AB, Yoon J-W, Notkins AL: Virus-induced diabetes mellitus: reovirus infection of pancreatic beta cells in mice. *Science* 201: 529, 1978.
112. Pak C-Y, Cha C-Y, Rajotte RV, Mc Arthur RG, Yoon J-W: Human pancreatic islet cell specific 38 Kilodalton autoantigen identified by cytomegalovirus- induced monoclonal islet cell auto-antibody. *Diabetologia* 33: 569-572, 1990.
113. Palmberg AC: Sequence allignments of picornaviral capsid proteins, in *Molecular Aspects of Picornavirus Infection and Detection* (Semler, B.L, Ehrenfeld E, eds) pp. 211-241. American Society for Microbiology, Washington DC, 1989.
114. Palmer JP, Cooney MK, Crossley JR, Hollander PH, Asplin CM: Antibodies to viruses and to pancreatic islets in non-diabetic and insulin-dependente diabetic patients. *Diabetes Care* 4: 525-8, 1981.
115. Palmer JP, Asplin C, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu P, Paquette TL: Insulin antibodies in insulin dependent diabetes before insulin treatment. *Science* 22: 1337-1339, 1983.
116. Prabhakar BS, Haspel MV, Mc Clintock PR, Notkins AL. Detection of conserved and non conserved epitopes on Coxsackie virus B: frequency of antigenic change. *Virology* 146: 302-306, 1985.
117. Ramsingh A, Araki H, Bryant S, Hixson A: Identification of candidate sequences that determine virulence in Coxsakievirus B4. *Vir Res* 23: 231-292, 1992.
118. Ray CG, Palmer JP, Crossley JR, William RH: Coxsackie B virus antibody responses in juvenile-onset diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)* 12: 375-378, 1980.

119. Richter W, Mertens T, Schoel B, Muir P, Ritzkowsky A, Scherbaum WA and Boehm BO: Sequence homology of the diabetes-associated autoantigen glutamate decarboxylase with Coxsackie B4-2C protein and heat shock protein 60 mediates no molecular mimicry of autoantibodies. *J Exp Med* 180: 721-726, 1994.
120. Riley WJ, Maclaren NK, Krischer J, Spillar RP, Silverstein JH, Shatz DA, Schuartz S, Malone J, Shah S, Vadheim C, Rotter JJ: A prospective study of the development of diabetes in relations of patients with insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med* 323: 1167-1172, 1990.
121. Roep BO: T-cell responses to autoantigens in IDDM. The search for the holy grail. *Diabetes*. 45: 1147-1156, 1996.
122. Schmidt WAK, Brade L, Mütterfering H, Klein M: Course of Coxsackie B antibodies during juvenile diabetes. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 164: 291-298, 1978.
123. Schnurr DP, Cao Y, Schmidt NJ: Coxsackie B3 virus persistence and myocarditis in N : NIH (s) II nu/nu and +/-nu mice. *J Gen Virol* 65: 1197-1201, 1984.
124. Schopfer K, Matter R, Flueler V, Werder E: Diabetes mellitus, endocrine autoantibodies and prenatal rubella infection. *Lancet*, 11: 159, 1982.
125. Sheikh S, Martin DL. Antisera to defined sequences of brain glutamate decarboxylase. *Tr Am Soc Neurochem* 23:(abstract) 227, 1992.
126. Solimena M, Folli F, Denis-Domini S, Comi GC, Pozza G, De Camilli P, Vicari AM: Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in a patient with stiff-man syndrome, epilepsy and type I diabetes mellitus. *N Engl J Med* 318: 1012-1020, 1988.

127. Stoneback TA, Crowell RL: A Coxsackie virus B3 variant cytopathic for pancreatic beta cells. Annual Meeting, *Am Soc Microbiol* (Abstract) 326, 1977.
128. Suenaga K, Yoon J-W: Association of  $\beta$ -cell specific expression of endogenous retrovirus with development of insulinitis and diabetes in NOD mouse. *Diabetes* 37: 1722-1726, 1988.
129. Sussman ML, Strauss L, Hodes HL: Fatal coxsackie group B virus infection in the newborn. *Am J Dis Child* 97: 483-492, 1959.
130. Szopa TM, Gamble DR, Taylor KW: Coxsackie B4 virus induces short-term changes in the metabolic functions of mouse pancreatic islets in vitro. *Cell Biochem Funct* 4: 181-189, 1986.
131. Szopa TM, Ward T, Taylor KW: Impaired metabolic function in human pancreatic islets following infection with Coxsackie B4 virus in vitro. *Diabetol* 30: 587 (Abstract), 1986.
132. Szopa TM, Dronfield DM, Ward T, Taylor KW: In vivo infection of mice with Coxsackie B4 virus induces long-term functional changes in pancreatic islets with minimal alteration in blood glucose. *Diabetic Med* 6: 314-319, 1989.
133. Szopa TM, Ward T, Taylor KW: Disturbance of mouse pancreatic  $\beta$ -cell function following echo 4 virus infection. *Biochem Soc Trans* 20: 3155, 1992.
134. Szopa TM, Titchener PA, Portwood ND, Taylor KW: Diabetes mellitus due to viruses - some recent developments. *Diabetologia* 36: 687-695, 1993.

135. Tarn A, Thomas J, Dean B, Igram D, Schuartz G, Bottazzo G, Gale E: Predicting insulin dependent diabetes. *Lancet* 1: 845-850, 1988.
136. Tian J, Lehmann PV and Kaufman DR: T cell cross-reactivity between Coxsackievirus and glutamate decarboxylase is associated with a murine diabetes susceptibility allele. *J Exp Med* 180: 1979-1984, 1994.
137. Tillakaratne NJK, Erlander MG, Collard MW, Greif KF, Tobin AJ: Glutamate decarboxylases in non-neural cells of a rat testis and oviduct: differential expression of GAD<sub>65</sub> and GAD<sub>67</sub>. *J Neurochem* 58: 618-627, 1992.
138. Tisch R, Yang X-D, Singer SM, Liblau RS, Fugger L, Mc Devitt HO: Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature*. 366: 72-75, 1993.
139. Titchener PA, Jenkins O, Szopa TM, Taylor KW, Almond JW: Complete nucleotide sequence of a beta-cell tropic variant of Coxsackievirus B4. *J Med Virol* 42: 369-373, 1994.
140. Toniolo A, Onodera T, Jordan G, Yoon J-W, Notkins AL: Virus-induced diabetes mellitus glucose abnormalities produced in mice by the six members of the Coxsackie B virus group. *Diabetes*. 31: 496-499, 1982.
141. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitro cellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(9): 4350-4354, 1979.
142. Tssui C-Y, Burch GE, Harb JM: Pancreatitis in mice infected with Coxsackie virus B1. *Arch Pathol* 93: 379, 1972.

143. Uriarte A, Cabrera E, Ventura R, Vargas J: Islet cell antibodies and echo 4 virus infection. *Diabetologia* 30: A590 (Abstract), 1987.
144. Velloso LA, Kämpe O, Hallberg A, Christmanson L, Betsholtz C, Karlsson FA: Demonstration of GAD<sub>65</sub> as the main immunogenic isoform of glutamate decarboxylase in type 1 diabetes and determination of autoantibodies using a radioligand produced by eukaryotic expression. *J Clin Invest*, 91: 2084-2090, 1993.
145. Von Meyerburg, H: Über "insulitis" bei diabetes. *Schweiz Med Wochsch* 21: 554, 1940.
146. Webb SR, Loria RM, Madge GE, Kibrick S: Susceptibility of mice to group B Coxsackievirus is influenced by the diabetic gene. *J Exp Med* 143: 1239-1248, 1976.
147. Wicker LS, Miller BJ, Mullen Y: Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetes*. 35: 855-910, 1988.
148. Wilson C, Connolly JM, Thomson D: Coxsackie B2 virus infection and acute onset diabetes in a child. *BMJ* : 1008, 1977.
149. Wood J-N: In *Molecular Biology*: Protein 1: 261-270, 1984.
150. Yoon J-W, Onodera T, Notkins AL: Virus-induced diabetes mellitus XV.  $\beta$ cell damage and insulin-dependent hyperglycemia in mice infected with coxsackie virus B4. *J Exp Med* 148: 1068-1080, 1978.

151. Yoon J-W, Austin M, Onodera T, Notkins AL: Virus induced diabetes mellitus. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med* 300: 1173-1179, 1979
152. Yoon JW, Morishima T, Mc Clintock PR, Austin M, Notkins AL: Virus-induced diabetes mellitus: mengovirus infects pancreatic beta cells in strains of mice resistant to the diabetogenic effects of encephalomyocardites virus. *J Virol* 50: 684-690, 1984.
153. Yoon J-W: Role of viruses in the pathogenesis of IDDM. *Ann of Med* 23: 437-445, 1991.