

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL

"PEDRO KOURÍ"

DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

**"ASOCIACIÓN ENTRE INFECCIÓN POR
ENTEROVIRUS Y DIABETES TIPO 1:
NUEVAS EVIDENCIAS CIENTÍFICAS"**

*Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias de la Salud.*

Autor: Luis Sarmiento Pérez. MSc

Tutores: Pedro Más Lago. DrC.

Eduardo Cabrera Rode. DrC.

Ciudad de la Habana

2008

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL

"PEDRO KOURÍ"

DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

**"ASOCIACIÓN ENTRE INFECCIÓN POR
ENTEROVIRUS Y DIABETES TIPO 1:
NUEVAS EVIDENCIAS CIENTÍFICAS"**

*Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias de la Salud.*

Autor: Luis Sarmiento Pérez. MSc

Tutores: Pedro Más Lago. DrC

Eduardo Cabrera Rode. DrC

Ciudad de la Habana

2008

“.....Los microbios llevan milenios viviendo en nuestra vida, navegando en nuestra sangre, durmiendo en nuestras heridas, naciendo y muriendo con nosotros, y todavía ni ellos ni nosotros sabemos quiénes somos. Su naturaleza diversa les impide hacer lo que quisieran, y nos impide hacer lo que quisiéramos, que es sentarnos a comer juntos en la misma mesa, jugar a las barajas y contarles a los niños las verdades del universo.

En cambio de eso, andamos a la greña desde el principio de la creación, ellos tratando de exterminarnos a nosotros y nosotros tratando de exterminarlos a ellos, empeñados en una guerra a muerte de la cual no sabemos ni siquiera contra quién la libramos. Pues es muy probable que nuestros microbios, al igual que nosotros, tampoco sepan donde están ni por qué han venido.....”

Gabriel García Márquez.

AGRADECIMIENTOS

Con este trabajo se consolidan 13 años de mi labor como investigador. No podría, aunque quisiera, mencionar a todas las personas que en este tiempo me han brindando una cálida sonrisa, una palabra de ánimo o una mano amiga.

A todos ellos muchas gracias y en especial:

Al Dr. Pedro Más Lago, Padre de la virología en Cuba, por haberme dado el privilegio de haberme formado a su lado. Me siento muy orgulloso de haber sido su discípulo, a él mis más sinceros agradecimientos por todas sus innumerables enseñanzas.

Al Dr. Eduardo Cabrera Rode del Instituto Nacional de Endocrinología, quien ha influido profundamente en mi formación como investigador integrando la virología con las enfermedades crónicas no transmisibles. Gracias además por ser compañero y amigo.

Al viejo laboratorio de enterovirus, en particular a Rosita Palomera por su colaboración técnica y por su incesante preocupación por mi trabajo y a Marité, pionera en el estudio de la relación de los enterovirus con la diabetes y de quien heredé este fascinante tema de investigación.

Al nuevo laboratorio de enterovirus, Magile, Lai, Sonia y Mery por su ayuda incondicional y por formar parte de esta gran familia que somos.

A la Dra. Guadalupe Guzmán y Dra. Alina Llop ya que gracias a su ardua labor el departamento de virología ha logrado el desarrollo investigativo que ha permitido nuestra formación integral.

Al resto de los integrantes del departamento de virología que de una forma u otra han contribuido a los resultados alcanzados, pero sobre todas las cosas por haber creado una atmósfera placentera para el desarrollo de nuestro trabajo. Entre ellos quiero agradecer de manera particular al Dr. Angel

Goyenechea y la Dra Clara Savón por haber guiado mis primeros pasos en esta Institución.

A mis colegas del laboratorio de cultivo de células, por su asistencia y colaboración con los servicios de células.

A mis amigos del departamento de Inmunología de la diabetes del Instituto Nacional de endocrinología, en especial al Dr. Oscar Diaz Horta por su cooperación y ayuda en los resultados obtenidos en esta tesis y a la Lic. Gisela Molina por la ejecución, organización de las muestras y datos obtenidos.

A los trabajadores de Docencia, en especial a Lázaro por haberlo molestado tanto.

A los oponentes de la predefensa de este trabajo, Dra. Gloria del Barrio de la Facultad de Biología y Dr. Manuel Araña del Instituto Nacional de endocrinología por las críticas, minucioso análisis del documento y sugerencias realizadas.

Quisiera agradecerles ahora a un grupo de personas, que si las he dejado para el final es para poder hacerlo de una forma muy especial.

A toda mi familia en general y mi suegra por su afecto.

A mi madre y mi padre por ser personas muy especiales que siempre han querido lo mejor para mi.

A Mylai por su cariño, comprensión y compañía.

De manera muy especial a mi pequeño hijo Diego, mi principal fuente de inspiración y quien llena mi vida con su alegría contagiosa y su amor pandémico.

A todos de corazón,

Muchas Gracias,

Luis Sarmiento Pérez

A mi pequeño hijo Diego:

Que tu alegría contagie por siempre mi vida.

LISTADO DE ABREVIATURAS

aa: Aminoácido, aminoácida

AAI: Autoanticuerpos anti-insulina

Ac: Anticuerpo

ADN: Ácido desoxiribonucleico

AGAD: Anticuerpos contra la descarboxilasa del ácido glutámico

AGP: Anticuerpos anti- gástricos parietales

AIA2: Anticuerpos contra antígeno 2 asociado a insulinoma, (siglas del inglés, anti-insulinoma-associated antigen 2)

AMT: Anticuerpos anti-microsomales tiroideos

ARN: Acido ribonucleico

BSA: Seroalbúmina bovina, (siglas del inglés Bovine Serum Albumin)

CVA: Coxsackievirus A

CVB: Coxsackievirus B

DM1: Diabetes mellitus tipo 1 o diabetes tipo 1

E: Echovirus

ECP: Efecto citopático

ELISA: Ensayo inmunoenzimático sobre fase sólida, (siglas del inglés Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

EV: Enterovirus

FPG: Familiares de primer grado de diabéticos tipo 1

GAD: Enzima descarboxilasa del ácido glutámico, (siglas del inglés Glutamic Acid Decarboxylase)

HbA1: Hemoglobina glicosidada

HLA: Sistema principal de histocompatibilidad humano, (siglas del inglés Human Leucocyte Antigens)

HSP60: Proteína de choque térmico 60, (siglas del inglés Heat Shock Protein 60)

ICA: Anticuerpos anti-isletos pancreáticos, (siglas del inglés Islet Cell Antibodies)

ICA-: ICA negativo(s)

ICA+: ICA positivo(s)

Inhprot I: Inhibidor de proteasas

JDF: Unidad arbitraria de los ICA que significa Federación Juvenil de la Diabetes, (siglas del inglés Juvenile Diabetes Foundation)

LBM: Lim y Benyesh-Melnick

NTR: Región no codificadora, (siglas del inglés Non-Translated Region)

pb: Pares de bases.

PBS: Tampón fosfato salino, (siglas del inglés Phosphate Buffer Saline)

PV: Poliovirus

RCP: Reacción en cadena de la polimerasa

TCID₅₀: Dosis que provoca efectos citopáticos en el 50% de los cultivos celulares inoculados, (siglas del inglés Tissue Culture Infective Dose)

TRIS: Tris hidroximetil-metilamina

VPg: Proteína del genoma del virión, (siglas del inglés Virion Protein Genoma)

SÍNTESIS

Se presentan nuevas evidencias científicas a favor de la asociación de la infección por enterovirus tanto con el comienzo de la diabetes clínica como con los estadios preclínicos de autoinmunidad contra las células β pancreáticas y se sugieren posibles mecanismos (daño citolítico agudo y mimetismo molecular) mediante el cual este fenómeno se desarrolla. Se demostró seroconversión a ICA, AGAD, AIA2 y AAI en el 92,1%, 28,9%, 44,7% y 42,1% de niños infectados por E16, así como seroconversión a ICA (87,5%), AGAD (37,5%) y AIA2 (12,5%) en niños infectados por E30. Se presenta un caso de diabetes tipo 1 donde la infección por E30 pudo ser un contribuyente ambiental que desencadenó la enfermedad. Se detectó mayor presencia de ARN de enterovirus en diabéticos tipo 1 al comienzo clínico de la enfermedad (9/34, 26,5%) y en familiares de primer grado positivos para ICA (5/32, 15,6%) que sus grupos controles correspondientes (2/68, 2,9%; $p= 0,0007$ y 0/64, 0,0%; $p= 0,0033$), así como asociación entre la presencia de ARN de enterovirus y cetoacidosis severa. Se detectó reactividad cruzada de la respuesta inmune humoral contra diferentes serotipos de enterovirus y el autoantígeno pancreático GAD65. Los resultados de este estudio permitieron obtener datos únicos que contribuyen a esclarecer el papel de la infección por enterovirus en la historia natural de la diabetes tipo 1.

INDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	
I.1 Antecedentes	2
I.2 Hipótesis de trabajo	6
I.3 Objetivos	6
I.4 Novedad científica	7
I.5 Valor teórico y práctico	7
I.6 Publicaciones científicas	8
I.7 Eventos científicos	9
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
II.1 Enterovirus	12
II.1.1 Características generales	12
II.1.2 Epidemiología	15
II.1.3 Patogenia y manifestaciones clínicas	17
II.1.4 Diagnóstico	19
II.2 Diabetes Mellitus	22
II.2.1 Características generales	22
II.2.2 Historia natural de la diabetes tipo 1	23
II.2.3 Autoinmunidad humoral	25
II.2.4 Genética de la diabetes tipo 1	29
II.2.5 Epidemiología de la diabetes tipo 1	31

	Pág.
II.3 Asociación enterovirus y diabetes tipo 1	33
II.3.1 Evidencias serológicas y moleculares	33
II.3.2 Evidencias epidemiológicas	36
II.3.3 Posibles mecanismos de participación de los enterovirus en la patogénesis de la diabetes tipo 1	39
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
III.1 Anticuerpos asociados a diabetes tipo 1 en individuos infectados por echovirus 16 y echovirus 30	45
III.1.1 Universo de estudio	45
III.1.2 Muestras	46
III.1.3 Determinación de marcadores de infección viral	46
III.1.4 Determinación de marcadores humorales de autoinmunidad pancreática	49
III.1.5 Anticuerpos anti-microsomales tiroideos y anti-gástricos parietales	54
III.1.6 Glucemia, hemoglobina glicosilada y péptido C	55
III.1.7 Tipaje HLA	55
III.1.8 Análisis estadístico	55
III.2 Presencia de ARN de enterovirus en diabéticos tipo 1 de diagnóstico reciente y en familiares de primer grado de diabéticos tipo 1	55
III.2.1 Universo de estudio	55
III.2.2 Extracción de ARN	57
III.2.3 Cebadores	57
III.2.4 Reacción de amplificación	58
III.2.5 Pruebas bioquímicas	59
III.2.6 Análisis demográfico	60
III.2.6 Análisis estadístico	60

	Pág.
III.3 Evaluación de la reactividad cruzada de la respuesta inmune humoral inducida por diferentes serotipos de enterovirus en conejos frente a los principales antígenos de las células β pancreáticas humanas	60
III.3.1 Virus	60
III.3.2 Preparación de antígenos	61
III.3.3 Obtención de sueros hiperinmunes	61
III.3.4 Anticuerpos neutralizantes contra enterovirus	62
III.3.5 Anticuerpos contra los principales autoantígenos de los islotes pancreáticos humanos	62
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
IV.1 Anticuerpos asociados a diabetes tipo 1 en individuos infectados por echovirus 16 y echovirus 30	64
IV.2 Presencia de ARN de enterovirus en diabéticos tipo 1 de diagnóstico reciente y en familiares de primer grado de diabéticos tipo 1	77
IV.3 Evaluación de la reactividad cruzada de la respuesta inmune humoral inducida por diferentes serotipos de enterovirus en conejos frente a los principales antígenos de las células β pancreáticas humanas	84
V. DISCUSIÓN GENERAL	88
VI. CONCLUSIONES	99
VII. RECOMENDACIONES	101
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Antecedentes

Los conocimientos actuales apuntan a considerar que varias enfermedades crónicas que en un inicio fueron atribuidas solamente a estilos de vida y a factores genéticos pudieran ser causadas o exacerbadas por agentes infecciosos. Estos incluyen algunos tipos de úlceras estomacales y ciertos tipos de cáncer. Se estima que al menos el 15% de todos los cánceres humano a nivel mundial pueden ser una consecuencia de una enfermedad infecciosa crónica (Huges, 2001). Sin embargo, todavía queda por dilucidar si un agente infeccioso se puede vincular con una enfermedad crónica no transmisible como la diabetes tipo 1 (Haller y cols., 2005; Lammi y cols., 2005; van der Werf y cols., 2007).

La diabetes mellitus tipo 1 o diabetes tipo 1 es considerada globalmente como una de las enfermedades crónicas no transmisibles más frecuentes en niños y adolescentes. Ella se sitúa entre la cuarta y quinta causa de muerte de los países industrializados y existen numerosas evidencias que la hacen considerar como una epidemia en países en vía de desarrollo. En Cuba, la prevalencia de esta enfermedad es de 20,4 x 100 000 habitantes y la aparición anual de nuevos casos es de 2,9 x 100 000 habitantes (Collado y cols., 1993)

El notable aumento de las complicaciones de la diabetes tipo 1, que incluyen: la enfermedad arterial coronaria y vascular periférica, los accidentes vasculares encefálicos, la neuropatía diabética, las amputaciones, el fallo renal y la ceguera, producen de forma creciente discapacidad, reducen la expectativa de vida e incrementan considerablemente el costo de salud (American Diabetes Association, 2005). La diabetes mellitus tipo 1 es el resultado de la destrucción autoinmune de más del 80% de las células β pancreáticas productoras de la hormona insulina.

Durante la fase preclínica de la enfermedad aparecen los anticuerpos asociados a diabetes tipo 1 que representa el primer signo detectable de la emergente autoinmunidad contra las células β . Existen cuatro importantes anticuerpos asociados a diabetes tipo 1 que han mostrado predecir la enfermedad, estos incluyen los anticuerpos contra las células de los islotes (ICA) y los anticuerpos contra tres de los principales autoantígenos de las células β pancreáticas: la insulina (AAI), la descarboxilasa del ácido glutámico (AGAD) y la porción intracelular de una proteína tirosina fosfatasa relacionada con la molécula IA2 (AIA2) (Rewers y cols., 2004). Sin embargo, los factores que desencadenan la respuesta inmune dirigida contra las células β todavía permanecen inexplicables (Hyöty, 2002; Notkins, 2002).

Los factores genéticos tienen indudablemente una gran importancia en la patogénesis de la diabetes tipo 1. Las influencias genéticas en el desarrollo de la enfermedad están basadas en la agregación familiar de la diabetes tipo 1 y en la asociación con antígenos de histocompatibilidad (HLA). Sin embargo numerosos estudios, especialmente los realizados en gemelos monocigóticos, muestran que los factores hereditarios acontecen solamente para el 30-50% de la susceptibilidad de la enfermedad (Pugliese y Eisenbarth, 2004). Además, la incidencia de la diabetes tipo 1 en el mundo se ha incrementado en los últimos 50 años en un rango de 2-3% por año, lo cual no puede ser explicado solamente por los factores genéticos (Pitkaniemi y cols., 2004). De esta manera, la atención se ha enfocado sobre los factores ambientales, y aunque se desconoce la forma como actúan, se hipotetiza que pudieran tanto desencadenar, acelerar o precipitar la enfermedad (Akerblom y Knip, 1998; Knip y Akerblom., 1999).

A partir de estudios realizados desde la segunda mitad del siglo XX las infecciones por enterovirus han sido identificadas como posibles contribuyentes ambientales asociados con la diabetes tipo 1 (Hyoty y Taylor, 2002). Los enterovirus constituyen un grupo de agentes infecciosos pertenecientes a la familia *Picornaviridae* que incluyen al menos 89 serotipos: Poliovirus (PV) (tres serotipos), Coxsackievirus A (CVA) (23 serotipos), Coxsackievirus B (CVB) (seis serotipos),

Echovirus (E) (28 serotipos) y Enterovirus numerados (EV) (29 serotipos) (King y cols., 2000; Oberste y cols., 2006; 2007).

La mayoría de los enterovirus se replican inicialmente en el tracto gastrointestinal o en las vías respiratorias altas y durante el curso de la infección sistémica pueden alcanzar los islotes pancreáticos y causar daño de las células β (Roivainen y cols., 2000; 2006). El conocimiento detallado de los mecanismos por los cuales los enterovirus pueden contribuir a la destrucción pancreática se encuentra incompleto actualmente, por ello existe mucha especulación sobre cómo una infección viral podría inducir diabetes tipo 1. Se ha postulado que los enterovirus pudieran destruir las células β directamente por una infección lítica o indirectamente por una respuesta inmune inducida por el virus contra las células β infectadas tanto por el mecanismo de similitud molecular (mimetismo molecular) como por la activación inespecífica de las células autoinmunes (Activación Bystander) (Achenbach y cols., 2005). No obstante, las bases moleculares que determinan el fenómeno al parecer aún están lejos de ser establecidos en forma definitiva (Fujinami y cols., 2006).

Hasta la fecha se han realizado un número considerable de investigaciones encaminadas a la búsqueda de posible asociación entre infección por enterovirus y diabetes tipo 1 pero la mayoría de ellas han estado limitadas a países europeos de alta incidencia de diabetes tipo 1 y baja circulación de enterovirus (Karvonen y cols; 2000; Viskari y cols; 2004). Entre los hallazgos más importantes obtenidos en estos estudios se destacan el aislamiento de CVB4 del páncreas de un paciente al momento del diagnóstico de la diabetes tipo 1 (Yoon y cols., 1979), así como el informe de varios casos en los cuales la diabetes se desarrolla después de infecciones por enterovirus (Jun y Yoon, 2002). Además, en estudios prospectivos realizados en Finlandia se ha demostrado que los individuos inicialmente no diabéticos, que desarrollaron autoanticuerpos o progresaron a diabetes tipo 1 adquirieron infecciones por enterovirus con mayor frecuencia que los individuos controles que se mantuvieron sin indicios de la enfermedad (Lonrot y cols., 2000a,b). También ha sido documentado por investigadores suecos que la

infección por enterovirus durante el embarazo está asociada con la posterior aparición de la diabetes tipo 1 en la descendencia (Dahlquist y cols., 2004).

A pesar de los progresos obtenidos consideramos que aún en nuestros días son pocas las evidencias que permiten vincular a los enterovirus con los mecanismos fisiopatológicos que desencadenan, aceleran o perpetúan el daño de las células de los islotes pancreáticos que conduce a la diabetes tipo 1. Por otra parte, la posible participación de los enterovirus en la patogénesis de esta enfermedad no ha sido totalmente aceptada por la comunidad científica internacional y se mantiene como un área de gran controversia por la publicación de varios estudios que no favorecen la hipótesis de asociación. Por ejemplo, Graves y colaboradores en el 2003 no encontraron asociación entre la presencia de ARN y el desarrollo de anticuerpos asociados a diabetes tipo 1 en un grupo de niños estudiados con riesgo genético de desarrollar la enfermedad (Graves y cols., 2003). Incluso, diferentes investigadores, trabajando en forma independiente, han detectado mayores niveles de anticuerpos específicos a CVB en sujetos controles saludables en comparación a pacientes diabéticos de diagnóstico reciente (Palmer y cols.; 1982; Tuvemo y cols., 1989; Green y cols., 2004).

La inconsistencia de los hallazgos reportados y las discrepancias entre los diferentes grupos de investigación en relación a si los enterovirus juegan un papel en la historia natural de la diabetes tipo 1, la falta de estudios orientados a la búsqueda de dichas asociaciones en regiones con prevalencias del problema diferentes a la de los países europeos, así como la ausencia de consenso en las investigaciones realizadas hasta el momento sobre los posibles mecanismos patogénicos mediante los cuales los enterovirus participan en la destrucción autoinmune de las células β son razones que justifican la necesidad de nuevas investigaciones que contribuyan a esclarecer la polémica que existe alrededor de la posible asociación de los enterovirus con la diabetes tipo 1 autoinmune.

La investigación que se presenta pretende enriquecer los hallazgos antes mencionados y abordar estudio de la relación entre infección por enterovirus y diabetes tipo 1 en una población con una alta circulación de enterovirus y baja incidencia de diabetes tipo 1.

I.2 Hipótesis de trabajo

La infección por enterovirus está asociada con la presencia de anticuerpos contra antígenos de los islotes pancreáticos así como con el comienzo clínico de la diabetes tipo 1 autoinmune siendo el mimetismo molecular un probable mecanismo inductor de la respuesta inmune humoral contra las células β pancreáticas.

I.3 Objetivos

General:

Proporcionar nuevas evidencias científicas sobre el papel de la infección por enterovirus en la historia natural de la diabetes tipo 1 en una población con una alta circulación de enterovirus.

Específicos:

1. Evaluar la posible asociación de la infección por echovirus 16 y echovirus 30 con la inducción de marcadores humorales del proceso de destrucción autoinmune de las células β pancreáticas en individuos sin antecedentes personales de diabetes tipo 1.
2. Valorar la posible asociación entre la presencia de ARN de enterovirus con el comienzo clínico de la enfermedad en diabéticos tipo 1 de diagnóstico reciente y con la presencia de anticuerpos contra los islotes pancreáticos en familiares de primer grado de diabéticos tipo 1.
3. Evaluar la reactividad cruzada de la respuesta inmune humoral inducida por diferentes serotipos de enterovirus en conejos frente a los principales antígenos de las células β pancreáticas humanas.

I.4 Novedad científica

- Constituye la primera evidencia a nivel mundial de asociación del echovirus 16 y echovirus 30 con la presencia de marcadores humorales del proceso de destrucción autoinmune de las células β pancreáticas, y se reporta de esta forma nuevos serotipos de enterovirus como posibles contribuyentes ambientales para el desarrollo de la diabetes tipo 1.
- Es el primer informe a nivel mundial de un caso de diabetes tipo 1 después de infección por echovirus 30.
- Se describe por primera vez en el mundo la reactividad cruzada de la respuesta inmune humoral contra diferentes serotipos de echovirus (E9, E11, E16, E30) y el autoantígeno pancreático GAD65.
- Los resultados encontrados aportan nuevas evidencias a nivel internacional a favor de la asociación de los enterovirus con la diabetes tipo 1 en una población con una alta circulación de enterovirus y baja incidencia de diabetes tipo 1.

I.5 Valor teórico y práctico

La investigación desarrollada tiene un gran valor teórico y práctico pues contribuyó a conocer la asociación de las infecciones por enterovirus con el comienzo de la diabetes tipo 1, así como durante el período preclínico, y se sugieren posibles mecanismos mediante el cual este fenómeno se desarrolla.

Además, nuestro trabajo estuvo enfocado a una entidad clínica que constituye uno de los más importantes problemas de salud a enfrentar en el siglo XXI y en la actualidad no se dispone de cura y prevención. De esta manera, los resultados obtenidos pudieran tener importantes implicaciones para el desarrollo de estrategias de prevención de esta enfermedad a nivel poblacional. En un futuro la inmunización contra enterovirus en población de riesgo podría ser una alternativa

para la prevención y reducción de las complicaciones derivadas de la diabetes tipo 1.

Algunos de los resultados presentados han sido objeto de reconocimientos como son:

- Resultado Relevante del IPK en el año 2003
- Premio Anual de Salud en la categoría de artículo científico en el año 2004
- Premio en el Concurso Central del premio anual de Salud 2008

Estos resultados, han sido objeto de seis publicaciones internacionales. Toda la temática tratada en la tesis aparece recogida en un libro publicado por una editora científica extranjera de alto prestigio y difusión internacional, además se han presentado en nueve eventos científicos nacionales e internacionales. Los diferentes estudios realizados formaron parte de una tesis de terminación de Residencia en Inmunología en el 2002, dos tesis para optar por el grado de Licenciado en Microbiología en el 2003 y una tesis de maestría en Virología en el 2006.

I.6 Publicaciones científicas donde han sido presentados los resultados de la tesis

ARTICULOS.

1. **Sarmiento L**, Cabrera-Rode E, Lekuleni L, Cuba I, Molina G, Fonseca M, Heng-Hung L, Borroto A, Gonzalez P, Mas P, Díaz-Horta O. Occurrence of enterovirus RNA in serum of children with newly diagnosed type 1 diabetes and islet cell autoantibody-positive subjects in a population with incidence of type 1 diabetes. **Autoimmunity 2007**; 40(7):540-545.
2. **Sarmiento L**, Cabrera-Rode E, Mas P, Díaz-Horta O. Antibodies to human glutamic acid decarboxylase in sera from enterovirus-immunized Rabbit. **Autoimmunity 2007**; 40(7):546-547.
3. Cabrera-Rode E, **Sarmiento L**, Molina G, Pérez C, Arranz C, Galvan J, Prieto M, Barrios J, Palomera R, Fonseca M, Mas P, Díaz- Díaz O, Díaz-Horta O. Islet cell related antibodies and Type 1 Diabetes Associated with echovirus 30 Epidemic: A case report. **J Medical Virology 2005**; 76(3):373-377.

4. **Sarmiento L**, Cabrera-Rode E, Díaz-Horta O. Lack of Association of Latent Autoimmune Diabetes in Adults (LADA) with Enterovirus Infection. **Autoimmunity** **2004**; 37(3):245-246.
5. Cabrera-Rode E, **Sarmiento L**, Tiberti C, Molina G, Barrios J. Hernandez D, Horta D, Mario, U. Type 1 diabetes islet associated antibodies in subject infected by echovirus 16. **Diabetologia** **2003**; 46(10):1348-1353.
6. **Sarmiento L**, Palomera R, Goyenechea A, Quintana I, Morier L, Santin M, Mas P. First epidemic of echovirus 16 meningitis in Cuba. **Emerging Infectious Diseases** **2001**;7(5):887-889.

LIBRO. Enterovirus Infections and Type 1 Diabetes Mellitus. **Nova Science Publishers** **2007** ISBN 1-60021-339-1. Autores/Editores: Luis Sarmiento y Eduardo Cabrera.

Capítulos del libro donde se aborda directamente el tema de la tesis:

- **Sarmiento L.** Human enterovirus infections. In: Luis Sarmiento-Pérez and Eduardo Cabrera-Rode, editors. Enterovirus Infections and Type 1 Diabetes Mellitus. New York: **Nova Science Publishers**; **2007**.p.93-123.
- **Sarmiento L.** Enterovirus - Induced Type 1 Diabetes. In: Luis Sarmiento – Pérez and Eduardo Cabrera-Rode, editors. Enterovirus Infections and Type 1 Diabetes Mellitus. New York: **Nova Science Publishers**; **2007**.p.125-165.
- Cabrera E and **Sarmiento L.** Our contributions to the association between enterovirus infections and type 1 diabetes. In: Luis Sarmiento-Pérez and Eduardo Cabrera-Rode, editors. Enterovirus Infections and Type 1 Diabetes Mellitus. New York: **Nova Science Publishers**; **2007**.p.167-187.

I.7 Eventos científicos donde han sido expuestos los resultados de la tesis

1. VI Congreso Cubano de Diabetes y II Simposio Cubano de Inmunología de la Diabetes. Enterovirus y diabetes tipo 1. Cuba, 2002.
2. XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología. VI Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. III Congreso Cubano de Medicina Tropical. Anticuerpos Asociados a diabetes tipo 1 en niños infectados por echovirus 16. Cuba, 2002.
3. 18th Congress of the International Diabetes Federation. Echovirus 16 and islet autoantibodies. Francia, 2003.

4. I Congreso Cubano de Endocrinología Pediátrica y de la Adolescencia, I Encuentro de las Sociedades Cubana y Española de Endocrinología Pediátrica. Asociación de de Echovirus 30 con anticuerpos anti-islotos pancreáticos y diabetes tipo 1 (Informe del primer caso). Cuba, 2003.
5. IV Congreso Nacional de Inmunología. Enterovirus y autoinmunidad pancreática. Cuba, 2004
6. TWAS-ROLAC First Regional Conference of Young Scientists. Enterovirus infections and Type 1 diabetes mellitus. Brazil, 2006.
7. Foro Nacional de Investigación e Innovación en Salud. FIINSA. Hipótesis viral de la diabetes tipo 1. Cuba, 2006.
8. XII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Diabetes. Prevención en la Diabetes. VII Congreso Cubano de Diabetes. Hipótesis viral y de higiene de la diabetes Tipo 1. Cuba, 2007.
9. VIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical. Asociación de ARN de enterovirus con la presencia de marcadores autoinmunes de progresión a diabetes tipo 1 e inicio clínico de esta enfermedad. Cuba, 2007.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 Enterovirus

II.1.1 Características generales

Los enterovirus pertenecen a la familia *Picornaviridae*, (pico: pequeño; rna: genoma ARN; viridae: virus) que consta de seis géneros. Dos de estos afectan solamente a los animales (cardiovirus y aphtovirus) y los otros afectan al hombre: hepatovirus, paraechovirus, rinovirus y enterovirus (Pallansch y Raymond, 2001). Dentro del género de enterovirus se agrupan importantes patógenos humanos que incluyen 89 serotipos: poliovirus (PV), coxsackievirus A (CVA), coxsackievirus B (CVB), echovirus (E) y enterovirus (EV) numerados (Hyypia y cols., 1997; King y cols., 2000; Oberste y cols., 2001) (Tabla 1A). El progreso obtenido en los últimos años en el conocimiento de la biología molecular de estos agentes ha conducido a que los enterovirus humanos sean clasificados en la actualidad en 5 especies (A-D y poliovirus) de acuerdo a sus características genéticas (Norder y cols., 2003, Oberste y cols., 2004; 2005; 2006; 2007) (Tabla 1B).

Los viriones son partículas esféricas, pequeñas y compactas que miden entre 22-30 nm de diámetro, las cuales carecen de una envoltura lipídica externa. Se componen de un core interno de ácido ribonucleico (ARN) rodeado por una capa proteica o cápside. La simetría de la cápside es icosaédrica y la misma está compuesta de 60 subunidades o protómeros. Cada protómero a su vez lo componen 4 proteínas VP1, VP2, VP3 y VP4. Las proteínas VP1, VP2 y VP3 se encuentran expuestas en la superficie del virión y VP4 se localiza sepultada en estrecha asociación con el ARN. El ácido nucleico constituye el 30% y las proteínas el 70% del peso del virión (Rueckert, 1996)

Tabla 1. Clasificación de los enterovirus.

A) Clasificación en base a antisueros serotipo específicos.

Virus	Tipos antigénicos	Número de serotipos
Poliovirus	1-3	3
Coxsackievirus, A	1-24 ^a	23
Coxsackievirus, B	1-6	6
Echovirus	1-34 ^b	28
Enterovirus	68-71, 73-91, 100-101	29

B) Clasificación en base a propiedades moleculares

Especie	Tipos antigénicos	Número de serotipos
Poliovirus	1-3	3
Enterovirus A	CVA2-A8, A10, A12, A14, A16, EV71, EV76, EV89, EV90, EV91	16
Enterovirus B	CVB1-B6, CVA9, E1- E33 ^b , EV69, EV73, EV74, EV75, EV77-88, EV95	52
Enterovirus C	CVA1, CVA11, CVA13, CVA15, CVA17-CVA22, CVA24	11
Enterovirus D	EV68, EV 70, EV94	3
Enterovirus no clasificados	EV96, EV97, EV100, EV101	4

Leyenda:

CVA :coxsackievirus A , CVB: coxsackievirus B, E: echovirus, EV: enterovirus.

^a CVA23 está relacionado con E9. ^b E8 se clasificó como reovirus 1, E22 y E23 como paraechovirus tipos 1 y 2, E28 como el rinovirus A1 humano, y el E34 como CA24.
Fuente: Tomado del *Field Virology*, 2001.

Su genoma es una molécula única, continua, lineal y simple de ARN denominado ARN positivo, al poder constituir directamente un ARN mensajero (ARNm) para la

síntesis de proteínas virales. Su extremo 3' es poliadenilado y el 5' tiene unido covalentemente un oligopéptido codificado por el virus, denominado VPg (siglas del inglés, virion protein genome). En ambos extremos de la cadena se encuentran zonas no codificadoras llamadas NTR (siglas del inglés, nontranslated region), las cuales posiblemente juegan un papel regulador en la iniciación de la síntesis proteica, en la síntesis de ARN y en la interacción del ARN con elementos del citoesqueleto y membranas intracelulares, así como en la estabilidad del genoma en su interacción con la cápside durante el empaquetamiento. En el centro se encuentra la zona codificadora que contiene un total de 11 genes que darán lugar a una poliproteína de 247 kdaltons que luego de un proceso proteolítico llevado a cabo por 3 proteasas virales (2A, 3C y 3CD) dará lugar a 11 proteínas finales con diversas funciones (Racaniello, 2001) (Figura 1).

ESTRUCTURA GENÉTICA

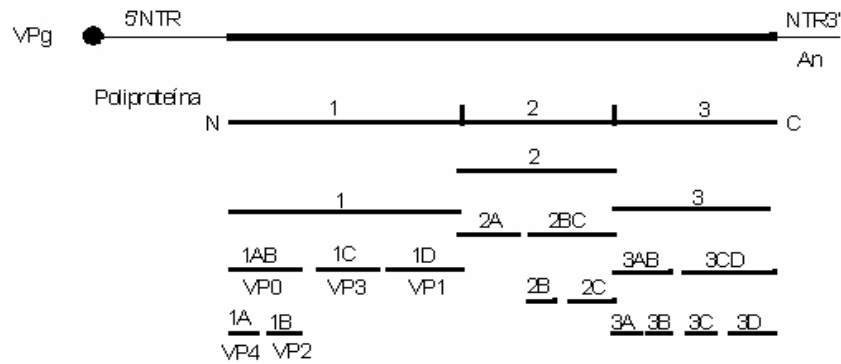


Figura 1. Genoma de los enterovirus.

Fuente: Tomado del Field Virology, 2001.

La proteína VP1 es la portadora de los sitios antigénicos principales dentro de la proteína capsídica (Harvala y cols, 2002). Los determinantes de virulencia, termoestabilidad del virión, rango hospedero, tropismo celular in vitro, infección persistente y morfología de las placas se localizan en la región codificadora de la cápside (Ramsingh y cols., 1995; Muir y cols., 1998; Tracy y cols., 2006).

Las proteínas no estructurales están involucradas en el procesamiento de las proteínas y la replicación del genoma. La proteína 2A es una proteasa encargada de procesar los precursores proteicos virales (Baxter y cols., 2006; Jurgens y cols., 2006). La proteína 2B juega un papel no bien conocido en la síntesis de ARN. Entre sus funciones se ha planteado la inducción de permeabilidad de la membrana celular y pudiera ser responsable de la proliferación de vesículas membranosas (van Kuppelveld y cols., 2002). La proteína 2C es altamente conservada en los enterovirus, interviene en la replicación del ARN viral y posiblemente en la estabilización de la estructura viral (Banerjee y cols., 2004). La proteína 3A se asocia a complejos de replicación y a las funciones de ensamblaje mientras que 3B es la proteína VPg la cual juega un papel en la iniciación de la síntesis de ARN viral y permite el empaquetamiento dentro de la cápside. La proteína 3C es la proteasa responsable de la mayoría de los cortes proteolíticos (Giachetti y cols., 1991). La proteína 3D es la de mayor tamaño y constituye la enzima ARN polimerasa dependiente de ARN (Muir y cols., 1998).

Los enterovirus son resistentes a todos los quimioterápicos conocidos, a la inactivación por solventes lípidicos y son estables a pH ácido. Presentan una tendencia natural a la agregación espontánea que los defiende del efecto de los agentes externos. Se inactivan rápidamente a temperaturas mayores de 50°C, por la luz ultravioleta y en condiciones de desecación. Son sensibles al tratamiento con ciertos desinfectantes como el formaldehído al 3% y ácido clorhídrico 0,1N (Abad y cols., 1997).

II.1.2 Epidemiología

El hombre es el único reservorio conocido y la transmisión es fundamentalmente por vía fecal-oral y respiratoria. Se reportan casos de transmisión por fómites o moscas, y transmisión vertical, pero la más frecuente es la vía directa de persona a persona (Pallansch y Raymond, 2001). Los virus se eliminan por las heces y se pueden detectar en aguas residuales (Sarmiento y cols., 1999). En las zonas en que las condiciones sanitarias son satisfactorias, la diseminación de tipo faríngeo

adquiere una importancia relativamente mayor. Los virus se pueden transmitir durante todo el tiempo que son excretados (Pallansch y Raymond, 2001).

Desde el punto de vista epidemiológico los enterovirus tienen una distribución mundial y pueden presentarse en forma endémica o en brotes epidémicos. Dentro de una localidad geográfica dada, algunos serotipos pueden ser endémicos, los cuales se encuentran continuamente circulando en una población no inmune y se reportan con frecuencia. Otros serotipos son epidémicos, los cuales se pueden encontrar completamente ausente de una comunidad o limitada su circulación por un número de años, creando un gran reservorio de susceptibles que pueden dar lugar a grandes epidemias cuando son reintroducidos en la comunidad (Heim, 2005; Ochiai y cols., 2006).

Las investigaciones realizadas en Cuba sobre la circulación de enterovirus en pacientes con meningoencefalitis han incrementado los conocimientos acerca de las diferencias en los patrones de prevalencia de los enterovirus. Los resultados obtenidos claramente indican que algunos serotipos siguen una manera endémica de transmisión, con un cambio gradual en el rango de serotipos presentes de año a año. Por el contrario, otros serotipos siguen una vía epidémica de transmisión, causando grandes brotes y desaparecen por un período de varios años a lo que se ha denominado circulación en oleadas (Sarmiento, 2004). Otros estudios realizados en Cuba en población infantil sin síntomas aparentes de infección por enterovirus han permitido demostrar que de manera general la circulación de enterovirus en la población cubana es alta. Más y colaboradores analizaron un total de 1 178 muestras de heces de niños seleccionados de círculos infantiles de 6 provincias del país, las cuales fueron colectadas consecutivamente a partir de enero de 1975 hasta diciembre de ese año. Aunque hubo variaciones en cuanto al número de aislamientos según meses del año, se encontró que algún serotipo de enterovirus fue aislado el 44,2% de las muestras analizadas (Más, 1979). Un estudio posterior realizado entre el período de 1990-1995 donde se analizaron un total de 586 muestras de heces, permitió demostrar la presencia de enterovirus en el 32,4% de los casos (Bello y cols., 1997). En un estudio más reciente se analizaron 838 heces de niños en la

población general y se encontró que en 170 de ellas se aislaron enterovirus para un 20,3% de positividad (Más y col., 2001).

II.1.3 Patogenia y manifestaciones clínicas

Una vez que se produce el contagio por vía oral o respiratoria, los enterovirus colonizan la bucofaringe y el tubo digestivo específicamente amígdalas, ganglios linfáticos y placas de peyer donde tiene lugar una activa multiplicación primaria. En el primer día, la infección se extiende a los ganglios linfáticos regionales (cervicales profundos y mesentéricos) produciéndose una viremia primaria transitoria de aproximadamente 3 días, llegando a diversos órganos del sistema mononuclear fagocítico como son el hígado, bazo y médula ósea. Después de la multiplicación en estos órganos, los virus difunden a la sangre desarrollando una viremia secundaria y pueden localizarse en los tejidos u órganos por los que tienen tropismo (meninges, sistema nervioso, músculos estriados, miocardio, mucosa respiratoria, piel o páncreas), produciendo un amplio número de enfermedades. Generalmente el virus se detiene en la fase de replicación intestinal o en las formaciones y órganos del sistema mononuclear fagocítico dando lugar a la infección subclínica que es más común que la infección manifiesta. Solo en un reducido número de casos se localiza en los tejidos y órganos susceptibles, dando lugar a cuadros clínicos cuya gravedad puede depender de varios factores, como son la edad, estado inmunitario del huésped y la virulencia del virus circulante (Abzug, 2004; Racaniello, 2006).

Como consecuencia de la infección por enterovirus se produce inmunidad local intestinal (IgA) y anticuerpos séricos (IgM e IgG) que neutralizan el virus durante la fase virémica. Su formación tan temprana en la infección es el resultado de una activa replicación viral en el tracto intestinal y en estructuras linfáticas profundas (Tracy y cols., 1995). La frecuencia de IgG e IgA a enterovirus aumentan con la edad, sugiriendo la existencia de una memoria inmunológica como resultado de reinfecciones con estos agentes (Zaman y cols., 1993). Debemos destacar el hecho de que en general los niños son los transmisores más importantes y los

más susceptibles a infecciones por enterovirus porque todavía carecen de inmunidad humoral adquirida por la exposición repetida a enterovirus. Sin embargo, cuando la exposición inicial a la infecciones por enterovirus ocurre en adultos, la incidencia y frecuencia de las manifestaciones más severas aumentan (Morens y Pallansch, 1995; Nwachuku y Gerba, 2006).

Las infecciones por enterovirus pueden ser asintomáticas o dar lugar a enfermedades graves del sistema nervioso como meningoencefalitis, parálisis, poliomielitis, encefalomielitis, mielitis transversa; en la piel y mucosas como herpangina, enfermedad mano-pie-boca, exantemas; en sistema muscular y cardiaco como pleurodinia, miocarditis, pericarditis; en el aparato respiratorio como un simple resfriado común, neumonía, neumonitis del lactante, edema pulmonar; en el aparato gastrointestinal como diarrea, hepatitis; así como también enfermedad febril indiferenciada, enfermedad generalizada en lactantes y conjuntivitis hemorrágica aguda (Rotbart, 1995; Pallansch y Raymond, 2001; Iturriza y cols., 2006; Kupila y cols., 2006) (Tabla 2).

La poliomielitis es la enfermedad producida por los enterovirus que se ha considerado de mayor importancia por su mortalidad y morbilidad. No obstante, gracias a la obtención, producción y aplicación de vacunas de poliovirus inactivadas y vivas atenuadas, se ha reducido marcadamente la incidencia de poliomielitis en todo el mundo confinándose el poliovirus salvaje a la región del sudeste asiático y algunos países africanos (Heim, 2005).

Además de la reconocida asociación con enfermedades agudas, los enterovirus se han invocado como posibles agentes etiológicos de enfermedades crónicas no transmisibles como la cardiomiopatía (Sole y Liu, 1993), síndrome de fatiga crónica, síndrome post-polio, esclerosis lateral amiotrófica (Julen y cols., 1999; Berger y cols., 2000) y diabetes mellitus tipo 1 (Roivainen, 2006). Aunque no existe una probada asociación de los enterovirus con estas enfermedades crónicas existen evidencias en la literatura que sugieren que los enterovirus bajo ciertas condiciones pueden establecer una infección persistente y desarrollar autoinmunidad, lo cual pudieran constituir probables hipótesis para explicar la

participación de los enterovirus en estas enfermedades (Oberste y Pallansch, 2003).

Tabla 2. Síndromes clínicos asociados con infecciones por enterovirus

Grupo	Enfermedades asociadas
Poliovirus 3 tipos (1 - 3)	Poliomielitis paralítica, meningoencefalitis, síndrome febril.
Coxsackievirus Grupo A, 23 tipos (A1-22, A24)	Meningoencefalitis, herpangina, enfermedades febriles, conjuntivitis, síndrome mano, pie y boca
Coxsackievirus Grupo B, 6 tipos (B1-6)	Meningoencefalitis, síndrome neonatal grave, miopericarditis, enfermedad de Bornholm, encefalitis, síndrome febril.
Echovirus 31tipos (1-9, 11-27)	Meningoencefalitis, exantema cutánea, síndrome febril, conjuntivitis, síndrome neonatal grave generalizado.
Enterovirus 4 tipos (68-71)	Síndrome de pseudo-polio, meningoencefalitis, síndrome mano, pie y boca, conjuntivitis epidémica.

Fuente: Tomado de Human Enterovirus Infection, 1995.

II.1.4 Diagnóstico

Las infecciones por enterovirus no pueden ser diagnosticadas en base a la clínica solamente debido a la alta frecuencia de infecciones subclínicas y la amplia variedad de las manifestaciones clínicas (Morens y cols., 1991; Modlin, 1996). No existe tratamiento específico para las enfermedades producidas por enterovirus, y por lo tanto la importancia del diagnóstico reside principalmente en distinguir entre enfermedades inducidas por enterovirus y otras enfermedades tratables que son clínicamente similares (Chonmaitree y cols., 1989; Sawyer, 1999).

La técnica de referencia para el diagnóstico específico de las infecciones por enterovirus es el cultivo en líneas celulares susceptibles. Ante una sospecha de infección por enterovirus, siempre que se pueda, se deben tomar muestras de

órgano afectado o fluido (líquido cefalorraquídeo, miocárdico y pericárdico, exudado faríngeo) y heces de cada paciente, ya que ello aumenta el porcentaje de aislamientos. Las muestras se deben transportar hasta el laboratorio refrigeradas (4°C) y es recomendable que sean almacenadas a temperaturas inferiores a -20 °C si no se procede a la inoculación inmediata de los cultivos (Kapsenberg, 1988). Para poder recuperar el máximo de tipos posibles de enterovirus, se deben inocular las muestras clínicas en distintas líneas celulares, y así aumentar la rentabilidad del cultivo. Sin embargo algunos serotipos (especialmente algunos virus coxsackie del grupo A) no pueden ser recuperados en líneas celulares, con lo que sería necesaria, en caso de sospecha, la inoculación de las muestras en ratones recién nacidos (Johnston y Siegel, 1990). Las heces son las muestras en las que se aíslan mayor número de enterovirus; sin embargo, el aislamiento únicamente a partir de heces no lo identifica necesariamente como el agente etiológico de la infección, pues estos virus pueden excretarse de forma asintomática hasta seis semanas después de haber adquirido la infección (Más y cols., 2003). El aislamiento de un enterovirus de un órgano afectado o fluido es una fuerte evidencia de asociación de enterovirus con el cuadro clínico, sin embargo los intentos de aislar un enterovirus de fluidos son frecuentemente insatisfactorios debido a bajos títulos virales en muestras clínicas (Rotbart y Romero, 1995; Andreoletti y cols., 1998).

Los enterovirus aislados son identificados clásicamente mediante la neutralización, que consiste en contrarrestar el efecto citopático sobre el cultivo mediante la utilización de un antisuero específico que impide la unión del virus a su receptor celular. La técnica se ha simplificado bastante con el desarrollo de mezclas de antisueros específicos de tipo, como la propuesta por Lim y Benyesh-Melnick (LBM), de manera que un antisuero concreto aparece en 1, 2 ó 3 mezclas. De esta forma, el enterovirus puede ser identificado por su patrón de neutralización, por la mezcla o mezclas que contienen su antisuero homotípico. (Melnick y Wimber, 1984; Bendig y Earl, 2005).

En ocasiones, es necesaria una tipificación molecular de la cepa. Para ello, se amplifica un fragmento del gen que codifica para la proteína mayoritaria de la

cápside VP1 y posteriormente se secuencia. El serotipo se obtiene tras la comparación de esta secuencia con las de cada una de las cepas prototipo de los enterovirus (Oberste y cols., 2000; Iturriza y cols., 2006).

La serología constituye un arma diagnóstica adicional para los enterovirus, aunque esta se complica por el gran número de serotipos, la respuesta humoral es frecuentemente heterotípica, y no se ha encontrado un grupo de antígenos que tiene una reactividad cruzada uniforme (Cherry J, 1998). La técnica recomendada para realizar la serología es la neutralización. Se necesitan muestras pareadas, la primera tomada tan precozmente como sea posible durante el curso de la infección, y la segunda de tres a cuatro semanas después. Las dos muestras se estudian simultáneamente utilizando varias diluciones del suero frente a una cantidad constante de virus. Un aumento de cuatro veces o más en el título de anticuerpos neutralizantes entre la muestra de suero en fase aguda y en la fase convalesciente es un criterio de diagnóstico clásico para una prueba de serología (Pallansch y Raymond, 2001).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) ha sido la técnica más prometedora en el campo de la biología molecular aplicada a la detección directa de los enterovirus por su rapidez y sensibilidad. El conocimiento de la existencia de fragmentos de secuencias nucleotídicas conservadas en la región 5' no codificadora del genoma de estos agentes ha permitido el diseño y empleo de cebadores universales para el género de enterovirus. Los primeros estudios realizados lograron la detección de aproximadamente 60 serotipos con la RCP a partir de muestras como exudados nasofaríngeos, heces y músculo cardíaco (Hyypiä y cols., 1989; Rotbart, 1990; Zooll y cols., 1992). Posteriormente se han desarrollado sistemas de RCP que permiten la amplificación de la totalidad de los serotipos de enterovirus (Halonen y cols., 1995). Otras muestras como aguas residuales, líquido cefalorraquídeo, líquido de vesículas, sangre total, linfocitos y líquido pericárdico han sido sometidos al diagnóstico virológico con esta técnica, la cual se ha valorado como de gran utilidad en la detección rápida de enterovirus en afecciones agudas y crónicas (Vuorinen y cols., 2003; Elfaitouri y cols., 2005; Subasic y Karamelic, 2006).

II.2 Diabetes Mellitus

II.2.1 Características generales

La diabetes mellitus es un síndrome metabólico heterogéneo caracterizado por hiperglucemia crónica como resultado de una deficiencia en la secreción de la hormona insulina o una insuficiente efectividad de su acción, que produce trastornos del metabolismo de los carbohidratos, proteínas y grasas. La hiperglucemia crónica se asocia con daño a largo plazo, disfunciones en varios órganos y tejidos, especialmente la retina (retinopatía con la probabilidad de pérdida de la visión), riñones (nefropatía que puede progresar hacia la insuficiencia renal), sistema nervioso (neuropatía periférica con el riesgo de producir úlceras en el pie, amputaciones, articulación de Charcot, y neuropatía autonómica), corazón y vasos sanguíneos (incremento en la ocurrencia de aterosclerosis, lo cual afecta la circulación del corazón, cerebro y sistema arterial periférico) (American Diabetes Association, 1997; 2005; Achenbach y cols., 2005). Los síntomas de la hiperglucemia incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso, algunas veces con polifagia, retraso en el crecimiento, visión borrosa, calambres musculares, cefalea y susceptibilidad a ciertas infecciones. Los extremos más peligrosos están representados por la hiperglucemia severa con cetoacidosis, al igual que el estado hiperosmolar no cetónico. La cetoacidosis se produce cuando el organismo empieza a utilizar las reservas de grasa por el fallo de la glucosa como fuente principal de energía lo que conduce a un aumento de los llamados cuerpos cetónicos en la sangre (American Diabetes Association, 1997; 2005). La mayoría de los casos de diabetes se agrupa en dos grandes categorías con disímiles características patogénicas: I) La diabetes mellitus tipo 1 también conocida como diabetes mellitus insulino dependiente o diabetes de inicio juvenil y II) la diabetes mellitus tipo 2 también llamada diabetes mellitus no insulino dependiente o diabetes de inicio maduro (Service y cols., 1997; Alberti y cols., 1998; Cabrera-Rode y cols., 1998; 2000; Maldonado y cols., 2003).

La diabetes tipo 1 representa solamente entre el 5 y 10 % de las personas con diabetes y es causada por una destrucción de las células β pancreáticas frecuentemente mediada por procesos de tipo autoinmune lo que produce una falla en la secreción de insulina y absoluta deficiencia de la misma. La diabetes tipo 1 exhibe una gran asociación con los genes HLA (Winter y cols., 2002; Pugliese y Eisenbarth, 2004).

Las personas con diabetes tipo 1 clásica se hacen dependientes de insulina para sobrevivir y están en riesgo de cetoacidosis. Se observa una disminución de las células β pancreáticas, así como infiltración linfocitaria en los islotes de Langerhans (acontecimiento denominado insulitis). Dependiendo de la sensibilidad a la insulina y la edad del paciente, la hiperglucemia sucede cuando el 80 al 90% de las células β han sido destruidas. Desafortunadamente el proceso de esta enfermedad es más agresivo en niños y adolescentes y la diabetes tipo 1 sigue siendo diagnosticada continuamente en edades jóvenes (Lernmark, 2005).

La diabetes tipo 2 abarca aproximadamente el 90% de la diabetes mellitas. Los individuos con este tipo de diabetes se caracterizan por tener una tendencia a la obesidad, generalmente no hay cetoacidosis y se trata fundamentalmente con dieta o hipoglucemiantes orales. Generalmente aparece después de los 35 años, aunque recientemente se ha observado a edades tempranas. La misma incluye individuos que tienen una resistencia a la insulina y los que usualmente tienen una deficiencia relativa de insulina. No se observa asociación con enfermedades autoinmunes y autoanticuerpos. Los procesos de destrucción autoinmune de las células β no están presentes, así como no exhibe una asociación con los genes HLA (Seelandt, 2007; Farag y cols., 2007; Green y cols., 2007). A continuación se describirán las principales características de la diabetes tipo 1 la cual será el motivo de nuestro trabajo.

II.2.2 Historia natural de la diabetes tipo 1

La historia natural de la diabetes tipo 1 consta de cuatro estadíos: I) Autoinmunidad preclínica contra las células β con un defecto progresivo de la secreción de insulina;

II) el diagnóstico clínico de la diabetes; III) el desarrollo de procesos de remisión transitoria; y IV) la diabetes establecida asociada a las complicaciones, así como una muerte prematura (Eisenbarth 2004).

El progreso hacia la diabetes por lo general de la siguiente forma. Como primer paso se supone que un agente ambiental (ciertos virus, algunos nutrientes en la dieta, ganancia de peso y estrés psicológico, entre otros) desencadene el inicio de la destrucción de las células β (Knip y Aklerblom, 1999; Bahillo y cols., 2006). Luego se asume que las células presentadoras engloban los antígenos pancreáticos de las células β destruidas; las cuales migran hacia los nódulos linfoides que drenan al páncreas, donde tiene lugar la presentación de los antígenos específicos de las células β de los islotes. Los linfocitos T CD4+ con el receptor de las células T reconocen los péptidos de las células β que se alojan en un surco (creado por el heterodímero) de la molécula HLA de clase II que puede entonces activar al linfocito y de esta forma iniciar la reacción autoinmune contra los islotes (Lernmark, 2005).

Como resultado de la activación de los linfocitos T y estimulación de los linfocitos B comienzan a producirse los anticuerpos contra las células de los islotes y contra los principales autoantígenos de las células β del páncreas, lo cual es seguido de una eventual pérdida de la primera fase de secreción de la insulina. Los anticuerpos pueden estar presentes en algunos individuos mucho más de una década antes del comienzo de la diabetes y está bien documentado que la combinación de estos anticuerpos predice la diabetes tipo 1 (Kulmala y cols., 2000; Eisenbarth 2004; Yu y Eisenbarth, 2004; Wasserfall y Atkinson, 2006). Después de haber desarrollado los anticuerpos, existe un segundo paso, en el cual tanto la genética como el factor ambiental pueden agravar la autoinmunidad contra los islotes (Pinkse y cols., 2005). Si observamos los islotes en el tejido obtenido de una biopsia pancreática de un paciente con diabetes tipo 1 de diagnóstico reciente se puede confirmar la presencia de un infiltrado compuesto por linfocitos T CD4 y CD8, linfocitos B y macrófagos lo cual sugiere que estas células tienen un papel en la destrucción de las células β que conduce a la diabetes tipo 1 (Devendra y cols., 2004; Barker y cols., 2005).

II.2.3 Autoinmunidad humoral

Actualmente la autoinmunidad en la diabetes tipo 1 es definida por la presencia de autoanticuerpos, porque su medición es segura y normalizada entre los laboratorios, en contraste con los marcadores de la inmunidad celular (Casu y cols., 2005). Existe un gran número de autoanticuerpos relacionados a la diabetes tipo 1, la mayoría de los cuales han sido observados en el plasma de individuos durante el período pre-diabético como son los anticuerpos anti-islotos pancreáticos (ICA), anti-insulina (AAI), anti-GAD65 (AGAD), anti-tirosina fosfatasa (AIA2), anti-37kD/40kD (64 kD no-GAD), anti-proinsulina y anti-carboxipeptidasa H (Rewers y cols., 2004). De ellos, los ICA, AAI, AGAD y AIA2 han sido los que más se han utilizados debido a que sus determinaciones han demostrado gran especificidad, sensibilidad y un alto valor predictivo en la detección de esta enfermedad (Schatz y cols., 2002; Mrena y cols., 2003; Barker y cols., 2004) (Tabla 3).

Tabla 3. Sensibilidad, especificidad y el valor predictivo de varios autoanticuerpos y sus combinaciones en hermanos sanos de niños diabéticos tipo 1.

Autoanticuepos	Sensibilidad %	Especificidad %	Valor predictivo positivo%
ICA	81	95	43
AAI	25	97	29
AGAD	69	96	42
AIA2	69	98	55
AGAD y AIA2	81	98	41
3 ó 4 anticuerpos	72	98	66

Fuente: Tomado de *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:3896-3902.

Anticuerpos antiislotos pancreáticos (ICA)

Los ICA fueron descubiertos por Bottazzo, Christensen y Doniach en 1974 en un grupo de pacientes con diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico y con distintos tipos de poliendocrinopatías, lo que originó que tomase valor la hipótesis del origen autoinmune de la diabetes tipo 1 (Botazzo y cols., 1974). Los ICA son los

autoanticuerpos que han recibido mayor atención en el estudio de los fenómenos inmunológicos en los pacientes con diabetes tipo 1; éstos son inmunoglobulinas de tipo IgG capaces de reaccionar con todas las células de los islotes de Langerhans (Winter y cols., 2002). Los resultados encontrados hasta el presente sugieren que los ICA constituyen un grupo de anticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos, algunos con especificidad para las células β (Pietropaolo y cols., 2005). En la actualidad se conoce la naturaleza de algunos de los antígenos reconocidos por los ICA: el gangliósido GM2 y/o glucolípidos (Cabrera-Rode y cols., 1992; Dotta y cols., 1995), la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD65) (Atkinson y cols., 1993), la proteína tirosina fosfatasa (ICA512/IA2) (Mansson y cols., 2001) y la insulina (Scott-Morgan y cols., 1988). Sin embargo, la estructura de otras moléculas reconocidas por los ICA continúa siendo un enigma (Korhonen y cols., 2002).

Desde la pasada década, se le ha dedicado gran atención a los ICA como posibles marcadores predictivos de la disfunción de las células β o de la inminencia de la diabetes tipo 1, ya que su presencia en el suero puede comprobarse varios años antes del inicio clínico de la enfermedad. Los ICA están presentes entre el 0,9 y 12,0% de los familiares de primer grado aparentemente sanos (padres, hermanos e hijos) de diabéticos tipo 1 (Korhonen y cols., 2002; Kukko y cols., 2006) y en los individuos sanos esta frecuencia es sólo de 0 – 1,6%. Se ha comprobado que la persistencia de positividad de los ICA es mucho más predictivo en el desarrollo clínico de la diabetes tipo 1 que su positividad intermitente (Kulmala y cols., 2000). Los resultados de estudios recientes sobre predicción de diabetes tipo 1 en familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 sugieren que los altos títulos de ICA (≥ 80 uJDF, siglas del inglés, U units Juvenil Diabetes Foundation) confieren un riesgo mucho mayor que los bajos títulos (< 20 uJDF) (Zamaklar y cols., 2002).

Cuando se establece el diagnóstico clínico de la diabetes tipo 1 en personas de origen caucásico la presencia de los ICA es de aproximadamente del 69% al 90% (Knip, 2002). En Cuba la frecuencia de este anticuerpo en los diabéticos al comienzo de la enfermedad es del 88% (Cabrera-Rode y cols., 1997).

Después que la diabetes tipo 1 se establece, la frecuencia de los ICA disminuye marcadamente y no más del 5 al 10% de los sujetos con diabetes tipo 1 continúan

siendo positivos para estos anticuerpos (Winter y cols., 2002). Se piensa que la persistencia de ICA por largo tiempo después del inicio clínico de la dependencia de insulina está relacionada con la presencia de células viables en los islotes. Una vez que el material antigénico en el páncreas esté completamente destruido, los ICA desaparecen (Ongangna y cols., 1997)

Anticuerpos antiinsulina (AAI)

Los AAI fueron descritos inicialmente en niños diabéticos recién diagnosticados, pero en la actualidad son considerados como marcadores adicionales en la identificación de sujetos con riesgo a desarrollar la enfermedad (Rewers y cols., 2004). Ziegler y colaboradores han sugerido que la combinación de los AAI con otros marcadores incrementan la posibilidad de predecir diabetes tipo 1 y señalan que, cuando se observan títulos de AAI mayores de 150 μ U/ml y de ICA superiores a 40 uJDF, el 100% de los sujetos desarrollan diabetes tipo 1 en un período de 5 años (Ziegler y cols., 1990). La mayoría de los estudios sugieren que los títulos de AAI tienen una relación inversamente proporcional con la edad, además de ser raramente detectados en adultos (Yu y Eisenbarth, 2004).

Los AAI están presentes entre el 1,3 y 3,7% de los familiares de primer grado aparentemente sanos (padres, hermanos e hijos) de diabéticos tipo 1 (Krischer y cols., 1993; Mrena y cols., 1999), en cambio, la frecuencia de estos anticuerpos en niños y adolescentes sanos con edades escolares de la población general varía entre el 0,36 al 2,0 % (LaGasse y cols., 2002; Schlosser y cols., 2002).

Anticuerpos contra la descarboxilasa del ácido glutámico (AGAD)

El antígeno 64 kD de los islotes ha sido identificado como la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) que convierte el ácido glutámico en ácido gamma aminobutírico. Aunque aparentemente está asociada a la membrana, la proteína 64 kD no tiene las propiedades típicas de una proteína integral de membrana y no puede ser identificada por marcaje en la superficie de las células de los islotes. Actualmente no existe duda de que los anticuerpos anti-

GAD y la reacción de las células T con el GAD están presentes en la diabetes tipo 1 (Guazzarotti y cols., 1995; Korhonen y cols., 2002).

Los AGAD son detectados en el 52-80% de los diabéticos tipo 1 autoinmune de diagnóstico reciente (Zanone y cols., 2003; Kawashima y cols., 2004). La frecuencia de este anticuerpo en los familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 oscila entre el 3,0 al 7,0% y en los niños y adolescentes sanos con edades escolares de la población general varía entre el 0.5 al 2.2% (Schmidli y cols., 1994).

Anticuerpos contra antígeno 2 asociado a insulinoma (AIA2)

La mayoría de los pacientes con diabetes tipo 1 presentan anticuerpos contra fragmentos trípticos de 40 y 50 kd derivados de una proteína tirosina fosfatasa específicamente identificada en las células β de los islotes pancreáticos denominada IA2. La función de esta molécula ha quedado como un misterio, pero recientemente se sugiere que juega un papel quizás en la secreción de insulina (Harashima y cols., 2005; Kubosaki y cols., 2005).

La molécula IA2 está constituida por un péptido señal, un dominio extracelular (aminoácidos 1-576), una región transmembrana (aminoácidos 577-600) y un dominio intracelular (aminoácidos 601-979). La misma está constituida por 979 aminoácidos y es codificada por un gen localizado en el cromosoma 2 (Notkins, 2002; Hu y cols., 2005).

Los principales determinantes antigénicos de la IA2 están localizados en el extremo carboxilo terminal del dominio intracelular (Farilla y cols., 2002). Los anticuerpos anti-IA2 se han detectado en un 54 al 86% de los sujetos diabéticos de diagnóstico reciente y oscila entre el 42 al 65% de los familiares de primer grado de pacientes con diabetes tipo 1 que posteriormente desarrollan diabetes (Chen y cols., 2005; Tiberti y cols., 2005). La frecuencia de anticuerpos anti-IA2 en los niños y adolescentes sanos con edades escolares de la población general varía entre el 0.6 al 2.6 % (Krischer y cols., 2003).

II.2.4 Genética de la diabetes tipo 1

Hasta la fecha no se ha identificado variante alélica alguna de ningún gen cuya presencia, por si sola, sea capaz de producir diabetes tipo 1 y por tanto se habla de una enfermedad poligénica, de patrón de herencia desconocido. Aunque múltiples genes están implicados, los genes HLA de clase II, son los más importantes. Existen también otros genes candidatos fuera de la región HLA que han sido identificados como de riesgo a desarrollar la enfermedad (Rewers y cols., 2004; Stene y cols., 2004). Alrededor del 90 al 95% de las personas con diabetes tipo 1 de origen caucásico tienen al menos HLA-DR3 y/o -DR4, o ambos antígenos (HLA-DR3/DR4), en comparación con el 45 al 55% de la población control (Marsh y cols., 2002). Aproximadamente el 30% de los sujetos con diabetes tipo 1 son heterocigóticos para HLA-DR3/DR4. El genotipo DR3/DR4 confiere un alto riesgo de diabetes con un sinergismo como modo de acción, seguido por DR4 y DR3 homocigótico, respectivamente. Como resultado del desarrollo de la tecnología del tipaje y de la secuenciación del ADN, se ha podido demostrar que el locus HLA-DQ es el de más fuerte asociación con la susceptibilidad a diabetes tipo 1. Este locus codifica para diversas variantes de la molécula HLA-DQ. En caucásicos, el heterodímero HLA-DQ (la cadena alfa designada DQA1 y la cadena beta DQB1) codifica para los alelos que tienen una mayor asociación con diabetes tipo 1 (DQA1*0301, DQB1*0302 y DQA1*0501, DQB1*0201). Estos alelos tienen un desequilibrio de unión (asociación no aleatoria) con los alelos HLA-DR4 y DR3 (Pugliese y Eisenbarth, 2004).

Los alelos HLA también confieren protección a diabetes. El más conocido alelo de “protección” es el DQB1*0602, usualmente encontrados en los haplotipos “DR2” (DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602). La protección que proporciona el haplotipo DQA1*0102-DQB1*0602 parece ser dominante, debido a que es protectoro aún en presencia de un haplotipo de alto riesgo en el mismo individuo (Redondo y cols., 2001). En la tabla 4 se muestran los genes HLA de clase II de susceptibilidad y resistencia a diabetes tipo 1 para poblaciones de origen caucásico.

Tabla 4. Riesgo para la diabetes autoimmune asociado a los alelos DR y DQ.

HLA-DR	DQA1	DQB1	DRB
Riesgo Elevado			
DR3	0501	0201	0301
DR4	0301	0302	0401
DR4	0301	0302	0405
Riesgo Moderado			
DR2	0102	0502	1601
DR4	0301	0302	0402
DR4	0301	0302	0404
DR8	0401	0402	0801
DR9	0301	0303	0901
Protección leve o moderada			
DR2	0103	0601	1502
DR4	0301	0302	0403
DR4	0301	0301	0401
DR4	0301	0303	0401
DR7	0201	0201	0701
Protección Fuerte			
DR2	0102	0602	1501
DR6	0101	0503	1401
DR7	0201	0303	0701

Fuente: Tomado de Immunology of Type 1 Diabetes, 2004.

La observación de conglomerados de familias con diabetes tipo 1 es un fuerte indicador que los factores genéticos están involucrados en la etiología de la diabetes tipo 1. La mayoría de los casos con diabetes tipo 1 de diagnóstico reciente (80 al 85%) es esporádica y no presenta historia familiar previa de diabetes. A pesar de esto, el riesgo a desarrollar diabetes y autoinmunidad pancreática en los familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 es mucho más elevado en comparación con la población en general (Redondo y cols., 2001).

El riesgo de diabetes tipo 1 autoimmune en la población general es del 0,4%, mientras que el riesgo de los hermanos de un individuo afectado es del 3 al 10% (Schatz y cols., 2002). El hijo de una madre con diabetes tipo 1 presenta un riesgo

del 1,4 al 4% a desarrollar diabetes y el riesgo que tiene el hijo de un padre con diabetes tipo 1 es mucho mayor y fluctúa entre el 6 y el 9%. Se ha informado que el riesgo a desarrollar la enfermedad en un hermano de un diabético tipo 1 es 15 veces más elevado que el de la población general (Pugliese y Eisenbarth, 2004). Las tasas de concordancia que han sido informadas para gemelos dicigóticos oscilan entre el 0 y el 13%, en cambio y para los gemelos monocigóticos las tasas de concordancia son del 21 al 70% (Petersen y cols., 1997; Hyttinen y cols., 2003). Los gemelos monocigóticos presentan un riesgo mucho mayor de progresar a diabetes tipo 1 y muestran más autoanticuerpos asociados a diabetes tipo 1 que los gemelos dicigóticos. Este dato reafirma la hipótesis del importante papel de los factores genéticos en la determinación de autoinmunidad pancreática. A pesar del comprometido efecto de los alelos asociados a diabetes tipo 1, es de destacar que la tasa de concordancia en los gemelos monocigóticos de diabéticos tipo 1 no es del 100% lo cual indica el papel que juegan los factores genéticos no germinales y el ambiente en el desarrollo de la diabetes tipo 1 (Redondo y cols., 2001).

II.2.5 Epidemiología de la diabetes tipo 1

La incidencia de la diabetes tipo 1 varía grandemente a nivel mundial (desde 0,1 a 37,4 x 100 000 individuos \leq 15 años por año) (Karvonen y cols., 2000) (Figura 2).

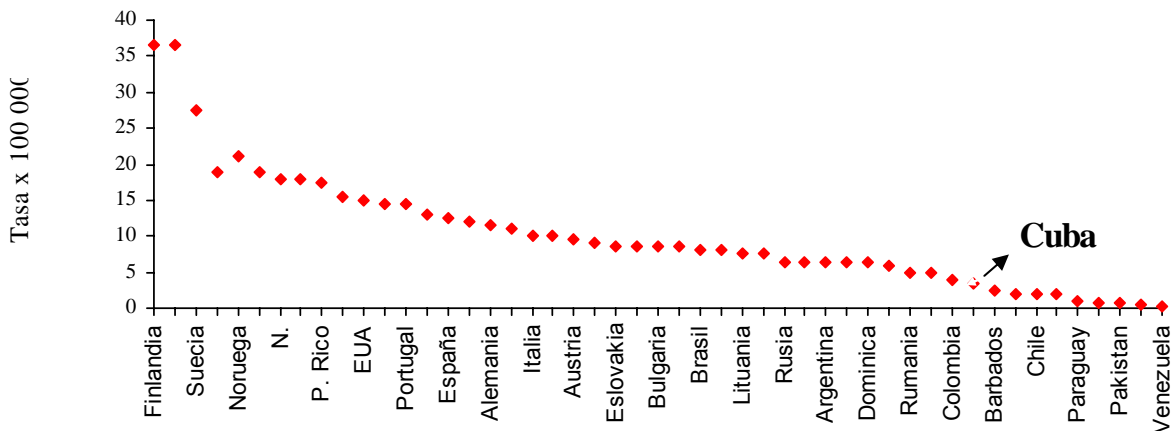


Figura 2. Incidencia de la diabetes tipo 1 en niños 0-14 años según país. 1990-1994.

Fuente: Tomado de *Diabetes Care* 2000;23:1516-1529.

Las poblaciones del norte de África presentan una tasa de incidencia intermedia de diabetes tipo 1. La mayoría de las poblaciones del continente asiático (26 de 29) tienen una muy baja o baja incidencia de diabetes tipo 1 (Haider y cols., 2000; Weintrop y cols., 2001; Diabetes atlas-Incidence, 2005;).

En un estudio multinacional realizado en distintos países europeos se demostró que la mitad de las poblaciones europeas (18 de 39) tienen una tasa de incidencia intermedia y el resto (21 de 39) presentan tasas altas o muy altas. Particularmente las tasas más altas de incidencia ocurren en la isla de Cerdeña en Italia y Finlandia (~37/100 000 por año) (Podar y cols., 2001). Otras poblaciones en Europa con tasas muy altas de incidencias son Suecia y Noruega (Karvonen y cols., 2000; Patterson y cols., 2001).

En todas las poblaciones de América del Norte las tasas de incidencias son altas y en algunas regiones de Canadá, la incidencia es particularmente elevada. La incidencia de diabetes tipo 1 entre las poblaciones en América del Sur está en el rango de intermedia a muy baja. Un hallazgo que hasta el momento no ha tenido explicación es el hecho de que las poblaciones de Puerto Rico e Islas Vírgenes presentan tasas de alta incidencia, y sin embargo el resto de las poblaciones de la América Central y el Caribe varían con tasas de incidencias intermedias y bajas (Serrano-Rio y cols., 1999; Karvonen y cols., 2000).

Ha sido postulado que la incidencia de diabetes tipo 1 aumenta cuando existe una mayor distancia del ecuador (Karvonen y cols., 2000; Rewers y cols., 2004), aunque algunos datos contradicen esta hipótesis. De hecho, Cerdeña, Puerto Rico y Kuwait son regiones con climas cálidos y a pesar de estar más cerca del ecuador presentan incidencias similares a la de los países del norte de Europa (Karvonen y cols., 2000; Rewers y cols., 2004). El diagnóstico de la diabetes tipo 1 en niños menores 15 años de edad presenta fluctuaciones estacionales con una menor incidencia en el verano y una mayor en otoño e invierno (Green y cols., 2001; Rewers y cols., 2004). Además, se han informado aumentos en las incidencias de la diabetes tipo 1 en poblaciones con una tasa de incidencia primaria baja que han emigrado hacia regiones de alta incidencia y viceversa (Serrano-Rios y cols., 1999; Feltbower y cols., 2002). En los últimos años, la

incidencia de la diabetes tipo 1 antes de los 15 años ha aumentado a nivel mundial y el incremento es particularmente mayor en las poblaciones de baja incidencia (Onkamo y col., 1999; Karvonen y cols., 2000; Gale, 2002).

Las razones que justifican esta variación global de la incidencia de la diabetes tipo 1 entre los distintos grupos étnicos no se conocen con certeza, pero se especula que pudiera ser el resultado de la interacción de los genes de susceptibilidad con diferentes factores ambientales como pueden ser productos químicos, toxinas y factores nutricionales, factores psicosociales y las infecciones (Muntoni y cols., 2000; Akerblom y cols., 2002; Virtanen y Knip, 2003, Holick, 2004)

II.3 Asociación enterovirus y diabetes tipo 1

II.3.1 Evidencias serológicas y moleculares

Las primeras evidencias sobre la posible asociación entre infección por enterovirus y diabetes tipo 1 provienen de estudios serológicos realizados hace más de 40 años (Gamble y cols., 1969). Varias investigaciones realizadas desde 1969 hasta la fecha han demostrado una mayor frecuencia de anticuerpos contra enterovirus en diabéticos tipo 1 con relación a individuos controles (Green y cols., 2004; van der Werf y cols, 2007).

Los hallazgos serológicos más consistentes han sido los publicados por un grupo de investigadores suecos, los cuales encontraron presencia de anticuerpos tipo IgM a CVB en diabéticos tipo 1 al comienzo clínico de la enfermedad y una ausencia completa de estos anticuerpos en niños controles pareados en cuanto a edad, sexo y fecha de la toma de muestra (Frisk y cols., 1985; 1992).

En la tabla 5A hacemos una recopilación de todos los estudios serológicos de casos y controles publicados en la literatura donde se ha encontrado asociación entre infección por enterovirus el desarrollo de la diabetes tipo 1. No obstante, en nuestra revisión también encontramos estudios donde tal asociación no ha podido ser confirmada (Tabla 5B).

Tabla 5. Resultados de los estudios serológicos realizados sobre la posible asociación de los enterovirus con la diabetes tipo 1.

B) Asociación positiva entre infección (es) por enterovirus y diabetes mellitus tipo 1.

Ref/año	País	casos/ controles	Edad (años)	Serotipos evaluados	Prueba usada
Gamble y cols., 1969	Inglaterra	123/250	0-60	CV A2, A5, A10, A16, CVB3–B5	FC, Nt
Gamble y cols., 1973	Inglaterra	162/319	0-20	CV B1–B5	Nt
Huff y cols., 1974	EUA	9/36	4 -13	CV B1–B6	Nt
King y cols., 1983	Inglaterra	28/290	3-14	CV B1–B6	Nt
Banatvala y cols., 1985	Inglaterra	38/98	<15	CV B1–B5	IgM, Elisa
Banatvala y cols., 1985	Austria	72/82	<15	CV B1–B5	IgM, Elisa
Banatvala y cols., 1985	Australia	12/24	2-12	CV B1–B5	IgM, Elisa
Frisk y cols., 1992	Suecia	23/46	<15	CV B1–B5	IgM RIE
Helfand y cols., 1995	EUA	128/120	<18	E4, 6, 9, 11, 30, 34, EV71.	IgM Elisa

A) Ausencia de asociación entre infección (es) por enterovirus y diabetes mellitus tipo 1.

Ref/ año	País	casos/ controles	Edad (años)	Serotipos evaluados	Prueba usada
Nelson y cols., 1975	Inglaterra	49/49	7-63	CV B1–B5	Nt
Schmidt y cols., 1978	Alemania	81/80	1-54	CV B1–B5	HA IgM IgG
Orchard y cols., 1983	EUA	175/67	<15	CV B1–B6	IgM IF
Palmer y cols., 1982	EUA	33/33	<15	CV B3–B5	Nt, FC
Tuvemo y cols., 1989	Suecia	98/94	0-14	CV B1–B6	IgM, RIE
Hadden y cols., 1972	Inglaterra	34/121	15-63	CV B1–B6	Nt

Leyenda:

EUA, Estados Unidos de América; CVAs, Coxsackievirus A; CVBs, Coxsackievirus B; FC, Fijación del complemento; ELISA, Ensayo Inmunoenzimático; Nt, Neutralización; RT-RCP, Reverso Transcriptasa- Reacción en Cadena de la Polimerasa; RIE, Radioinmunoensayo; IF, Immunofluorescencia; HA, Hemoaglutinación.

Fuente: Tomado de *Diabet Med* 2004; 21:507-14.

Aunque las evidencias serológicas no son convincentes para aprobar la asociación entre infección por enterovirus y diabetes tipo 1, dicha relación ha sido respaldada por otros estudios que han empleado técnicas más sensibles como la detección de genomas de enterovirus mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Oberste y cols., 2003).

Diferentes grupos de investigadores trabajando en forma independiente han demostrado una mayor presencia de ARN de enterovirus en suero o sangre de diabéticos tipo 1 al comienzo clínico de la enfermedad en comparación con sujetos controles (Foy y cols., 1995; Andreoletti y cols., 1997; Tuvemo y cols., 2001; Coutant y cols., 2002; Yin y cols., 2002; Craig y cols., 2003; Dahlquist y cols., 2004; Moya-Suri y cols., 2005). En algunos de estos estudios se incluyó además la búsqueda de ARN de enterovirus en individuos positivos y negativos para anticuerpos asociados a diabetes tipo 1. En tales investigaciones, los sujetos con autoanticuerpos relacionados con la diabetes tipo 1 mostraron mayor frecuencia de ARN de enterovirus que sus controles e individuos sin estos autoanticuerpos (Yin y cols., 2002; Moya-Suri y cols., 2005).

La detección del genoma de enterovirus en la mayoría de los estudios mencionados se ha realizado empleando cebadores específicos de la región 5' no codificadora la cual es una zona altamente conservada entre todos los miembros del género de los enterovirus. Aunque la secuenciación de esta parte del genoma viral proporciona solo una vaga idea del serotipo viral, el análisis de la secuencia de los amplicones obtenidos de esta región ha revelado la presencia de coxsackievirus del grupo B. Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos en la mayoría de los estudios serológicos descritos anteriormente que detectan un incremento de anticuerpos contra coxsackievirus en diabéticos tipo 1 al comienzo clínico de la diabetes (Clements y cols., 1995; Andreoletti y cols., 1997; Chehadeh y cols., 2000).

No obstante debemos señalar que, de forma similar a lo acontecido con los estudios serológicos, algunos investigadores también han fallado en detectar asociación entre enterovirus y diabetes empleado métodos moleculares de detección viral (Graves y cols., 2003). Por otra parte y en contraste con el

aparente suceso que ha sido la detección de ARN de enterovirus de suero o sangre de pacientes diabéticos, la mayoría de los intentos realizados para detectar genomas de enterovirus en páncreas humanos post mortem no han sido exitosos (Foulis y cols., 1990; 1997; Buesa-Gomez y cols., 1994; Foy y cols., 1994). Un estudio realizado por Ylipaasto y colaboradores en Finlandia es la única investigación hasta el momento donde se ha podido demostrar la presencia de ARN de enterovirus en los islotes pancreáticos de siete niños que fallecieron de una infección fatal por coxsackievirus, así como de cuatro pacientes que fallecieron a causa de diabetes (Ylipaasto y cols., 2004).

II.3.2 Evidencias epidemiológicas

Se han acumulado diferentes evidencias epidemiológicas que sugieren que los enterovirus pueden estar involucrados en el desarrollo de la diabetes tipo 1. Estudios internacionales muestran que los picos anuales de enfermedades por enterovirus (Agosto-Septiembre) (Morens y Pallansch, 1995), preceden al período de mayor incidencia de aparición de diabetes tipo 1 (Octubre-Enero) (Hyöty y Taylor, 2002; Knip y cols., 2005). Muchos estudios realizados tanto en el hemisferio norte como en el sur han confirmado esta observación y en algunos de ellos ha sido demostrado un incremento en la incidencia de diabetes tipo 1 después de epidemias causadas por enterovirus (Glenson y cols., 1982).

El estudio realizado por Wagenknecht y colaboradores en 1991 donde se demuestra una asociación entre un brote de CVB5 ocurrido en Alabama, Estados Unidos, durante los meses de junio y octubre de 1983 y un incremento posterior en la incidencia de diabetes tipo 1, ofrece el mejor ejemplo descrito sobre la influencia de la infección por enterovirus en la variación estacional de la diabetes tipo 1. Esta investigación reveló que la incidencia promedio anual de diabetes tipo 1 en Alabama para el período de 1979-1988 fue relativamente estable (11,7/100 000 habitantes por año) con excepción de los años 1983-1984 en los cuales se observó un pico en la incidencia de la diabetes tipo 1 (18,4/100 000 habitantes por año), correspondiendo temporalmente este hecho a la ocurrencia de la epidemia

de meningoencefalitis por CVB5. Es de destacar que el pico de incidencia de la diabetes ocurrió a los dos meses después del pico de incidencia de los casos de meningoencefalitis (Wagenknecht y cols., 1991).

Un hallazgo llamativo es que en Polonia el número de casos de diabetes tipo 1 aumentó considerable después de una epidemia de meningoencefalitis por CVB5 que también tuvo lugar en 1983. En ese año la incidencia de diabetes en Polonia (6,6/100 000 habitantes) fue el doble de la informada en los 12 años anteriores (3,5/100 000 habitantes) (Rewers y cols., 1987).

Datos como estos sugieren que la influencia de un factor ambiental similar debió ser el responsable de las “epidemias” de diabetes tipo 1 acontecidas en diferentes poblaciones en el mismo período de tiempo. Por ello no resultaría sorprendente que la circulación de CVB5, el cual tiene una distribución mundial, haya sido el factor ambiental común responsable del cambio en la incidencia en la diabetes tipo 1 en estas dos regiones del mundo geográficamente distantes (Rewers y Atkinson, 1995).

La evidencia más fuerte que existe en la literatura sobre asociación de los enterovirus con el desarrollo de diabetes tipo 1 fue el aislamiento de un CVB4 del páncreas de un niño de 10 años de edad fallecido con cetoacidosis. Antes de fallecer el niño tenía un título elevado de anticuerpos contra CVB4 por lo que es poco probable que el aislamiento haya sido una contaminación de laboratorio. El virus aislado fue inoculado en ratones y estos desarrollaron hiperglucemia y necrosis en las células de los islotes. Los virus pudieron ser recuperados de las células β productoras de insulina murina, con lo cual se demostraban los postulados de Kochs (Yoon y cols., 1979; See y Tilles, 1998).

Otras evidencias indicativas de posible asociación de los enterovirus con la diabetes tipo 1 incluyen el informe de un caso fallecido de miocarditis y diabetes en el que se detectó antígenos de CVB4 en los islotes pancreáticos y altos niveles de anticuerpos contra CVB4 en el suero, así como el desarrollo de síntomas de diabetes en una joven a los 10 días de haber sufrido una infección por CVB5 (Jun y Yoon, 2002).

Smith y su grupo de trabajo en Inglaterra describen la manifestación de diabetes tipo 1 en gemelos de 14 meses de edad en los cuales hubo evidencias de infección por enterovirus. El diagnóstico de diabetes se realizó en los gemelos con un intervalo de 12 días entre uno y otro. Los estudios virológicos revelaron que ambos niños estuvieron infectados por E6 al momento del diagnóstico de la diabetes y no habían sufrido infecciones previas con otros enterovirus (Smith y cols., 1998). También se ha documentado el comienzo simultáneo de la diabetes en una madre y su hijo lo cual fue coincidente con una infección por enterovirus. El resultado de tal estudio demostró que todos los miembros de la familia estuvieron infectados por enterovirus al momento del diagnóstico de la diabetes en la madre e hijo. Este estudio sugiere que la infección probablemente se haya obtenido de una fuente común dentro de la familia y que la misma fuera el evento precipitante de la diabetes en dos de los miembros de la misma (Hindersson y cols., 2005).

A partir de los estudios prospectivos sobre la exposición viral en individuos con alto riesgo de diabetes tipo 1 realizados en Finlandia ha ganado más credibilidad la idea de que los enterovirus pueden estar asociados con esta enfermedad. El primer estudio prospectivo (DiMe, Childhood Diabetes) se realizó durante los años 1987 a 1993 y consistió en una serie de tres grandes investigaciones. En el primer grupo de estas investigaciones se analizaron madres desde el embarazo hasta que su descendencia desarrolló diabetes tipo 1 y madres controles cuyos hijos no desarrollaron diabetes. El segundo grupo de investigaciones consistió de una cohorte de familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 que fueron seguidos hasta que manifestaron daños subclínicos de las células β o diabetes clínicamente manifiesta y un grupo control de familiares que se mantuvieron sin manifestar diabetes durante la observación prospectiva. El tercer grupo comprendió una serie de estudios caso-control donde se analizaron individuos con diagnóstico reciente de diabetes y niños controles (Hyoty y cols., 1995).

En estos estudios se demostró tanto por métodos serológicos como moleculares que la infección por enterovirus durante el embarazo estuvo asociada con la posterior aparición de la diabetes tipo 1 en niños antes de los tres años de edad. Estos resultados sugieren que desde etapas tan tempranas como el embarazo, las

infecciones por enterovirus pueden iniciar los procesos autoinmunes que conducen a la diabetes (Roivainen y cols., 1998). También se demostró que individuos inicialmente no diabéticos, que manifestaron daños subclínicos de células β o diagnóstico de diabetes tipo 1 durante la observación prospectiva, adquirieron infecciones por enterovirus con mayor frecuencia que los controles que se mantuvieron sin indicios de enfermedad. Además la infección por enterovirus parece coincidir con un incremento en los autoanticuerpos asociados a diabetes tipo 1 o al inicio de la enfermedad clínica (Hiltunen y cols., 1997).

Estos hallazgos fueron confirmados en un segundo estudio prospectivo (DIPP, Finish Diabetes Prediction and Prevention Trial) que fue iniciado en Finlandia en 1994. En esta oportunidad un grupo de niños con alto riesgo de desarrollar diabetes tipo 1 fueron seguidos desde el nacimiento hasta los dos años de edad en búsqueda de anticuerpos asociados a diabetes tipo 1. En concordancia con el estudio anterior, se demostró una asociación temporal entre la infección por enterovirus y la aparición de autoanticuerpos. La frecuencia de infecciones por enterovirus durante todo el período de observación prospectiva fue mayor en niños que presentaron respuesta autoinmune contra las células β que los niños controles pareados según edad, sexo y alelos HLA DQB asociados a diabetes tipo 1 (Lonnrot y cols., 1998; Kupila y cols., 2001; Sadeharju y cols., 2001; Salminen y cols., 2003; 2004).

II.3.3 Posibles mecanismos de participación de los enterovirus en la patogénesis de la diabetes tipo 1

Varios mecanismos que no son mutuamente excluyentes han sido sugeridos para explicar como una infección viral podría inducir diabetes tipo 1 (Drescher y cols., 2004; Hinderson y cols., 2005; Lammi y cols., 2005).

Uno de los mecanismos propuestos ha sido la destrucción directa de las células β pancreáticas mediante una infección citolítica aguda sin mediación de una respuesta autoinmune (Haverkos y cols., 2003). Sin embargo, por lo general el proceso de destrucción pancreática es pausado, progresivo y puede prolongarse

por algunos años antes de la manifestación clínica de la enfermedad por lo que este mecanismo parece ser incompatible con el período prediabético de la autoinmunidad que precede la diabetes tipo 1. Por tanto, es probable que el mismo pueda explicar la patogenia solamente en aquellos casos que progresan a diabetes tipo 1 sin autoinmunidad (Orchard y cols., 1983; Jun y Yoon, 2002). Investigadores Japoneses han confirmado que algunos pacientes con diabetes tipo 1 exhiben una nueva forma de la enfermedad, denominada diabetes tipo 1 fulminante, la cual no es causada por la respuesta inmune contra el páncreas (Imagawa y cols., 2000; Fenkci y cols., 2005). Recientemente los mismos investigadores han demostrado la presencia de altos títulos de anticuerpos IgA contra los enterovirus en pacientes con diabetes tipo 1 fulminante sin autoanticuerpos asociados a diabetes tipo 1 (Imagawa y cols., 2005). Resulta de interés señalar que el virus de la encefalomiocarditis, que constituye el modelo mejor caracterizado de la diabetes inducida por virus en ratones, produce una infección aguda de las células β pancreáticas y diabetes y su severidad se corresponde con el grado de destrucción de las células β . En este modelo no hay evidencias que este virus desencadene la autoinmunidad humoral de las células β , pues se ha demostrado la ausencia de anticuerpos contra los islotes del páncreas (Hayashi y cols., 1974; Jun y Yoon, 2002).

Los resultados de los estudios realizados con autopsias de páncreas humano y cultivos de islotes humanos apoyan la idea de que los enterovirus pueden alcanzar los islotes pancreáticos durante la infección sistémica y causar daño de las células β de una forma directa (Roivainen, 2006). Sin embargo, con excepción de algunos casos, la mayoría de los casos de diabetes tipo 1 no parece ser el resultado de una destrucción directa de las células β por enterovirus (Jun y Yoon, 2002). De esta manera, la destrucción indirecta de las células β por una respuesta autoinmune inducida por enterovirus es el mecanismo patogénico más aceptado. Conceptualmente existen dos posibles mecanismos de acción: el que recurre a la reactividad cruzada entre el virus y los antígenos pancreáticos propios y el que se basa en los trastornos de inmunorreactividad que causa la infección (Maclaren y Alkinson, 1997; Varela-Calvino y Peakman, 2003).

El concepto de similitud molecular (mimetismo molecular) propone que identidad de secuencias o estructuras entre virus y determinantes autoantigénicos pueden conllevar a una reactividad cruzada funcional de células B y T (anti-virus con anti-huésped) resultando en un daño del tejido y la perpetuación de la respuesta autoimmune (Harkonen y cols., 2003; Amedei y cols., 2003; Fujinami y cols., 2006). La primera evidencia que hizo pensar en la similitud molecular como un posible mecanismo involucrado en la patogénesis de la diabetes tipo 1 fue el hallazgo en 1992 de una identidad de seis aminoácidos entre la proteína no estructural 2C del CVB4 y el autoantígeno pancreático GAD65 (Kaufman y cols., 1992). Los avances obtenidos en la secuenciación nucleotídica del genoma de los enterovirus han permitido demostrar que la secuencia de la proteína 2C que muestra homología con la GAD 65 es altamente conservada en los miembros del grupo B de los enterovirus (Hovi, 1998; Oberste y cols., 2006) (Figura 3).

GRUPO GENÉTICO	GAD65 P2C	F	K	M	F	P	E	V	K	E	K	G	M	A
		B	CVB4 -2C	V	K	I	L	P	E	V	K	E	K	H
B	CVB1-2C	V	K	I	L	P	E	V	K	E	K	H	E	F
B	CVB3-2C	V	K	I	L	P	E	V	K	E	K	H	E	F
B	CVB5-2C	V	K	I	L	P	E	V	K	E	K	H	E	F
B	E4-2C	V	K	I	L	P	E	V	K	E	K	H	E	F
B	E11-2C	V	K	I	L	P	E	V	K	E	K	H	E	F
B	E12-2C	V	K	I	L	P	E	V	K	E	K	H	E	F
B	E16-2C	V	K	I	L	P	E	V	K	E	K	H	E	F
B	E30-2C	V	K	I	L	P	E	V	K	E	K	H	E	F
A	CVA2-2C	V	K	I	I	P	E	A	K	D	K	V	E	F
A	CVA16-2C	E	R	I	I	P	E	A	K	D	K	V	E	F
C	CVA24-2C	E	K	I	I	P	A	A	K	E	K	V	E	F
D	E70-2C	T	K	I	L	P	E	A	R	E	K	H	E	F
POLIO	PV1-2C	E	K	I	I	P	Q	A	R	D	K	L	E	F
POLIO	PV2-2C	E	K	I	I	P	Q	A	R	D	K	L	E	F
POLIO	PV3-2C	E	K	I	I	P	Q	A	R	D	K	L	E	F

Figura 3. Secuencia aminoacídica entre la GAD 65 humana y la proteína 2C de varios enterovirus. Las áreas en gris representan la identidad de 6 aminoácidos.

Fuente: Tomado de Diabetología 1998;41:40-6.

De estos datos podemos suponer que además de los CVB4, otros serotipos del grupo B de los enterovirus pudieran participar en la patogénesis de la diabetes mediante este mecanismo (Vreugdenhil y cols., 1998; 1999). Se han sugerido además la existencia de similitud molecular entre otras proteínas de los CVB con autoantígenos de las células β pancreáticas como la IA2 y HSP60 (siglas del inglés Heat Shock Protein). La región carboxilo terminal de la IA2 tiene una homología de 5 aminoácidos con una región conservada de la proteína VP1 de los CVB4 la cual es un epítope inmunogénico tanto para las células B y como las células T. La región inmunogénica de HSP60 comparte una homología de secuencias con regiones de las proteínas capsídicas VP0 y VP1 de CVB4 y CVA9 (Harkonen y cols., 2000; 2002). Sin embargo, hasta el momento la mayoría de los trabajos en esta área no han podido esclarecer de manera convincente si esta similitud molecular tiene relevancia desde el punto de vista funcional.

El otro mecanismo es la activación inespecífica, conocido en inglés como activación bystander, el cual propone que los patógenos socavan la autotolerancia sin entrar en juego la especificidad antigénica (Achenbach y cols., 2005; Lammi y cols., 2005; Fujinami y cols., 2006). Ellos pueden lograrlo mediante varias vías: I) Los enterovirus durante la infección pueden acceder a las células β y causar citólisis lo cual pudiera producir la exposición de antígenos pancreáticos propios hasta el momento ocultos para el sistema inmune lo que incrementa su visibilidad y abundancia, II) atrayendo y potenciando las células presentadoras de antígeno en el cual un componente clave es la activación de células dendríticas o perturbando el equilibrio de las citoquinas en el contexto de la inflamación asociada a la infección (Kramer y cols., 2007).

En este escenario se produce la activación no específica de células T autorreactivas que han escapado a la selección tímica, adquieren un patrón Th1 y se convierten en patogénicas como resultado de la respuesta inflamatoria inducida por los virus (Varela- Calvino y Peakman, 2003).

Varela Calvino y colaboradores han estudiado el efecto in vitro de células infectadas y destruidas por enterovirus sobre las células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos humanos. Ellos han encontrado que miembros del grupo

de los enterovirus humanos son capaces de inducir moléculas co-estimuladoras y citoquinas pro-inflamatorias provocando la activación de células dendríticas. De acuerdo a esta experiencia este grupo de investigadores han propuesto que la generación de autoinmunidad contra las células β pancreáticas pudiera depender de la capacidad de los enterovirus de inducir activación innata proinflamatoria (Varela- Calvino y Peakman, 2003). El daño de las células β del páncreas como resultado de reacciones inflamatorias producidas por enterovirus ha sido apoyado por el hallazgo de un incremento de las concentraciones séricas de $INF\alpha$ en diabéticos tipo 1 de reciente diagnóstico en los cuales se ha podido demostrar presencia de ARN de enterovirus (Chehadeh y cols., 2000).

La importancia de la activación “bystander” en el contexto de la diabetes tipo 1 ha sido también sustentada por los resultados obtenidos de los estudios realizados en modelos animales donde la destrucción de las células β pancreáticas murinas ha sido generada mediante células T autoreactivas que son activadas en respuesta a la producción de citoquinas proinflamatorias después de la infección por CVB (Wen y cols., 2000; Horwitz y cols., 1998; 2001; 2002; Wong y Wen, 2004).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Anticuerpos asociados a diabetes tipo 1 en individuos infectados por echovirus 16 y echovirus 30

III.1.1 Universo de estudio

Fueron seleccionadas dos grandes epidemias de meningoencefalitis ocurridas en Cuba. La epidemia ocurrida en el período de abril a septiembre del año 2000 causada por el echovirus 16 (E16) y la epidemia de echovirus 30 (E30) ocurrida entre los meses de junio a noviembre del año 2001 (Sarmiento, 2004).

Para conocer si la infección por ambos virus está asociada con la inducción de marcadores humorales del proceso de destrucción autoinmune de las células β pancreáticas fueron tomados 38 pacientes (rango de edad desde 11 a 156 meses, 86 ± 49 ; media \pm desviación estándar) hospitalizados de 11 provincias del país con síntomas clínicos de meningoencefalitis durante la epidemia de E16 así como 8 pacientes hospitalizados (rango de edad desde 11 a 156 meses, $55,4 \pm 49,4$; media \pm desviación estándar) procedentes de seis provincias cubanas durante la epidemia de E30.

Las manifestaciones clínicas predominantes en los niños seleccionados fueron vómitos (91,5%), cefalea (88,1%) y fiebre (72,8%). Algunos de estos pacientes manifestaron diarreas (11,8%) y rash cutáneo (6,8%). Ninguno de ellos presentaba alteraciones de los niveles de glucosa en ayunas al momento de las obtención de las muestras, ni antecedentes personales de diabetes tipo 1.

Por cada uno de los pacientes en estudio fueron seleccionados dos individuos controles a partir de 300 individuos sin antecedentes de meningoencefalitis que formaban parte de la vigilancia seroepidemiológica de sarampión, rubéola y

parotiditis del país durante los años 2000-2001. La base de datos correspondiente a esta vigilancia recoge datos relativos a nombre, edad, sexo, fecha de toma de muestra, dirección, lugar de residencia y posible diagnóstico clínico. Esta información nos permitió revisar que estos individuos no eran diabéticos ni tenían historia familiar de diabetes. Los mismos fueron pareados en cuanto a edad, sexo y lugar de residencia en relación con los niños que padecieron la infección durante las epidemias. En total se seleccionaron 80 individuos controles durante la epidemia de E16 (rango de edad desde 11 a 153 meses, 88 ± 47 ; media \pm desviación estándar) y 20 individuos controles (rango de edad desde 11 a 156 meses, $55,1 \pm 44,5$; media \pm desviación estándar) durante la epidemia de E30.

III.1.2 Muestras

De cada uno de los pacientes fueron obtenidas muestras de heces y sueros pareados (fase aguda y convaleciente de la infección). Los sueros en la fase aguda fueron obtenidos a los cinco/ cinco a seis (mediana/ rango) días después de iniciada la infección (al momento de los síntomas clínicos). Los sueros de la fase convaleciente fueron obtenidos a los 30/ 29 a 35 (mediana/ rango) días después de comenzada la infección (cuando los pacientes se recuperaron completamente). De cada uno de los individuos controles se tomó una muestra de suero que se correspondió con la fecha de la toma de muestra del suero de fase convaleciente de los pacientes.

III.1.3 Determinación de marcadores de infección viral

Se realizó aislamiento e identificación viral a partir de las muestras de heces y serología mediante la determinación de anticuerpos neutralizantes en las muestras de suero

Aislamiento viral

Se realizó una suspensión de heces al 10% (peso/volumen) en medio esencial mínimo (MEM) (Sigma) con sulfato de neomicina (Sigma) al 0,2%. Se agitó en

vortex (Genie) durante un minuto y se clarificó por centrifugación (centrífuga Sigma) a 10 000 gravedades (g) durante 10 minutos. Se tomaron 900 μ L del sobrenadante y se mezclaron con 100 μ L de cloroformo (Sigma). La mezcla se agitó durante cinco minutos y se centrifugó como en el paso anterior. Se extrajo el sobrenadante listo para inocular en los cultivos celulares.

Para el aislamiento viral se utilizaron las células de línea de riñón de mono verde africano adulto normal *Cercopithecus aetiops* (Vero), en el rango de 130-145 pases procedentes de la American Type Culture Collection (American Type Culture Collection, 1992) y las células diploides de fibroblasto de pulmón embrionario humano (PHuE-1) en el rango de 17-21 pases, obtenidas y aportadas por el laboratorio de cultivo celular del Instituto "Pedro Kourí " (IPK) (Castillo y Morier, 1992).

Las líneas celulares se recibieron en tubos de poliestireno de 16x125 mm (Corning-Costar) con monocapa confluyente en medio MEM conteniendo suero bovino fetal (SBF) (Eurobio) al 10% para favorecer el crecimiento celular, sulfato de neomicina al 0,2% (Sigma), y pH 7,2 ajustado con bicarbonato de sodio al 1% (Sigma). Previo a la inoculación se cambió el medio de crecimiento por medio de mantenimiento suplementado con 2% de SBF (Eurobio).

Se inocularon por duplicado 200 μ L de cada suspensión de heces en ambas líneas celulares. Como controles celulares se dejaron dos tubos de cada línea celular sin inocular. Se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 4% (Incubadora Sanyo). Los tubos del cultivo celular se observaron diariamente durante siete días en un microscopio invertido (Olympus), en busca de efecto citopático (ECP) característico de enterovirus (células redondeadas, refringentes, desprendimiento celular y alcalinización del medio).

Los tubos del cultivo celular que mostraron ECP se congelaron y descongelaron y se subcultivaron, observándose diariamente y se realizaron además dos pases a ciegas (Melnick y cols., 1979; 1996). Si el ECP se mantenía en los subcultivos se procedió a la identificación viral. Se consideró negativa toda muestra que no exhibió un ECP típico en dos pases consecutivos.

Identificación viral

Los aislamientos con ECP característicos de una infección por enterovirus, fueron identificadas por la técnica de neutralización del ECP, previamente determinados los 100 TCID₅₀ (del inglés, tissue culture infective dose) de las cepas aisladas por el método de Reed y Muench (Melnick y cols, 1979; 1996). La identificación se realizó con sueros equinos hiperinmunes a enterovirus (A-H), según el esquema de Lim Benyesh-Melnick (LBM) que permite identificar 42 serotipos diferentes (Melnick y cols., 1973; Melnick y Winber 1984). Se tomaron 25µL de cada uno de los sueros hiperinmunes a 50 unidades neutralizantes y se mezclaron por separado con 25µL de la dilución del virus a identificar que contenía 100 TCID₅₀. Las mezclas virus-sueros se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 4% (Incubadora Sanyo) durante 2 horas. También se incubó 25 µL de la dilución de trabajo del virus con 25 µL de medio de cultivo (control viral). Transcurrido el tiempo de incubación las muestras se inocularon en una placa de 96 pocillos y fondo plano (Corning-Costar) con monocapa confluyente de células Vero, previo cambio de medio de crecimiento por el de mantenimiento. Se incubó a 37°C en atmósfera de CO₂ al 4% (Incubadora Sanyo) por un período de cinco días. Los pocillos que no contienen mezcla de virus-suero se utilizan como control celular. Se realizó la observación diaria del cultivo en microscopio invertido (Olympus) y cuando el control de virus mostró ECP del 75%, se procedió a la lectura de la prueba de acuerdo con el esquema de LBM (Melnick y Winber, 1984).

Anticuerpos neutralizantes

Se realizó la determinación de anticuerpos neutralizantes contra los principales serotipos de enterovirus que han circulado en Cuba en los últimos 30 años: echovirus (E4, E6, E9, E11, E16, E30) y coxsackievirus (CVA9, CVB1, CVB2, CVB3, CVB4, CVB5, CVB6) según los métodos recomendados por la OMS (World Health Organization, 2001) con modificaciones que consistieron en el uso de diluciones seriadas al doble de suero comenzando con 1:10 hasta 1:320.

Se mezclaron 25 μ L de cada una de las diluciones de los sueros con 25 μ L de los virus a las 100 TCID₅₀ (rango 32-320 TCID₅₀) previamente determinados según el método de Reed y Muench (Melnick y cols, 1979; 1996). Las mezclas de virus-sueros se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 4% (Incubadora Sanyo) durante dos horas. Transcurrido el tiempo de incubación las muestras se inocularon en una placa de 96 pocillos y fondo plano (Corning-Costar) con monocapa confluyente de células Vero, previo cambio de medio de crecimiento por el de mantenimiento. Se incubó a 37°C en atmósfera de CO₂ al 4%, (Incubadora Sanyo) por un período de cinco días. De cada suero se hicieron dos repeticiones. Cada lote de prueba se acompañó de los siguientes controles: control de células, control de toxicidad del suero, control de dosis de cada virus y control de titulación utilizando un suero de referencia validado con el control internacional.

Se consideraron positivos aquellos sueros en los que el título de anticuerpos neutralizantes resultó ser mayor o igual que 1:10. El título neutralizante del suero se definió como la mayor dilución del suero que neutraliza la infectividad del virus. Como criterio de seroconversión se consideraron aquellos casos donde ocurrió un incremento de cuatro veces (dos logaritmos) o más del título de anticuerpos del segundo suero (fase convaleciente) con respecto al primero (fase aguda). Los casos que tuvieron títulos menores que el valor de corte (1:10) en la fase aguda fueron considerados positivos cuando el segundo suero correspondiente resultó ser al menos el doble del valor de corte ($\geq 1:20$) (Melnick y cols., 1979).

III.1.4 Determinación de marcadores humorales de autoinmunidad pancreática: Anticuerpos asociados a diabetes tipo 1

A todos los sueros se les realizó las determinaciones de anticuerpos contra todas las células de los islotes pancreáticos (ICA) y contra los tres principales autoantígenos de los islotes del páncreas: antiinsulina (AAI), antidescarboxilasa del ácido glutámico (AGAD) y contra la porción intracelular de una proteína tirosina fosfatasa relacionada con la molécula IA2 (AIA2).

Anticuerpos anti-islotos (ICA)

Los ICA se determinaron por el método de inmunofluorescencia indirecta modificado con incubación prolongada (18 h) a 4°C en presencia de un inhibidor de proteasas (Botazzo y cols., 1974; Pilcher y Elliot, 1990).

Se prepararon portaobjetos gelatinizados, para lo cual se calentó la gelatina (gelatina tipo A de piel de cerdo, Sigma, USA) a 60°C, sumergiendo los portaobjetos en la misma durante siete segundos y secándolos a temperatura ambiente por 24 horas. Para la determinación de ICA se utilizó páncreas de cadáver de grupo sanguíneo O con un tiempo de isquemia de 50 minutos (tiempo desde la muerte hasta la congelación). El tejido se cortó en fragmentos de 1 cm² que se conservaron en tubos de congelación a -70°C hasta el momento de su utilización. Se realizaron cortes al bloque de páncreas para obtener las secciones pancreáticas de cinco micras de espesor en un criostato a una temperatura de -25°C.

Estos cortes se colocaron sobre los portaobjetos previamente gelatinizados, durante 20 minutos a temperatura ambiente. A cada corte de tejido pancreático se le añadió 30 µL del suero de los sujetos a evaluar. En cada experimento se utilizó un suero control positivo de 80 uJDF donado por los talleres internacionales de mejoramiento de la determinación de los ICA y un suero control negativo conocido. Todos los sueros se adicionaron a las láminas diluidos 1:2, con una solución del inhibidor de proteasas (Inhprot I, obtenido en la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana) a una concentración de 400 UI/ml en tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4, y se incubaron durante 18 horas a 4°C.

Se decantó el exceso de suero y se lavó con PBS en agitación durante 15 minutos. A continuación, se añadió a cada corte 30 µL del conjugado anti-IgG humana marcado con isotiocianato de fluoresceína (Kallestad, Austin, Tx, USA), diluido previamente en PBS a una concentración de 1:64. Se realizó una segunda incubación durante 30 minutos en cámara húmeda en la oscuridad y temperatura ambiente. Se repitieron una vez más las mismas operaciones de lavado y secado

previamente descritas. Finalmente, a cada sección pancreática se le colocó un cubreobjeto y una gota de glicerol-PBS.

La lectura se realizó en un microscopio de epifluorescencia (Leitz) ocular 10x y objetivo 40x de aumento por parte de dos lectores experimentados de manera independiente. Cuando las lecturas fueron discordantes con respecto a la muestra se repitió de nuevo la determinación. Se consideró como ICA positivo la fluorescencia citoplasmática de tres a cinco islotes de Langerhans por campo al observarse el tejido al microscopio. Todas las muestras ICA positivas fueron expresadas en unidades JDF comparando la dilución final de cada suero con una curva patrón de dilución usando el suero control positivo.

Para la titulación de los ICA se partió de una dilución de 1:2 que equivale a 10 uJDF y a continuación se realizaron diluciones dobles y sucesivas hasta conseguir agotar el título. Los títulos de ICA iguales o mayores de 10 uJDF se consideraron positivos. Valores superiores a 40 uJDF en el título de ICA fueron considerados como de alto título. El método empleado por el laboratorio donde fueron realizadas estas determinaciones (lab 274, La Habana, Cuba) mostró una sensibilidad de 75% y especificidad de 75% en el Octavo taller internacional de mejoramiento del ICA realizado en 1993 organizado por la Universidad de la Florida, USA.

Autoanticuerpos antiinsulina (AAI)

Los AAI fueron detectados por la técnica de radio-ligando competitiva e incubación prolongada, descrita por Vardi y colaboradores la cual mide la cantidad de insulina marcada que es capaz de unirse a anticuerpos en un volumen de suero (Vardi y cols., 1987). En tubos cuadruplicados se añadieron 150 μ L de la muestra de suero, a dos de ellos se le añadió 50 μ l de PBS y a los otros dos el tampón conteniendo insulina humana (Humulin R) a una concentración de 9 nU/mL (PBS-Ins.). Se agitó durante 60 segundos y se incubó a 4°C durante una hora. Se añadieron 200 μ L de insulina marcada con Iodo 125 (I^{125} , actividad específica 150 μ Cl/ μ g) en PBS y se incubó a 4°C durante siete días. La precipitación del complejo anticuerpo-insulina ocurrió al añadir 1 mL de polietilenglicol 8000 (PEG) (BDH) al

14,3% en tampón barbital (pH 8,7). Se agitó 60 durante segundos y se centrifugó (Centrífuga Sigma) a 1 200-1 400 g por 30 minutos a 4°C. Luego se aspiró el sobrenadante y se repitió este paso dos veces, lavando el precipitado con 1 mL de PEG (BDH) al 11,0%. Posteriormente, se realizó el conteo de la radioactividad del precipitado (cpm) durante 5 minutos en un contador de radiaciones gamma (LKB-Wallack). Los cálculos se realizaron de la siguiente forma:

$$\% \text{ Unión} = \frac{(\text{cpm de la muestra} - \text{cpm fondo}) \times 100}{\text{cpm Total}}$$

Una vez calculado el porcentaje (%) de unión para cada muestra (PBS con y sin insulina), se calculó el incremento determinando la diferencia del porcentaje de unión ($\Delta = \% \text{ PBS} - \% \text{ PBS-Ins}$) y esto se multiplicó por un factor para expresarlo en nU/mL.

$$\text{nU/mL} = \frac{\Delta \% \times 10\,000}{100}$$

En el cuarto taller de diabetes para el mejoramiento de los AAI celebrado en 1994 en la Universidad de la Florida se demostró que el método empleado por el laboratorio donde se realizaron estas determinaciones (lab 232, La Habana, Cuba) obtuvo 100% de especificidad y 43% de sensibilidad. Se consideraron positivos aquellos sujetos que presentaron valores superiores a 40 nU/mL, el cual fue establecido como el 99 percentil de la concentración detectada en 100 individuos sanos sin historia de diabetes tipo 1 (Cabrera-Rode y cols., 1997).

Anticuerpos anti-GAD 65 (AGAD)

Los anticuerpos contra la isoforma 64KD de la proteína descarboxilasa del ácido glutámico se detectaron por la técnica de radioinmunoprecipitación tipo “sándwich”, empleando un juego de reactivos comercial (Inmunotech SAS, Francia) (Schmidli y cols., 1995). Se tomaron 20µL del suero problema y sueros controles tanto positivos (contiene anticuerpos anti-GAD65) como negativos (no contiene anticuerpos anti-GAD65) y se mezclaron por separado con 50µL de GAD65 humana recombinante marcada con I¹²⁵. La mezcla se agitó durante 20 segundos y se incubó a 18-25°C durante dos horas (tiempo suficiente para que ocurra la

reacción antígeno-anticuerpo). Posteriormente se adicionó 50 μ L de suspensión de proteína A-sepharosa (componente que tiene la capacidad de unirse a la región Fc de la IgG), se agitó durante 60 segundos y se incubó a 18-25 $^{\circ}$ C durante 1 hora (tiempo suficiente para que ocurra la combinación de la proteína A con cualquier complejo antígeno-anticuerpo que se haya formado en el paso anterior y facilitar la separación de la GAD65 libre de la unida a los anticuerpos). A continuación se centrifugó (Centrifuga Sigma) A 1 500 g por dos minutos a 2-8 $^{\circ}$ C. Luego se aspiró el sobrenadante y se procedió al conteo de la reactividad del precipitado durante cinco minutos en un contador de radiaciones gamma (LKB-Wallack).

Los valores fueron calculados mediante interpolación de una curva patrón obtenida con sueros controles positivos conocidos (0 a 300 U/mL), siendo la radioactividad proporcional a la concentración de anticuerpos anti-GAD65 presentes en la muestra. La sensibilidad analítica del ensayo (Inmunotech SAS) es de 0,2 U/mL y permite reconocer solamente los anticuerpos anti-GAD65 presentes en la muestra.

Estudios previos realizados en 200 sujetos cubanos normales sin historia familiar de diabetes han demostrado que el 99,5% presentaba una concentración de AGAD menor de 1 U/mL (Cabrera-Rode y cols., 1997). De esta manera, valores superiores a 1 U/mL de anticuerpos anti-GAD65 se consideraron como positivos

Anticuerpos antitirosina fosfatasa (AIA2)

Las determinaciones de los anticuerpos anti-IA2 se realizaron por la técnica de radioinmunoprecipitación tipo “sándwich”, empleando un juego de reactivos comercial (Inmunotech SAS, Francia) (Bonifacio y cols., 1995). Se tomaron 20 μ L del suero problema y sueros controles tanto positivos (contiene anticuerpos anti-IA2) como negativos (no contiene anticuerpos anti-IA2) y se mezclaron por separado con 50 μ L de GAD65 humana recombinante marcada con I¹²⁵. La mezcla se agitó durante 20 segundos y se incubó a 18-25 $^{\circ}$ C durante dos horas (tiempo suficiente para que ocurra la reacción antígeno-anticuerpo). Posteriormente se adicionó 50 μ L de suspensión de proteína A-sepharosa (componente que tiene la capacidad de unirse a la región Fc de la IgG), se agitó durante 60 segundos y se incubó a 18-

25°C durante una hora (tiempo suficiente para que ocurra la combinación de la proteína A con cualquier complejo antígeno -anticuerpo que se haya formado en el paso anterior y facilitar la separación de la IA2 libre de la unida a los anticuerpos). A continuación se centrifugó (Centrifuga Sigma) A 1 500 g por dos minutos a 2-8°C. Luego se aspiró el sobrenadante y se procedió al conteo de la reactividad del precipitado durante cinco minutos en un contador de radiaciones gamma (LKB-Wallack). Los valores fueron calculados mediante interpolación de una curva estándar obtenida con sueros controles positivos conocidos (0 a 50 U/mL), siendo la radioactividad proporcional a la concentración de anticuerpos anti-IA2 presentes en la muestra. La sensibilidad analítica del ensayo (Inmunotech SAS) es de 0,1 U/mL y permite reconocer solamente los anticuerpos anti-IA2 presentes en la muestra. Estudios previos realizados en 200 sujetos cubanos normales sin historia familiar de diabetes han demostrado que el 100% presentaba una concentración de AIA2 menor de 1 U/mL (Cabrera-Rode y cols., 1997). De esta manera, valores superiores a 1 U/mL de anticuerpos anti-IA2 se consideraron como positivos.

III.1.5 Anticuerpos anti-microsomales tiroideos (AMT) y anti-gástricos parietales (AGP)

Las determinaciones de AMT y AGP se realizaron solamente a los sujetos infectados, con el fin de demostrar la actividad pancreatotóxica específica de la infección. Las determinaciones de AMT y AGP se realizaron por la técnica de inmunofluorescencia indirecta descrita anteriormente empleando como sustrato tiroides congelados proveniente de tiroidectomía de grupo sanguíneo O del bocio de un paciente con enfermedad de Graves y estómago de ratas Wistar, respectivamente (Pilcher y Elliot, 1990). Se consideraron sujetos positivos para AMT y AGP cuando presentaron fluorescencia a partir de las diluciones 1:4 y 1:10 de los sueros, respectivamente. Estudios previos han demostrado que la frecuencia de AMT y AGP mediante dicha técnica en un grupo de 100 individuos sanos sin historia de diabetes fue de 4% y 1%, respectivamente (Cabrera-Rode y cols., 1997).

III.1.6 Glucemia, hemoglobina glicosidada (HbA1) y péptido C

La glucosa en ayunas se determinó por el método de glucosa oxidasa (Trinder, 1969) y se consideraron normales los valores menores de 6,1 mmol/L. La hemoglobina glicosidada (HbA1) se determinó por el método de separación por resina de intercambio iónico (Human Gesellschaft, Germany) (Fluckiger y Winterhalter; 1976; Ezcurra, 1986). Valores normales fueron considerados entre 4,5% y 7,0%. Las concentraciones de péptido C en ayunas se determinaron por la técnica de radioinmunoensayo en fase sólida (CIS bio internacional). Valores normales fueron considerados entre 1,07-3,51 ng/mL.

III.1.7 Tipaje HLA.

El tipaje HLA-clase II (DR/DQ) de baja resolución se realizó por PCR-SSP (siglas del inglés: Polimerase Chain Reaction – Sequence Specific Primer) de acuerdo a la metodología descrita por Bunce (Bunce, 2000).

III.1.8 Análisis estadístico.

Las diferencias entre las frecuencias de los grupos se analizaron por la prueba de Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher según corresponda (GraphPadInPrism Versión 4,0, 2003). Se consideró significativa una probabilidad $p < 0,05$. La prueba de correlación de rangos de Spearman's se aplicó para comparar el grado de correlación entre los niveles de anticuerpos contra el E16 e ICA.

III.2 Presencia de ARN de enterovirus en diabéticos tipo 1 de diagnóstico reciente y en familiares de primer grado de diabéticos tipo 1

III.2.1 Universo de estudio

Se analizaron 322 muestras de sueros que fueron divididos en cuatro grupos de estudio.

I) 34 muestras de suero de diabéticos tipo 1 (13 masculinos/21 femeninos, entre 1 a 15 años de edad, $7,3 \pm 4,5$ años; media \pm desviación estándar). Las muestras de suero de este grupo de pacientes fueron tomadas de 0 a 10 días ($0,78 \pm 2,4$ días; media \pm desviación) después del diagnóstico clínico de la diabetes.

II) 32 muestras de suero de familiares de primer grado (madre, padre, hermano/a, hijo/a) de diabéticos tipo 1 (18 masculinos/14 femeninos, entre 1 a 46 años de edad, $13,5 \pm 9,5$ años; media \pm desviación estándar) que poseen autoinmunidad humoral específica (positivos para ICA) hacia el páncreas endocrino.

III) 62 muestras de suero de familiares de primer grado (madre, padre, hermano/a, hijo/a) de diabéticos tipo 1 (30 masculinos/32 femeninos, entre 2 a 47 años de edad, $13,3 \pm 9,6$ años; media \pm desviación estándar) sin autoinmunidad humoral específica (negativos para ICA) hacia el páncreas endocrino.

Todos sueros correspondientes a los grupos de estudio I, II y III fueron seleccionados del banco de sueros del departamento de inmunología del Instituto Nacional de Endocrinología.

IV) 194 muestras de sueros de individuos saludables (92 masculinos/102 femeninos, entre 1 a 47 años de edad, $11,0 \pm 8,4$ años media \pm desviación estándar) los cuales fueron verificados como negativos para ICA y empleados como grupo control. Por cada uno de los sueros de los grupos I y II fueron seleccionados 2 sueros controles (68 sueros para el grupo I y 64 sueros para el grupo II) mientras que para las 62 muestras de suero del grupo III se seleccionaron la misma cantidad de sueros controles.

Estos sueros fueron tomados del banco de sueros del IPK correspondiente a la vigilancia seroepidemiológica de sarampión, rubéola y parotiditis del país durante los años 2005-2007, los cuales se corresponden con el período en que fueron seleccionadas las muestras problemas. La base de datos de esta vigilancia recoge los datos relativos a nombre, edad, sexo, fecha de toma de muestra, dirección, lugar de residencia y posible diagnóstico clínico. Esta información nos permitió revisar que estos individuos no eran diabéticos o familiares de primer grado de diabéticos tipo 1. Los mismos fueron pareados en cuanto a edad, sexo, lugar de

residencia y fecha de toma de la muestra en relación con los individuos de los grupos I, II y III.

III.2.2 Extracción de ARN

Se tomaron 250µL de la muestra de suero y se les añadió 750µL de TRIZOL (Life Technologies, Gibco BRL; Grand Island, N.Y., USA). Esta mezcla se agitó y se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente. Terminado este tiempo, se le adicionaron 200µL de cloroformo (Sigma), se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 10 000 g (Centrifuga Sigma), durante 15 minutos, a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo eppendorf, se le agregaron 500µL de isopropanol (Sigma) y 1µL de precipitante (paint pellet) (Novagen) y se incubó, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Concluida la incubación, se centrifugó a 10 000 g (Centrifuga Sigma), durante 10 minutos, a 4°C. La fase acuosa se desechó y al precipitado obtenido se le adicionó 1 mL de etanol (BDH) al 75%, se mezcló y se centrifugó a 10 000 g (Centrifuga Sigma), durante cinco minutos a 4°C. Después de eliminar todo el etanol residual, el precipitado se dejó secar completamente a temperatura ambiente. El material seco se resuspendió en 50µL de agua tratada con dietilpirocarbonato (Sigma).

III.2.3 Cebadores

Se emplearon cebadores que hibridan con sitios altamente conservados dentro de la región 5' no codificadora del genoma de los enterovirus, los cuales fueron sintetizados en el Centro para el Control de las Enfermedades (CDC) de Atlanta, Estados Unidos por el método de β-cianoetil-fosforamidite (Sinha y cols., 1984), usando sintetizador automático. La secuencia de los cebadores y la ubicación en el genoma se muestran en la tabla 6. El uso de cebadores EV/RCP-1 y EV/RCP-2 generan fragmentos de 153 pares de bases (Halonen y cols., 1995) mientras que la combinación de los cebadores EV/RCP-2 y EV/RCP-3 generan fragmentos de 114 pares de bases (Yang y cols., 1992).

Tabla 6. Secuencia y ubicación en el genoma de los cebadores.

Código	Posición	Secuencia
EV/RCP-1	(577-596)	5' ATTGTCACCATAAGCAGCCA 3'
EV/RCP-2	(444-468)	5' TCCGGCCCCCTGAATGCGGCTAATCC-3'
EV/RCP-3	(531-557)	5'ACACGGACACCCAAAGTAGTCGGTTCC-3'

Fuente: *J Clin Microbiol* 1995;33:648-53 y *Virus Res* 1992;24:277-96.

III.2.4 Reacción de amplificación

La reacción de amplificación se realizó empleando un método de Reverso Transcripción y la Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada (RT-N-RCP) altamente sensible (0,01 TCID₅₀) y específico para el género de los enterovirus (Kilpatrick y cols., 1998; Sarmiento y cols., 2000). Para la primera ronda de amplificación se tomaron 100ng de los cebadores EV/RCP-1 y EV/RCP-2 y se adicionaron a una mezcla de reacción, preparada en un volumen de 50µL, que contiene tampón de amplificación 10X [Tris HCl 67mM pH 8,8 (Sigma), NH₄SO₄ 17 mM (Sigma), EDTA 6µM (Sigma), MgCl₂ 2mM (Sigma), 2-mercaptoetanol, 1mM (Sigma)], 100µM de cada deoxinucleótido trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), 5 U de inhibidor de Rnasa (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis IN), 1,6 U de Transcriptasa Inversa AMV (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis IN), 1,26 U de Taq ADN Polimerasa (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis IN). A cada tubo de reacción se le añadió 5µL de ARN previamente extraído. Los tubos se colocaron en un termociclador (Modelo PTC 100TM. MJ Research, Inc.) con el siguiente programa:

- 42°C, 20 minutos (Reacción de transcripción reversa).
 - 95°C, 3 minutos (Inactivación de la transcriptasa inversa).
 - 95°C, 45 segundos (Desnaturalización del ADN).
 - 55°C, 45 segundos (Hibridación de los cebadores).
 - 70°C, 45 segundos (Extensión).
 - 70°C, 5 minutos (Extensión prolongada).
- } 30 ciclos.

Para la RCP anidada se tomó 1 μ L de la reacción de amplificación anterior y se adicionó a una mezcla de reacción, preparada en un volumen de 50 μ L, que contenía tampón de amplificación 10X [Tris HCl 67mM pH 8,8 (Sigma), NH₄SO₄ 17 mM (Sigma), EDTA 6 μ M (Sigma), MgCl₂ 2mM (Sigma), 2-mercaptoetanol, 1mM (Sigma)], 100 μ M de cada deoxinucleótido trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), 1,26 U de Taq ADN Polimerasa (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis IN) y 100 ng de los cebadores EV/RCP-2 y EV/RCP-3. La mezcla de reacción fue sometida a 30 ciclos a las temperaturas de 94⁰C, 55⁰C y 72⁰C por 45 segundos cada uno en un termociclador (Modelo PTC 100TM. MJ Research, Inc.). Como control negativo de cada ensayo se empleó como muestra agua libre de ARNasa que se sometió a las mismas condiciones de amplificación que las muestras de suero. Para la realización de este ensayo, se tuvieron en cuenta todas las medidas necesarias para evitar las contaminaciones de la RCP, como son: la utilización de puntas con barreras, guantes, así como de materiales nuevos y estériles. El empleo de distintos locales para hacer los pasos de extracción de ADN, la primera y la segunda reacción de amplificación, y la corrida electroforética entre otras (Kwok y Higuchi, 1989; Kitchin y Bootman, 1993, Sarmiento y cols., 1999).

Para chequear el producto amplificado se tomaron 10 μ L del producto de la RCP y se les añadieron 2 μ L del colorante bromofenol azul (Sigma). La mezcla se sometió a corrida electroforética en gel de agarosa (Sigma) al 4% en buffer TBE (Tris-Borato 0,09M (Sigma), EDTA 2mM (Sigma), pH 8. La tinción de los geles se realizó con una solución de bromuro de etidio (Sigma), a una concentración final de 0,1-0,2 μ g/mL. Para observar las bandas de amplificación, se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta (Spectroline). Se empleo como marcador de peso molecular el marcador V (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis IN).

III.2.5 Pruebas bioquímicas

La detección de cetonas en orina se realizó a todos los diabéticos tipo 1 al comienzo clínico de la enfermedad previo a la administración de insulina

(Maldonado y cols. 2003). Para conocer el grado de cetoacidosis se realizaron las determinaciones de bicarbonato y pH en sangre. La cetoacidosis severa se definió como aquella que presentara concentraciones de bicarbonato $<5\text{mmol/L}$ y $\text{pH}<7,1$ y la cetoacidosis moderada como aquella que presentara concentraciones de bicarbonato entre $5\text{-}15\text{ mmol/L}$ y $\text{pH } 7,1\text{-}7,3$ (Craig y cols., 2003; Maldonado y cols., 2003).

III.2.6 Análisis demográfico

La posible influencia de la edad en los resultados del RT-N-RCP en los diabéticos tipo 1 al comienzo clínico de la enfermedad y familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 fue analizado usando como valor de corte las edades 5 y 15 años respectivamente. La presencia de ARN de enterovirus entre los grupos también fue analizado por sexo y color de la piel.

III.2.7 Análisis estadístico

Para determinar diferencias de frecuencia entre grupos se utilizó la prueba exacta de Fisher (GraphPadInPrism Versión 4,0, 2003). Se consideró significativa una probabilidad $p<0,05$.

III.3 Evaluación de la reactividad cruzada de la respuesta inmune humoral inducida por diferentes serotipos de enterovirus en conejos frente a los principales antígenos de las células β pancreáticas humanas

III.3.1 Virus

Se emplearon las cepas de echovirus (E1, E2, E3, E4, E6, E9, E11, E16, E30), y coxsackievirus (CVA9, CVA7, CVA16, CVA24, CVB1, CVB3, CVB5, CVB6) que han sido aisladas e identificadas a partir de muestras de heces de pacientes en el laboratorio de enterovirus del IPK. Las cepas de E16 y E30 empleadas fueron aisladas durante las epidemias de meningoencefalitis del 2000 y 2001 mencionadas en el acápite III.1.

III.3.2 Preparación de antígenos

Para la preparación de los antígenos virales se utilizaron frascos Roux (Corning-Costar) con monocapa confluyente de células Vero, en el rango de 130-145 pases y células de línea de carcinoma laríngeo humano (Hep-2) en un rango de 44-54 pases conteniendo 10% de SBF (Eurobio), sulfato de neomicina (Sigma) al 0,2% y bicarbonato de sodio (Sigma) al 1% para ajustar el pH a 7,2. Ambas líneas celulares fueron procedentes de la American Type Culture Collection (American Type Culture Collection, 1992).

La cepa de CVA24 se inoculó en la línea celular Hep-2 y el resto de las cepas virales se inocularon en células Vero, previo cambio del medio de crecimiento por el medio de mantenimiento suplementado con 2% de SBF (Eurobio). Los cultivos se incubaron a 37⁰C y se observaron hasta la aparición del ECP característico. Posteriormente los frascos se sometieron a tres ciclos de congelación a -70⁰C y descongelación a 37⁰C para garantizar la ruptura de las membranas celulares y la liberación de los virus al medio. Los restos celulares se precipitaron mediante centrifugación a 1 000 g por 20 minutos a 4⁰C (Centrifuga Sigma). El sobrenadante se trató con cloroformo (Sigma) y luego de una centrifugación a 10 000 g por 5 minutos (Centrifuga Sigma), el sobrenadante quedó listo para ser utilizado como antígeno viral (Más y cols, 1997). Se prepararon además dos antígenos a partir de las células Vero y Hep-2 sin inocular.

III.3.3 Obtención de los sueros hiperinmunes

Cada suero hiperinmunes se obtuvo a partir de la inoculación de un conejo blanco adultos Nueva Zelanda con el antígeno viral. El esquema de inmunización consistió en 5 dosis intravenosas de 15 mL cada una conteniendo 100 TCID₅₀ de los antígenos virales en los días 0, 7, 30, 40, y 90. Se realizó sangramiento siete días después de la última inyección. Para la obtención del suero la sangre total se dejó reposar a 37⁰C durante una hora y se incubó toda la noche a 4⁰C. Posteriormente se centrifugó 1 000 g por 20 minutos a 4⁰C (centrifuga Sigma) y se obtuvo la fase acuosa (Más y cols., 1997). Se obtuvieron además sueros controles

a partir de la inmunización de dos conejos con los antígenos preparados a partir de las células Vero y Hep2 sin inocular, así como sueros obtenidos de cada uno de los conejos previo a la inmunización con sus correspondientes antígenos.

III.3.4 Anticuerpos neutralizantes contra enterovirus

La determinación del título de anticuerpos neutralizantes contra enterovirus en los sueros hiperinmunes se realizó según los métodos recomendados por la OMS (World Health Organization, 2001) con modificaciones que consistieron en el uso de diluciones seriadas al doble de suero comenzando con 1:100 hasta 12 800. Los sueros con títulos superiores a 1:12 800, se les repitió la determinación de anticuerpos empleando diluciones desde 1:12 800 hasta 1:163 840 0.

Se tomaron 25 µL de cada una de las diluciones de los sueros y se mezclaron por separado con 25 µL de los virus a las 100 TCID₅₀ (rango 32-320 TCID₅₀) previamente determinados según el método de Reed y Muench (Melnick y cols, 1979; 1996). Las mezclas de virus-sueros se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 4% durante dos horas (Incubadora Sanyo). Transcurrido el tiempo de incubación las muestras se inocularon en una placa de 96 pocillos y fondo plano (Corning-Costar) con monocapa confluyente de células Vero o Hep-2 según el tipo de virus, previo cambio de medio de crecimiento por el de mantenimiento. Se incubó a 37°C en atmósfera de CO₂ al 4%, (Incubadora Sanyo) por un período de cinco días. De cada suero se hicieron dos repeticiones. Cada lote de prueba se acompañó de los siguientes controles: control de células, control de toxicidad del suero y control de dosis de cada virus.

III.3.5 Anticuerpos contra los principales autoantígenos de los islotes pancreáticos humanos¹

La determinación de AGAD, AAI, AIA2 en los sueros de conejo se realizó como fue descrito en el acápite III.1.4.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. 1 Anticuerpos asociados a diabetes tipo 1 en individuos infectados por echovirus 16 y echovirus 30

El E16 fue aislado tanto en cultivo de células Vero como PhuE-1 a partir de las heces del 38,8% de los niños con meningoencefalitis que fueron seleccionados para el estudio durante la epidemia del año 2000. En el 55,2% de los sueros de estos pacientes se demostró un aumento significativo del título de anticuerpos neutralizantes contra la cepa aislada. El título promedio geométrico de los sueros de fase aguda y convaleciente fue de 1:3,4 y 1:22,4, respectivamente (Tabla 7A).

De los niños seleccionados de la epidemia de meningoencefalitis del año 2001 fue posible aislar el E30 en el 87% de las heces estudiadas en ambos sistemas celulares. Todos los sueros de estos pacientes mostraron un aumento significativo del título de anticuerpos neutralizantes contra la cepa aislada. El título promedio geométrico de los sueros de fase aguda y convaleciente fue de 1:14,1 y 1:113,1, respectivamente (Tabla 7B).

Tabla 7. Título promedio geométrico de anticuerpos neutralizantes contra diferentes serotipos de enterovirus.

A) Sueros seleccionados durante la epidemia de meningoencefalitis por E16 del año 2000

Fase	CVB1	CVB2	CVB3	CVB4	CVB5	CVB6	CVA9	E4	E6	E9	E11	E16	E30
1	3,5	19,9	27,7	8,9	11,4	1,7	65,2	1,3	9,4	23,7	10,9	3,4	9,8
2	3,9	13,5	25,9	9,3	6,2	1,7	70,4	1,4	10,0	27,2	11,5	22,4*	10,2

B) Sueros seleccionados durante la epidemia de meningoencefalitis por E30 del año 2001

Fase	CVB1	CVB2	CVB3	CVB4	CVB5	CVB6	CVA9	E4	E6	E9	E11	E16	E30
1	4,7	16,3	21,8	5,1	6,1	3,9	67,2	2,2	12,6	33,7	18,3	6,9	14,1
2	4,7	23,7	28,2	5,6	8,2	4,2	80,0	2,9	14,9	47,5	23,8	8,1	113,1*

Leyenda:

Fase 1: Infección aguda

Fase 2: Convalecencia de la infección

* Aumento de más de 4 veces el título de anticuerpos neutralizantes entre la fase aguda y convaleciente

Ningún otro agente viral fue aislado de estos pacientes durante ambas epidemias y los títulos de anticuerpos neutralizantes a E16 y E30 en el grupo control fueron menores de 1:10 en todos los casos. Estos resultados permiten corroborar que los individuos seleccionados para el estudio fueron infectados por E16 y E30 durante las epidemias del 2000 y 2001, respectivamente.

El desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra ambos virus se relacionó con la aparición de anticuerpos contra antígenos de los islotes pancreáticos, siendo significativamente superior la presencia de estos autoanticuerpos en la fase de convalecencia en relación a la fase aguda de la infección (Tabla 8 A, B). Estos resultados sugieren que la infección viral en estos individuos está asociada con la inducción de autoinmunidad contra las células β pancreáticas.

Las muestras de sueros controles que fueron serológicamente verificados como negativos para los anticuerpos neutralizantes contra ambos virus no tuvieron presencia de anticuerpos contra antígenos de los islotes pancreáticos (Tabla 8 A, B). Solamente se encontró positividad para AGAD en uno de los sueros controles de la epidemia de E16, siendo este hallazgo similar a la prevalencia de AGAD reportado en la población general en Cuba y otras poblaciones (Cabrera-Rode y cols., 1997; Winter y cols., 2002) (Tabla 8A).

Tabla 8. Frecuencia de anticuerpos neutralizantes al virus, anticuerpos asociados a diabetes tipo 1, anti-microsomales tiroideos (AMT) y anti-gástricos parietales (AGP) en individuos infectados por el E16 y E30

A) Sueros seleccionados durante la epidemia de meningoencefalitis por E16 del año 2000

Anticuerpos	Fase 1 +/n (%)	Fase 2 +/n (%)	Control +/n (%)
AcNt	6/38 (15,8)	21/38 (55,2)^{ad}	0/80 (0,0)
ICA	5/38 (13,1)	35/38 (92,1)^b	0/80 (0,0)
AGAD	0/38 (0,0)	11/38 (28,9)^{cd}	1/80 (1,2)
AIA2	0/38 (0,0)	17/38 (44,7)^b	0/80 (0,0)
AAI	0/38 (0,0)	16/38 (42,1)^b	0/80 (0,0)
AMT	0/38 (0,0)	0/38 (0,0)	0/80 (0,0)
AGP	0/38 (0,0)	0/38 (0,0)	0/80 (0,0)

B) Sueros seleccionados durante la epidemia de meningoencefalitis por E30 del año 2001

Anticuerpos	Fase 1 +/n (%)	Fase 2 +/n (%)	Control +/n (%)
AcNt	0/8(0,0)	8/8(100)^{ed}	0/20(0,0)
ICA	0/8 (0,0)	7/8 (87,5)^{ed}	0/20 (0,0)
AGAD	0/8 (0,0)	3/8 (37,5)^{ed}	0/20(0,0)
AIA2	0/8 (0,0)	1/8 (12,5)^{ed}	0/20(0,0)
AAI	0/8 (0,0)	0/8 (0,0)	0/20(0,0)
AMT	0/8 (0,0)	0/8 (0,0)	0/20(0,0)
AGP	0/8 (0,0)	0/8 (0,0)	0/20(0,0)

Leyenda:

Fase 1: Infección aguda, Fase 2: Convalecencia de la infección

AcNt: Anticuerpos neutralizantes

ICA: Anticuerpos antiislotes pancreáticos

AAI: Anticuerpos antiinsulina

AGAD: Anticuerpos antidescarboxilasa del ácido glutámico

AIA2: Anticuerpos antitirosina fosfatasa

Control: Negativos para anticuerpos neutralizantes

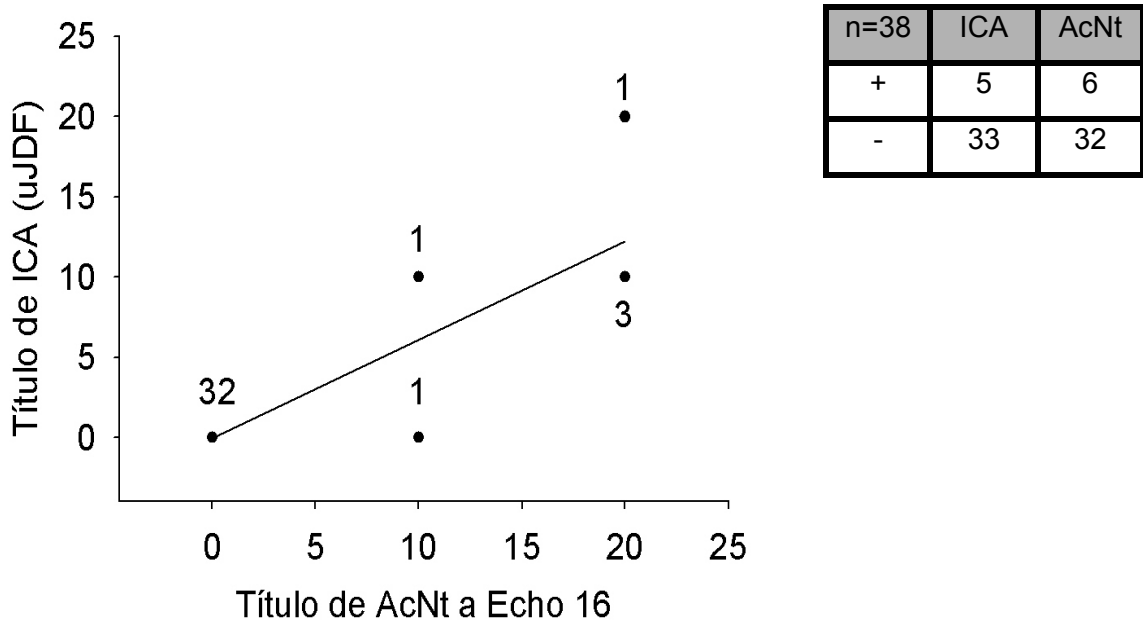
n: Total de individuos

a $p = 0,0006$ vs fase 1, b $p < 0,0001$ vs fase 1 y control , c $p = 0,0004$ vs fase 1, d $p < 0,0001$ vs control , e $p < 0,01$ vs fase 1

Consideramos que la alta prevalencia de anticuerpos asociados a diabetes tipo 1 en la fase convaleciente no es el resultado de una respuesta general de autoanticuerpos durante la infección, sino la consecuencia de una actividad pancreatotóxica específica de estos virus debido a que no se detectó la presencia de anticuerpos a otros órganos endocrinos como los anti-microsomales tiroideos y anti-gástricos parietales (Tabla 8 A, B).

Por otra parte, se encontró una fuerte correlación positiva entre los niveles de anticuerpos neutralizantes a E16 con los títulos de ICA tanto en la fase aguda ($r = 0,91$; $p < 0,0001$) (Figura 4 A) como en la convaleciente ($r = 0,55$; $p = 0,0003$) (Figura 4 B) de la infección por E16 lo cual apoya la asociación de la infección con la inducción de autoinmunidad contra las células β .

A



B

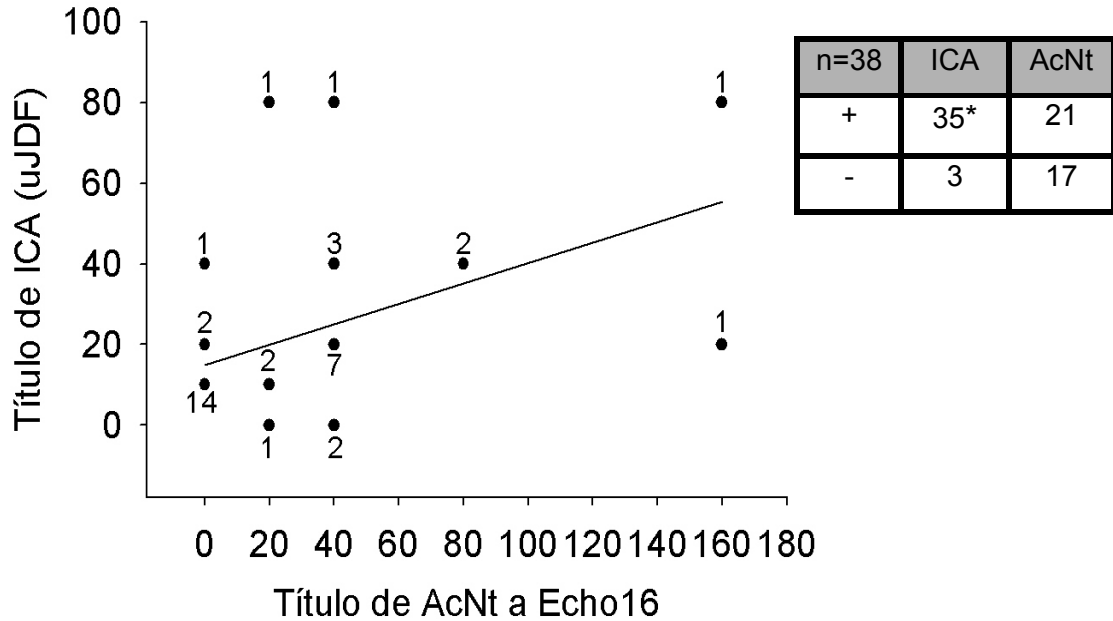


Figura 4. (A) Correlación de los títulos de ICA y AcNt a E16 durante la fase aguda de la infección ($r = 0,91$, $p < 0,0001$) y (B) en la fase convaleciente de la infección por E16 ($r = 0,55$, $p = 0,0003$).

Legenda:

AcNt: Anticuerpos neutralizantes

ICA: Anticuerpos antiislotos pancreáticos

n: Total de individuos

uJDF: unidades JDF (del inglés: Juvenil Diabetes Foundation)

* Están incluidos los 5 sujetos que fueron positivos para ICA en la fase aguda los cuales se mantuvieron positivos en la fase convaleciente. Esta incluido además el caso con AcNt que resultó negativo para ICA en la primera fase experimental el cual seroconvirtió para ICA en la fase convaleciente

Además, la presencia de altos títulos de ICA (≥ 40 uJDF) en la fase convaleciente de la infección por E16 (25,7%) (Tabla 9 A) y E30 (42,8%) (Tabla 9 B) en comparación con la fase aguda de la infección por ambos virus constituye otro argumento que permite sustentar la asociación entre la infección y autoinmunidad pancreática.

Tabla 9. Títulos de ICA en sujetos infectados por el E16 y E30 de acuerdo a la fase de la infección.

A) Sueros seleccionados durante la epidemia de meningoencefalitis por E16 del año 2000

Fase	ICA <40 uJDF + (%)	ICA ≥ 40 uJDF + (%)
1 (n=5)	5 (100,0)	0 (0,0)
2 (n=35)	26 (74,3)	9 (25,7)

B) Sueros seleccionados durante la epidemia de meningoencefalitis por E30 del año 2001

Fase	ICA <40 uJDF + (%)	ICA ≥ 40 uJDF + (%)
1 (n=0)	0 (0,0)	0 (0,0)
2 (n=7)	4 (57,1)	3 (42,8)

Leyenda:

Fase 1: Infección aguda.

Fase 2: Convalecencia de la infección.

n: Total de sujetos ICA positivos

uJDF: unidades JDF (del inglés: Juvenil Diabetes Foundation)

La presencia de anticuerpos contra antígenos de los islotes del páncreas constituyen marcadores del proceso de destrucción autoinmune de las células β (Eisenbarth, 2004). Se plantea que los ICA son el resultado de una respuesta inmune secundaria al fenómeno iniciado por la exposición de antígenos (componentes citoplasmáticos) comunes en todas las células de los islotes (Mansson y cols, 2001). Se piensa que estos antígenos son liberados como consecuencia de un daño celular producido por un mecanismo de destrucción primario (Lernmark, 2005; Pietropaolo y cols., 2005). De acuerdo a ello cabe la posibilidad de que la seroconversión a ICA y demás autoanticuerpos pancreáticos demostrada en los individuos estudiados sea el resultado de un proceso de destrucción autoinmune de las células β pancreáticas probablemente inducida o desencadenada por la infección viral.

Para apoyar esta propuesta analizamos como se comportó la multiplicidad de inmunoreactividad frente a antígenos pancreáticos y la relación que tuvo la misma con el título de anticuerpos neutralizantes contra E16 en la fase convaleciente de la infección (Tabla 10).

Tabla 10. Multiplicidad de inmunoreactividad frente a antígenos pancreáticos y relación con la frecuencia y títulos de anticuerpos neutralizantes en la fase convaleciente de la infección por E16

Autoanticuerpos		Anticuerpos Neutralizantes	
Combinaciones	n	Frecuencia +/n (%)	Título (Min-Max)
ICA	11	1/11 (9%)	40
ICA+AGAD	1	5/9 (55,5%)	20-40
ICA+AIA2	6		
ICA+AAI	2		
ICA+AGAD+AAI	4	7/10 (70%)	40-160
ICA+AGAD+AIA2	1		
ICA+AAI+AIA2	5		
ICA+AGAD+AAI+AIA2	5	5/5 (100%)	80-160

Legenda:

ICA: Anticuerpos antiislotes pancreáticos

AAI: Anticuerpos antiinsulina

AGAD: Anticuerpos antidescarboxilasa del ácido glutámico

AIA2: Anticuerpos antitirosina fosfatasa

n: Total de individuos

Min: Menor valor del título de anticuerpos neutralizantes contra E16

Max: Mayor valor del título de anticuerpos neutralizantes contra E16

Los resultados claramente indican que el incremento en la frecuencia y títulos de anticuerpos neutralizantes contra E16 en los sujetos estudiados guarda relación con la multiplicidad de inmunoreactividad frente a diferentes antígenos pancreáticos. Así pues, en el 100% de los individuos que desarrollaron los cuatro autoanticuerpos se demostró la presencia de anticuerpos neutralizantes en títulos entre 1:80 y 1:160 (Tabla 10). En contraste, de los 11 individuos que desarrollaron

ICA como único anticuerpo solamente en uno de ellos se detectó la presencia de anticuerpos neutralizantes con título de 1:40 lo que representó el 9% de positividad (Tabla 10).

Debemos destacar el hecho de que en todos los individuos donde se detectaron anticuerpos contra los tres autoantígenos específicos de las células β pancreáticas (AGAD, AAI o AIA2) se pudo constatar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra E16 (Tabla 10). Teniendo en cuenta que la GAD, IA2 y la insulina forman parte de los antígenos pancreáticos reconocidos por los ICA, realizamos el análisis del comportamiento de la frecuencia de AGAD, AAI o AIA2 en relación a los títulos de ICA. Encontramos una alta frecuencia de AGAD en los sueros con altos títulos de ICA durante el estadio convaleciente de la infección por E16. El 19,2% (5/26) de los sujetos con ICA menores de 40 uJDF y el 66,6% (6/9) de los sujetos con ICA mayor o igual a 40 uJDF fueron positivos para AGAD ($p = 0,0146$). La presencia de AAI fue también alta en los sujetos con ICA mayor o igual a 40 uJDF (77,7%, 7/9) en comparación a los sujetos con ICA menores a 40 uJDF (34,6%, 9/26; $p = 0,0216$). De igual manera se comportó la frecuencia de AIA2 siendo la misma superior en los sujetos con ICA mayor o igual a 40 uJDF (88,8%, 8/9) en comparación a los sujetos con ICA menores a 40 uJDF (34,6%, 9/26; $p = 0,02$).

A nuestro juicio estos hallazgos pudieran ser el reflejo de un daño severo de las células β producido como consecuencia de la infección y aportan nuevas evidencias a favor de la asociación de los enterovirus con los procesos de destrucción autoinmune de las células β pancreática. Presumiblemente como resultado de la infección viral se expongan antígenos pancreáticos que son reconocidos por el sistema inmune dando lugar a la generación de una respuesta inmune humoral extendida a varios autoantígenos.

Resulta de interés señalar que se encontró una diferencia en el patrón de autoanticuerpos inducido por cada uno de los virus estudiados. Se demostró seroconversión para ICA, AGAD e AIA2 en los individuos infectados por ambos virus (Tabla 8 A, B). En cambio la positividad para AAI solamente se constató en los individuos infectados por E16 (Tabla 8A).

Existen una serie de estudios que sugieren que la inducción de anticuerpos asociados a las células de los islotes puede ocurrir después de episodios de infecciones por enterovirus y en todos ellos se describen diferentes patrones de autoanticuerpos. La presencia de ICA, AAI y AGAD fue descrita en un caso reportado en el cual la infección materna por E6 produjo diabetes tipo 1 en el neonato (Otonkoski y cols., 2000). Lonnrot y colaboradores encontraron que la presencia de ARN de enterovirus en suero de un grupo de sujetos prediabéticos estuvo asociada con incrementos de ICA y AGAD, pero no con las concentraciones de AAI o AIA2 (Lonnrot y cols., 2000a). Los AGAD y AIA2 no fueron encontrados después de una severa infección aguda por E9, sin embargo se demostró la presencia de ICA y AAI (Vreugdenhil y cols., 2000). Por otra parte el desarrollo de ICA e AIA2 asociado con una infección por E3 fue descrito recientemente en un niño que participaba en el ensayo Finlandés de predicción y prevención de diabetes (Williams y cols., 2006).

El hecho de no encontrar coincidencia en el patrón de anticuerpos asociados a diabetes tipo 1 generados durante cada una de las epidemias ocurridas en Cuba y otras infecciones por enterovirus reportadas en la literatura sugiere que hay una heterogeneidad en la respuesta autoinmune contra las células β pancreáticas, la cual probablemente pudiera ser el resultado de diferencias entre la interacción de los virus con el sistema inmune o a diferencias en la capacidad de estos virus de destruir las células β pancreáticas.

En nuestro estudio no fue explorado la evolución de la respuesta autoinmune pancreática así como el posible desarrollo de diabetes tipo 1 en los pacientes que resultaron positivos para autoanticuerpos asociados a diabetes tipo 1 durante las epidemias de meningoencefalitis ocurridas en Cuba en el 2000 y 2001. No obstante, realizamos la caracterización clínica, virológica, inmunológica y genética de una adolescente mestiza de 12 años de edad, la cuál desarrolló diabetes tipo 1 después de sufrir meningoencefalitis durante la epidemia del 2001.

En noviembre del 2001, esta paciente la cual no presentaba antecedentes personales de diabetes tipo 1, comienza con síntomas clínicos de meningoencefalitis (cuadros de cefalea intensa de localización fronto occipital,

vómitos en proyectil, fotofobia y febrícula) y ninguno de diabetes. Este cuadro clínico junto con los resultados de los exámenes complementarios, evolución y el contexto epidemiológico en el cual la paciente desarrolló la enfermedad indicó la etiología viral de la meningoencefalitis. La concentración de glucosa sanguínea en una determinación al azar fue de 7,7 mmol/L durante la infección. Se realiza una glucemia en ayunas en la fase convaleciente de la enfermedad donde se encontraron cifras de 6,02 mmol/L (valores normales < 6,1 mmol/L). Durante este período el peso corporal de la paciente fue de 34 kg.

Posteriormente a este episodio de meningoencefalitis, la joven comenzó a ganar peso corporal, pasando de 34 a 39 kg en los primeros seis meses. A los seis meses después de la infección se realiza una glucemia en ayunas mostrando valores de 4,02 mmol/L. Dos meses después, la paciente comenzó con síntomas sugerentes de diabetes (poliuria, polidipsia y polifagia) y pérdida de 3 Kg de peso. Se tomaron muestras de glucosa en ayunas con valores de 12,1 mmol/L y post prandial de 2 horas de 18,9 mmol/L y se decidió su ingreso para diagnosticar diabetes mellitus. El perfil glucémico resultante constataba cifras de glucosa en ayunas de 6,02 mmol/L, antes de almuerzo 8,2 mmol/L y antes de comida 4,55 mmol/L. Con estos resultados se diagnosticó que la adolescente presentaba una diabetes mellitus y se inició su tratamiento con manejo dietético. Por otra parte, se realizaron las determinaciones de anticuerpos asociados a la diabetes tipo 1 (ICA, AAI, AGAD y AIA2) y péptido C, con el objetivo de conocer la existencia de autoinmunidad y estimar la secreción de insulina.

Los resultados mostraron títulos elevados de ICA 160 μ JDF y de AIA2 13,9 U/mL, así como valores negativos para AAI 20 nU/mL y AGAD < 1 U/mL. Los anticuerpos AMT y AGP no fueron detectados. La concentración de péptido C fue de 1,1 ng/ml, cercano al límite inferior de la normalidad y el valor de la hemoglobina glucosilada fue de 7,8%. Estos datos demostraron el diagnóstico de la diabetes tipo 1. Se inició tratamiento intensivo con múltiples dosis de insulina a razón de 0,2 U/Kg/día con tratamiento dietético de 2 200 kcal.

A los tres meses del tratamiento con insulina, se reevaluaron los autoanticuerpos y el péptido C. El título de ICA fue 80 μ JDF y el AIA2 fue 8 U/mL. Los AAI y AGAD

continuaron negativos y las concentraciones de glucosa y péptido C en ayunas fueron 7,29 mmol/L y 0,8 ng/mL, respectivamente.

Para comprobar que la paciente estuvo infectada por E30, identificado como el agente causal de la epidemia de meningoencefalitis en el año 2001 (Sarmiento, 2004), se estudiaron los anticuerpos neutralizantes para los enterovirus que mayormente se han asociado con meningoencefalitis en Cuba en los últimos 30 años. Se encontraron altos títulos de anticuerpos neutralizantes para la cepa E30 (1:80) aislada durante la epidemia de meningoencefalitis del año 2001. De los restantes enterovirus epidémicos estudiados, solamente se encontraron anticuerpos en bajos títulos al CVB2 (1:10) y CVA9 (1:20) (Figura 5).

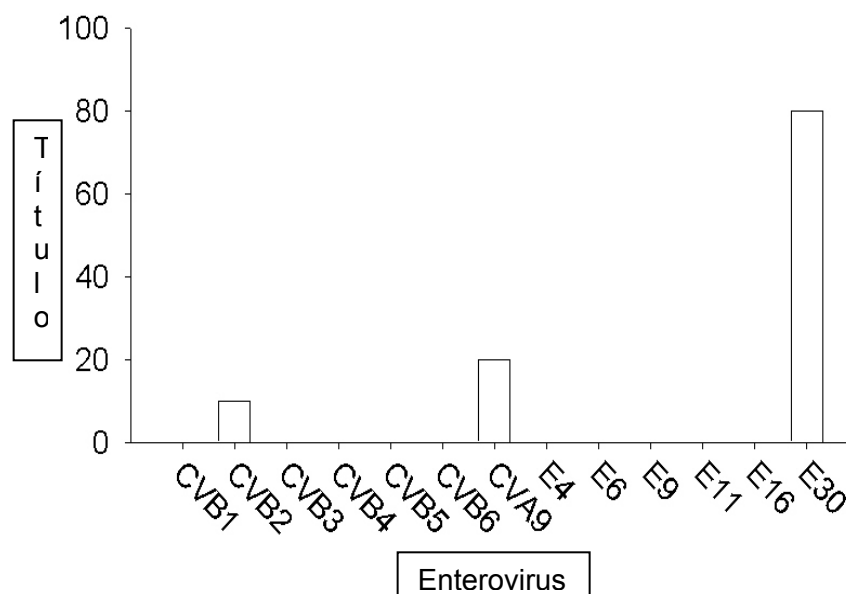


Figura 5. Título de anticuerpos neutralizantes a los diferentes enterovirus

Estos hallazgos nos hacen pensar que la infección por E30 pudiera estar asociada con la presencia de ICA y AIA2 así como con el desarrollo de la diabetes en la paciente estudiada. No obstante, este hecho alcanza mayor relevancia si tomamos en consideración que el estudio de los genes HLA-DR/DQ aportó que la adolescente presenta un genotipo con combinación de alelos HLA DR 15 (DR2)/DR7 y DQ 2 DQ6 (DQ1) que ha sido descrito como una combinación de

haplotipos con moderada o alta protección para el desarrollo de diabetes tipo 1 en personas de origen caucásico (Redondo y cols., 2001). Sin embargo, el efecto protector de estos alelos no es absoluto y puede diferir entre grupos étnicos. En concordancia con nuestros resultados, Craig y colaboradores (Craig y cols., 2003) encontraron una baja frecuencia de genotipo de alto riesgo (HLA DRB1*03-DQB1*02) en sujetos no blancos con diabetes tipo 1 que eran positivos para ARN de enterovirus. Los autores sugieren que existe un subgrupo de sujetos con diabetes tipo 1 quienes presentan un bajo riesgo genético en los cuales los enterovirus contribuyen en el desarrollo de la diabetes (Craig y cols., 2003).

Los resultados encontrados en el análisis de este caso apoyan nuestra observación con relación a que la inducción de anticuerpos asociados a las células de los islotes puede ocurrir después de episodios de infecciones por enterovirus (Hiltunen y cols, 1997; Hyöty y Taylor, 2002). La presencia de AIA2 constituye un marcador altamente sensible de progresión a diabetes tipo 1 y su persistencia representa un indicador de una función residual de las células β (Kulmala y cols., 2000; Krischer y cols., 2003; Zanone y cols., 2003). De esta manera, la disminución de los títulos de AIA2 en paralelo con la concentración de péptido C observada en el caso estudiado indica el deterioro progresivo de la función pancreática sufrida por la paciente.

Existen solamente dos estudios en la literatura sobre desarrollo de diabetes como posible consecuencia de infección por echovirus. En uno de ellos se informa un caso en el cual la infección materna por E6 produjo diabetes tipo 1 en el neonato (Otonkoski y cols, 2000) y en el otro estudio se logró el aislamiento de un E9 en una niña de seis semanas de edad al comienzo de la diabetes tipo 1 (Vreugdenhil y cols, 2000). Debido a la coincidencia del comienzo de la enfermedad durante la infección los autores sugieren una relación causal entre la infección viral y el desarrollo de la enfermedad en ambos casos. Por lo tanto, nuestro estudio constituye el primer informe de un caso de diabetes tipo 1 después de una infección por E30.

Es de gran importancia conocer y encontrar cuales serotipos de enterovirus son capaces de inducir el daño a las células β pancreáticas. La mayoría de las

investigaciones sugieren a los CVB4 y CVB5 como los principales serotipos de enterovirus relacionados a la patogénesis de la diabetes tipo 1 (Hyoty y Taylor, 2002; Kawashima y cols., 2004; Kanno y cols, 2006). Nuestros resultados sugieren que las cepas de E16 y E30 que circularon en Cuba en los años 2000 y 2001 pueden inducir la producción de autoanticuerpos por lo que pudieran ser consideradas como variantes potencialmente diabetogénicas.

El E16 ha sido reportado con poca frecuencia en el mundo (Miwa y cols., 1990; Palacios y Oberste, 2005), sin embargo consideramos que esto puede deberse a que es un virus difícil de propagar en cultivo de células (Sarmiento, 2004). Además, el E16 no constituía un patógeno de importancia clínica hasta el momento de la epidemia en Cuba en el año 2000 donde emerge como agente causal de una epidemia de meningoencefalitis (Dorta y cols., 2002; Sarmiento, 2004). De esta manera, genotipos de E16 potencialmente diabetogénicos pudieran estar circulando de forma “silente” en diferentes regiones del mundo, de modo que poblaciones con alta incidencia de diabetes tipo 1 podrían estar expuestas de forma endémica a este virus.

En contraste, el E30 es uno de los serotipo de más amplia circulación mundial siendo el responsable de grandes epidemias de meningoencefalitis en diferentes regiones del mundo en los últimos 40 años (Oberste y cols, 1999; CDC, 2003; Sarmiento, 2004; CDC, 2006), lo cual lógicamente no implica que todas las infecciones por E30 conduzcan a diabetes tipo 1. Los hallazgos obtenidos por Roivainen y colaboradores (Roivainen y cols., 2002) muestran que existen diferencias entre las cepas en cuanto a su potencialidad diabetogénica. Estos investigadores demostraron que el E30 es capaz de destruir las células β pancreáticas in vitro, sin embargo, la capacidad de los E30 para dañar las células β o alterar su función no esta definida por el serotipo. La cepa prototipo de E30 no produce destrucción a las células β pancreáticas, mientras que las cepas de E30 aisladas en Holanda en los años 1977, 1979, 1987 y en Francia en 1996 fueron claramente más destructivas que las cepas aisladas en otros países. Estos

resultados sugieren la existencia de variantes de E30 con diferencias en el potencial diabetogénico (Roivainen y cols., 2002; Paananen y cols, 2007).

La presencia de variantes antigénicas dentro de un mismo serotipo con diferentes expresiones patogénicas es un hecho bien documentado para la familia *picornaviridae* (Domingo y Holland, 1994). Sin embargo, no son del todo bien conocidas las razones por la que algunas cepas de enterovirus son diabetogénicas y otras no (Al-Hello y cols, 2005). Uno de los modelos mejor caracterizado de la diabetes inducida por virus en ratones es el virus de la encefalomiocarditis y en el mismo se ha demostrado que no todas las variantes antigénicas de estos virus pueden infectar y destruir las células β pancreáticas murinas (Kaptur y cols, 1989; Jun y Yoon, 2002). Se ha demostrado que mutaciones puntuales en la región de la proteína capsídica VP1 de estos virus definen el fenotipo diabetogénico (Bae y Yoon, 1993). Hasta el momento, no se conoce cuales son las regiones del genoma de los enterovirus humanos que regulan la diabetogenicidad (Paananen y cols., 2007). Nuestros resultados proporcionan la primera evidencia *in vivo* de asociación de la infección por E16 y E30 con la inducción de marcadores humorales de autoinmunidad pancreática. Con estos hallazgos, se dispone ahora de cepas de echovirus que permitirán estudiar las regiones del genoma que podrían determinar la diabetogenicidad.

IV. 2 Presencia de ARN de enterovirus en diabéticos tipo 1 de diagnóstico reciente y en familiares de primer grado de diabéticos tipo 1

La presencia de ARN de enterovirus en diabéticos tipo 1 al comienzo de la enfermedad (9/34, 26,5%) fue significativamente más elevada que en los individuos controles saludables (2/68, 2,9%; $p=0,0007$) (Tabla 11). Se detectó también mayor presencia de ARN de enterovirus en familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 positivos para ICA (5/32, 15,6%) que en individuos controles sanos (0/64, 0,0%; $p=0,0033$) (Tabla 11). La presencia de ARN de enterovirus entre los familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 negativos para ICA (1/62, 1,6%) en relación a su grupo control (1/62, 1,6%) no mostró diferencias

estadísticamente significativas (Tabla 11). En contraste, la presencia de ARN de enterovirus en familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 positivos para ICA fue superior en relación a los familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 negativos para ICA ($p=0,0164$).

Tabla 11. Presencia de ARN de enterovirus en diabéticos tipo 1 de diagnóstico reciente, familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 positivos y negativos para ICA y grupo control.

Grupos de Estudio	n	EV ARN + (%)	Valor p
DM1	34	9 (26,5)	0,0007
Control	68	2 (2,9)	
FPG/ICA+	32	5 (15,6)	0,0033
Control	64	0 (0,0)	
FPG/ICA-	62	1 (1,6)	NS
Control	62	1 (1,6)	
FPG/ICA+	32	5 (15,6)	0,0164
FPG/ICA-	62	1 (1,6)	

Leyenda:

EV ARN +: ARN positivo de enterovirus

DM1: Diabetes mellitus tipo 1 de diagnóstico reciente

FPG/ICA+: Familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 positivos para ICA

FPG/ICA-: Familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 negativos para ICA

Control: Grupo control

n: total de individuos

NS: Estadísticamente no significativo

Empleamos la RT-N-RCP como método de detección viral para valorar la posible asociación de la infección con el inicio clínico de la diabetes tipo 1 o con la presencia de marcadores humorales de progresión a esta enfermedad pues con el uso de cebadores que hibridan en sitios altamente conservados de la región 5' no

codificadora del genoma de los enterovirus podemos detectar ARN de todos los serotipos de enterovirus (Yang y cols., 1992; Halonen y cols., 1995).

Por otro lado, la presencia de ARN de enterovirus en suero es un marcador de viremia. Durante la viremia los enterovirus son transportados extracelularmente en el suero a diferentes órganos susceptibles incluyendo el páncreas (Pallansh y Raymond, 2001). El período virémico de los enterovirus es de corta duración (aproximadamente siete días) por lo que el resultado del ensayo es dependiente del momento de la toma de la muestra (Craig y cols, 2003; Subasic y Karamehic, 2006). De esta manera, las diferencias encontradas en la frecuencia de ARN enteroviral entre los sueros de diabéticos tipo 1 de diagnóstico reciente y sus respectivos controles sugiere la asociación temporal de la infección por enterovirus y el inicio de la enfermedad clínica.

Por otra parte, la mayor presencia de ARN de enterovirus encontrada en el suero de familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 positivos para ICA en relación a sus controles sanos, así como las diferencias obtenidas al comparar los grupos de familiares de primer grado positivos y negativos para ICA con respecto a la presencia de ARN de enterovirus sugiere la asociación entre la infección por enterovirus y la presencia de autoinmunidad pancreática. Sin embargo podríamos preguntarnos. ¿En que medida puede ser relevante esta asociación teniendo en cuenta el corto período de viremia (\pm siete días) y la cinética de la respuesta inmune?

A nuestro juicio, presumiblemente estos individuos presentaban clones de células autorreactivas contra los islotes pancreáticos sensibilizados previamente por la influencia de algún o algunos factores ambientales y la infección por enterovirus produjo la activación de estas células de memoria que dieron lugar a la producción de autoanticuerpos. Así pues, la infección por enterovirus probablemente haya perpetuado o acelerado la destrucción autoinmune de las células β pancreática la cual había sido iniciada por algún evento anterior. Una explicación similar se consideraría para dilucidar la asociación entre la presencia de ICA y anticuerpos neutralizantes contra E16 en la fase aguda de la infección (\pm cinco días del

comienzo de los síntomas) en cinco de los 38 pacientes con meningoencefalitis estudiados en el acápite anterior.

Otro elemento que apoya la posible participación de la infección por enterovirus en los procesos de destrucción autoinmune de las células β en ambos grupos de estudio es el hecho de haber encontrado la presencia de altos títulos de ICA en diabéticos tipo 1 al comienzo clínico de la enfermedad y familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 positivos para ARN de enterovirus (Tabla 12).

Tabla 12. Relación entre presencia de ARN y títulos de ICA en diabéticos tipo 1 y familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 positivos para ICA.

Grupo (n)	ICA < 40 uJDF		ICA \geq 40 uJDF		Valor p
	n	EVARN+ (%)	n	EVARN+ (%)	
DM1 n=34	17	1 (5,8)	17	8 (47,0)	0,0164
FPG/ICA+ n=32	19	0 (0,0)	13	5 (38,5)	0,0064

Leyenda:

EV ARN +: ARN positivo de enterovirus

DM1: Diabetes mellitus tipo 1 de diagnóstico reciente

FPG/ICA+: Familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 positivos para ICA

n: número de casos

uJDF: unidades JDF (del inglés: Juvenil Diabetes Foundation)

Resultados similares se han encontrado en estudios previos realizados en regiones del mundo, por lo general, con una elevada prevalencia de la enfermedad. Nairn y colaboradores en Inglaterra (Nairn y cols., 1999) encontraron presencia de ARN de enterovirus en el 27% de los sueros de niños diabéticos lo cual fue significativamente superior al 4,9% de individuos controles. En un estudio realizado en Finlandia (Lonnrot y cols., 2000b) se demostró una mayor frecuencia de ARN de enterovirus en suero de niños con autoanticuerpos (22%) comparado con los sujetos controles (2%). Por otro lado, un grupo de investigadores suecos

(Yin y cols., 2002) demostraron la presencia de ARN específico de enterovirus en 12 de 24 (50%) pacientes con diabetes tipo 1 al comienzo de la enfermedad así como en 5 de 19 (26%) familiares de primer grado con autoinmunidad pancreática y en ninguno de los individuos del grupo control. Trabajos más recientes realizados en Alemania (Moya–Suri y cols., 2005) informan la presencia de ARN de enterovirus en el 36 % (17/47) de los diabéticos tipo 1 así como en el 20% (10/50) de sujetos con autoanticuerpos y solamente en el 4% de los controles. Sin embargo, en la mayoría de estos estudios no ha sido analizada la posible influencia que pudieran tener en los resultados variables como la edad, sexo y colore de la piel. En nuestro trabajo analizamos si algunas características demográficas podrían tener influencia en los resultados obtenidos, así como la posible relación entre la presencia de ARN de enterovirus con diferentes grados de cetoacidosis. No se encontró asociación entre el sexo, edad o el color de la piel y la presencia de ARN de enterovirus entre los familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 positivos para ICA (Tabla 13) y entre los diabéticos tipo 1 (Tabla 14).

Tabla 13. Características de los familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 positivos para ICA de acuerdo a la presencia de ARN de enterovirus.

Características	Enterovirus ARN-positivo n (%)	Enterovirus ARN-negativo n (%)	Valor p
FPG/ICA+	5 (15,6)	27 (84,4)	NS
Masculinos	2 (40,0)	16 (59,2)	NS
Femeninos	3 (60,0)	11 (40,7)	NS
Edad ≤ 15 años	5 (100)	17 (62,9)	NS
Edad > 15 años	0 (0,0)	10 (37,0)	NS
Piel Blanca	5 (100)	24 (88,8)	NS

Leyenda:

n: número de casos

FPG/ICA+: Familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 positivos para ICA

NS: Estadísticamente no significativo

Tabla 14. Características de los diabéticos tipo 1 de diagnóstico reciente de acuerdo a la presencia de ARN de enterovirus.

Características	Enterovirus ARN-positivo n (%)	Enterovirus ARN-negativo n (%)	Valor p
DM1	9 (26,5)	25 (73,5)	
Masculino	5 (55,5)	8 (32,0)	NS
Femenino	4 (44,4)	17 (68,0)	NS
Edad ≥ 5 años	8 (88,8)	13 (52,0)	NS
Edad < 5 años	1(11,1)	12 (48,0)	NS
Piel Blanca	7 (77,7)	21 (84,0)	NS
ICA-negativo	1 (11,1)	2 (8,0)	NS
ICA-positivo	8 (88,8)	23 (92,0)	NS
Cetosis	8 (88,8)	17 (68,0)	NS
Cetoacidosis moderada	0 (0,0)	3 (12,0)	NS
Cetoacidosis severa	6 (66,6)	5 (20,0)	0,0328

Leyenda:

n: número de casos.

DM1: Diabetes mellitus tipo 1 de diagnóstico reciente

ICA: Anticuerpos antiislotos

NS: Estadísticamente no significativo

Cetoacidosis moderada definida como pH 7,1-7,3, bicarbonato 5-15 mmol/L

Cetoacidosis severa definida como pH <7,1, bicarbonato <5 mmol/L

Es llamativo que la presencia de ARN de enterovirus está asociada con el desarrollo de cetoacidosis severa al comienzo clínico de la diabetes (6/9, 66,6% versus 5/25, 20,0%; $p= 0,0328$) (Tabla 14). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación a la presencia de cetosis y cetoacidosis moderada al comienzo clínico de la enfermedad cuando se compararon los sueros de los diabéticos tipo 1 positivos y negativos para ARN de enterovirus (Tabla 14).

La asociación de la infección por enterovirus con la cetoacidosis severa fue reportada previamente por Craig y colaboradores (Craig y cols., 2003) y sugieren que los enterovirus pueden causar un daño citolítico agudo de las células insulares del páncreas. Puesto que la mayoría de los diabéticos tipo 1 tenían presencia de ICA al momento del diagnóstico de la diabetes es probable que estos individuos hayan perdido una considerable masa de células β a través del daño causado por la autoinmunidad progresiva pero la infección citolítica aguda pudo ser el evento precipitante final en el proceso de daño de las células β pancreáticas que condujo a las manifestaciones clínicas de la enfermedad. En efecto, diferentes grupos de investigadores han desarrollado ensayos que han demostrado la replicación de los enterovirus en células β humanas y su efecto en términos de citotoxicidad sobre las células β y disminución de la capacidad de secreción de insulina (Roivainen y cols., 2002; Elshebani y cols., 2007).

Sin embargo, como mencionamos anteriormente no excluimos la posibilidad de que los enterovirus también pudieran mediar o acelerar la progresiva destrucción autoinmune de las células β del páncreas debido a que encontramos asociación entre la presencia de ARN de enterovirus y anticuerpos antiislotes en familiares de primer grado que todavía no han desarrollado la diabetes. Surge por tanto las interrogantes siguientes: ¿Será que las infecciones por enterovirus actúan principalmente como agentes precipitadores del proceso de destrucción autoinmune de las células β pancreáticas que conduce al inminente desarrollo de la diabetes tipo 1? o por el contrario ¿Predomina la influencia de los enterovirus en los estadios preclínicos de autoinmunidad contra las células β pancreáticas?

El hecho de no haber encontrado diferencias estadísticamente significativas al comparar los grupos de pacientes con diabetes tipo 1 al comienzo clínico de la enfermedad y familiares de primer grado positivos para ICA respecto a la presencia de ARN de enterovirus ($p=0,370$) nos permite sugerir que no existe un balance favorecido hacia uno u otro evento bajo la influencia de la infección por enterovirus.

IV. 3 Evaluación de la reactividad cruzada de la respuesta inmune humoral inducida por diferentes serotipos de enterovirus en conejos frente a los principales antígenos de las células β pancreáticas humanas

Se detectaron altos títulos de anticuerpos neutralizantes en los sueros de los conejos inmunizados con antígenos obtenidos de las 17 cepas de enterovirus, lo cual indica que en todos los conejos se ha generado una respuesta inmune humoral contra los virus inoculados (Tabla 15).

Se detectó la presencia de AGAD en los sueros hiperinmunes preparados contra los antígenos de E9, E11, E16, E30, CVB1, CVB3 y CVB5. No se encontró presencia de AAI y AIA2 en ninguno de los sueros estudiados. Los sueros controles preparados a partir de las células Vero y Hep-2 empleadas para el aislamiento viral, resultaron ser negativos (Tabla 15) y no se detectó título preinmune de AGAD, AAI y AIA2 en ninguno de los conejos inmunizados.

La producción de los sueros hiperinmunes contra enterovirus se realizó en conejos debido a que estos animales no son susceptibles a la infección por enterovirus (Lonnrot y cols., 1996). De esta manera garantizamos que se genere una respuesta inmune contra los virus inoculados como parte de los mecanismos de defensa del conejo frente a un agente patógeno invasor, pero descartamos la posibilidad de replicación viral en células β pancreáticas del conejo que pudieran generar una respuesta humoral contra autoantígenos de las células insulares del páncreas dañadas.

Por tanto, la presencia de anticuerpos contra la GAD 65 humana en suero de conejos inmunizados con antígenos de enterovirus sugiere la existencia de un determinante antigénico común entre los serotipos de enterovirus mencionados y la GAD 65 humana.

Es de destacar que los serotipos donde se encontró reactividad cruzada corresponden al grupo B de los enterovirus en los cuales se ha descrito una homología de seis aminoácidos entre la proteína viral P2-C y la GAD 65 humana (Vreugdenhil y cols., 1998, 1999) (Figura 3).

Tabla 15. Título de anticuerpos neutralizantes contra enterovirus y anticuerpos contra autoantígenos pancreáticos humanos (AGAD, AAI y AIA2) en los sueros hiperinmunes de conejos.

Antígenos	Título AcNt	AGAD U/ml	AAI U/ml	AIA2 U/ml
E1	18080	0	0	0
E2	12800	0	0	0
E3	12800	0	0	0
E4	251959	0,47	0	0
E6	102400	0	0	0
E9	31494	2,63	0	0
E11	3200	19,26	0	0
E16	3200	2,4	0	0
E30	18080	2,13	0	0
CVB1	36160	2,5	0	0
CVB3	72321	2,73	0	0
CVB5	18080	2,13	0	0
CVB6	25600	0	0	0
CVA9	51160	0	0	0
CVA16	9686	0	0	0
CVA7	51200	0	0	0
CVA24	9040	0	0	0
Control Vero	-	0	0	0
Control Hep-2	-	0	0	0

Leyenda:

AcNt: Anticuerpos neutralizantes

AGAD: Anticuerpos antidescarboxilasa del ácido glutámico

AAI: Anticuerpos antiinsulina

AIA2: Anticuerpos antitirosina fosfatasa

Positividad: AGAD >1 U/mL, AAI > 40 nU/mL, AIA2 > 1 U/mL

Se ha demostrado experimentalmente que es posible inducir una respuesta inmune cruzada humoral y celular entre la proteína P2-C de CVB4 con la GAD 65 humana mediante la inmunización de conejos y ratones con péptidos derivados de la región de homología de ambas proteínas (Varela-Calvino y cols., 2000; Marttila y cols., 2001; 2002; Tong y cols., 2002; Chou y cols., 2004). De este modo, es posible que el mimetismo molecular entre estas dos regiones pudiera explicar la reactividad cruzada observada en nuestros resultados.

No obstante, los avances en los estudios estructurales de proteínas han permitido conocer que la reacción cruzada entre determinantes hospederos y virales se produce fundamentalmente como consecuencia de similitud estructural más que identidad de secuencias (Varela-Calvino y Peakman, 2003). Aún cuando todos los serotipos del grupo B de los enterovirus comparten la región de identidad aminoácídica entre P2-C y GAD65 humana, es probable que no todos exhiban características estructurales comunes. Esto explicaría que la reactividad cruzada no se haya observado para los sueros hiperinmunes de aquellos conejos que fueron inmunizados con otros serotipos también del grupo B de los enterovirus como los E1-6, CVB6 y CVA9.

Nos resulta de interés destacar el hecho de haber detectado anticuerpos contra la GAD65 humana en los sueros hiperinmunes de conejos preparados contra las cepas epidémicas de E16 y E30 pues este hallazgo nos hace pensar que el mimetismo molecular sea uno de los mecanismos responsables de la respuesta autoinmune contra las células β pancreáticas generada en los pacientes infectados por E16 y E30 durante las epidemias de meningoencefalitis del 2000 y 2001.

V. DISCUSIÓN GENERAL

V. DISCUSIÓN GENERAL

Desde hace varios años se conoce que los procesos patogénicos que conducen a la diabetes tipo 1 se deben a la combinación de factores genéticos y ambientales (Knip y cols., 2005) sin embargo, los avances en la caracterización de agentes ambientales inequívocamente relacionados con la patogénesis de la enfermedad son limitados (Akerblom y cols., 2002). De los factores ambientales, se considera que los virus podrían estar involucrados en la enfermedad y entre ellos aún se debate si las infecciones por enterovirus pudieran estar relacionadas con esta enfermedad autoinmune de etiología desconocida (Haverkos y cols., 2003; van der Werf y cols., 2007).

Teniendo en cuenta que los enterovirus causan grandes y explosivas epidemias, consideramos que el estudio de las mismas ofrece una excelente oportunidad para evaluar la relación entre infección por enterovirus, desarrollo de autoinmunidad pancreática y diabetes tipo 1. En Cuba se reportó la primera evidencia de asociación entre la presencia de anticuerpos contra los islotes pancreáticos y una epidemia de meningoencefalitis causada por el E4 en 1986 (Uriarte y cols., 1987). Además se han encontrado alteraciones del metabolismo de los carbohidratos en los niños infectados por este virus (Uriarte y cols., 1990; 1991; Szopa y cols., 1993). Estudios posteriores permitieron demostrar una mayor frecuencia de anticuerpos neutralizantes contra el E4 en diabéticos tipo 1 de diagnóstico reciente en relación con un grupo control (Diaz-Horta y cols., 2001). Hallazgos similares fueron documentados en estudios sobre epidemias de enterovirus que han tenido lugar en Polonia (Rewers y cols., 1987) e Inglaterra (Dronfield y cols., 1993).

El primer estudio de nuestro trabajo se sustentó en la posibilidad de realizar nuevas investigaciones orientadas a **conocer si la infección por enterovirus está asociada con la inducción de marcadores humorales del proceso de**

destrucción autoinmune de las células β pancreáticas o comienzo clínico de la diabetes tipo 1 dado por la ocurrencia de dos grandes epidemias de meningoencefalitis que se extendieron a todo el país. La epidemia causada por E16, un serotipo con un excepcional comportamiento epidemiológico pues emerge como agente causal de una epidemia de meningoencefalitis viral en Cuba en el año 2000 y la epidemia de E30 ocurrida en el 2001, un serotipo que ha causado grandes epidemias en diferentes regiones del mundo (Sarmiento, 2004).

El estudio de ambas epidemias reveló que más del 85% de los individuos infectados sin antecedentes personales de diabetes tipo 1 mostraron evidencias de respuesta autoinmune contra las células β pancreáticas. Los autoanticuerpos que fueron detectados preceden al desarrollo clínico de la diabetes tipo 1 y son considerados como los principales marcadores preclínicos de progresión a esta enfermedad. Además se conoce que la respuesta inmune humoral extendida a varios autoantígenos parece ser estable en el tiempo y es altamente predictiva del desarrollo de la diabetes tipo 1. Ha sido bien documentado en la literatura que el número de anticuerpos detectables está considerablemente relacionado con el riesgo a la progresión de diabetes tipo 1 en un período próximo de 5 a 10 años tanto en los estudios de familiares como en los realizados en la población general (Rewers y cols., 2004).

No obstante a ello, si tenemos en cuenta que la incidencia de la diabetes tipo 1 en Cuba es baja (2,9/100 000 habitantes) (Díaz y cols., 1983; Collado y cols., 1993), nos atrevemos a pronosticar que la autoinmunidad contra diferentes antígenos de las células β pancreáticas generada en el curso de la infección viral no debe persistir y es poco probable que se desarrolle diabetes clínicamente manifiesta en todos los individuos. En apoyo a esta propuesta, se debe tener en cuenta lo planteado por otros autores que consideran que puede haber remisión de la respuesta autoinmune sin causar diabetes (Maclaren y cols., 1990). Estudios prospectivos realizados en Suecia y Finlandia con niños sin historia familiar de diabetes han demostrado una prevalencia de anticuerpos antiisletos del 4%, sin embargo solo una minoría de los niños con autoinmunidad contra las células β desarrollaron diabetes tipo 1 a los 15 años de edad (Karjalainen, 1990).

Por otra parte, los sujetos involucrados en el estudio fueron seleccionados al azar de la población que sufrió meningoencefalitis durante las epidemias. De esta manera resulta poco probable que todos los individuos que desarrollaron anticuerpos asociados a diabetes tipo 1 después de la infección por E16 y E30 presenten genes de susceptibilidad de diabetes tipo 1. De acuerdo a esta observación es posible que la infección con estos virus pueda desencadenar el desarrollo de autoanticuerpos marcadores de autoinmunidad pancreática en cualquier individuo, pero la susceptibilidad genética a diabetes tipo 1 debe ser el factor crucial para la progresión de la autoinmunidad hasta la diabetes clínicamente manifiesta.

Presumiblemente, la presentación de autoantígenos específicos de las células β dañadas en el contexto de haplotipos de los genes HLA clase II de susceptibilidad a diabetes tipo 1 pudieran dirigir una respuesta autoinmune sostenida contra estos autoantígenos resultando en una destrucción progresiva de los islotes pancreáticos y desarrollo de diabetes tipo 1.

Nuestro análisis es consistente con observaciones previas realizadas en modelos animales que demuestran la importancia de la susceptibilidad genética del huésped en el desarrollo de diabetes (Haverkos y cols., 2003). Uno de los clásicos reportes en este sentido es el realizado por Jun y Yoon que consistió en la inoculación de cuatro especies de monos (*Rhesus*, *Cynomolgus*, *Cebus* y *Patas*) con una cepa diabetogénica de CVB4 y condujo a la demostración de que solamente en los monos de la especie *Patas* se producía anomalías en la tolerancia a la glucosa y una disminución en la secreción de insulina después de la infección por CVB4. Puesto que las alteraciones se presentaron solamente en una de las especies de monos inoculadas con la misma variante viral, este estudio demuestra la importancia de la genética del huésped como un factor crítico para el desarrollo de diabetes tipo 1 (Jun y Yoon, 2002).

Sin embargo, el desarrollo de diabetes tipo 1 en una paciente con antecedentes de infección durante la epidemia de meningoencefalitis del 2001 la cual presenta un genotipo relacionado con un bajo riesgo hacia diabetes (DR2/DR7 y DQ 2/DQ6) sugiere que el efecto determinante de la susceptibilidad genética no es absoluto y

abre la posibilidad de que la infección por E30 pudo ser un contribuyente ambiental que desencadenó la enfermedad en la paciente estudiada. Estos resultados concuerdan con reportes previos de Craig y colaboradores (Craig y cols., 2003) y apoyan el papel de la infección por enterovirus en el desarrollo de diabetes tipo 1 en niños y adolescentes con una predisposición genética atípica.

De este modo, nuestro primer estudio permitió demostrar que los enterovirus pueden contribuir al desencadenamiento de la autoinmunidad pancreática y comienzo de la diabetes tipo 1 en individuos sin antecedentes personales de diabetes tipo 1 y con componentes de haplotipos de resistencia a esta enfermedad. Así pues, el próximo paso de nuestra investigación fue conocer **si la infección por enterovirus también está asociada con el comienzo clínico de la enfermedad en diabéticos tipo 1 de diagnóstico reciente o con la presencia de marcadores humorales de autoinmunidad pancreática en sujetos con alto riesgo a desarrollar la enfermedad como son los familiares de primer grado de diabéticos tipo 1.**

Nuestro segundo estudio permitió demostrar que la presencia de ARN de enterovirus está asociada con el inicio de la enfermedad clínica en diabéticos tipo 1 de reciente diagnóstico y con la presencia de marcadores autoinmunes de progresión a diabetes tipo 1 en familiares de primer grado de diabéticos tipo 1, lo que sugiere que los enterovirus participan tanto en el curso de la diabetes clínica como en los estadios preclínicos de autoinmunidad contra las células β pancreáticas.

El mecanismo por el cual los enterovirus pueden desencadenar una respuesta inmune dirigida contra las células β pancreáticas no se conoce con exactitud (van der Werf y cols, 2007). De los mecanismos que han sido propuestos, en nuestro trabajo nos enfocamos en el mimetismo molecular preguntándonos **si existe reactividad cruzada de la respuesta inmune humoral contra diferentes serotipos de enterovirus frente a los principales antígenos de las células β pancreáticas humanas.**

Hasta este momento, la reactividad cruzada inmunológica entre enterovirus y determinantes antigénicos de los islotes del páncreas humano sólo se había

demostrado para los coxsackievirus del grupo B (Varela-Calvino y cols., 2000; Marttila y cols., 2001; Tong y cols., 2002; Chou y cols., 2004). El hecho de haber demostrado que la respuesta inmune generada en conejos contra diferentes serotipos de enterovirus (echovirus y coxsackievirus) muestra reactividad cruzada con la GAD 65 humana nos permiten suponer que la identidad de secuencias o estructuras entre determinantes autoantigénicos y virales no es un fenómeno exclusivo para los coxsackievirus del grupo B sino que puede estar presente en diferentes serotipos de enterovirus. Probablemente la exposición de un individuo a infecciones con diferentes serotipos de enterovirus que compartan determinantes antigénicos comunes con las células β pancreáticas pudiera ser uno de los factores involucrados en la generación de una respuesta autoinmune pancreática. No obstante, no podemos excluir la posibilidad de que el desarrollo de una respuesta autoinmune pancreática sea el resultado de un daño tisular directo de los islotes pancreáticos (Elshebani y cols., 2007). En efecto, hemos demostrado asociación entre la presencia de ARN de enterovirus y cetoacidosis severa en diabéticos tipo 1 al comienzo clínico de la enfermedad lo que sugiere que los enterovirus pueden causar un daño citolítico agudo de las células β . Presumiblemente los enterovirus pueden contribuir al proceso de destrucción de las células β pancreáticas por diferentes mecanismos los cuales pueden operar en los mismos o distintos estadios del desarrollo de la diabetes tipo 1.

A nuestro juicio, los resultados presentados en este trabajo aportan nuevas evidencias que permiten apoyar hipotéticamente que la infección por enterovirus desencadena, perpetúa o bien precipita la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas. Desde luego, no debemos pretender que estos resultados constituyan un índice de probables relaciones causales.

Reconocemos que la relación causal de los enterovirus con la diabetes tipo 1 es difícil de probar debido al largo período preclínico de autoinmunidad que precede a la diabetes. En la mayoría de los casos la etapa subclínica de la enfermedad puede durar meses y hasta años por lo que cuando la diabetes o prediabetes es diagnosticada, la autoinmunidad contra las células β ya se encuentra firmemente

establecida y la exposición a su agente desencadenante puede haber desaparecido lo cual se conoce en la literatura inglesa como el efecto de hit and run. Así pues, cualquier efecto del virus probablemente pudo haber tenido lugar varios meses o años antes del diagnóstico de la diabetes por lo que la interacción virus-huésped es difícil de comprobar (Eisenbarth, 2004). De hecho, algunos autores opinan que la ocurrencia de infección por enterovirus y desarrollo de diabetes tipo 1 en un individuo pueden ser la coincidencia de dos eventos reales pero no necesariamente relacionados (Graves y cols., 1997). Aunque no podemos descartar esta posibilidad, la coherencia de los hallazgos obtenidos en nuestros estudios y su consistencia con estudios previos (Hiltunen y cols., 1997; Hyoty y cols., 1998; Lonrot y cols., 2000a,b; Hyoty, 2002) que demuestran la asociación temporal de la infección por enterovirus con el desencadenamiento de autoinmunidad pancreática y comienzo de la enfermedad clínica permiten sugerir que las infecciones por enterovirus constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de la diabetes tipo 1.

Otro factor que ha hecho polémica la posible relación causal de los enterovirus con la diabetes tipo 1 es que las infecciones por enterovirus son muy comunes y causan una amplia gama de enfermedades principalmente en la niñez y adolescencia mientras que la diabetes es comparativamente menos frecuente, con lo cual resulta obvio que la mayoría de las infecciones por enterovirus no estén asociadas con progresión a diabetes. Por otra parte, si los enterovirus constituyen factores ambientales relacionados con el desarrollo de diabetes tipo 1 podría esperarse que la incidencia de la diabetes tipo 1 sea mayor en poblaciones con alta prevalencia de circulación de enterovirus. Sin embargo, a pesar de esta expectativa la mayor incidencia de diabetes tipo 1 se reporta en países como Finlandia, Suecia, Alemania, Holanda e Inglaterra donde la prevalencia de circulación de enterovirus es baja (Tuomilehto y cols., 1995; Hovi, 1998; Lonrot y cols., 1999; Viskari y cols., 2000; Green y cols., 2001). Entonces, cabría preguntar, ¿Por qué la incidencia de la diabetes tipo 1 es alta en poblaciones europeas donde la circulación de enterovirus es baja a diferencia de la población cubana que exhibe un panorama completamente opuesto?

Nosotros proponemos varias explicaciones razonables para esta paradoja. Una posible explicación radica en las diferencias en la composición genética de las poblaciones humanas. Consideramos que en países europeos aunque la circulación de enterovirus es baja los mismos encuentran un “escenario genético” más favorable para el desarrollo de la enfermedad dado por la mayor presencia de genotipos HLA DR y DQ que confieren alto riesgo de diabetes tipo 1 en la población general (Viskari y cols., 2000). De hecho, Ronningen y sus colegas han reunido evidencias que demuestran la existencia de una correlación entre la incidencia de diabetes tipo 1 en niños menores de 15 años en Europa y la presencia genotipos de alto riesgo de diabetes tipo 1 (Ronningen y cols., 2001). Estudios muy recientes realizados en Cuba sobre la distribución de los alelos HLA en la población general han demostrado una baja frecuencia de alelos de alto riesgo en la población cubana y una alta frecuencia de alelos de protección lo cual pudiera, en parte, justificar la baja incidencia de la diabetes tipo 1 a pesar de la circulación de variantes de enterovirus potencialmente diabetogénicas en nuestro país (Alegre y cols., 2007).

Otra posible respuesta a la interrogante la podemos encontrar en la llamada “hipótesis de higiene”. Según esta hipótesis, parte del riesgo de diabetes tipo 1 pudiera ser debido a la carencia de exposiciones tempranas y sostenidas a infecciones por enterovirus (Hiltunen y cols., 1999). Este análisis lo podemos sustentar con experiencias previas obtenidas con la poliomielitis, que es una enfermedad producida por poliovirus, un miembro del género enterovirus y donde el riesgo del daño de las neuronas motoras se incrementa cuando la frecuencia de infección por poliovirus disminuye en la población. La infección por poliovirus fue endémica hasta finales del siglo XIX cuando la frecuencia de infección disminuyó debido a un mejoramiento de los niveles de vida e higiene. Hasta entonces, la infección por poliovirus fue frecuente pero la enfermedad parálisis era rara. Cuando la frecuencia de infecciones por poliovirus disminuyó, paradójicamente la incidencia de la parálisis como complicación de la infección aumentó considerablemente (Hyoty y Taylor, 2002; Viskari y cols., 2004). Las bases de este fenómeno fue un retraso en la edad de exposición inicial a la infección y por tanto

la frecuencia de las manifestaciones más severa de la enfermedad aumentaron (Viskari y cols., 2005). Por esta misma razón, el riesgo de enfermedad parálitica fue mucho más alto en países europeos donde la infección por poliovirus es menor comparado con países como Cuba donde la infección por poliovirus era más común (Más, 1999). De acuerdo a estas observaciones, pensamos que un mecanismo similar debe operar para las cepas diabetogénicas de enterovirus. Es decir, un ambiente con una baja frecuencia de infecciones por enterovirus favorece que los individuos sean más vulnerables al efecto diabetogénico de tales virus y por consiguiente el desarrollo de diabetes como complicación de la infección es más común. Por el contrario, en Cuba el desarrollo de diabetes se puede ver reducida por la gran circulación de enterovirus (Bello y cols., 1997; Más y cols., 2001) que protegen a la población desde edades tempranas a la subsiguiente exposición a variantes diabetogénicas de enterovirus.

Diferentes estudios en modelos experimentales han permitido demostrar que la incidencia de diabetes autoinmune puede ser reducida sustancialmente en ratas BB y ratones NOD por la exposición de los roedores a altas dosis de antígenos microbianos en las etapas tempranas de la vida (Jun y Yoon, 2002). Basados en estas observaciones y en el indiscutible incremento de las condiciones higiénicas en las dos últimas décadas en los países industrializados, podemos sugerir que el incremento de la diabetes tipo 1 en gran parte de los países europeos quizás se deba a una mejor higiene dando lugar a una reducción postnatal de los antígenos microbianos.

Por otra parte se conoce que la eliminación de las células que adquieren receptores para moléculas propias no es exhaustiva dejando escapar un gran número de células potencialmente autorreactivas que pueden reconocer determinantes autoantigénicos claves como pueden ser los autoantígenos pancreáticos GAD65, IA2 e insulina (Ueda y cols., 2003). A pesar de la presencia de estas células autorreactivas que forman parte del repertorio inmune de un individuo, la inmunopatología no se produce debido a la presencia de las llamadas células T reguladoras que ejercen una actividad de control o protección (Kokuina, 2001). No obstante, estudios muy recientes han revelado que tanto las células reguladoras o

protectoras como las autorreactivas pueden reconocer los mismos determinantes antigénicos, lo cual implica que una infección viral pudiera conducir a dos posibilidades: I) que las células autorreactivas existentes pero controladas hasta el momento adquieran capacidades patogénicas y desencadenar la enfermedad autoinmune o por el contrario, II) que se preserve la actividad reguladora favoreciendo la generación de una respuesta protectora (Homann y Eisenbarth, 2006).

De esta manera, aunque nuestros hallazgos se encuentran hasta el momento limitados a la influencia de la infección por enterovirus sobre la presencia de marcadores humorales de autoinmunidad pancreática, pensamos que en nuestro escenario de alta incidencia de infecciones por enterovirus y por el contrario, baja incidencia de diabetes tipo 1 pudiera existir la posibilidad de un balance favorecido hacia respuestas inmunes protectoras predominantes contra antígenos pancreáticos sobre las patogénicas bajo la influencia de este factor ambiental. Esta propuesta la podemos fundamentar con estudios previos realizados en modelos animales donde se ha demostrado que la modulación de la regulación inmune bajo la influencia de una infección viral es dependiente de la predisposición genética del huésped (Zipris y cols., 2003).

Por último debemos tener en cuenta que la etiología de la diabetes tipo 1 tiene una naturaleza multifactorial por lo que no debemos atribuir los procesos de destrucción autoinmune de las células β pancreáticas que conduce a la diabetes tipo 1 solamente como una consecuencia de la infección por enterovirus (Akerblom y cols., 2005; Sadeharju y cols., 2003; Knip y cols., 2005). A nuestro juicio, la diabetes tipo 1 clínicamente evidente es solo el Iceberg de una amplia gama de sucesos inmunológicos, genéticos y ambientales (estrés físico y psicológico, nitrosaminas en la dieta, acumulación de grasas, etc) que actúan de conjunto hasta producir al daño de las células β pancreáticas, entre los cuales las infecciones por enterovirus pueden formar parte de esta interacción (Figura 6).

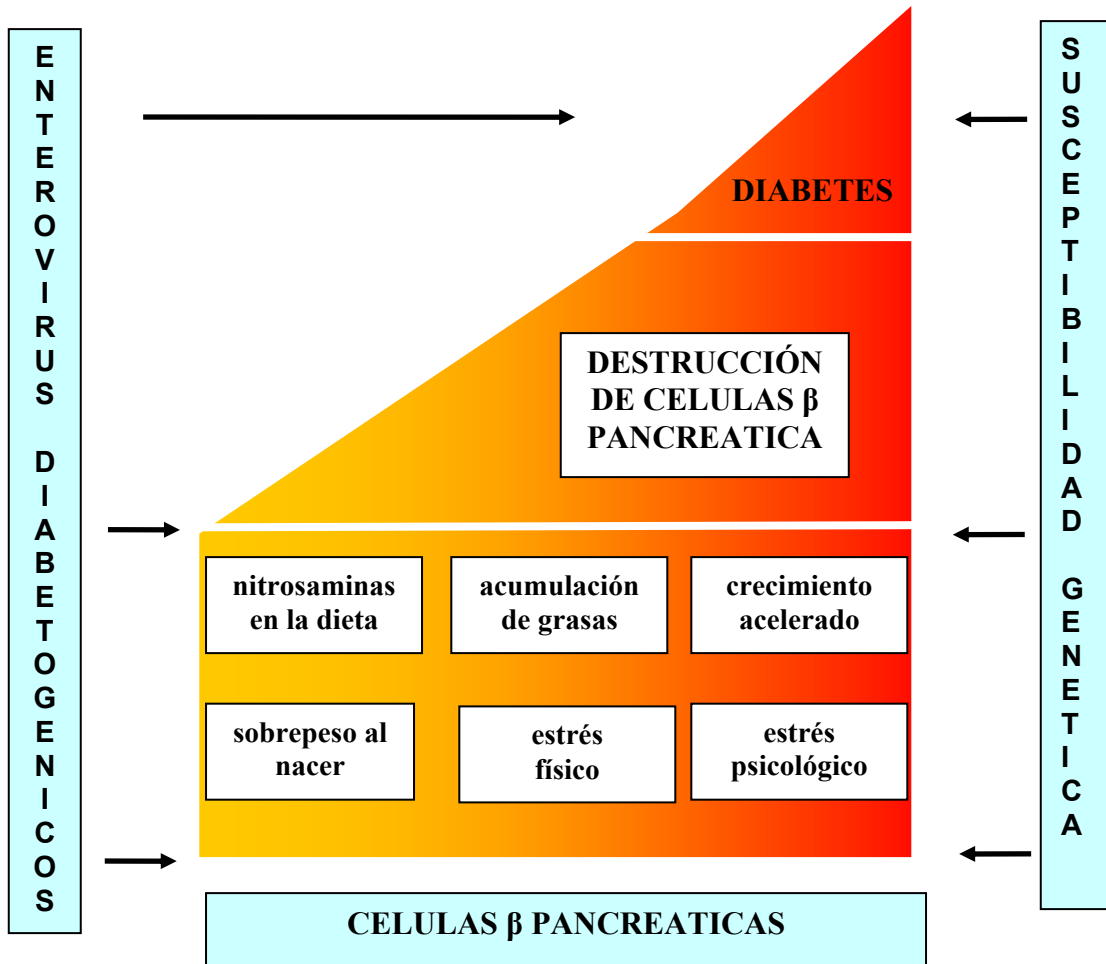


Figura 6. Participación de los enterovirus en la patogénesis de la diabetes tipo 1.

Estamos conscientes que nuestro trabajo no da respuesta a toda la polémica que existe en relación al posible papel etiológico de los enterovirus en la diabetes, pero los resultados obtenidos han demostrado la veracidad de la hipótesis formulada y aportan nuevas evidencias científicas a favor de la participación de los enterovirus como un importante factor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad crónica. Si ello motiva a la comunidad científica a descifrar las posibles causas infecciosas de enfermedades crónicas de etiología desconocida, no es utópico pensar que en un futuro algunas enfermedades crónicas no transmisibles pudieran ser tratadas con antibióticos, prevenidas por vacunas o controladas por programas de educación de salud.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

- 1- La infección por E16 y E30 está asociada con la inducción de marcadores humorales del proceso de destrucción autoinmune de las células β pancreáticas.
- 2- La presencia de ARN de enterovirus está asociada con el comienzo clínico de la enfermedad en diabéticos tipo 1 de diagnóstico reciente y con la presencia de anticuerpos contra los islotes pancreáticos en familiares de primer grado de diabéticos tipo 1.
- 3- Existe reactividad cruzada de la respuesta inmune humoral generada en conejos contra diferentes serotipos de enterovirus frente al autoantígeno pancreático GAD65.
- 4- Se sugiere que los enterovirus inducen una respuesta autoinmune humoral pancreática mediante los mecanismos de mimetismo molecular y daño citolítico de las células β pancreáticas.

VII. RECOMENDACIONES

VII. RECOMENDACIONES

1. Investigar prospectivamente los pacientes que resultaron positivos autoanticuerpos asociados a diabetes tipo 1 durante las epidemias de meningoencefalitis ocurridas en Cuba en el 2000 y 2001 explorando la evolución de la autoinmunidad pancreática y desarrollo de diabetes tipo 1.
2. Caracterizar molecularmente las cepas de E16 y E30 aisladas durante la epidemias del 2000 y 2001 con vistas a dilucidar las bases estructurales que distinguen a estas cepas asociadas con la autoinmunidad pancreática.
3. Evaluar la capacidad de las cepas epidémicas de E16 y E30 de causar daño tisular directo de los islotes pancreáticos mediante estudios in vitro de citotoxicidad sobre las células β .
4. Evaluar la capacidad de las cepas epidémicas de E16 y E30 de mediar una respuesta inmune innata pro-inflamatoria (activación bystander) mediante estudios in vitro de activación de células dendríticas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abad FX, Pinto RM, Bosch A. Disinfection of human enteric viruses on fomites. *FEMS Microbiol Lett* 1997;156:107-11.
2. Abzug MJ. Presentation, diagnosis, and management of enterovirus infections in neonates. *Paediatr Drugs* 2004;6:1-10.
3. Achenbach P, Bonifacio E, Koczwara K, Ziegler A. Natural history of type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54:S25-31.
4. Akerblom HK, Knip M. Putative environmental factors in type 1 diabetes. *Diabet Metab Rev* 1998;14:31-67.
5. Akerblom HK, Vaarala O, Hyoty H, Ilonen J, Knip M. Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. *Am J Med Genet* 2002;30:18-29.
6. Akerblom HK, Virtanen SM, Ilonen J, Savilahti E, Vaarala O, Reunanen A, et al. Dietary manipulation of beta cell autoimmunity in infants at increased risk of type 1 diabetes: a pilot study. *Diabetologia* 2005;48:829-37.
7. Al Hello H, Davydova B, Smura T, Kaialainen S, Ylipaasto P, Saario E, et al. Phenotypic and genetic changes in coxsackievirus B5 following repeated passage in mouse pancreas in vivo. *J Med Virol* 2005;75:566-74.
8. Alberti KG, Zimmet PZ, WHO. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabetic Med* 1998;5:539-53.
9. Alegre R, Moscoso J, Martinez-Laso J, Martin-Villa M, Suarez J, Moreno A, et al. HLA genes in Cubans and the detection of Amerindian alleles. *Mol Immunol* 2007;44:2426-35.
10. Amedei A, Bergman M, Appelmelk B, Azzurri A, Benagiano M, Tamburini C, et al. Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* antigens and H+, K+ -- adenosine triphosphatase in human gastric autoimmunity. *J Exp Med* 2003;198:1147.
11. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabet Care* 2005;27:S5-S10.
12. American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabet Care* 1997;20:1183-97.

13. American Type Culture Collection. Catalogue of cell lines and hybridomas. 7^{ma} ed. Rockville: American Type Culture Collection; 1992.p.48.
14. Andreoletti L, Damman N, Dewilde A, Vallee L, Cremer R, Hober D, et al. Comparison of use of cerebrospinal fluid, serum, and throat swab specimens in diagnosis of enteroviral acute neurological infection by a rapid RNA detection PCR assay. *J Clin Microbiol* 1998;36:589-91.
15. Andreoletti L, Hober D, Hober-Vandenberghe C, Belaich S, Vantghem MC, Lefebvre J, et al. Detection of coxsackie B virus RNA sequences in whole blood samples from adult patients at the onset of type I diabetes mellitus. *J Med Virol* 1997;52:121-7.
16. Atkinson MA, Kaufman D, Newman D, Tobin A, Maclaren N. Islet cell cytoplasmic autoantibody reactivity to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 1993;91:350-56.
17. Bae Y, Yoon J. Determination of diabetogenicity attributable to a single amino acid Ala-776, on the polyprotein of encephalomyocarditis virus. *Diabetes* 1993;42:435-43.
18. Bahillo C, Hermoso L, Marugan M, Lama G, Garcia V, Ochoa S, et al. Factores ambientales implicados en la etiopatogenia de la diabetes mellitus tipo 1 infantil. *Bol Pediatr* 2006;46:120-27.
19. Banatvala JE, Bryant J, Schernthaner G, Borkenstein M, Schober E, Brown D, 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* 1985;1:1409-12.
20. Banerjee R, Weidman MK, Echeverri A, Kundu P, Dasgupta A. Regulation of poliovirus 3C protease by the 2C polypeptide. *J Virol* 2004;78:9243-56.
21. Barker JM, Barriga KJ, Yu L, Miao D, Erlich HA, Norris JM, et al. Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: diabetes autoimmunity study in the young (DAYSY). *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3896-902.
22. Barker JM, Yu J, Yu L, Wang J, Miao D, Bao F, et al. Autoantibody "subspecificity" in type 1 diabetes. Risk for organ-specific autoimmunity clusters in distinct groups. *Diabet Care* 2005;28:850-5.
23. Baxter NJ, Roetzer A, Liebig HD, Sedelnikova SE, Hounslow AM, Skern T. Structure and dynamics of coxsackievirus B4 2A proteinase, an enzyme involved in the etiology of heart disease. *J Virol* 2006;80:1451-62.
24. Bello M, Mas P, Palomera R, Morier L, Avalos I, Acosta B, et al. Meningoencefalitis virales por enterovirus en el período 1990-1995. *Rev Arg Microbiol* 1997;29:176-83.
25. Bendig J, Earl P. The Lim Benyesh-Melnick antiserum pools for serotyping human enterovirus cell culture isolates--still useful, but may fail to identify

- current strains of echovirus 18. *J Virol Methods* 2005;127:96-9.
26. Berger M, Kopp N, Vital C, Redl B, Aymard M, Lina B. Detection and cellular localization of enterovirus RNA sequences in spinal cord of patients with ALS. *Neurology* 2000;54:20-5.
 27. Bonifacio E, Lampasona V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E. 1995. Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40k autoantigen and a target of islet-cell antibodies. *J Immunol* 1995;155:5419-26.
 28. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 1974;2:1279-83.
 29. Buesa-Gomez J, de la Torre JC, Dyrberg T, Landin-Olsson M, Mauseth RS, Lernmark A, et al. Failure to detect genomic viral sequences in pancreatic tissues from two children with acute-onset diabetes mellitus. *J Med Virol* 1994;42:193-7.
 30. Bunce M. PCR-SSP typing. In: Bedwell JC, Navarrete C, eds. *Histocompatibility testing*. Imperial College Press;2000. p.149.
 31. Cabrera-Rode E, Suárez L, Díaz-Horta O, Díaz O. Physiopathologic classification of diabetes mellitus. *Rev Cub Endocrinol* 1998;9:91-4.
 32. Cabrera-Rode E, Díaz-Horta O, Rendón A, Molina G, Vera M, Licea M, et al. Prevalence of islet cell antibodies (ICA) in diabetes mellitus and other diseases in Cubans. *Autoimmunity* 1997;26:7-9.
 33. Cabrera-Rode E, Fernandez LE, Carr A, Marquina G, Valiente O, Uriarte A, et al. Which glycolipids are the autoantigens of cytoplasmatic islet cell antibodies?. *Acta Diabetol* 1992;29:70-4.
 34. Cabrera-Rode E, Suárez L, Díaz-Horta O, Díaz O. New criteria for the classification of the diabetes mellitus. *Rev Cub Endocrinol* 2000;11:51-5.
 35. Castillo A, Morier L. Obtención de una línea celular diploide de pulmón humano (PHuE-1). *Rev Cub Med Trop* 1992;44:224-5.
 36. Casu A, Trucco M, Pietropaolo M. A look to the future: Prediction, prevention, and cure including islet transplantation and stem cell therapy. *Pediatr Clin N Am* 2005;52:1779-1804.
 37. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreaks of aseptic meningitis associated with echoviruses 9 and 30 and preliminary surveillance reports on enterovirus activity - United States, 2003. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2003;52:761-4.
 38. Centers for Disease Control and Prevention. Enterovirus surveillance-United States, 2002-2004. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2006;55:153-6.

39. Chehadeh W, Weill J, Vantighem MC, Alm G, Lefebvre J, Wattré P, et al. Increased level of interferon-alpha in blood of patients with insulin-dependent diabetes mellitus: relationship with coxsackievirus B infection. *J Infect Dis* 2000;181:1929-39.
40. Chen S, Willis J, Maclean C, Ananieva-Jordanova R, Amoroso MA, Brooking H, et al. Sensitive non-isotopic assays for autoantibodies to IA2 and to a combination of both IA2 and GAD65. *Clin Chem Acta* 2005;357:74-83.
41. Cherry J. Enteroviruses: coxsackieviruses, enteroviruses and polioviruses. In: Feigin R, Cherry J, eds. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. 4th ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders;1998.p.1787-1839.
42. Chonmaitree T, Baldwin C, Lucia H. Role of the virology laboratory in diagnosis and management of patients with central nervous system diseases. *Clin Microbiol Rev* 1989;2:1-14.
43. Chou CC, Lin KH, Ke GM, Tung YC, Chao MC, Cheng JY et al. Comparison nucleotide sequence of p2C region in diabetogenic and non- diabetogenic coxsackie virus B5 isolates. *Kaohsiung J Med Sci* 2004;20:525-32.
44. Clements GB, Galbraith DN, Taylor KW. Coxsackie B virus infection and onset of childhood diabetes. *Lancet* 1995;346:221-3.
45. Collado F, Diaz O, Hernandez I. Epidemiologic behaviour of insulin dependent diabetes mellitus in children younger than 15 years of old. Cuba, 1990-1993. *Rev Cub Endocrinol* 1993;8:119-25.
46. Coutant R, Carel JC, Lebon P, Bougneres PF, Palmer P, Cantero-Aguilar L. Detection of enterovirus RNA sequences in serum samples from autoantibody-positive subjects at risk for diabetes. *Diabet Med* 2002;19:968-9.
47. Craig ME, Howard NJ, Silink M, Rawlinson WD. Reduced frequency of HLA DRB1*03-DQB1*02 in children with type 1 diabetes associated with enterovirus RNA. *J Infect Dis* 2003;187:1562-70.
48. Dahlquist GG, Forsberg J, Hagenfeldt L, Boman J, Juto P. Increased prevalence of enteroviral RNA in blood spots from newborn children who later developed type 1 diabetes: a population-based case-control study. *Diabet Care* 2004;27:285-6.
49. Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ* 2004;328:750-4.
50. Diabetes atlas-Incidence. www.eatlas.idf.org. 2005
51. Diaz O, Carvajal F, Fernández L, Rodríguez J. Epidemiology of type 1 diabetes mellitus in children younger than 15 years old. Evidence of season variation. *Invest Biochem* 1983;2:316-25.

52. Diaz-Horta O, Bello M, Cabrera-Rode E, Suárez J, Mas P, García I, et al. Echovirus 4 and Type 1 Diabetes Mellitus. *Autoimmunity* 2001;34:275-81.
53. Domingo E, Holland J. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In: Morse S, ed. *The Evolutionary Biology of Viruses*. New York; Raven Press;1994.p.161-84.
54. Dorta J, Reiber H, Tarrau M, Weissbrich B, Morales M, García E, et al. Valor neuroinmunoepidemiológico del reibergrama en la primera epidemia de meningoencefalitis por echovirus 16 en Cuba. *Rev Neurol* 2002;35:517-20
55. Dotta F, Previti M, Lenti L, Dionisi S, Casetta B, D'Erme M, et al. GM2-1 pancreatic islet ganglioside: identification and characterization of a novel islet-specific molecule. *Diabetologia* 1995;38:1117-21.
56. Drescher KM, Kono K, Bopegamage S, Carson SD, Tracy S. Coxsackievirus B3 infection and type 1 diabetes development in NOD mice: insulinitis determines susceptibility of pancreatic islets to virus infections. *Virology* 2004;329:381-94.
57. Dronfield D, Taylor K. Changes in serum insulin and islet cell antibodies following an outbreak of Echovirus 4 in Glasgow. *Diabet Med* 1993;10:S41.
58. Eisenbarth GS. Prediction of type 1 diabetes: The natural history of the prediabetic period. In: George S Eisenbarth, ed. *Immunology of type 1 diabetes*. New York: Eureka.com and Kluwer Academic/ Plenum Publishers;2004.p.268-85.
59. Elfaitouri A, Mohamed N, Fohlman J, Aapholm R, Frisk G, Froman G et al. Qualitative PCR-enhanced immunoassay for measurement of enteroviral immunoglobulin M antibody and diagnosis of aseptic meningitis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:235-41.
60. Elshebani A, Olsson A, Westman J, Tuvemo T, Korsgren O, Frisk G. Effects on isolated human pancreatic islet cells after infection with strains of enterovirus isolated at clinical presentation of type 1 diabetes. *Virus Res* 2007;124:193-203.
61. Ezcurra E. Montaje y estandarización de la determinación de hemoglobina glucosilada. *Rev Cub Med* 1986;5:397-402.
62. Farag A, Karam J, Nicasio J, McFarlane SI. Prevention of type 2 diabetes: an update. *Curr Diab Rep* 2007;7:200-7.
63. Farilla L, Tibert C, Luzzago A, Yu L, Eisenbarth GS, Cortese R, et al. Application of phage display peptide library to autoimmune diabetes: identification of IA-2/ICA512bdc dominant autoantigenic epitopes. *Eur J Immunol* 2002;32:1420-7.

64. Feltbower RG, Bodansky HJ, McKinney PA, Houghton J, Stephenson CR, Haigh D. Trends in the incidence of childhood diabetes in south Asians and other children in Bradford, UK. *Diabet Med* 2002;19:162-6.
65. Fenkci SM, Yaylah G, Güclü A, Topsakal S, Sermez Y. Two cases with non autoimmune type 1 diabetes resembling to fulminant diabetes. *Tur J Endocrinol Metab* 2005;2:65-9.
66. Fluckinger R, Winterhalter KH. In vitro synthesis of hemoglobin A1c. *Febs Lett* 1976;71:356-60.
67. Foulis AK, Farquharson MA, Cameron SO, McGill M, Schonke H, Kandolf R. A search for the presence of the enteroviral capsid protein VP1 in pancreases of patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes and pancreases and hearts of infants who died of coxsackieviral myocarditis. *Diabetologia* 1990;33:290-8.
68. Foulis AK, McGill M, Farquharson MA, Hilton DA. A search for evidence of viral infection in pancreases of newly diagnosed patients with IDDM. *Diabetologia* 1997;40:53-61.
69. Foy CA, Quirke P, Lewis FA, Futers TS, Bodansky H. Detection of common viruses using the polymerase chain reaction to assess levels of viral presence in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabet Med* 1995;12:1002-8.
70. Foy CA, Quirke P, Williams D, Lewis FA, Grant PJ, Eglin R et al. A search for candidate viruses in type 1 diabetic pancreas using the polymerase chain reaction. *Diabet Med* 1994;11:564-9.
71. Frisk G, Fohlman J, Kobbah M, Ewald U, Tuvemo T, Diderholm H, et al. High frequency of Coxsackie B virus-specific IgM in children developing type 1 diabetes during a period of high diabetes morbidity. *J Med Virol* 1985;17:219-27.
72. Frisk G, Friman G, Tuvemo T, Fohlman J, Diderholm H. Coxsackie B virus IgM in children at onset of type 1 (insulin dependent) diabetes mellitus: Evidence for IgM induction by a recent or current infection. *Diabetologia* 1992;35:249-53.
73. Fujinami RS, von Herrath MG, Christen U, Whitton, J. Molecular Mimicry, Bystander Activation, or Viral Persistence: Infections and Autoimmune Disease. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:80-94.
74. Gale EAM. The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century. *Diabetes* 2002;51:3353-61.
75. Gamble DR, Kinsley MJ, Fitzgerald MG, Bolton R, Taylor KW. Viral antibodies in diabetes mellitus. *Br Med J* 1969;3:627-30.
76. Gamble DR, Taylor KW, Cumming H. Coxsackie viruses and diabetes mellitus. *Br Med J* 1973;4:260-2.

77. Giachetti C, Semler B. Role of a viral membrane polypeptide in strand-specific initiation of poliovirus RNA synthesis. *J Virol* 1991;65:2647-54.
78. Glenson R, Kahn C, Funk I, Craighead J. Seasonal incidence of insulin dependent diabetes in Massachusetts, 1964-1973. *Int J Epidemiol* 1982;11:39-45.
79. Graves PM, Norris JM, Pallansch MA, Gerling IC, Rewers M. The role of enteroviral infections in the development of IDDM: limitations of current approaches. *Diabetes* 1997;46:161-8.
80. Graves PM, Rotbart HA, Nix WA, Pallansch MA, Erlich HA, Norris JM, et al. Prospective study of enteroviral infections and development of beta-cell autoimmunity. Diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). *Diabet Res Clin Pract* 2003;59:51-61.
81. Green A, Patterson CC, on behalf of the EURODIAB TIGER Study Group. Trends in the incidence of childhood-onset diabetes in Europe 1989-1998. *Diabetologia* 2001;44:B3-B8.
82. Green J, Casabonne D, Newton R. Coxsackie B virus serology and Type 1 diabetes mellitus: a systematic review of published case-control studies. *Diabet Med* 2004;21:507-14.
83. Green J, Feinglos M. Update on type 2 diabetes mellitus: understanding changes in the diabetes treatment paradigm. *Int J Clin Pract* 2007;154:3-11.
84. Guazzarotti L, Thivolet C, Tardivel I, Chevalier A, European prediabetes study group and Carel JC. Reactivity of islet cell antibodies (ICA) to recombinant glutamic acid decarboxylase (GAD). *J Autoimmunity* 1995;8:901-14.
85. Hadden DR, Connolly JH, Montgomery D, Weaver JA. Coxsackie B virus and diabetes. *Br Med J* 1972;4:729.
86. Haider MZ, Shaltout A, Alsaeid K, Al-Khawari M, Dorman JS. High frequency of HLA-DQB1 non-Asp(57) alleles in Kuwaiti children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Hum Hered* 2000;50:242-6.
87. Haller MJ, Atkinson MA, Schatz D. Type 1 diabetes mellitus: Etiology, presentation, and management. *Pediatr Clin N Am* 2005;52:1553-78.
88. Halonen P, Rocha E, Hierholzer J. Detection of enteroviruses and rhinoviruses in clinical specimens by PCR and liquid-phase hybridization. *J Clin Microbiol* 1995;33:648-53.
89. Harashima S, Clark A, Christie MR, Notkins AL. The dense core transmembrane vesicle protein IA-2 is a regulator of vesicle number and insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:8704-9.
90. Harkonen T, Lankinen H, Davydova B, Hovi T, Roivainen M. Enterovirus infection can induce immune responses that crossreact with beta-cell autoantigen tyrosine phosphatase IA-2/IAR. *J Med Virol* 2002;66:340-50.

91. Harkonen T, Paananen A, Lankinen H, Hovi T, Vaarala O, Roivainen M. Enterovirus infection may induce humoral immune response reacting with islet cell autoantigens in humans. *J Med Virol* 2003;69:426-40.
92. Harkonen T, Puolakkainen M, Sarvas M, Airaksinen U, Hovi T, Roivainen M. Picornavirus proteins share antigenic determinants with heat shock proteins 60/65. *J Med Virol* 2000;62:383-91.
93. Harvala H, Kalimo H, Dahllund L, Santti J, Hughes P, Hyypia T, et al. Mapping of tissue tropism determinants in coxsackievirus genomes. *J Gen Virol* 2002;83:1697-706.
94. Haverkos HW, Battula N, Drotman DP, Rennert OM. Enteroviruses and type 1 diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother* 2003;57:379-85.
95. Hayashi K, Boucher D, Notkins A. Virus-induced diabetes mellitus. Relationship between β cell damage and hyperglycemia in mice infected with encephalomyocarditis virus. *Am J Pathol* 1974;75:91-102.
96. Heim A. From poliovirus surveillance to enterovirus surveillance: a complete picture? *J Med Microbiol* 2005;54:1-2.
97. Helfand RF, Gary HE, Freeman CY, Anderson LJ, Pallansch MA, Pittsburgh Diabetes Research Group. Serologic evidence of an association between enteroviruses and the onset of type 1 diabetes mellitus. *J Infect Dis* 1995;172:1206-11.
98. Hiltunen M, Hyoty H, Knip M, Ilonen J, Reijonen H, Vahasalo P, et al. Islet cell antibody seroconversion in children is temporally associated with enterovirus infections. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *J Infect Dis* 1997;175:554-60.
99. Hiltunen M, Lonrot M, Hyoty H. Immunisation and type 1 diabetes mellitus: is there a link? *Drug Saf* 1999;20:207-12.
100. Hindersson M, Elshebani A, Orn A, Tuvemo T, Frisk G. Simultaneous type 1 diabetes onset in mother and son coincident with an enteroviral infection. *J Clin Virol* 2005;33:158-67.
101. Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 2004;79:362-71.
102. Homann D, Eisenbarth G. An immunologic homunculus for type 1 diabetes. *J Clin Invest* 2006;116:1212-15.
103. Horwitz M, Bradley LM, Harbertson J, Krahl T, Lee J, Sarvetnick N. Diabetes induced by coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med* 1998;4:781-5.
104. Horwitz M, Fine C, Ilic A, Sarvetnick N. Requirements for viral-mediated autoimmune diabetes: beta-cell damage and immune infiltration. *J Autoimmun* 2001;16:211-7

105. Horwitz M, Ilic A, Fine C, Rodriguez E, Sarvetnick N. Presented antigen from damaged pancreatic beta cells activates autoreactive T cells in virus-mediated autoimmune diabetes. *J Clin Invest* 2002;109:79-87.
106. Hovi T. Molecular Epidemiology of enterovirus with special reference to their potential role in the etiology of insulin-dependent diabetes mellitus. A review. *Clin Diagn Virol* 1998;9:85-99.
107. Hu YE, Zhang HL, Cai T, Harashima S, Notkins AI. The IA-2 interactome. *Diabetologia* 2005;48:2576-81.
108. Huff JC, Hierholzer JC, Farris WA. An "outbreak" of juvenile diabetes mellitus: consideration of a viral etiology. *Am J Epidemiol* 1974;100:277-87.
109. Hughes J. Emerging Infectious Diseases: A CDC perspective. *Emerg Infect Dis* 2001;7:494-6.
110. Hyoty H, Hiltunen M, Knip M, Laakkonen M, Vahasalo P, Karjalainen J, et al. A prospective study of the role of coxsackie B and other enterovirus infections in the pathogenesis of IDDM. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetes* 1995;44:652-7.
111. Hyoty H, Hiltunen M, Lonrot M. Enterovirus infections and insulin dependent diabetes mellitus-evidence for causality. *Clin Diagn Virol* 1998;9:77-84.
112. Hyoty H, Taylor KW. The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia* 2002;45:1353-61.
113. Hyöty H. Enterovirus infections and type 1 diabetes. *Ann Med* 2002;34:138-47.
114. Hyttinen V, Kaprio J, Kinnunen L, Koskenvuo M, Tuomilehto J. Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs. *Diabetes* 2003;52:1052-5.
115. Hyypiä T, Auvinen P, Maaronen M. Polymerase chain reaction for human picornaviruses. *J Gen Virol* 1989;70:3261-328.
116. Hyypia T, Hovi T, Knowles N, Stanway G. Classification of enterovirus based on molecular and biological properties. *J Gen Virol* 1997;78:1-11.
117. Imagawa A, Hanafusa T, Makino H, Miyagawa JI, Juto P. High titres of IgA antibodies to enterovirus in fulminant type-1 diabetes. *Diabetologia* 2005;48:290-3.
118. Imagawa A, Hanafusa T, Miyagawa J, Matsuzawa Y. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. *New Engl J Med* 2000;342:301-7.
119. Iturriza M, Megson B, Gray J. Molecular detection and characterization of human enteroviruses directly from clinical samples using RT-PCR and DNA sequencing. *J Med Virol* 2006;78:243-53.

120. Johnston L, Siegel C. Presumptive identification of enteroviruses with RD, HEp-2, and RMK cell lines. *J Clin Microbiol* 1990;28:1049-50.
121. Julen J, Leparç-Goffart I, Lina B, Fuchs F, Fory S, Janatova I, et al. Postpolio syndrome: poliovirus persistence is involved in the pathogenesis. *J Neurol* 1999;246:472-6.
122. Jun H, Yoon J. A new look at Virus in Type 1 Diabetes. *Diabet Metab Res Rev* 2002;19:8-31
123. Jurgens CK, Barton DJ, Sharma N, Morasco BJ, Ogram SA, Flanagan JB. 2Apro is a multifunctional protein that regulates the stability, translation and replication of poliovirus RNA. *Virology* 2006;345:346-57.
124. Kanno T, Kim K, Kono K, Drescher KM, Chapman NM, Tracy S. Group B coxsackievirus diabetogenic phenotype correlates with replication efficiency. *J Virol* 2006;80:8843.
125. Kapsenberg J. Picornaviridae: the enteroviruses (polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses). In Lennette HE, Halonen P, and Murphy FA, eds. *Laboratory diagnosis of infectious diseases. Principles and practice*. New York: Springer- Verlag;1988.p.692-722.
126. Kaptur P, Thomas D, Giron D. Differing attachment of diabetogenic and nondiabetogenic variants of encephalomyocarditis virus to B-cells. *Diabetes* 1989;38:1103-8.
127. Karjalainen J. Islet cell antibodies as predictive markers for IDDM in children with high background incidence of disease. *Diabetes* 1990;39:1144-50.
128. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. *Diabet Care* 2000;23:1516-26.
129. Kaufman D, Erlander M, Clare-Salzler M, Atkinson N, Maclaren N, Tobin J. Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992;89:283-92.
130. Kawashima H, Ihara T, Ioi H, Oana S, Sato S, Kato N, et al. Enterovirus-related type 1 diabetes mellitus and antibodies to glutamic acid decarboxylase in Japan. *J Infect* 2004;49:147-51.
131. Kilpatrick DR, Nottay B, Yang SJ, Da Silva E, Peñaranda S, Pallansch M et al. Serotype-specific identification of polioviruses by PCR using primers containing mixed-base or Deoxyinosine residues at positions of codon degeneracy. *J Clin Microbiol* 1998;36:352-7.
132. King A, Brown F, Christian P, Hovi T, Hyypia T, Knowles N. Picornaviridae. In: Van Regenmortel M, Fauguet C, Bishop E, et al., eds. *Virus taxonomy: The classification and nomenclature of viruses*. Seventh

- report of the international committee on taxonomy of viruses. San Diego, CA: Academic Press;2000.p.657-73.
133. King ML, Shaikh A, Bidwell D, Voller A, Banatvala JE. Coxsackie B virus-specific IgM responses in children with insulin-dependent (juvenile-onset/type 1) diabetes mellitus. *Lancet* 1983;1:1397-9.
 134. Kitchin PA, Bootman YS. Quality control of polymerase chain reaction. *Rev Med Virol* 1993;3:107-14.
 135. Knip K. Natural course of preclinical type 1 diabetes. *Horm Res* 2002;57:6-11.
 136. Knip M, Akerblom HK. Environmental factors in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999;107:S93-100.
 137. Knip M, Veyda R, Virtanen SM, Hyöty H, Akerblom HK. Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54:5125.
 138. Kokuina E. De la autoinmunidad a las enfermedades autoinmunes. *Rev Cub Med* 2001;40:36-44.
 139. Korhonen S, Knip MM, Kulmala P, Savola K, Akerblom HK, Knip M. Autoantibodies to GAD, IA-2 and insulin in ICA-positive first degree relatives of children with type 1 diabetes: a comparison between parents and siblings. *Diabet Metab Res Rev* 2002;18:43-8.
 140. Kramer M, Schulte BM, Toonen LW, de Bruijini MA, Galama JM, et al. Echovirus infection causes rapid loss-of-function and cell death in human dendritic cells. *Cell Microbiol* 2007;9:1507-18.
 141. Krischer J, Cuthbertson DD, Yu L, Orban T, Maclare N, Jackson R, et al. Screening strategies for the identification of multiple antibody-positive relatives of individuals with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:103-8.
 142. Krischer J, Schatz D, Riley W, Spillar R, Silverstein J, Schwartz S, et al. Insulin and islet cell autoantibodies as time-dependent covariates in the development of insulin-dependent diabetes: A prospective study in relatives. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:743-9.
 143. Kubosaki A, Nakamura S, Notkins AL. Dense Core Vesicle Proteins IA-2 and IA-2 beta: Metabolic Alterations in Double Knockout Mice. *Diabetes* 2005;54:S46-S51.
 144. Kukko M, Toivonen A, Kupila A, Korhonen S, Keskinen P, Viejola R et al. Familial clustering of beta cell autoimmunity in initially non-diabetic children. *Diabet Metab Res Rev* 2006;22:53-8.
 145. Kulmala P, Savola K, Reijonen H, Veijola R, Vahasalo P, Karjalainen J, et al. Genetic markers, humoral autoimmunity, and prediction of type 1 diabetes in siblings of affected children. *Diabetes* 2000;49:48-58.

146. Kupila A, Muona P, Simell T, Arvilommi P, Savolainen H, Hamalainen A, et al. Feasibility of genetics and immunological prediction of Type 1 diabetes in a population based birth cohort. *Diabetologia* 2001;44:290-7.
147. Kupila L, Vuorinen T, Vainionpaa R, Hukkanen V, Marttila RJ, Kotilainen P. Etiology of aseptic meningitis and encephalitis in an adult population. *Neurology* 2006;66:75-80.
148. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989;339:237-8.
149. LaGasse JM, Brantley MS, Leech NJ, Rowe RE, Monks S, Palmer JP, et al. Successful prospective prediction of type 1 diabetes in schoolchildren through multiple defined autoantibodies: An 8-year follow-up of the Washington state diabetes prediction study. *Diabet Care* 2002;25:505-11.
150. Lammi N, Karvonen M, Tuomilehto J. Do microbes have a causal role in type 1 diabetes? *Med Sci Monit* 2005;11:RA63-69.
151. Lernmark A. Type 1 diabetes-Does suppressing T cells increase insulin?. *N Engl J Med* 2005;352:2642-4.
152. Lonrot M, Hyoty H, Knip M, Roivainen M, Kulmala P, Leinikki P, et al. Antibody cross-reactivity induced by the homologous regions in glutamic acid decarboxylase (GAD 65) and 2C protein of coxsackievirus B4. *Clin Exp Immunol* 1996;104:398-405.
153. Lonrot M, Knip M, Marciulionyte D, Rahko J, Urboinaite B, Moore W, et al. Enterovirus antibodies in relation to islet cell antibodies in two populations with high and low incidence of type 1 diabetes. *Diabet Care* 1999;22:2086-8.
154. Lonrot M, Knip M, Roivainen M, Koskela P, Akerblom HK, Hyoty H. Onset of type 1 diabetes mellitus in infancy after enterovirus infections. *Diabet Med* 1998;15:431-4.
155. Lonrot M, Korpela K, Knip M, Ilonen J, Simell O, Korhonen S, et al. Enterovirus infection as a risk factor for beta-cell autoimmunity in a prospectively observed birth cohort: the Finnish Diabetes Prediction and Prevention Study. *Diabetes* 2000a;49:1314-8.
156. Lonrot M, Salminen K, Knip M, Savola K, Kulmala P, Leinikki P, et al. Enterovirus RNA in serum is a risk factor for beta-cell autoimmunity and clinical type 1 diabetes: a prospective study. *Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. J Med Virol* 2000b;61:214-20.
157. Maclaren N, Horne G, Spillar R, Brown L, Silverstein J, Shah S, et al. The feasibility of using ICA to predict IDDM in U.S. school children. *Diabetes* 1990;39:122A.

158. Maclaren NK, Alkinson MA. Insulin-dependent diabetes mellitus: the hypothesis of molecular mimicry between islet cell antigens and microorganisms. *Mol Med Today* 1997;3:76-83.
159. Maldonado M, Hampe CS, Gaur HL, D'Amico S, Iyer D, Hammerle LP, et al. Ketosis-prone diabetes: Dissection of a heterogeneous syndrome using an immunogenetic and β -cell functional classification, prospective analysis, and clinical outcomes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5090-8.
160. Mansson L, Torn C, Landin-Olson M. Islet cell antibodies represent autoimmune response against several antigens. *Int J Exp Diabetes Res* 2001;2:85-90.
161. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et al. Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens* 2002;60:407-64.
162. Marttila J, Hyoty H, Vilja P, Harkonen T, Alho A, Roivainen M, et al. T cell epitopes in coxsackievirus B4 structural proteins concentrate in regions conserved between enteroviruses. *Virology* 2002;293:217-24.
163. Marttila J, Juhela S, Vaarala O, Hyoty H, Roivainen M, Hinkkanen A, et al. Responses of coxsackievirus B4-specific T-cell lines to 2C protein characterization of epitopes with special reference to the GAD65 homology region. *Virology* 2001;284:131-1.
164. Mas P. Circulation of poliovirus in the child population in Cuba. *Bull PAHO* 1979, 87:443-9.
165. Más P. Eradication of poliomyelitis in Cuba: a historical perspective. *Bull WHO* 1999;77:681-687.
166. Más P, Cáceres V, Galindo M, Gary H, Valcárcel, M., Barrios, J, Sarmiento L, Avalos I, Bravo J, Palomera R, Bello M, Sutter R, Pallansch M, de Quadros C. Persistence of vaccine-derived Poliovirus following a mass vaccination campaign in Cuba: implications for stopping polio vaccination after global eradication. *Inter J Epidemiol* 2001;30:1029-34.
167. Más P, Gary H, Sarmiento L, Cáceres V, Barrios J, Palomera R, et al. Poliovirus detection in wastewater and stool following an immunization campaign in Havana, Cuba. *Inter J Epidemiol* 2003; 32:772-7.
168. Más P, Pelegrino J, Guzman M, Comellas M, Resik S, Alvarez M, et al. Viral isolation from cases of epidemic neuropathy in Cuba. *Arch Pathol Lab Med* 1997;121:825-33.
169. Melnick J, Wenner H, Phillips C. Enterovirus. En: Lenette EH, Schmidt NJ eds. *Diagnostic Procedures for viral, Rickettsial and Chlamydial infections*. 5th ed. Washington D.C. American Public Health Association, Inc;1979.p.471-534.

170. Melnick J. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enterovirus. In: Fields B, Knipe D, Howley P, et al, eds. *Fields Virology*. 3rd ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Raven Publisher;1996.p.655-712.
171. Melnick JL, Rennick V, Hampil B. Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: Preparation and test procedures for the identification of field strains of 42 enteroviruses. *Bull World Health Organ* 1973;48:263–8.
172. Melnick JL, Wimber IL. Liophilized combination of the Enterovirus equine antisera. New LBM pools prepared from reserves of antisera stored frozen for two decades. *Bull World Health Organ* 1984;63:543-50.
173. Miwa C, Watanabe Y. Diversity of etiological agent associated with aseptic meningitis-a survey on an epidemic in Tajimi City, Gifu Prefecture in 1984. *Kansenshogaku Zasshi* 1990;64:794-801.
174. Modlin J. Update on enterovirus infection in infants and children. *Adv Pediatr Infect Dis* 1996;12:161.
175. Morens D, Pallansch M, Moore M. Polioviruses and other enteroviruses. In: Belshe RB, ed. *Textbook of human virology*. St. Louis, Mo: Mosby Year Book;1991.p.427-97.
176. Morens D, Pallansch M. Epidemiology. In: Rotbart H, ed. *Human Enterovirus Infections*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press;1995.p.3-23.
177. Moya-Suri V, Schlosser M, Zimmermann K, Rjasanowski I, Gurtler L, Mentel R. Enterovirus RNA sequences in sera of schoolchildren in the general population and their association with type 1-diabetes-associated autoantibodies. *J Med Microbiol* 2005;54:879-83.
178. Mrena S, Savola K, Kulmala P, Akerblom HK, Knip M, and the childhood diabetes in Finland study group. Staging of preclinical type 1 diabetes in siblings of affected children. *Pediatrics* 1999;104:925-30.
179. Mrena S, Savola K, Kulmala P, Reijonen H, Ilonen J, Akerblom HK, et al. Genetic modification of risk assessment based on staging of preclinical type 1 diabetes in siblings of affected children. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2682-9.
180. Muir P, Kammerer U, Korn K, Mulders MN, Poyry T, Weissbrich B et al. Molecular typing of enterovirus: Current status and future requirements. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:202-27.
181. Muntoni S, Cocco P, Aru G, Cucca F, Muntoni S. Nutritional factors and worldwide incidence of childhood type 1 diabetes. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1525-9.
182. Nairn C, Galbraith DN, Taylor KW, Clements GB. Enterovirus variants in

- the serum of children at the onset of type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med* 1999;16:509-13.
183. Nelson PG, Pyke DA, Gamble DR. Viruses and the aetiology of diabetes: a study in identical twins. *Br Med J* 1975;4:249-51.
 184. Norder H, Bjerregaard L, Magnius L, Lina B, Aymard M, Chomel JJ. Sequencing of “untypable” enteroviruses reveals two new types, EV-77 and EV-78, within human enterovirus type B and substitutions in the BC loop of the VP1 protein for knowntypes. *J Gen Virol* 2003;84:827–36.
 185. Notkins AL. Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes. *J Biol Chem* 2002;277:43545-8.
 186. Nwachuku N, Gerba CP. Health risks of enteric viral infections in children. *Rev Environ Contam Toxicol* 2006;186:1-56.
 187. Oberste M, Maher K, Michele SM, Belliot G, Uddin M, Pallansch MA. Enteroviruses 76, 89, 90 and 91 represent a novel group within the species human enterovirus A. *J Gen Virol* 2005;86:445–51.
 188. Oberste M, Maher K, Nix WA, Michele SM, Uddin M, Schnurr D, et al. Molecular identification of 13 new enterovirus types, EV79-88, EV97, and EV100-101, members of the species Human Enterovirus B. *Virus Res* 2007;128:34-42.
 189. Oberste M, Maher K, Williams AJ, Dybdahl-Sissoko N, Brown BA, Gookin MS, et al. Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *J Gen Virol* 2006;87:119-28.
 190. Oberste M, Michele SM, Maher K, Schnurr D, Cisterna D, Junttila N, et al. Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75. *J Gen Virol* 2004;85:3205–12.
 191. Oberste M, Pallansch MA. Establishing evidence for enterovirus infection in chronic disease. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1005:23-31.
 192. Oberste M, Schnurr D, Maher K, al-Busaidy S, Pallansch M. Molecular identification of new picornaviruses and characterization of a proposed enterovirus 73 serotype. *J Gen Virol* 2001;82:409–16.
 193. Oberste S, Maher K, Flemister R, Marchetti G, Kilpatrick D and Pallansch M. Comparison of Classic and Molecular Approaches for the Identification of untypable Enteroviruses. *J Clin Microbiol* 2000;38:1170-4.
 194. Oberste S, Maher K, Kennett M, Campbell J, Carpenter M, Schnurr D. Molecular epidemiology and genetic diversity of echovirus type 30 (E30): genotypes correlate with temporal dynamics of E30 isolation. *J Clin Microbiol* 1999;37:3928-33.
 195. Ochiai H, Campbell SA, Archer GE, Chewing TA, Dragunsky E, Ivanov A et al. Enterovirus surveillance--United States, 2002-2004. *Clin Cancer*

- Res 2006;12:1349-54.
196. Ongangna JC, Levy-Marchal C. Sensitivity at diagnosis of combined β -cell autoantibodies in insulin-dependent diabetic children. *Diabet Metab* 1997;23:155-60.
 197. Onkamo P, Väänänen S, Karvonen M, Tuomilehto J. Worldwide increase in incidence of type 1 diabetes: the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia* 1999;42:1395-1403.
 198. Orchard T, Becker D, Atchison R, La Porte R, Wagener D, Rabin B, et al. The development of type 1 (insulin dependent) diabetes mellitus: two contrasting presentations. *Diabetologia* 1983;25:89-92.
 199. Otonkoski T, Roivainen M, Vaarala O, Dinesen B, Leipala JA, Hovi T, et al. Neonatal Type I diabetes associated with maternal echovirus 6 infection: a case report. *Diabetologia* 2000;43:1235-8.
 200. Paananen A, Savolainen-Kopra C, Kaijalainen S, Vaarala O, Hovi T, Roivainen M. Genetic and phenotypic diversity of echovirus 30 strains and pathogenesis of type 1 diabetes. *J Med Virol* 2007;79:945-55
 201. Palacios G, Oberste MS. Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J Neurovirol* 2005;11:424-33.
 202. Pallansch M, Raymond P. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enterovirus. In: Knipe D, Howley P, Griffin D, et al, eds. *Fields Virology*. 3th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Raven Publisher; 2001.p.123-775.
 203. Palmer JP, Cooney MK, Ward RH, Hansen J, Brodsky J, Ray C, et al. Reduced Coxsackie antibody titres in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients presenting during an outbreak of Coxsackie B3 and B4 infection. *Diabetologia* 1982;22:426-9.
 204. Patterson CC, Dahlquist G, Soltéz G, Green A. Is childhood-onset type 1 diabetes a wealth-related disease?. An ecological analysis of European incidence rates. *Diabetologia* 2001;44:B9-B16.
 205. Petersen JS, Kyvic KO, Bingley PJ, Gale EAM, Green A, Dyrberg T, et al. Population based study of prevalence of islet cell antibodies in monozygotic and dizygotic Danish twins pairs with insulin-dependent diabetes mellitus. *BMJ* 1997;314:1575-9.
 206. Pietropaolo M, Yu S, Lipman IM, Pietroapolo SL, Riley K, LaPorte RE, et al. Cytoplasmic islet cell antibodies remain valuable in defining risk of progression to type 1 diabetes in subjects with other islet autoantibodies. *Pediatr Diabetes* 2005;6:184-92.
 207. Pilcher CC, Elliott RB. A sensitive and reproducible method for the assay of human islet cell antibodies. *J Immunol Meth* 1990;129:111-7.

208. Pinkse GG, Tysma OH, Bergen CA, Kester MG, Ossendorp F, van Veelen PA, et al. Autoreactive CD8 T cells associated with beta cell destruction in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:18425-30.
209. Pitkäniemi J, Onkamo P, Tuomilehto J, Arjas E. Increasing incidence of type 1 diabetes- role for genes?. *BMC Genet* 2004;5:5.
210. Podar T, Solntsev A, Karvonen M, Padaiga Z, Brigis G, Urbonaite B, et al. Increasing incidence of childhood-onset type I diabetes in 3 Baltic countries and Finland 1983–1998. *Diabetologia* 2001;44:B17-B20.
211. Pugliese A, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes mellitus of man: Genetic susceptibility and resistance. In: George S Eisenbarth, ed. *Immunology of type 1 diabetes*. New York: Eureka.com and Kluwer Academic/ Plenum Publishers;2004.p.170-203.
212. Racaniello V. Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe D, Howley P, Griffin D, et al, eds. *Fields Virology*. 3th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Raven Publisher;2001.p.123-775.
213. Racaniello VR. One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology* 2006;344:9-16.
214. Ramsingh A, Caggana M, Ronstrom S. Genetic mapping of the determinants of plaque morphology of coxsackievirus B4. *Arch Virol* 1995;140:2215-26.
215. Redondo MJ, Fain PR, Eisenbarth GS. Genetics of type 1A diabetes. *Recent Prog Horm Res* 2001;56:69-89.
216. Rewers M, Atkinson M. The possible role of enteroviruses in diabetes mellitus. In: Rotbart HA, ed. *Human Enterovirus Infections*. Washington. ASM Press;1995.p.353-385.
217. Rewers M, LaPorte R, Walczak J, Dmochowski K, Bogaczynska E. Apparent epidemic of insulin-dependent diabetes mellitus in Midwestern Poland. *Diabetes* 1987;36:106-13.
218. Rewers M, Norris J, Dabelea D. Epidemiology of type 1 diabetes. In: George S Eisenbarth, ed. *Immunology of type 1 diabetes*. New York: Eureka.com and Kluwer Academic/ Plenum Publishers;2004.p.219-46.
219. Roivainen M, Knip M, Hyoty H, Kulmala P, Hiltunen M, Vahasalo P, et al. Several different enterovirus serotypes can be associated with prediabetic autoimmune episodes and onset of overt IDDM. *J Med Virol* 1998;56:74-8.
220. Roivainen M, Rasilainen S, Ylipaasto P, Nissinen R, Ustinov J, Bouwens L, et al. Mechanisms of coxsackievirus-induced damage to human pancreatic beta-cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:432-40.
221. Roivainen M, Ylipaasto P, Savolainen C, Galama J, Hovi T, Otonkoski T. Functional impairment and killing of human beta cells by enterovirus: the

- capacity is shared by a wide range of serotypes, but the extend is characteristic of individual virus strains. *Diabetologia* 2002;45:693-702.
222. Roivainen M. Enterovirus: New findings on the role of enterovirus in type 1 diabetes. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:721-5.
223. Ronningen KS, Keiding N, Green A on behalf of Genomic Marker Contributors and the EURODIAB ACE Study Group. Correlations between the incidences of childhood-onset type 1 diabetes in Europe and HLA genotypes. *Diabetologia* 2001;44:B51-B59.
224. Rotbart H, Romero J. Laboratory diagnosis of enteroviral infections. In: Rotbart H, ed. *Human enterovirus Infections*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press;1995.p.401-18.
225. Rotbart H. Enteroviral infections of the central nervous system. *Clin Infect Dis* 1995;20:971-81.
226. Rotbart H. Enzimatic RNA amplification of the Enterovirus. *J Clin Microbiol* 1990;28:438-442.
227. Rueckert R. Picornaviridae: the viruses and their replication. In: Fields B, Knipe D, Howley P, et al, eds. *Virology*. 3rd ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Raven Publisher;1996.p.609-54.
228. Sadeharju K, Hamalainen AM, Knip M, Lonrot M, Koskela P, Virtanen SM, et al. Enterovirus infections as a risk factor for type I diabetes: virus analyses in a dietary intervention trial. *Clin Exp Immunol* 2003;132:271-7.
229. Sadeharju K, Lonrot M, Kimpimaki T, Savola K, Erkkila S, Kalliokoski T, et al. Enterovirus antibody levels during the first two years of life in prediabetic autoantibody positive children. *Diabetologia* 2001;44:818-23.
230. Salminen K, Sadeharju K, Lonrot M, Vahasalo P, Kupila A, Korhonen S, et al. Enterovirus infections are associated with the induction of beta-cell autoimmunity in a prospective birth cohort study. *J Med Virol* 2003;69:91-8.
231. Salminen KK, Vuorinen T, Oikarinen S, Helminen M, Simell S, Knip M, et al. Isolation of enterovirus strains from children with preclinical Type 1 diabetes. *Diabet Med* 2004;21:156-64.
232. Sarmiento L. Enteroviral Meningitis and Emergence of Rare Enterovirus Types: Cuban Experience. In: Phyllis V Strong, ed. *Focus on Meningitis Research*. New York: Nova Science Publishers, Inc;2004.p.1-14.
233. Sarmiento L, Avalos I, Ramos Y, Mas P, Bello M, Palomera R, et al. Rapid detection of enterovirus by a direct method of polymerase chain reaction. *Rev Cub Med Trop* 2000;52:15-20.

234. Sarmiento L, Mas P, Avalos I, Palomera R, Barrios J, Bello M. Evaluation of a new technology for the detection of enterovirus in sewage. *Rev Cub Med Trop* 1999;51:166-71.
235. Sawyer MH. Infecciones por enterovirus: diagnóstico y tratamiento. *Pediat Infect Dis J* 1999;18:1033-40.
236. Schatz D, Krisher J, She JX. To screen or not to screen for pre-type 1 diabetes? *Horm Res* 2002;57:12-17.
237. Schlosser M, Strebellow M, Wassmuth R, Arnold MI, Breuning I, Rjasanowski I, et al. The Kalsburg type 1 diabetes risk study of a normal schoolchild population: association of beta-cell autoantibodies and human leucocyte antigen-DQB1 alleles in antibody-positive individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2254-61.
238. Schmidli RS, Colman PG, Bonifacio E. Disease sensitivity and specificity of 52 assays for glutamic acid decarboxylase antibodies. The second international GADAb workshop. *Diabetes* 1995;44:636-40.
239. Schmidli RS, DeAizpurua HJ, Harrison LC, Colman PG. Antibodies to glutamic acid decarboxylase in at-risk and clinical insulin-dependent diabetic subjects: relationship to age, sex and islet cell antibody status, and temporal profile. *J Autoimmun* 1994;7:55-66.
240. Schmidt WAK, Brade L, Munterfering H, Klein M. Course of Coxsackie B antibodies during juvenile onset diabetes. *Med Microbiol Immunol* 1978;164:291-8.
241. Scott-Morgan L, Keller U, Heitz P, Mirza I, Diaz JI, Casey C, et al. Insulin autoantibodies (IAA) may cause false positive islet cell antibody (ICA) results in the indirect immunofluorescence test. *Diabet Res* 1988;8:45-8.
242. See DM, Tilles JG. The pathogenesis of viral-induced diabetes. *Clin Diagn Virol* 1998;9:85-8.
243. Seelandt KK. Diabetes mellitus update. *J Contin Educ Nurs* 2007;38:54-5.
244. Serrano-Rios M, Goday A, Martinez LT. Migrant populations and the incidence of type 1 diabetes mellitus: an overview of the literature with a focus on the Spanish-heritage countries in Latin America. *Diabet Metab Res Rev* 1999;15:113-32.
245. Service EJ, Rizza RA, Zimmerman BR, Dyck PJ, O'Brien PC, Melton LJ. The classification of diabetes by clinical and C-peptide criteria. *Diabet Care* 1997;20:198-201.
246. Sinha ND, Biernat J, Mc Manus J, Köster H. Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII: use of B - cyanoethyl - N, N - dialkylamino - / N - morpholino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product. *Nucleic Acid Res* 1984;12:4539-57.

247. Smith CP, Clements GB, Riding MH, Bottazzo GF, Taylor KW. Simultaneous onset of type 1 diabetes mellitus in identical infant twins with enterovirus infection. *Diabet Med* 1998;15:515-7.
248. Sole M, Liu P. Viral myocarditis: a paradigm for understanding the pathogenesis and treatment of dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1993;22:99A-105A.
249. Stene LC, Barriga K, Norris JM, Hoffman M, Erlich HA, Eisenbarth GS, et al. Perinatal factors and development of islet autoimmunity in early childhood: the diabetes autoimmunity study in the young. *Am J Epidemiol* 2004;160:3-10.
250. Subasic D, Karamehic J. Optimisation of RT-PCR for detection of enterovirus. *Med Arh* 2006;60:217-8.
251. Szopa TM, Titchener PA, Portwood ND, Taylor KW. Diabetes mellitus due to viruses - some recent developments. *Diabetologia* 1993;36:687-95.
252. Tiberti C, Verrienti A, Fiore B, Yu L, Eisenbarth GS, Dotta F, et al. IA-2 combined epitope assay: a new, highly sensitive approach to evaluate IA-2 humoral autoimmunity in type 1 diabetes. *Clin Immunol* 2005;115:260-7.
253. Tong JC, Myers MA, Mackay IR, Zimmet PZ, Rowley MJ. The PEVKEK region of the pyridoxal phosphate binding domain of GAD 65 expresses a dominant B cell epitope for type 1 diabetes sera. *Ann N Y Acad Sci* 2002;958:182-9.
254. Tracy S, Chapman N, Drescher KM, Kono K, Tapprich W. Evolution of virulence in picornaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;299:193-209.
255. Tracy S, Chapman N, Rubocki R, Beck M. Host Immune Responses to Enterovirus Infections. In: Rotbart H, ed. *Human Enterovirus Infections*. Washington, DC: ASM Press;1995.p.175-91.
256. Trinder P. Determination of glucose oxidase with one alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 1969;6:24-7.
257. Tuomilehto J, Virtala E, Karvonen M, Lounamaa R, Pitkaniemi J, Reunanen A, et al. Increase in incidence of insulin-dependent diabetes mellitus among children in Finland. *Int J Epidemiol* 1995;24:984-92.
258. Tuvemo T, Berg AK, Frisk G, Yin H. Enterovirus RNA is found in a majority of IDDM children at onset. *Ups J Med Sci* 2001;56:73.
259. Tuvemo T, Dahlquist G, Frisk G, Blom L, Friman G, Landin-Olsson et al. The Swedish childhood diabetes study III: IgM against Coxsackie B viruses in newly diagnoses type 1 (insulin-dependent) diabetic children—no evidence of increased antibody frequency. *Diabetologia* 1989;32:745-7.

260. Ueda H, Howson J, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003;423:506.
261. Uriarte A, Cabrera-Rode E, Ventura R, Vargas J. Islet cell antibodies and Echo 4 virus infection. *Diabetologia* 1987;30:590.
262. Uriarte A, Cabrera-Rode E, Ventura R, Vargas J. Alteraciones pancreatoespecíficas de la inmunidad en niños infectados con virus ECHO-4. *Rev Cub Pediatr* 1990;62:359-63.
263. Uriarte A, Molina G, Cabrera-Rode E, Ventura R, Vargas J, Vera M. Estudio prospectivo en niños con alto riesgo de diabetes tipo 1 como secuela de infección por virus ECHO-4. 1986-1989. *Rev Cub Endocrinol* 1991;2:34-43.
264. van der Werf N, Kroese FG, Rozing J, Hillebrands JL. Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. *Diabet Metab Res Rev* 2007; 3:169-83
265. van Kuppelveld FJ, Melchers WJ, Willems PH, Gazella TW. Homomultimerization of the coxsackie virus 2B protein in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer microscopy. *J Virol* 2002;76:9446-56.
266. Vardi P, Dib SA, Tuttleman M, Connelly JE, Grinbergs M, Radizabeth A, et al. Competitive insulin autoantibody assay. Prospective evaluation of subjects at high risk for development of type 1 diabetes mellitus. *Diabetes* 1987;36:1286-91.
267. Varela-Calvino R, Peakman M. Enterovirus and type 1 diabetes. *Diabet Metab Res Rev* 2003;19:431-1.
268. Varela-Calvino, R, Sgarbi, G., Arif S, Peakman, M. T Cell reactivity to the P2C nonstructural protein of a diabetogenic strain of coxsackievirus B4. *Virology* 2000;274:56-64.
269. Virtanen SM, Knip M. Nutritional risk predictors of β cell autoimmunity and type 1 diabetes at a young age. *Am J Clin Nutr* 2003;78:1053-67.
270. Viskari H, Ludvigsson J, Uibo R, Salur L, Marciulionyte D, Hermann R, et al. Relationship between the incidence of type 1 diabetes and enterovirus infections in different European populations: results from the EPIVIR project. *J Med Virol* 2004;72:610-7.
271. Viskari HR, Koskela P, Loñnrot M, Luonuansuu S, Reunanen A, Baer M, et al. Can enterovirus infections explain the increasing incidence of type 1 diabetes? *Diabet Care* 2000;23:414-6.
272. Viskari HR, Ludvigsson J, Uibo R, Salur L, Marciulionyte D, Hermann R, Soltesz G, et al. Relationship between the incidence of type 1 diabetes

- and maternal enterovirus antibodies: time trends and geographical variation. *Diabetologia* 2005;48:1280-7.
273. Vreugdenhil GR, Batstra MR, Aanstoot HJ, Melchers WJ, Galama JM. Analysis of antibody responses against coxsackie virus B4 protein 2C and the diabetes autoantigen GAD 65. *J Med Virol* 1999;59:256-61.
 274. Vreugdenhil GR, Geluk A, Ottenhoff T, Melchers W, Roep B, Galama J. Molecular mimicry in diabetes mellitus: the homologous domain in Coxsackie B virus protein 2C and islet autoantigen GAD65 is highly conserved in the Coxsackie B-like enteroviruses and binds to the diabetes associated HLA-DR3 molecule. *Diabetologia* 1998;41:40-6.
 275. Vreugdenhil GR, Schloot NC, Hoorens A, Rongen C, Pipeleers DG, Melchers WJ, et al. Acute onset of type I diabetes mellitus after severe echovirus 9 infection: putative pathogenic pathways. *Clin Infect Dis* 2000;31:1025-31.
 276. Vuorinen T, Vainionpää R, Hyypiä T. Five year's experience of reverse transcriptase polymerase chain reaction in daily diagnosis of enterovirus and rhinovirus infections. *Clin Infect Dis* 2003;37:452-5.
 277. Wagenknecht L, Roseman J, Herman W. Increased incidence of insulin-dependent diabetes mellitus following an epidemic of coxsackievirus B5. *Am J Epidemiol* 1991;133:1024-31.
 278. Wasserfall CH, Atkinson MA. Autoantibody markers for the diagnosis and prediction of type 1 diabetes. *Autoimm Rev* 2006;5:424-8.
 279. Weintrop N, Sprecher E, Israel S, Pinhas-Hamiel O, Joong Kwon O, Bloch K, et al. Type 1 environmental factors and correspondence analysis of HLA class II genes in the Yemenite Jewish community in Israel. *Diabet Care* 2001;24:650-3.
 280. Wen L, Wong F, Tang J, Chen N, Altieri M, David C, et al. In vivo evidence for the contribution of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DQ molecules to the development of diabetes. *J Exp Med* 2000;191:97.
 281. Williams CH, Oikarinen S, Tauriainen S, Salminen K, Hyoty H, Stanway G. Molecular analysis of an echovirus 3 strain isolated from an individual concurrently with appearance of islet cell and IA-2 autoantibodies. *J Clin Microbiol* 2006;44:441-8.
 282. Winter WE, Harris N, Schatz D. Immunological markers in the diagnosis and prediction of autoimmune type 1 diabetes. *Clin Diabet* 2002;20:183-91.
 283. Wong F, Wen L. What can the HLA transgenic mouse tell us about autoimmune diabetes? *Diabetologia* 2004;47:1476.
 284. World Health Organization. Polio laboratory manual. Department of Vaccines and Biologicals. WHO, Geneva 2001.

285. Yang C, De L, Yang S, Gómez J, Cruz J, Halloway BP, et al. Genotype-specific in vitro amplification of sequences of the wild type 3 polioviruses from México and Guatemala. *Virus Res* 1992;24:277-96.
286. Yin H, Berg AK, Tuvemo T, Frisk G. Enterovirus RNA is found in peripheral blood mononuclear cells in a majority of type 1 diabetic children at onset. *Diabetes* 2002;51:1964-71.
287. Ylipaasto P, Klingel K, Lindberg A, Otonkoski T, Kandolf R, Hovi T, et al. Enterovirus infection in human pancreatic islet cells, islet tropism in vivo and receptor involvement in cultured islet beta cells. *Diabetologia* 2004;47:225-39.
288. Yoon J, Austin M, Onodera T, Notkins A. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetes ketoacidosis. *N Engl J Med* 1979;300:1173-9.
289. Yu L, Eisenbarth GS. Humoral autoimmunity. In: George S Eisenbarth, ed. *Immunology of type 1 diabetes*. New York: Eureka.com and Kluwer Academic/ Plenum Publishers;2004.p.247-267
290. Zamaklar M, Jotic A, Lalic N, Lalic K, Rajkovic N, Milicic T. Relation between course of disease in type 1 diabetes and islet cell antibodies. *Ann N Y Acad Sci* 2002;958:251-3.
291. Zaman S, Carlsson B, Morikawa A, Jeansson S, Narayanan I, Thiringer K. Poliovirus antibody titres, relative affinity, and neutralising capacity in maternal milk. *Arch Dis Child* 1993;68:198-201.
292. Zanone MM, Catalfamo E, Pietropaolo SL, Rabbone I, Sacchetti C, Cerutti F, et al. Glutamic acid decarboxylase and ICA512/IA2 autoantibodies as disease markers and relationship to residual beta-cell function and glycemic control in young type 1 diabetic patients. *Metabolism* 2003;52:25-9.
293. Ziegler AG, Dumont-Herskowitz R, Jackson RA, Soeldner JS, Eisenbarth GS. Predicting type 1 diabetes. *Diabet Care* 1990;13:762-75.
294. Zipris D, Hillebrands J, Welsh R, Rozing J, Xie J, Mordes J, et al., Infections That Induce Autoimmune Diabetes in BBDR Rats Modulate CD4+CD25+ T Cell Populations. *J Immunol* 2003;170:3592–3602.
295. Zooll GJ, Melchers WJ, Komecka H, Jambroes G, van der Poel HJ, Galama JM. General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of enteroviruses: Application for diagnostic routine and persistent infections. *J Clin Microbiol* 1992;30:160-5.