

## **Hipótesis Enteroviral de la Diabetes tipo 1**

(i) DrC. Luis Sarmiento Pérez. IPK, ([sarmiento@ipk.sld.cu](mailto:sarmiento@ipk.sld.cu)), (i) DrC. Eduardo Cabrera Rode. INEN.

### **Otros autores**

(ii) DrC Oscar Díaz Horta. INEN, (ii) MSc. Magilé Fonseca. IPK, (ii) Lic. Gisela Molina Mato. INEN, (ii) Lic. Lai Heng-Hung. IPK, (ii) Dr. Oscar Díaz Díaz. INEN, (ii) DrC. Pedro Más Lago. IPK, (ii) Dra. Ileana Cuba. IPK, (ii) DrC. Sonia Resik. IPK.

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, (IPK) e Instituto Nacional de Endocrinología (INEN).

Palabras claves: Diabetes tipo 1, Enterovirus, Autoinmunidad, Autoanticuerpos.

### **Introducción:**

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. Sin embargo, todavía queda por dilucidar si un agente infeccioso se puede vincular con una enfermedad crónica no transmisible como la diabetes tipo 1 (DM1) (Haller y cols., 2005). La DM1 es el resultado de la destrucción autoinmune de más del 80% de las células  $\beta$  pancreáticas productoras de la hormona insulina. Como consecuencia del proceso de destrucción inmune de las células  $\beta$  se originan anticuerpos contra las células de los islotes (ICA) y contra 3 de los principales autoantígenos de los islotes pancreáticos: la insulina (AAI), la descarboxilasa del ácido glutámico (AGAD) y la porción intracelular de la proteína tirosina fosfatasa relacionada con la molécula IA2 (AIA2). Sin embargo, los factores que desencadenan la respuesta inmune dirigida contra las células  $\beta$  todavía permanecen inexplicables (Rewers y cols., 2004).

Los factores genéticos tienen indudablemente una gran importancia en la patogénesis de la DM1. Sin embargo los estudios realizados en gemelos monocigóticos han demostrado que los factores genéticos por si solo acontecen del 30 al 50 % de la susceptibilidad a la enfermedad (Hyöty, 2002). De ahí que la atención se haya enfocado hacia los factores ambientales y entre ellos los enterovirus humanos, se han invocados como posibles contribuyentes ambientales para el desarrollo de esta enfermedad. No obstante, consideramos que aun en nuestros días son pocas las evidencias que permiten vincular a los enterovirus con los procesos fisiopatológicos que desencadenan, aceleran o perpetúan el daño de las células  $\beta$  pancreáticas. Teniendo en consideración lo antes expuesto hemos formulado una hipótesis que pretende explicar la relación de la infección por enterovirus con la historia natural de esta enfermedad autoinmune de etiología desconocida.

**Hipótesis/Teoría científica: La infección por enterovirus puede inducir la generación de autoanticuerpos asociados a diabetes tipo 1, así como el inicio clínico de la diabetes tipo 1.**

Para sustentar la hipótesis formulada diseñamos tres grandes estudios que tuvieron como

## Objetivo:

Responder los siguientes problemas científicos.

1. ¿Está asociada la infección por enterovirus con la inducción de marcadores humorales del proceso de destrucción autoinmune de células  $\beta$  pancreáticas o el comienzo clínico de la diabetes tipo 1 en individuos sin antecedentes personales de esta enfermedad?
2. ¿Está asociada la infección por enterovirus 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?
3. ¿Existe reactividad cruzada de la respuesta inmune humoral contra diferentes serotipos de enterovirus frente a los principales antígenos de las células  $\beta$  pancreáticas humanas?

## Estudio 1

### **“Anticuerpos asociados a diabetes tipo 1 en individuos infectados por echovirus 16 (E16) y echovirus 30 (E30): Informe de un caso”**

Muestras: Fueron seleccionados 38 pacientes (rango de edad desde 11 a 156 meses) con síntomas clínicos de meningoencefalitis durante la epidemia de E16 ocurrida en el año 2000 así como 8 pacientes (rango de edad desde 11 a 156 meses) durante la epidemia de E30 ocurrida en el año 2001 (Sarmiento, 2004). Por cada uno de los pacientes en estudio fueron seleccionados dos individuos controles pareados en cuanto a edad, sexo y lugar de residencia en relación con los niños que padecieron la infección durante las epidemias. Todos los individuos involucrados en el estudio fueron seleccionados de las diferentes provincias del país y ninguno tenía antecedentes de DM1 al momento de la toma de la muestra. De cada uno de los pacientes fueron obtenidas muestras de heces y sueros pareados (fase aguda y convaleciente de la infección) y 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. En todos estos individuos se realizó la determinación de marcadores de infección viral y de autoinmunidad pancreática.

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 contra echovirus (E4, E6, E9, E11, E16, E30) y coxsackievirus (CVA9, CVB1, CVB2, CVB3, CVB4, CVB5, CVB6) en las muestras de suero según los métodos recomendados por la OMS (WHO, 2001)

Determinación de marcadores humorales de autoinmunidad pancreática: Anticuerpos asociados a DM1: A todos los sueros se les realizó las determinaciones de anticuerpos contra todas las células de los islotes pancreáticos (ICA) mediante un método de inmunofluorescencia indirecta modificado con incubación prolongada (Pilcher y Elliot, 1990). Mediante radioinmunoensayo se determinaron

anticuerpos contra los tres principales autoantígenos de los islotes del páncreas: AAI, AGAD y AIA2 (Cabrera-Rode y cols., 1997). Para demostrar si se produce una actividad pancreatotóxica específica mediante inmunofluorescencia se determinaron anticuerpos contra otros órganos endocrinos no pancreáticos como fueron los anticuerpos antigástricos parietales (AGP) y antimicrosomales tiroideos (AMT) (Pilcher y Elliot, 1990).

Caracterización de un caso de DM1 con antecedentes de meningoencefalitis viral durante la epidemia del 2001: Se determinaron los niveles de glucosa en ayunas por el método de glucosa oxidasa (Trinder, 1969), hemoglobina glicosidada (HbA1) por el método de separación por resina de intercambio iónico (Ezcurra, 1986) y péptido C en ayunas por la técnica de radioinmunoensayo en fase sólida. El tipaje HLA-clase II (DR/DQ) de baja resolución se realizó por PCR-SSP de acuerdo a la metodología descrita por Bunce (Bunce, 2000).

Resultados: Se comprobó tanto por aislamiento, identificación y serología que los pacientes seleccionados para el estudio estuvieron infectados por las cepas de E16 y E30 responsables de cada una de las respectivas epidemias. Por su parte los sujetos controles fueron serológicamente verificados como negativos para infección por ambos virus. Se demostró seroconversión a ICA, AGAD, AIA2 y AAI en el 92,1%, 28,9%, 44,7% y 42,1% de individuos infectados por E16, así como seroconversión a ICA (87,5%), AGAD (37,5%) y AIA2 (12,5%) en individuos infectados por E30. Estos resultados sugieren que la infección viral en estos individuos está asociada con la inducción de autoinmunidad contra las células  $\beta$  pancreáticas. Por su parte, los individuos controles no desarrollaron anticuerpos contra antígenos de los islotes pancreáticos y esta alta prevalencia de anticuerpos asociados a diabetes tipo 1 consideramos que no es la consecuencia de una respuesta general de autoanticuerpos durante la infección, sino el resultado de una respuesta pancreatotóxica específica de estos virus pues no se encontró presencia de anticuerpos contra otros órganos endocrinos no pancreáticos como los AGP y AMT. 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 ( $r = 0,91$ ,  $p < 0,0001$ ) como en la convaleciente ( $r = 0,55$ ,  $p = 0,0003$ ) de la infección por E16 lo cual apoya la asociación de la infección con la inducción de autoinmunidad contra las células  $\beta$ . Además 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. 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.

A nuestro juicio estos hallazgos pudieran ser el reflejo de un daño severo de las células  $\beta$  producido como consecuencia de la infección. 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 contra varios autoantígenos.

Se realizó la caracterización clínica, virológica, inmunológica y genética de una adolescente mestiza de 12 años de edad, la cuál desarrolló DM1 después de sufrir meningoencefalitis durante la epidemia del 2001. En este caso pudimos demostrar que 8 meses después de haber sufrido meningoencefalitis la paciente desarrolló signos y síntomas típicos de DM1. En esta paciente encontramos altos títulos de anticuerpos neutralizantes contra la cepa de E30 aislada durante la epidemia del 2001. La determinación de los principales anticuerpos asociados a DM1 demostró positividad para ICA e AIA2. Los resultados de la glucemia, péptido C y hemoglobina glicosilada corroboraron el diagnóstico de DM1 en la paciente. Estos hallazgos sugieren 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 DM1 en personas de origen caucásico (Redondo y cols., 2001).

## Estudio 2

### **“Presencia de ARN de enterovirus en diabéticos tipo 1 de diagnóstico reciente y en familiares de primer grado de diabéticos tipo 1”**

Universo de estudio: Se analizaron 322 muestras de sueros que fueron divididos en 4 grupos de estudio. I) 34 muestras de suero de diabéticos tipo 1 las cuales fueron tomadas de 0 a 10 días después del diagnóstico clínico de la diabetes; II) 32 muestras de suero de familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 positivos para ICA; III) 62 muestras de suero de familiares de primer grado de diabéticos tipo 1 negativos para ICA; IV) 194 muestras de sueros de individuos saludables (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. 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.

Detección de ARN de Enterovirus: Para la detección de ARN a partir de las muestras de suero se empleó un método de Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada (RT-N-RCP) altamente sensible (0,01 TCID<sub>50</sub>) y específico para los enterovirus (Sarmiento y cols., 2000).

Pruebas bioquímicas: La detección de cetonas en orina se realizó a todos los diabéticos tipo 1 previo a la administración de insulina. Para conocer el grado de cetoacidosis se realizaron las determinaciones de bicarbonato y pH en sangre (Maldonado y cols., 2003)

Resultados: 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%,  $p=0,0007$ ). 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%,  $p=0,0033$ ). 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. 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 ( $p=0,0164$ ).

La presencia de ARN de enterovirus en suero es un marcador de viremia. 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 (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. Teniendo en cuenta el corto período de viremia y la cinética de la respuesta inmune en este caso pensamos que 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.

Analizamos además la posible relación entre la presencia de ARN de enterovirus con diferentes grados de cetoacidosis. 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%;  $p=0,0328$ ). 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. La asociación de la infección por enterovirus con la cetoacidosis severa 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  $\beta$  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  $\beta$  pancreáticas que condujo a las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

### Estudio 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 $\beta$ pancreáticas humanas.**

Preparación de antígenos virales: Se prepararon antígenos virales según el método descrito por Más y cols (Más y cols, 1997) a partir de las cepas de echovirus (E1, E2, E3, E4, E6, E9, E11, E16 E30), y coxsackievirus (CVA9, CVA7, CVA16, CVA24, CVB1, CVB3, CVB5, CVB6). Las cepas de E16 y E30 empleadas fueron aisladas durante las epidemias de meningoencefalitis del 2000 y 2001. Se prepararon además 2 antígenos a partir de las células Vero sin inocular.

Obtención de los sueros hiperinmunes: Los sueros hiperinmunes se obtuvieron a partir de la inoculación de conejos blancos adultos Nueva Zelanda con 100TCID<sub>50</sub> de los antígenos virales. Se obtuvieron además sueros controles a partir de la inmunización de dos conejos con los antígenos preparados a partir de las células Vero sin inocular, así como sueros obtenidos de cada uno de los conejos previo a la inmunización con sus correspondientes antígenos.

Anticuerpos neutralizantes a enterovirus: La determinación de anticuerpos neutralizantes en los sueros se realizó según los métodos recomendados por la OMS (WHO, 2001) empleando diluciones seriadas al doble de suero comenzando con 1:100 hasta 1:163 840 0.

Anticuerpos contra los principales autoantígenos de los islotes pancreáticos humanos: La determinación de AGAD, AAI, AIA2 en los sueros hiperinmunes de conejo se realizó como fue descrito anteriormente

Resultados: 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 empleadas para el aislamiento viral resultaron ser negativos y no se detectó título preinmune de AGAD, AAI y AIA2 en ninguno de los conejos inmunizados.

Utilizamos el conejo como modelo experimental para realizar este estudio pues los conejos no son susceptibles a la infección por enterovirus. De esta manera garantizamos que se genere una

respuesta inmune contra los virus inoculados como parte de los mecanismos de defensa del huésped frente a un agente patógeno invasor, pero descartamos la posibilidad de replicación viral en células  $\beta$  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 6 aminoácidos entre la proteína viral P2-C y la GAD 65 humana (Vreugdenhil y cols., 1999). De este modo, es posible que el mimetismo molecular entre estas dos regiones pudiera explicar la reactividad cruzada observada en nuestros resultados.

### **Discusión / Argumentación de la teoría**

El estudio de ambas epidemias reveló que más del 85% de los individuos infectados sin antecedentes personales de DM1 mostraron evidencias de respuesta autoinmune contra las células  $\beta$  pancreáticas. Los autoanticuerpos que fueron detectados preceden al desarrollo clínico de la DM1 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 DM1 (Rewers y cols., 2004). No obstante a ello, si tenemos en cuenta que la incidencia de la DM1 en Cuba es baja (2,9/100 000 habitantes) (Collado y cols., 1993), nos atrevemos a pronosticar que la autoinmunidad contra diferentes antígenos de las células  $\beta$  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. 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.

Sin embargo, el desarrollo de DM1 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 apoyan el papel de la infección por enterovirus en el desarrollo de DM1 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 DMI en individuos sin antecedentes personales de DMI 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 DMI 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  $\beta$  pancreáticas.

El mecanismo por el cual los enterovirus pueden desencadenar una respuesta inmune dirigida contra las células  $\beta$  pancreáticas no se conoce con exactitud. Se ha postulado que los enterovirus pudieran replicarse en las células  $\beta$  del páncreas y causar una destrucción directa de las mismas como resultado de una infección citolítica aguda. Alternativamente se ha planteado que los enterovirus pueden causar una destrucción indirecta de las células  $\beta$  pancreáticas mediante la inducción de una respuesta autoinmune por diferentes mecanismos como pueden ser la activación inespecífica de las células autoreactivas, la citotoxicidad y liberación de autoantígenos pancreáticos hasta el momento ocultos para el sistema inmune y el mimetismo o similitud molecular entre determinantes autoantigenicos pancreáticos y determinantes virales (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  $\beta$  pancreáticas humanas.**

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 exposición de un individuo a infecciones con diferentes serotipos de enterovirus que compartan determinantes antigénicos comunes con las células  $\beta$  pancreáticas pudiera ser uno de los factores involucrados en la generación de una respuesta autoinmune pancreática. 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  $\beta$  pancreáticas generada en

los pacientes infectados por E16 y E30 durante las epidemias de meningoencefalitis del 2000 y 2001. No obstante nosotros no descartamos la participación de otros mecanismos en la generación de una respuesta autoinmune pancreática (Elshehani y cols., 2007). De hecho, en los dos primeros estudios presentados hemos encontrado evidencias que sugieren que los enterovirus pueden causar un daño citolítico de las células  $\beta$  y por tanto a nuestro juicio los enterovirus pueden participar en los procesos autoinmunes de destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas por diferentes mecanismos los cuales pueden operar en los mismos o distintos estadios del desarrollo de la enfermedad.

A nuestro juicio, los resultados presentados en este trabajo han demostrado la veracidad de la hipótesis formulada y aportan 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  $\beta$  pancreáticas y se sugieren posibles mecanismos (daño citolítico y mimetismo molecular) mediante el cual este fenómeno se desarrolla.

### **Conclusiones**

- 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  $\beta$  pancreáticas, y se reporta de esta forma nuevos serotipos de enterovirus como posibles contribuyentes ambientales para el desarrollo de la DM1.
- Es el primer informe a nivel mundial de un caso de DM1 después de infección por echovirus 30.
- Se demuestra que la infección por enterovirus está asociada tanto con el comienzo clínico de la enfermedad en diabéticos tipo 1 de diagnóstico reciente como con la presencia de anticuerpos contra los islotes pancreáticos en familiares de primer grado de diabéticos tipo 1.
- 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.
- Se sugiere que los enterovirus inducen una respuesta autoinmune humoral pancreática mediante los mecanismos de mimetismo molecular y daño citolítico de las células  $\beta$  pancreáticas.

## Bibliografía

1. Bunce M. PCR-SSP typing. In: Bedwell JC, Navarrete C, eds. *Histocompatibility testing*. Imperial College Press;2000. p.149.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Ezcurra E. Montaje y estandarización de la determinación de hemoglobina glucosilada. *Rev Cub Med* 1986;5:397-402.
6. Haller MJ, Atkinson MA, Schatz D. Type 1 diabetes mellitus: Etiology, presentation, and management. *Pediatr Clin N Am* 2005;52:1553-78.
7. Hyöty H. Enterovirus infections and type 1 diabetes. *Ann Med* 2002;34:138-47.
8. 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  $\beta$ -cell functional classification, prospective analysis, and clinical outcomes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5090-8.
9. 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.
10. Pilcher CC, Elliott RB. A sensitive and reproducible method for the assay of human islet cell antibodies. *J Immunol Meth* 1990;129:111-7.
11. Redondo MJ, Fain PR, Eisenbarth GS. Genetics of type 1A diabetes. *Recent Prog Horm Res* 2001;56:69-89.
12. 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.
13. 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.
14. Subasic D, Karamehic J. Optimisation of RT-PCR for detection of enterovirus. *Med Arh* 2006;60:217-8.

15. Trinder P. Determination of glucose oxidase with one alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 1969;6:24-7.
16. 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
17. World Health Organization. Polio laboratory manual. Department of Vaccines and Biologicals. WHO, Geneva 2001.