



UNIVERSIDAD DE LA HABANA
FACULTAD DE BIOLOGÍA

**Un ligando peptídico modificado derivado de la proteína de
estrés celular de 60 kDa con potencialidades terapéuticas
para la artritis reumatoide.**

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

Autor: Lic. María del Carmen Domínguez Horta

Tutor: Dr. Gabriel Padrón Palomares



CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

2011

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL DOCUMENTO

Por orden alfabético:

AcM	anticuerpo monoclonal
AA	artritis inducida por adyuvante
AIC	artritis inducida por colágeno
AR	artritis reumatoide
AIF	adyuvante incompleto de Freund
AINES	anti-inflamatorios no esteroideos
APC	célula presentadora de antígeno (del inglés “Antigen presenting cells”)
APL	ligando peptídico modificado (del inglés “altered peptide ligand”)
CII	colágeno tipo II
dLN	linfonodos conectados con el sitio de inoculación (del inglés “draining lymph nodes”)
CTLA-4	antígeno-4 asociado al Linfocito T Citotóxico (del inglés “cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4”)
DC	células dendríticas (del inglés “dendritic cells”)
EBV	virus Epstein-Barr (del inglés, “Epstein-Barr virus”)
ELISA	inmunoensayo enzimático (del inglés “enzyme-linked immunoabsorbent assay”)
FARM	fármacos anti-reumáticos modificadores de la enfermedad
Foxp3	factor transcripcional Foxp3 (del inglés, “forkhead box protein P3”)
FR	factor reumatoide
HLA	antígenos leucocitarios humanos (del inglés “human leukocyte antigen”)
HSP	proteínas de estrés celular (del inglés “heat shock proteins”)
IE	índice de estimulación
IFN γ	interferón gamma
IgG	inmunoglobulina G
IL	interleucina
MHC	complejo principal de hiscompatibilidad (del inglés “major histocompatibility complex”)
<i>Mt</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTX	Metotrexato
ndLN	linfonodos no conectados con el sitio de inoculación (del inglés “non draining lymph node”)
PBMC	células mononucleares periféricas (del inglés “peripheral blood mononuclear cells”)
PBS	solución amortiguadora de fosfato (del inglés “phosphate buffer solution”)
SFB	suero fetal bovino
SFMC	células mononucleares aisladas del fluido sinovial (del inglés “synovial fluid mononuclear cells”)
TCR	receptor de células T (del inglés “T cell receptor”)
TGF- β	factor de crecimiento transformante β (del inglés “transforming growth factor beta”)
TH	células T cooperadoras (del inglés “T helper”)
TLRs	receptores tipo Toll (del inglés “Toll like receptors”)
TNF α	factor de necrosis tumoral alfa (del inglés “tumor necrosis factor alpha”)
Treg	células T reguladoras

Síntesis

En los últimos años diversos grupos de investigadores se han focalizado en el uso de estrategias antígeno-específicas para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, con el objetivo de regular la respuesta inmune, no de suprimirla. El presente trabajo está centrado en desarrollar una estrategia para el tratamiento de la artritis reumatoide, con el uso de un ligando peptídico modificado derivado de la proteína de estrés celular humana de 60 kDa. Esta proteína es un autoantígeno involucrado en la patogénesis de la artritis reumatoide. A partir de ella, se predijo a través de herramientas bioinformáticas una nueva región que contiene varios epitopos de células T. El péptido correspondiente se modificó en un aminoácido que probablemente esté involucrado en la interacción con la molécula HLA clase II, lo cual cambió sus propiedades inmunogénicas. Este ligando peptídico modificado induce células T CD4+ con fenotipo regulador *in vivo* y en ensayos *ex vivo* con células mononucleares aisladas de pacientes con artritis reumatoide. Además se demostró que este péptido ejerce un potente efecto terapéutico en dos modelos animales para la artritis reumatoide, asociado con una disminución de los niveles del TNF α en los animales. Estos resultados avalan las potencialidades terapéuticas del péptido basadas en los mecanismos supresores que pueden mediar las células T reguladoras, que contribuyen al restablecimiento de la tolerancia periférica que se pierde como parte del curso de la enfermedad, sin causar inmunosupresión.

Índice

Introducción	1
I. Revisión Bibliográfica	6
I.1 Artritis reumatoide	6
I.1.1 Fisiopatología de la artritis reumatoide	6
I.1.2 Etiología	8
I.1.2.1 Factores ambientales	8
I.1.2.2 Factores genéticos	9
I.1.2.3 Factores inmunológicos	10
I.2 Células T reguladoras	14
I.2.1 Células T reguladoras en la artritis reumatoide	16
I.2.2 HSP60 en la inducción de células T reguladoras	17
I.3 Modelos animales para la artritis reumatoide	19
I.3.1 Artritis inducida por adyuvante en ratas	19
I.3.2 Artritis inducida por colágeno en ratones DBA-1	20
I.4 Tratamientos para la artritis reumatoide	20
I.4.1 Medicamentos tradicionales	21
I.4.2 Terapias biológicas	22
I.4.2.1 Terapia anti-citocinas	22
I.4.2.2 Disminución de linfocitos B	24
I.4.2.3 Inhibición de la coestimulación	24
I.4.3 Estrategias antígenos-específicas	24
I.5 Ligandos peptídicos modificados. Mecanismos moleculares y resultados en la clínica	26
I.5.1 Topografía de la unión de péptidos a moléculas MHC clase II	29
II. Materiales y Métodos	32
II.1 Predicción de epitopos de células T a partir de la HSP60 humana y diseño de ligandos peptídicos modificados	32
II.1.1 Predicción de epitopos de células T para humanos	32
II.1.2 Diseño de los ligandos peptídicos modificados	32
II.1.3 Predicción de epitopos de células T para murinos	32
II.2 Péptidos	32
II.3 Características de los pacientes con artritis reumatoide y de los donantes sanos	33
II.4 Animales de experimentación	34
II.5 Ensayos	35
II.5.1 Determinación de la proliferación inducida por los péptidos en células T CD4+ aisladas de donantes sanos	35
II.5.2 Cuantificación de los niveles de TNF α e INF γ inducidos por los péptidos en ensayos <i>ex vivo</i> con PBMC aisladas de pacientes con artritis reumatoide	36
II.5.3 Evaluación por citometría de flujo de la frecuencia de células T reguladoras (CD4+Foxp3+) inducidas por los péptidos en ratones BALB/c	37
II.5.4 Evaluación por citometría de flujo de la frecuencia de células T reguladoras (CD4+CD25 ^{high} Foxp3+) inducidas por los péptidos en ensayos <i>ex vivo</i> con células mononucleares aisladas de pacientes con artritis reumatoide y de donantes sanos	38
II.6 Evaluación terapéutica de los péptidos en dos modelos animales para la artritis reumatoide	39
II.6.1 Obtención de los inductores de la artritis	39
II.6.2 Inducción experimental de la artritis por adyuvante y por colágeno. Evaluación de los signos clínicos	40
II.6.3 Esquema terapéutico para las ratas con artritis inducida por adyuvante	40
II.6.4 Esquema terapéutico para los ratones con artritis inducida por colágeno	41
II.6.5 Análisis histológico	42
II.6.6 Evaluación por citometría de flujo de la frecuencia de células T reguladoras inducidas por la terapia con los péptidos en ratas Lewis y ratones DBA-1	42

II.6.7 Medición de los niveles de TNF α e IL-10.....	43
II.7 Análisis estadístico	44
III. Resultados	46
III.1 Selección de un epitopo de células T derivado de la HSP60 humana	46
III.1.1 Predicción de epitopos de células T derivados de la HSP60 humana	46
III.1.2 El péptido E18-3 induce la proliferación de células T CD4+	46
III.1.3 El péptido E18-3 aumenta significativamente los niveles de las citocinas TNF α e IFN γ en las PBMC aisladas de pacientes con artritis reumatoide.....	47
III.2 Selección de un ligando peptídico modificado derivado del péptido E18-3 con potencialidades terapéuticas para la artritis reumatoide	48
III.2.1 Diseño de ligandos peptídicos modificados derivados del péptido E18-3.	48
III.2.2 El APL2 induce la proliferación de células T CD4+ mientras que el APL1 no tiene este efecto.....	50
III.2.3 El APL1 induce un incremento significativo de células T reguladoras con fenotipo CD4+Foxp3+ en los linfonodos y el bazo de ratones BALB/c.....	51
III.2.4.1 El APL1 induce un incremento significativo de las células T reguladoras con fenotipo CD4+CD25 ^{high} Foxp3+ en ensayos <i>ex vivo</i> con PBMC aisladas de pacientes con artritis reumatoide.....	54
III.2.4.2 El APL1 no incrementa las células T reguladoras con fenotipo CD4+CD25 ^{high} Foxp3+ en ensayos <i>ex vivo</i> con PBMC aisladas de donantes sanos	59
III.3 Evaluación del efecto terapéutico del APL1 en dos modelos animales para artritis reumatoide.....	60
III.3.1 El APL1 atenúa la respuesta patogénica en el modelo de artritis inducida por adyuvante	60
III.3.2 El APL1 atenúa la respuesta patogénica en el modelo de artritis inducida por colágeno	67
IV. Discusión	75
Conclusiones	90
Recomendaciones	91
Referencias bibliográficas	92
Anexos	114
Autobibliografía	115

INTRODUCCIÓN

Introducción

A partir de los años noventa del siglo pasado se ha progresado sustancialmente en la comprensión de los mecanismos moleculares que median el comienzo y el curso de las enfermedades autoinmunes. Entre las más estudiadas está la artritis reumatoide (AR) (1,2). La AR es una enfermedad autoinmune sistémica que afecta al 1% de la población mundial con un índice mujer/hombre de 3:1. El desarrollo de esta enfermedad se asocia con factores hormonales, ambientales y ciertos genes como los que codifican para las moléculas HLA (del inglés “human leukocyte antigen”) clase II (3,4,5). Las células T auto-reactivas desempeñan un papel crucial en la patogénesis de esta enfermedad (6,7). La AR se caracteriza por la inflamación crónica de las articulaciones periféricas, debido a la infiltración de células T y B activadas, neutrófilos y macrófagos en la membrana sinovial, lo cual conduce a la destrucción progresiva del cartílago y del hueso (8,9,10). Esto genera una marcada discapacidad en los pacientes que, unido a las manifestaciones sistémicas de la enfermedad, afecta considerablemente la vida social y familiar de estos (11).

Tradicionalmente, esta enfermedad se ha tratado con fármacos que tienden a mejorar los síntomas o que actúan como potentes inmunosupresores no específicos, por lo cual no constituyen una terapia eficiente. Los avances en el conocimiento de la fisiopatología de esta enfermedad y en la biotecnología han permitido el surgimiento de una nueva era en el tratamiento de la AR, conocida como terapia biológica. A través de estos tratamientos se ha intentado interferir diferentes elementos claves en la patogenia de la enfermedad como las citocinas: TNF α (del inglés “tumor necrosis factor alfa”) (12), la interleucina (IL)1(13), IL-6 (14,15) y las señales coestimuladoras a través del CD28 que impide la activación de los linfocitos T (16,17). Los fármacos anti-TNF α constituyen hasta el momento la alternativa de mayor éxito para el tratamiento de la AR (18). Si bien los resultados de estos tratamientos son considerados superiores a los obtenidos con los medicamentos tradicionales, cerca del 50% de los pacientes no responden a este tipo de terapia (19). Además, debido a que estos fármacos inhiben una citocina crucial involucrada en la respuesta inmune innata y adaptativa provocan en muchos pacientes alta susceptibilidad a contraer infecciones y neoplasias (20, 21). El desarrollo de variantes terapéuticas que puedan eliminar específicamente células T patogénicas sin provocar una inmunosupresión generalizada constituye un reto en la actualidad. Esto ha llevado en los últimos años a diversos grupos de investigadores a retomar el uso de las estrategias antígeno-específicas para el tratamiento de las

enfermedades autoinmunes, con el objetivo de regular la respuesta inmune, no de suprimirla (22,23,24). La inducción de tolerancia periférica a través del uso de autoantígenos involucrados en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes constituye una alternativa para este propósito. La selección del autoantígeno en cuestión representa un punto fundamental para el desarrollo de este concepto terapéutico. La proteína de estrés celular de 60 kDa (HSP60- del inglés “heat shock protein 60”) es considerada un autoantígeno para la AR y otras enfermedades autoinmunes (25). A partir de la HSP60 se han identificado varios epitopos involucrados en los mecanismos de regulación que controlan la respuesta patogénica en el modelo de artritis inducida por adyuvante (AA) en ratas Lewis (26,27). Por otra parte, se ha descrito que la HSP60 puede inducir clones de células T reguladoras (Treg) en determinadas condiciones como los procesos inflamatorios (28,29). Estos elementos señalan a la HSP60 como un candidato atractivo para la inducción de tolerancia periférica en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes (30). Al respecto, se concluyó con resultados promisorios un ensayo clínico fase II en pacientes con diabetes tipo I tratados con un péptido derivado de esta proteína (31).

Además de péptidos que contienen epitopos originales de autoantígenos como inductores de tolerancia periférica, este concepto terapéutico ha sido abordado en modelos experimentales con ligandos peptídicos modificados (APL- del inglés “altered peptide ligand”) (32,33,34,35,36,37,38). Los APLs son análogos de los péptidos inmunogénicos de los cuales se derivan. Generalmente presentan una o varias sustituciones en las posiciones esenciales de contacto con el receptor de las células T (TCR- del inglés “T cell receptor”) o con las moléculas del sistema principal de histocompatibilidad (MHC- del inglés “major histocompatibility complex”), que interfieren o modifican la cascada de eventos intracelulares para la activación de las células T (39).

La capacidad de manipular experimentalmente las propiedades intrínsecas de los ligandos peptídicos conocidos, permite alterar apropiadamente la naturaleza y el curso de la respuesta inmune celular. Para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, los APLs deben tener propiedades antagónicas al péptido inmunogénico original. Se ha descrito que los APLs pueden bloquear o atenuar la respuesta de las células T auto-reactivas por diferentes mecanismos como: anergia, el cambio en el patrón de citocinas o la inducción de apoptosis (40,41,42,43). Otro mecanismo de acción que se ha descrito para estos péptidos es la inducción de Treg (35,44).

El presente trabajo está focalizado en el desarrollo de estrategias antígeno-específicas para el tratamiento de la AR, a través del uso de APLs derivados de autoantígenos que intervengan en la patogénesis de esta enfermedad. Bajo esta línea de investigación se formuló la siguiente **hipótesis**:

Un ligando peptídico modificado, derivado de una región de la HSP60 humana que contiene nuevos epitopos de células T, puede inducir células T CD4+ con fenotipo regulador y tener efecto terapéutico sobre dos modelos animales para la artritis reumatoide.

A partir de esta hipótesis de trabajo se trazaron los siguientes **objetivos**:

1. Seleccionar un péptido derivado de la HSP60 humana que contenga nuevos epitopos de células T que pueda ser presentado por varios alelos de la molécula HLA clase II, asociados con la AR.
2. Elegir un APL derivado del péptido seleccionado que no incremente la proliferación *in vitro* de células T CD4+ aisladas de donantes sanos e induzca Treg en ratones y en ensayos *ex vivo* con células mononucleares aisladas de pacientes con AR.
3. Evaluar el efecto terapéutico del APL seleccionado en dos modelos animales para AR.

Para el cumplimiento de estos objetivos se acometieron las siguientes tareas experimentales:

Tareas para el objetivo 1:

- Predicción de nuevos epitopos de células T derivados de la HSP60 humana que pudieran ser presentados por varios alelos de la molécula HLA clase II, asociados con la AR.
- Evaluación del efecto del péptido seleccionado sobre la proliferación *in vitro* de las células T CD4+ aisladas de donantes sanos.
- Evaluación del efecto del péptido seleccionado sobre los niveles de las citocinas TNF α e interferón gamma (IFN γ), en cultivos de células mononucleares periféricas (PBMC-del inglés “peripheral blood mononuclear cells”) aisladas de pacientes con AR.

Tareas para el objetivo 2:

- Diseño de APLs derivados del péptido original seleccionado.
- Evaluación del efecto de los APLs sobre la proliferación *in vitro* de células T CD4+ aisladas de donantes sanos.
- Evaluación de la capacidad del APL seleccionado para inducir Treg en ratones.

- Evaluación de la capacidad del APL seleccionado para inducir Treg con fenotipo CD4+CD25^{high} Foxp3+ en ensayos *ex vivo* con PBMC aisladas de pacientes con AR y de donantes sanos.

Tareas para el objetivo 3:

- Evaluación del efecto terapéutico del APL seleccionado en el modelo de AA en ratas Lewis.
- Evaluación del efecto terapéutico del APL seleccionado en el modelo de artritis inducida por colágeno (AIC) en ratones DBA-1.

De los resultados surgen varios **aportes al conocimiento**. En primer lugar, en este trabajo se identificó una región de la HSP60 humana que contiene nuevos epitopos de células T, que pudieran ser presentados por varios alelos de la molécula HLA clase II, asociados con una predisposición a padecer la AR. Estos epitopos no coinciden con los descritos con anterioridad en la literatura (45,46,47,48). En segundo lugar, los resultados de este trabajo contribuyen al diseño de APLs, ya que se demostró que uno de los cambios efectuados en el péptido original modifica considerablemente sus propiedades inmunogénicas. La modificación en cuestión dio lugar a un APL que induce Treg en ratones BALB/c y en ensayos *ex vivo* con PBMC aisladas de pacientes con AR. Esta capacidad del APL pudiera mediar el efecto terapéutico evidenciado en dos modelos animales para la AR. Por lo que estos resultados también contribuyen a la caracterización de los mecanismos de acción de los APLs.

Precisamente, uno de los elementos más relevantes y novedosos de este trabajo son los resultados que demuestran, que un nuevo APL derivado de la HSP60 humana es capaz de inducir células T CD4+ con fenotipo regulador, a diferencia del epitopo original. Este hecho lo convierte en un atractivo candidato para el tratamiento de la AR, ya que pudiera contribuir a restaurar la tolerancia periférica que se pierde durante el curso de la enfermedad, sin causar la marcada inmunosupresión que generan los anti-TNF α . Este hallazgo constituye la principal **novedad científica** de esta tesis.

El conjunto de resultados alcanzados en este trabajo ha contribuido a sustentar el posible uso en la **práctica médica**, de este APL para el tratamiento de pacientes con AR. En estos momentos disponemos de una formulación estable del péptido, con la cual se realizaron los estudios de toxicología necesarios con resultados satisfactorios y se prepara la solicitud de autorización al CECMED para la ejecución de un ensayo clínico (fase I) en pacientes con AR.

La **importancia económica** de este trabajo radica en el posible aporte monetario de la comercialización de un nuevo fármaco para el tratamiento de la AR. En este aspecto, es importante considerar que los fármacos más efectivos para el tratamiento de esta enfermedad son comercializados a un alto costo (cerca de 12000 USD/paciente/año). Este hecho, unido a la incidencia de esta enfermedad a nivel mundial, hace que la AR represente un mercado importante.

La **importancia social** reside en que este posible fármaco no debe causar el conjunto de reacciones adversas descritas para las terapias tradicionales y biológicas. Por otra parte, en nuestro país no se aplican los fármacos más actuales a los pacientes con AR, debido a las limitaciones que impone el bloqueo norteamericano. Por lo que disponer de este fármaco representaría una opción muy atractiva para los pacientes cubanos.

Este trabajo de tesis consta de: Introducción (5 páginas), Revisión Bibliográfica (26 páginas), Materiales y Métodos (14 páginas), Resultados (29 páginas), Discusión (15 páginas), Conclusiones (1 página), Recomendaciones (1 página), Referencias (23 páginas) y un Anexo. El trabajo contiene un total de 29 figuras y 10 tablas.

Los resultados presentados en esta tesis han sido discutidos en varios Congresos Nacionales e Internacionales: IV Taller Nacional de Inflamación 2005, Hematología Habana 2005, V Congreso de la Sociedad Cubana de Inmunología 2006, Biotecnología Habana 2006, VI Congreso Nacional de Inmunología 2008, Hematología Habana 2009, Congreso Europeo de la Liga contra las Enfermedades Reumáticas Dinamarca 2009 y Biotecnología Habana 2009.

Además, forman parte de tres publicaciones científicas, en las revistas “Autoimmunity”, “Biotecnología Aplicada” y la “Revista Cubana de Reumatología”. Además, de dos artículos de revisión en las revistas: “CENIC Ciencias Biológicas” y “Biotecnología Aplicada”. Estos resultados forman parte de una patente solicitada en Cuba y en PCT, ya concedida en Rusia, Australia, Corea del Sur y Japón.

La mayor parte del trabajo experimental se realizó en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de La Habana. Los experimentos con los ratones BALB/c y DBA-1 se ejecutaron en el Laboratorio de Biología y Terapia de las Patologías Inmunes del Hospital Pitie-Salpetriere en Paris y en el Centro de Biotecnología Molecular de la Universidad de Turín, respectivamente.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I. Revisión Bibliográfica

I.1 Artritis Reumatoide

La AR es una enfermedad autoinmune sistémica cuya manifestación clínica primaria es la inflamación de las articulaciones periféricas. Esta es una enfermedad que afecta al 1% de la población mundial, con un índice mujer/hombre de 3:1. El daño articular suele ocurrir de forma simétrica con una evolución crónica y progresiva, que se caracteriza por periodos de actividad y remisiones (1). En periodos de actividad se presentan los signos y síntomas característicos de la enfermedad, dado por la activación en periferia y migración de células T activadas a la articulación. Sin embargo, en los periodos de remisión clínica la respuesta inflamatoria se logra controlar, hasta que se produce una nueva crisis, tras la que se incrementa el daño articular. Además, pueden ocurrir alteraciones sistémicas que complican el cuadro clínico de la enfermedad. En la patogénesis de la AR participan varias poblaciones celulares que potencian y perpetúan la enfermedad: linfocitos T y B, macrófagos, neutrófilos y sus productos (citocinas, quimiocinas, proteasas y autoanticuerpos) (6,49,50,51,52,53). La formación del *pannus* es el elemento determinante en la aparición de la erosión ósea, con la consiguiente desorganización del espacio intra-articular y la destrucción de la articulación. El *pannus* es un tejido de granulación que se comporta de forma similar a un tumor multicéntrico e invasivo (54,55).

I.1.1 Fisiopatología de la artritis reumatoide

La AR se caracteriza por la inflamación crónica de las articulaciones periféricas, debido a la infiltración de células activadas en la membrana sinovial, lo cual conduce a la destrucción progresiva del cartílago y el hueso (56).

La afectación de la articulación depende de tres elementos principales que están vinculados estrechamente con una red de coestimulación que tiene como resultado final la destrucción del cartílago y del hueso. Estos elementos son: la inflamación, la hiperplasia con infiltración del tejido sinovial y la angiogénesis.

Hasta el momento la hipótesis más aceptada propone que el daño se origina a través del reconocimiento de un antígeno proveniente de virus, bacterias o presente en el propio organismo (autoantígeno) (57).

El reconocimiento del autoantígeno por parte de los linfocitos T CD4⁺ auto-reactivos, conjuntamente con la estimulación de diferentes citocinas (57) inducen la diferenciación de estas células a un fenotipo TH1 y TH17 (58). Estas células producen citocinas proinflamatorias, las cuales tienen efectos positivos sobre la activación de linfocitos T y células sinoviales lo que a su vez genera mayor producción de citocinas proinflamatorias, expresión de moléculas de adhesión y migración hacia la articulación

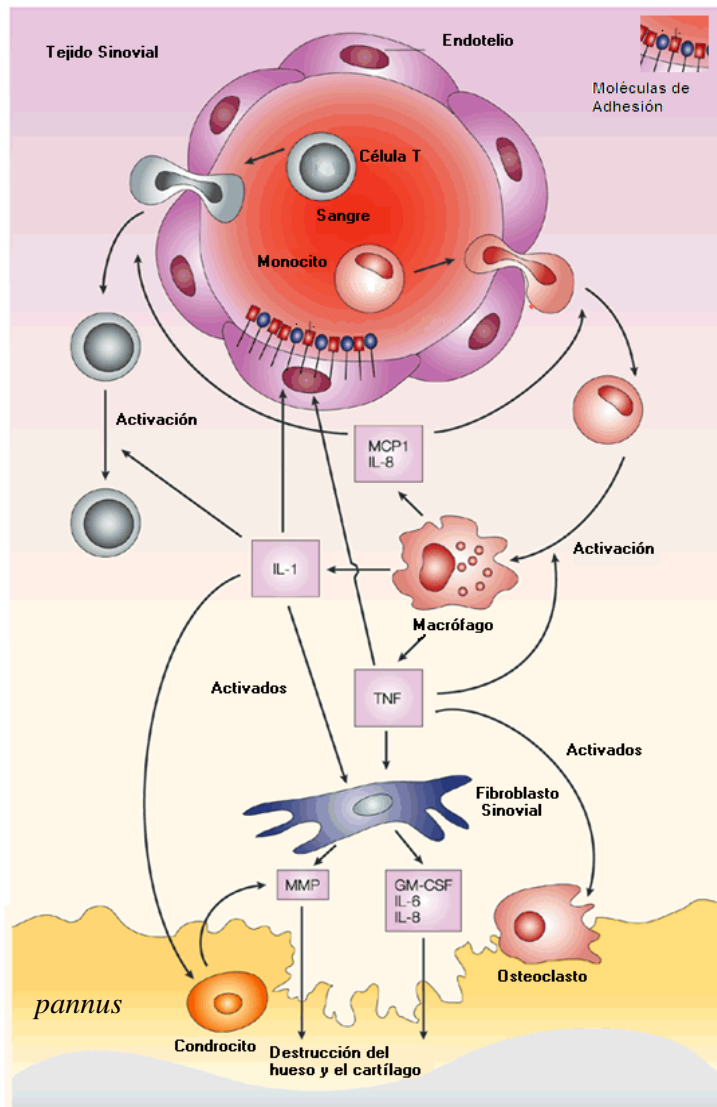


Figura1. Fisiopatología de la AR. Tomado de *Moctezuma JF* (68)

principalmente de monocitos y neutrófilos (59,60). Estos últimos, pueden dañar severamente la articulación a través de la generación y liberación de metaloproteasas (MMPs) y radicales libres de oxígeno (61). La activación de los macrófagos, por su parte, conlleva a la producción de niveles elevados de TNF α y de IL-1 (12,62). El efecto más importante de estas citocinas es sobre los osteocitos pues se conoce que pueden inhibir la regeneración ósea por los osteoblastos e inducir mayor reabsorción por los osteoclastos (63). Estas citocinas influyen además en la regulación de la

expresión en las células endoteliales de las moléculas de adhesión LFA-1 (del inglés, "leukocyte function antigen"), ICAM-1 (del inglés, "intercellular adhesion molecule") y VCAM-1 (del inglés, "vascular cell adhesion molecule") las que favorecen el reclutamiento de otras células al sitio de la inflamación. Los fibroblastos sinoviales, en respuesta a la IL-1 y el TNF α , producen diferentes moléculas que conllevan al daño

articular como: prostaglandinas, MMPs y la IL-8 (64). De igual forma a través de la síntesis de IL-6 estimulan la producción de reactantes de la fase aguda, los cuales participan potenciando esta respuesta inflamatoria (65,66). Por otro lado, el TNF α y la IL-1 inhiben la producción de citocinas anti-inflamatorias como la IL-10 y la IL-4. Incluso, pueden inducir la diferenciación de linfocitos B en células productoras de anticuerpos, como por ejemplo, el factor reumatoide (FR) que potencialmente también participa en la destrucción articular (67). De esta forma, el TNF α y la IL-1 conllevan a la proliferación excesiva de la membrana sinovial, lo cual conduce a la formación del *pannus* (figura 1) (68). Por su parte, el proceso de angiogénesis, que tiene lugar en el sinovio, prepara el sitio para una mayor migración de células inflamatorias y permite soportar los requerimientos metabólicos de una respuesta inflamatoria crónica (69). Aunque el mecanismo por el cual se induce y/o propaga la inflamación crónica en la AR no está completamente caracterizado, existen evidencias que indican anormalidades en los procesos apoptóticos de las células inflamatorias, lo que conlleva a la proliferación anormal de las mismas en el sinovio reumatoide (70).

I.1.2 Etiología

I.1.2.1 Factores ambientales

Algunos virus y bacterias han sido propuestos como agentes causales de la AR o que aumentan la predisposición a padecerla. Entre estos se incluyen el EBV (del inglés, "*Epstein-Barr virus*"), *Parvovirus* B19, *Lentivirus*, el Virus de la Hepatitis C y bacterias como *Mycobacterium tuberculosis* (Mt), *Proteus mirabilis*, *Micoplasma proteus*, *Yersinia enterocolitica* y *Porphyromonas gingivalis* (71,72,73,74,75). Aunque de modo general cualquier agente infeccioso que cause daño tisular o necrosis local puede desencadenar una respuesta inmune auto-reactiva al descubrir epitopos crípticos y/o crear nuevos autoantígenos para los cuales no existía tolerancia (76).

Dentro de los mecanismos que se han propuesto para explicar la relación con diversos agentes biológicos se encuentra el conocido como mimetismo molecular. Este mecanismo quizás sea el más difundido para explicar el desarrollo de las enfermedades autoinmunes. En esencia, plantea que si un huésped es infectado por un patógeno, que posea algún antígeno relacionado estructuralmente con alguna molécula del huésped, puede ocurrir una ruptura de la tolerancia al autoantígeno. La patología autoinmune aparece si la respuesta cruzada antígeno-específica provoca daño tisular

(76). El desarrollo de bases de datos que registran secuencias de péptidos ha permitido la identificación de varias secuencias lineales aminoacídicas compartidas por humanos y microorganismos. Sin embargo, muchas de las secuencias descritas en la década de los años 90 no presentaron ninguna correlación clínica (77). Estos hechos sugirieron que la mimica antigénica es más compleja que la simple homología de secuencias aminoacídicas lineales y que podría ser más relevante la homología tridimensional que la secuencia lineal (78,79,80).

Por otra parte, los superantígenos de bacterias específicas (*Streptococcus* y *Staphylococcus*) así como los derivados del EBV son capaces de propiciar la interacción del TCR con el MHC de otras células sin la necesidad del procesamiento antigénico. No presentan restricción al MHC clase II y pueden causar la proliferación de las células T sin ningún mecanismo coestimulador adicional, propiedad que los convierte en inmunoestimuladores muy potentes. Bueno y colaboradores sugieren que los superantígenos podrían promover la activación de mas del 20% de células T que estuviesen previamente en estado silente (81).

Pratesis y col. encontraron que los sueros de pacientes con AR pueden reaccionar con el antígeno nuclear del EBV citrulinado. Estos autores sugieren que una previa infección con este virus puede conllevar a una subsiguiente activación de varios clones de células T, con una citrulinación paralela (82).

I.1.2.2 Factores genéticos

Numerosos estudios demuestran que la AR tiene una mayor incidencia en pacientes con una especial predisposición genética, sin embargo, no se puede calificar como una enfermedad hereditaria. Algunas personas que desarrollan la enfermedad no presentan los genes que determinan la susceptibilidad a padecerla, y otras personas que tienen los genes nunca desarrollan la patología. Esto ha sugerido que el fondo genético de cada persona es importante pero no es determinante (4).

Contribución de MHC

La asociación entre la molécula HLA clase II, en particular los alelos: DR1, DR4 y DR10 y principalmente los alelos: DRB1*0101,*0102, *0401, *0404, *0405, *0408, *1001, y *1402 y el desarrollo de la AR fue establecida hace más de 30 años (83). Todos estos alelos codifican para el motivo: EQKRAA, el cual es denominado epitopo compartido y se localiza en la tercera región hipervariable de la cadena DRB (84,85).

Por otra parte, se conoce que ciertos alelos del HLA-DRB1 poseen un efecto protector dominante frente a la aparición de la AR, cuyo mecanismo podría ser la presentación de péptidos derivados del HLA-DRB1, en el contexto del HLA-DQ (85).

Trabajos recientes que emplean sofisticadas herramientas para el análisis genético, han permitido establecer refinadas asociaciones entre determinados genes que codifican para MHC, independientes de DRB1 y la presencia de anticuerpos que reconocen péptidos citrulinados, los cuales tienen un papel importante en la patogénesis de la AR (86,87,88).

I.1.2.3 Factores inmunológicos

El sistema inmunitario durante la evolución ha desarrollado complejos mecanismos biológicos, los cuales ante la invasión de cualquier microorganismo (virus, bacteria, hongo) o frente al desarrollo de procesos anormales (tumores) generan una respuesta inmune, que trata de eliminar el patógeno o la célula aberrante. La consiguiente reacción inflamatoria generada como consecuencia de dicha respuesta inmune, debe ser rigurosamente regulada de forma tal que no dañe la integridad del organismo. Cuando se afectan los mecanismos que garantizan esta fina regulación se rompe la tolerancia hacia los antígenos propios y se desencadenan los procesos autoinmunes patológicos (89,90,91).

La protección contra la autoinmunidad patológica está dada por la selección negativa de células T auto-reactivas en el timo, la cual se denomina tolerancia central. Este mecanismo es complementado por la inducción de tolerancia a autoantígenos en la periferia denominada precisamente tolerancia periférica (90,91). La eliminación de los clones auto-reactivos por el mecanismo de selección negativa en el timo ocurre por apoptosis de los linfocitos T que reconocen con elevada afinidad un péptido propio en el contexto del HLA. La expresión de antígenos periféricos por las células presentadoras de antígenos (APC- del inglés "*Antigen presenting cells*") del timo asegura la eficacia de este proceso. No obstante aproximadamente el 5% de la población de linfocitos T son clones auto-reactivos que escapan a la selección tímica y se encuentran circulando en la periferia en todos los individuos, ya que existen numerosos antígenos que no se encuentran expresados en niveles suficientes o simplemente no se expresan en el timo (92,93). En este sentido la tolerancia periférica proporciona mecanismos para evitar la activación de los linfocitos T que escapan a la tolerancia central. A este nivel, la tolerancia es mantenida por diversos mecanismos como el reconocimiento de autoantígenos en ausencia de coestimulación que conlleva a la anergia de los clones auto-reactivos (94,95,96).

Además, entre los complejos procesos desarrollados por el sistema inmunitario para asegurar la tolerancia a los autoantígenos en la periferia, están los mecanismos mediados por las Treg (97,98).

Sin embargo, ocasionalmente algunas células específicas para un antígeno propio pueden escapar a estos mecanismos generadores de tolerancia y atacar a los tejidos propios donde se localice el antígeno para el que es específico, dando lugar a una patología de tipo autoinmune como la AR. Aunque sus causas no son bien conocidas, se ha propuesto la participación de factores genéticos, ambientales, inmunológicos y hormonales (99,100,101)

Dos de los aspectos involucrados en la ruptura de la tolerancia son el estado de maduración de las APCs y los niveles de expresión de autoantígenos (102). Existen evidencias de que las APCs, en ausencia de señales de peligro o de estimulación del sistema inmunitario innato, permanecen en estado inmaduro e inducen tolerancia en las células T auto-reactivas al presentarle péptidos propios (103). Un aumento en los niveles de expresión de autoantígenos posibilita que sean reconocidos por células T auto-reactivas. Si este incremento ocurre en ausencia de señales de peligro se mantiene la tolerancia, si por el contrario ocurre en presencia de eventos que promuevan la activación de las APCs se rompe la tolerancia y se desencadena el síndrome autoinmune (104).

En este acápite trataremos varios factores inmunológicos muy relacionados de forma específica con la patogénesis de la AR.

Autoanticuerpos (factor reumatoide y anticuerpos anticitrulina)

Históricamente, el FR, un anticuerpo que reacciona con la fracción Fc de la IgG (inmunoglobulina G), ha sido el principal marcador serológico usado en el diagnóstico de la AR y es aún utilizado como uno de los criterios para la clasificación de la enfermedad (105). Sin embargo, el FR esta presente en otras enfermedades autoinmunes, en determinadas infecciones y en el 5% de la población sana. Por tanto, la presencia del FR pudiera ser simplemente una consecuencia de la activación policlonal de linfocitos B (106).

En la última década, un gran número de trabajos se han centrado en el estudio del rol de los anticuerpos contra proteínas citrulinadas. Los resultados derivados de estos estudios han generado el desarrollo de medios diagnósticos para la AR basados en el uso de diversas variantes de péptidos citrulinados (107,108).

La citrulinación es una modificación de la cadena lateral de la arginina. La reacción de transformación es catalizada por la enzima peptidil arginina desiminasa, la cual transforma el grupo guanidinio de la arginina (carga positiva) a grupo ureido citrulinado (neutro). Esta modificación post-traducciona l tiene la capacidad de alterar la estructura, la antigenicidad y la función de las proteínas (109).

Las proteínas citrulinadas tienen un rol en una gran variedad de tejidos y células en condiciones fisiológicas normales, por ejemplo: durante la diferenciación de los queratinocitos, en la regulación de la transcripción de las histonas y en la descondensación de la cromatina durante la replicación (110).

Específicamente, en la AR cuatro autoantígenos descritos para esta enfermedad se han encontrado citrulinados: el fibrinógeno, la vimentina, el colágeno tipo II (CII) y la α -enolasa (111,112,113,114). Las cuatro proteínas son expresadas en la articulación y existen evidencias que sustentan que los anticuerpos contra el fibrinógeno y el colágeno tipo II citrulinados median la inflamación articular, a través de la formación de inmunocomplejos (115,116,117).

Por otra parte, anticuerpos contra proteínas citrulinadas presentes en pacientes con AR están asociados con la presencia de moléculas HLA clase II portadoras del epitopo compartido. En este sentido, una de las evidencias más fuertes se centra en un péptido citrulinado derivado de la α -enolasa que se asocia con los alelos: HLA-DRB1*0401, *0404, 620W (118).

Linfocitos B

Los linfocitos B contribuyen a la inmunidad a través de la producción de anticuerpos, actuando como células presentadoras de antígenos para las células T y secretando citocinas. El éxito del Rituximab en el tratamiento de la AR, ha confirmado el rol substancial de los linfocitos B en la patogenia de esta enfermedad. El Rituximab es un anticuerpo que reconoce el antígeno CD20, este último es un receptor presente en las células B (desde células pre-B hasta linfocitos B activados), pero que no se expresa en las células plasmáticas ni en otros linajes celulares (119).

Wagner y col. identificaron dos clases de pacientes con AR: aquellos que presentan un alto número de linfocitos B y otros que presentan un bajo número de estas células. Estos últimos presentan una mayor actividad de la enfermedad (120).

Esta aparente contradicción, pudiera explicarse por los resultados de varios estudios recientes que han sugerido que además del rol patogénico de los linfocitos B,

relacionado con la presentación de antígenos y la producción de autoanticuerpos, estas células pueden tener también funciones reguladoras durante el curso de las enfermedades autoinmunes que contribuyen a suprimir la inflamación (121, 122, 123).

Células TH17

El tercer tipo de células colaboradoras descritas hasta el momento son las TH17, las cuales desempeñan un papel fundamental en la respuesta contra bacterias de crecimiento extracelular y hongos. Asimismo, se ha descrito para ellas un efecto proinflamatorio que les permite hacer de puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (124,125).

Las citocinas implicadas en el control de la actividad de las TH17 son la IL-23, el TGF- β y la IL-6. El TGF- β y la IL-6 promueven la diferenciación de los linfocitos T en reposo a TH17 y, una vez diferenciados, la citocina que induce la proliferación de estas células es la IL-23 (126).

Los diferentes tipos de células colaboradoras se inactivan mutuamente, de modo que las TH1 (a través del IFN γ) inhiben selectivamente la actividad de las TH2 y las TH17. A su vez, las TH2 inhiben la proliferación de las TH1 y las TH17 mediante la IL-10 y la IL-4. Las TH17 inhiben a las TH1 y a las TH2 (127).

Se ha descrito que diversos procesos patológicos de base inmune se deben a la pérdida de regulación de las células TH. Así, el exceso de las señales que generan las TH1 se asocia a los procesos inflamatorios, mientras que el exceso de las señales que generan las TH2 desencadenan enfermedades tóxicas, fundamentalmente alergias y asma (128).

Las funciones de las TH17 se ha asociado a procesos inflamatorios crónicos y autoinmunes, promovidos por el efecto proinflamatorio de la citocina que producen: la IL-17. Esta citocina actúa directamente en el desarrollo de diversas enfermedades autoinmunes como la AR. En esta enfermedad se ha encontrado que la expresión de la IL-17 está elevada en las articulaciones periféricas (129).

En la AR, además de potenciar la actividad de la IL-1 y el TNF- α , la IL-17 tiene una acción directa en la evolución del cuadro clínico, puesto que estimula la diferenciación de los osteoclastos y promueve la destrucción del cartílago y el hueso (130)

Hasta hace unos años se consideraba que las principales células causantes del daño tisular en las enfermedades autoinmunes eran las células TH1, pero actualmente se considera que las TH17 son las principales inductoras de estas enfermedades ya que:

migran más rápidamente que las TH1 a las zonas de la lesión y una vez allí, organizan la respuesta inflamatoria, además son capaces de reclutar a otras células complementarias, entre ellas, las propias TH1, que necesariamente deben colaborar con las TH17 para que se produzca la inflamación y la destrucción tisular (129). Además de las TH17, se ha descrito que otros linfocitos T, como los gamma delta, son importantes secretores de IL-17 (131). Esto puede explicar el hecho paradójico de que en las articulaciones de los pacientes con AR donde las concentraciones de IL-17 son elevadas, las células predominantes son las TH1, que deberían inhibir la acción de las TH17 (132).

I.2 Células T reguladoras

El término de Treg se utiliza para describir diferentes poblaciones celulares que exhiben una acción inmunosupresora, tanto *in vitro* como *in vivo*, sobre otras células del sistema inmunitario. Las funciones descritas para las Treg son: mantenimiento de la tolerancia periférica, control de las respuestas inflamatorias contra gérmenes, mantenimiento de la homeostasis intestinal y supresión de la respuesta inmune antitumoral (133,134,135).

Las Treg pueden ser divididas en dos poblaciones en dependencia de su origen: las Treg naturales y las adaptativas (136). Las Treg naturales son generadas en el timo en respuesta a interacciones de alta afinidad entre su TCR y el complejo péptido (propio)-MHC presentado por las células del estroma tímico. El repertorio de los TCRs de las Treg es al menos tan diverso como el de las células T convencionales (137).

Estas células salen a la periferia con un fenotipo supresor estable completamente funcional (138), donde constituyen alrededor del 5% de las células T CD4⁺ (136). Ellas expresan constitutivamente la cadena α del receptor de IL-2, el CD25, pero apenas producen dicha citocina por lo que su supervivencia es dependiente de la IL-2 exógena (139). Las Treg naturales son cruciales para el mantenimiento de la tolerancia periférica y en la prevención de enfermedades autoinmunes (140).

Las Treg pueden ejercer sus funciones supresoras a través de varios mecanismos. Dichos mecanismos pueden ser dependientes de contacto celular mediado por la Granzima A y B o por la vía de las Perforinas a través de los cuales pueden inducir apoptosis en las células T efectoras y de otras células como: monocitos y linfocitos B (141,142). Las Treg pueden realizar también su acción supresora a través de contacto

celular con las células dendríticas, afectando la maduración y las funciones de estas (143,144).

Otros mecanismos se basan en la secreción de factores solubles por la Treg como las citocinas: TGF- β (145), IL-10 (146) e IL-35 (147). Recientemente se han descrito otras moléculas secretadas por la Treg como el monóxido de carbono y la galectina que también tienen un rol supresor (148,149).

Asociado con la dependencia del consumo de IL-2 exógena por las Treg en periferia, se postula un mecanismo a través del cual pueden inducir apoptosis en los linfocitos T efectores, al privarlos de esta citocina (150)

Las Treg adaptativas son generadas en la periferia a partir de poblaciones maduras de células T bajo ciertas condiciones de estimulación antigénica. Al igual que las Treg naturales poseen propiedades inmunosupresoras y ejercen su función a través de la secreción de citocinas y del contacto celular (151). Dentro de estas, se han identificado diferentes subpoblaciones según sus propiedades genotípicas y funcionales, las células Tr1 (Treg tipo 1) las cuales secretan IL-10 y las TH3 que producen TGF- β . Estas células son cruciales para la homeostasis en el tracto gastro-intestinal (152,153).

Además de las Treg CD4⁺ se describen Treg CD8⁺, generadas en el timo, las cuales intervienen en la tolerancia neonatal, en la inducción de tolerancia durante los procesos de trasplantes de tejido y en el control de las enfermedades autoinmunes. Las Treg CD8⁺ median la supresión de la respuesta inmune mediante diferentes mecanismos los cuales pueden incluir el contacto celular y la secreción de citocinas (154).

Marcadores fenotípicos de las células T reguladoras

El factor transcripcional Foxp3 (del inglés, “forkhead box protein P3”) es esencial en el establecimiento de las funciones de las Treg (155). Este factor actúa como el controlador maestro del desarrollo y mantenimiento de las Treg. Foxp3 se une a más de 700 genes celulares y funciona como activador y en otros casos como represor de la transcripción de estos (156). Constituye además el marcador más específico para las Treg (156) y su expresión génica se correlaciona con las funciones supresoras de estas (154).

Inicialmente las Treg CD4⁺ se identificaron por la expresión simultánea de los antígenos CD4 y CD25. Sin embargo, el empleo de métodos de marcaje utilizando solamente CD4 y CD25 para la caracterización de Treg no permite discriminar entre

las Treg y las células T CD4⁺ activadas o efectoras, debido a que el CD25 es expresado también por estas últimas.

La población de Treg con fenotipo CD4⁺CD25^{high} esta enriquecida por otras proteínas de membranas como MHC clase II y el antígeno CD95 (Fas) (157). Además, se caracterizan por la expresión constitutiva de diferentes marcadores que incluyen: GITR (del inglés, “glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related protein”) y la molécula CTLA-4 (del inglés, “cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4”) (158,159). Ambas moléculas pueden encontrarse también en células T efectoras/memorias después de la activación dirigida por antígenos (160).

Actualmente, la mayoría de las Treg humanas pueden ser diferenciadas de las células efectoras por la expresión del antígeno CD62L (L-selectina) ya que más del 95% de las Treg con fenotipo CD4⁺CD25^{high} expresan este antígeno (161). Además se ha encontrado una correlación directa entre la expresión de Foxp3 en las Treg CD4⁺, la actividad supresoras de estas y la ausencia del receptor de la IL-7 (CD127) (162).

Dieckmann y col. caracterizaron a las Treg CD4⁺CD25⁺ humanas aisladas de la sangre como: CD45RO⁺, CD45RA⁻ y CD45RB^{low} (163). Recientemente Miyara y col. clasificaron a las células CD4⁺Foxp3⁺ humanas aisladas de las PBMC en tres subpoblaciones diferentes: CD45RA⁺Foxp3^{lo}, CD45RA⁻Foxp3^{hi} y CD45RA⁻Foxp3^{lo}. Las dos primeras tienen actividad supresora *in vitro*, mientras que la tercera secreta citocinas proinflamatorias como IL-17 y no es supresora (164).

1.2.1 Células T reguladoras en la artritis reumatoide

Las Treg juegan un rol fundamental en la prevención del desarrollo de las enfermedades autoinmunes (136,140,165). En este sentido, varios estudios se han focalizado en demostrar alguna alteración en el número o la actividad de las Treg que pudieran contribuir al desarrollo de las enfermedades autoinmunes como la AR.

En relación con la AR, algunos autores encontraron un incremento en la frecuencia de células T con fenotipo regulador en el fluido sinovial (166,167,168). Otros estudios han demostrado que la frecuencia de Treg en el líquido sinovial de pacientes con AR es más elevado que en la periferia y, a su vez, el número de Treg CD4⁺CD25⁺ periféricas de pacientes con AR es menor que en donantes sanos (169). El incremento de las Treg en la articulación inflamada se ha visto que no está asociada a la duración, la severidad de la enfermedad o al tratamiento (170).

Uno de los mecanismos que pudiera explicar este hecho lo constituye la expresión en las Treg del fluido sinovial de receptores de quimocinas tales como CXCR4 y CCR4 (171). Los ligandos de CCR4, CCL17 y CCL22, son ampliamente expresados en el tejido sinovial (172). El ligando de CXCR4, SDF-1 (del inglés, “stromal-derived factor1”), es expresado sobre células endoteliales sinoviales (173), y la expresión persistente de CXCR4 en células T CD4⁺ media su retención dentro del sinovio reumatoide (174). Debido a esto, es posible que las células T CD4⁺CD25⁺ sean reclutadas y retenidas selectivamente en el líquido sinovial (161).

La AR se desarrolla a pesar de un incremento de la frecuencia de las Treg en el sinovio como resultado de un reclutamiento preferencial de estas. Sin embargo, varios trabajos han confirmado que las Treg en AR presentan un deterioro en sus funciones, pues a pesar de suprimir la proliferación de células T CD4⁺CD25⁻ autólogas no son capaces de inhibir la secreción de citocinas pro-inflamatorias tales como IFN- γ y TNF- α (175,176). Esta función defectuosa de las Treg podría estar dada por el efecto inhibitorio que ejercen algunos componentes del ambiente del sinovio inflamado como las citocinas: IL-7, IL-15 e IL-6 las cuales se encuentran aumentadas en los pacientes con AR (177,178).

Otros autores demostraron que las Treg aisladas de pacientes con AR exhiben deficiencia en la regulación mediada por la molécula CTLA-4, este hecho pudiera también afectar la actividad supresora de estas (179). Por otra parte, las Treg y monocitos aislados de pacientes con AR expresan en mayor concentración el receptor GITR y su ligando en comparación con los donantes sanos. La unión de GITR con su ligando se ha asociado con la supresión de la funciones de las Treg (180,181).

1.2.2 HSP60 en la inducción de células T reguladoras

Las HSP son probablemente las proteínas más conservadas filogenéticamente en todos los organismos eucariotas y procariotas (25). Estas proteínas aumentan su expresión bajo condiciones de estrés tales como el incremento de la temperatura e infecciones virales. Su función primaria es la de servir como chaperonas moleculares, participan en la síntesis, el plegamiento, el transporte y la degradación de proteínas intracelulares (182).

Las HSP60 son muy inmunogénicas, capaces de inducir la producción de anticuerpos y la activación de células T, lo cual se ha visto tanto en individuos sanos como en

pacientes con enfermedades autoinmunes; aunque el nivel de reactividad en estos últimos es mayor (48). Esta proteína tiene gran capacidad para estimular la respuesta proinflamatoria del sistema inmunitario innato, lo cual incluye la liberación de mediadores inflamatorios como: el TNF- α , óxido nítrico e IL-6 secretadas por los monocitos, macrófagos y células dendríticas. También se ha encontrado que la HSP60 induce la expresión de los genes de la IL-12 y la IL-15, las cuales están involucradas en la promoción de un fenotipo TH1. Estos hechos sugieren que la HSP60 actúa como una señal de peligro para el sistema inmunitario innato (183).

Además de la proteína en su conjunto, péptidos derivados de la HSP60 pueden constituir una señal de peligro. Estos péptidos pueden participar en la amplificación de procesos autoinmunes, durante la eliminación de una posible invasión de patógenos al provocar respuestas fisiológicas inflamatorias; pero pueden inducir células T con función reguladora. Esta última función se encuentra reducida en la artritis autoinmune (184). La inducción de una respuesta reguladora puede estar condicionada por contactos previos con la HSP60 lo cual ocurre a lo largo de la vida de un ser humano, por ejemplo: durante las infecciones microbianas, vacunaciones, a través de los alimentos y por la presencia de las bacterias comensales (185)

La HSP60 es capaz de inducir la disminución de la inflamación inmune mediante dos mecanismos diferentes: como un ligando para receptores inmunes innatos, a través del TLR2 (del inglés "Toll like receptors") y como un autoantígeno reconocido por receptores inmunes adaptativos como el TCR (186).

Se ha comprobado en ensayos *ex vivo* empleando PBMC de donantes sanos que la señalización a través de TLR2, por la HSP60 y un péptido derivado de dicha proteína, potencia la actividad supresora de las Treg con fenotipo CD4+CD25+, las cuales son más efectivas para inhibir la secreción de citocinas proinflamatorias y la proliferación de las células T CD4+CD25- o de células T CD8+ (187). Por otra parte, se comprobó en ensayo *ex vivo* con PBMC aisladas de pacientes con AIJ (artritis idiopática juvenil) oligoarticular que la inducción de células T con un fenotipo regulador inducido por la HSP60 o péptidos derivados de ella, puede contribuir a la remisión de la enfermedad *in vivo* (188).

Además de estos mecanismos se ha planteado uno adicional por el cual la HSP60 provoca la disminución de la inflamación. Este mecanismo se basa en la presentación de epitopos de HSP60 por células T efectoras activadas a Treg que se denominan anti-

ergotopos. Estas Treg anti-ergotopo reconocen péptidos derivados de moléculas - ergotopos- expresadas por células T vírgenes cuando estas son activadas. Las Treg anti-ergotopo específicas para la HSP60 pueden provocar la disminución de los efectos pro-inflamatorios de las células T efectoras tanto *in vitro* como *in vivo* (186).

I.3 Modelos animales para la artritis reumatoide

Los modelos animales experimentales constituyen una herramienta de inestimable valor, pues permiten estudiar los mecanismos patogénicos de determinadas enfermedades y la evaluación de candidatos terapéuticos. En particular, para la AR se han desarrollado modelos en ratas y ratones que reproducen algunos de los signos clínicos que presentan los pacientes. Por ejemplo, las características histológicas de los animales enfermos incluyen la hiperplasia sinovial con una masiva infiltración de células inflamatorias y la formación de *pannus* (189).

I.3.1 Artritis inducida por adyuvante en ratas

La AA es un proceso subagudo, que aparece de 10 a 14 días después de la inyección intradérmica del *Mt* emulsificado en Adyuvante Incompleto de Freund (AIF) en la base de la cola de cepas de ratas susceptibles genéticamente, como las Lewis y las DA. Algunos autores han descrito que la respuesta celular en dicho biomodelo está dirigida fundamentalmente contra la proteína HSP60. Los granulocitos y los linfocitos T CD4+ auto-reactivos juegan un papel fundamental en la patogénesis. Como resultado, desde el cuarto día de administrar el inductor se pueden detectar incrementos en los niveles de TNF α , IL-1 e IL-6 (190). La enfermedad progresa rápidamente durante tres semanas y presenta un comportamiento monofásico. Comienza con una poliartritis migratoria que afecta primariamente los tobillos, muñecas y articulaciones pequeñas. La lesión primaria es una sinovitis, seguida de periartritis, peritendinitis y la formación del *pannus* con la destrucción del cartílago y del hueso. Este es el único modelo en ratas que representa un proceso sistémico, que involucra no solo las articulaciones sino además los tractos gastrointestinal y genitourinario, la piel y los ojos. A pesar de compartir muchas similitudes con los mecanismos fisiopatológicos en humanos, existen también algunas diferencias, entre las que se encuentran la ausencia del factor reumatoide y el curso monofásico que desarrolla la enfermedad (191).

I.3.2 Artritis inducida por colágeno en ratones DBA-1

La AIC comparte varias características con la AR. Dos de estas son la ruptura de la tolerancia y la generación de anticuerpos contra el CII endógeno. Estas características lo han convertido en el modelo animal de referencia para los estudios de AR. La AIC es inducida con la administración de CII heterólogo en adyuvante completo de Freund (ACF) en cepas de ratas y ratones susceptibles. La cepa de ratones más utilizada es la DBA-1. Los signos clínicos característicos de la enfermedad aparecen aproximadamente entre los días 21 y 25. Histológicamente se caracteriza por la hiperplasia sinovial con la erosión del cartílago y el hueso (190). En la actualidad existen varios procedimientos desarrollados por firmas comerciales (*Hooke Laboratorios*, EUA), que logran inducir la AIC con un curso crónico similar a la AR. Estos protocolos comerciales incluyen una segunda inoculación con CII pero en adyuvante incompleto de Freund (AIC), cuando aparecen los primeros signos de la enfermedad (192).

La inoculación del inductor a los ratones hace que las APCs de los linfonodos (LN) activan a los linfocitos T CD4+ que reconocen el CII heterólogo. Este evento es favorecido por los componentes del *Mt* (presente en el ACF) que contribuyen a la ruptura de la tolerancia hacia el CII. En este contexto los linfocitos T adquieren un fenotipo TH1 que producen IFN γ en los LN. Esta citocina favorece la producción de anticuerpos IgG2a por linfocitos B específicos al CII. Estos anticuerpos migran a los vasos sanguíneos y entran en la articulación, donde reconocen el CII endógeno y activan la cascada del complemento. Este evento afecta la integridad del endotelio de los vasos sanguíneos que rodean la articulación y facilita la entrada de linfocitos TH1, macrófagos y neutrófilos. En este ambiente articular los macrófagos y neutrófilos producen altos niveles de TNF α e IL-1. El TNF α pasa a la circulación periférica contribuyendo a la patogénesis de la enfermedad. La IL-1 actúa como el factor desencadenante de la destrucción articular, al provocar la infiltración de células fagocíticas, que progresivamente dan lugar a la formación del *pannus* (193).

I.4 Tratamientos para la artritis reumatoide

En la actualidad no existe un tratamiento efectivo para la AR. Los tratamientos se centran en aliviar el dolor, reducir la inflamación, retrasar los daños en las articulaciones y mejorar las funciones y el bienestar de los pacientes.

I.4.1 Medicamentos Tradicionales

Analgésicos y anti-inflamatorios no esteroideos (AINES)

Este grupo incluye drogas como la aspirina, ibuprofeno, piroxicam, naproxeno, ketoprofeno, indometacina, ketorolaco y nimesulide que actúan inhibiendo la inflamación y el dolor de las articulaciones pero simultáneamente pueden lesionar el estómago. Esto se produce porque bloquean al mismo tiempo la acción de dos enzimas que intervienen en procesos distintos: las enzimas ciclooxigenasas (COX) 1 y 2. La COX 1 está involucrada en la síntesis del mucus que protege al estómago del ácido gástrico y la COX 2 en la síntesis de las prostaglandinas, que son mediadores de la inflamación.

Fármacos anti-reumáticos modificadores del curso de la enfermedad (FARM)

Estos medicamentos no calman el dolor ni moderan la inflamación pero a largo plazo disminuyen la actividad y severidad de la enfermedad. Entre estos medicamentos podemos encontrar al metotrexato (MTX), la leflunomida, antimaláricos como cloroquina e hidroxiclороquina, las sales de oro, la D-penicilamina, la sulfasalazina y la ciclosporina.

El MTX constituye el medicamento de primera línea para el tratamiento de la AR (194,195,196). Este medicamento fue usado inicialmente como parte de la quimioterapia combinada para el cáncer. Actualmente constituye también el medicamento de primera línea para el tratamiento de algunas enfermedades neoplásicas como la leucemia linfoblástica aguda (197).

El MTX inhibe competitivamente la dihidrofolato reductasa, una enzima que participa en la síntesis del tetrahidrofolato. Como resultado de la unión irreversible con la dihidrofolato reductasa, evita la reducción de dihidrofolato a tetrahidrofolato activo y por tanto inhibe la síntesis de DNA, RNA, timidinato y proteínas. Por tanto actúa inhibiendo la proliferación celular y afecta más a las poblaciones celulares que proliferan rápidamente como: células malignas, células epiteliales en la psoriasis y granulocitos que conforman el *pannus* en la AR (198). Recientemente, se considera un factor importante en el mecanismo de acción del MTX la liberación de adenosina (199).

El MTX se usa para el tratamiento de la AR desde 1947, pero debido a su mecanismo de acción puede ocasionar un conjunto de reacciones adversas dentro de las cuales está: trombocitopenia, fibrosis hepática, cirrosis, neumonitis (200).

Por lo general, los FARMs se administran en asociación con los AINES ya que carecen de efecto analgésico y anti-inflamatorio. Los FARMs disminuyen en más de un 30% la incapacidad física de los pacientes a largo plazo, es por ello que se recomienda su uso desde las etapas iniciales de la enfermedad (201).

I.4.2 Terapias Biológicas

A través de esta variante se ha intentado bloquear selectivamente elementos claves en la fisiopatología de la AR.

I.4.2.1 Terapia anti-citocinas

En la AR, predominan las citocinas inflamatorias como el TNF α , la IL-1, la IL-6 y la IL-15 entre otras, que participan en la iniciación y cronocidad de la AR (1). Este conocimiento ha permitido elaborar agentes terapéuticos que bloquean la acción de estas citocinas

Inhibidores del TNF- α

El TNF- α es una citocina crucial en la patogénesis de la AR, se ha encontrado en altos niveles en la membrana sinovial de los pacientes. Una vez liberado se une a receptores específicos que se encuentran en la superficie de la mayoría de las células del organismo. Existen 2 tipos de receptores para el TNF α , el tipo I y el tipo II (18).

En la actualidad se dispone de cinco medicamentos bloqueadores de la actividad del TNF α aprobados por la FDA (del inglés, "Food and Drug Administration") para el tratamiento de la AR, estos son: el Infliximab (Remicade®), el Etanercept (Enbrel®), el Adalimumab (Humira®) y recientemente fueron aprobados el Certolizumab pegol y el Golimumab (18).

El Etanercept es una proteína recombinante humana de fusión que contiene dos cadenas monoméricas de la fracción soluble del receptor tipo II del TNF α , unidas a la porción Fc de la IgG1 humana (202). Este fármaco, al unirse al TNF- α , lo inactiva biológicamente (203,204).

El Infliximab es un anticuerpo monoclonal (AcM) quimérico que contiene la región variable murina y la región constante de una molécula IgG1 humana. Se une con gran afinidad y especificidad al TNF α circulante y al que está unido a las membranas (205).

El Adalimumab, constituye el primer AcM completamente humanizado para el tratamiento de la AR. Este anticuerpo ha mostrado una alta selectividad y eficacia clínica en monoterapia y en terapia combinada con MTX (206,207).

Por último, se han aprobado por la FDA para el tratamiento de la AR dos nuevos fármacos que inhiben esta citocina: el Golimumab y el Certolizumab. El primero es otro AcM anti-TNF α humanizado. El Certolizumab es un fragmento Fab pegilado derivado de un AcM humanizado (190).

La terapia anti-TNF α constituye sin duda alguna la alternativa de mayor éxito para el tratamiento de la AR en estos momentos. Sin embargo, la supresión sistémica del TNF α ha estado asociada con la susceptibilidad de los pacientes a contraer infecciones. Por ejemplo, un análisis retrospectivo de 709 pacientes tratados con uno de estos inhibidores arrojó que el 34.5% de los pacientes presentaron infecciones durante el período de tratamiento. De estas infecciones el 6,2% fue considerado como serias (208). Además, de estas complicaciones la inhibición sistémica del TNF α ha demostrado en algunas situaciones un aumento de la generación de anticuerpos antinucleares (209,210).

Aparte de las reacciones adversas descritas y del alto costo del tratamiento, aproximadamente el 50% de los pacientes son resistentes a esta terapia (211,212).

Anti-IL-1

El único inhibidor de la IL-1 aprobado por la FDA para el tratamiento de la AR es el Anakinra®, un antagonista del receptor de la IL-1 que se indica a pacientes que no responden a los agentes anti-TNF α .

Los resultados de los ensayos clínicos iniciales realizados con este fármaco no fueron tan buenos como los obtenidos con los bloqueadores del TNF α . Además este inhibidor debe administrarse a los pacientes diariamente. Estos dos hechos han provocado que este fármaco sea menos usado que los inhibidores del TNF α (213).

Anti-receptor de IL-6

El Tocilizumab® es un AcM humanizado contra el receptor de IL-6, reduce los niveles séricos del factor de crecimiento del endotelio vascular y de la proteína C en pacientes con AR, lo cual favorece la disminución de los signos clínicos y síntomas de la artritis (214,215).

I.4.2.2 Disminución de linfocitos B

Esta terapia ha sido investigada en un amplio número de desórdenes autoinmunes con el objetivo de reducir la fuente celular de autoanticuerpos patogénicos. En la AR se usa el Rituximab®, que es un AcM quimérico anti-CD20. El CD20 constituye un pan-B, por lo que su expresión está restringida a células pre-B y células B maduras, no se encuentra en células madres y se pierde una vez diferenciados los linfocitos B en células plasmáticas (216). Varios ensayos clínicos han mostrado una buena eficacia del Rituximab® para el tratamiento de la AR (217,218,219).

I.4.2.3 Inhibición de la coestimulación

El Abatacept® es una proteína de fusión, formada por la molécula CTLA-4 unida a la cadena pesada de la región constante de la IgG1 humana. Esta proteína es la primera de una clase de agentes terapéuticos conocidos como moduladores selectivos de la coestimulación. El Abatacept® interactúa con el CD80 y el CD86 de las APCs, bloqueando las señales coestimuladoras a través del CD28, lo que impide la activación de los linfocitos T. En varios ensayos clínicos se demostró la efectividad del tratamiento en pacientes con AR con una inadecuada respuesta al MTX (220,221).

I.4.3 Estrategias antígenos-específicas

Las terapias biológicas anteriormente descritas bloquean puntos claves de la respuesta inmunológica de forma sostenida. Estos tratamientos por largos períodos de tiempo podrían provocar diversos desórdenes inmunológicos que afecten la respuesta inmune (18). Por tanto, el desarrollo de estrategias terapéuticas que eliminen de forma específica los clones de células T, sin alterar el resto de las poblaciones celulares, constituye el principal desafío en la búsqueda de tratamientos efectivos para la AR y otras enfermedades autoinmunes. La inducción de tolerancia empleando antígenos-específicos puede ser una solución a este reto. Numerosos investigadores coinciden en el hecho de que, bajo el concepto de inducción de tolerancia antigénica, no es importante conocer cuál es el antígeno que desencadena la enfermedad, basta emplear uno que sea capaz de activar mecanismos reguladores de la tolerancia periférica. En este sentido, diversos autoantígenos han sido identificados en pacientes con AR y propuestos como candidatos para inducir tolerancia, por ejemplo: el CII, la

glicoproteína 39 del cartílago, proteínas y péptidos citrulinados, así como varios miembros de la familia de las HSP (222,223,224).

Tolerancia oral

Uno de los primeros métodos usados para inducir tolerancia fue la administración oral de un autoantígeno. Los mecanismos que median este proceso no solo están relacionados con la neutralización directa de las células T antígeno específica, sino además con la inducción de otros clones de células T, los cuales suprimen las células T auto-reactivas (225). Por ejemplo, la inducción de células TH3 secretoras de TGF- β , después de la ingestión de un antígeno ha sido demostrada en varios ensayos. Este hecho se ha asociado con las características de las APCs del tracto digestivo (226,227). Otros autores han demostrado la inducción de tolerancia oral mediada por Treg (CD4+CD25+) (228,229,230).

Los ensayos clínicos realizados a nivel de prueba de concepto han demostrado que la modulación inmune antígeno específica a través del uso oral de un autoantígeno es clínicamente factible. Sin embargo, los resultados obtenidos no han demostrado una mejoría significativa en los pacientes tratados (231,232,233,234). Por consiguiente, es necesario desarrollar nuevos métodos para potenciar los efectos tolerogénicos durante la inducción de tolerancia oral antes de que este concepto pueda convertirse en una terapia exitosa (235).

La inducción de tolerancia oral está asociada con la activación de células T por las APCs especializadas con propiedades tolerogénicas (236). Específicamente, la presentación de antígenos en el intestino se relaciona con la ausencia de señales co-estimuladoras o con la expresión de señales co-inhibitorias en las APC (237,238). Ichim y col. proponen que la amplificación de la respuesta tolerogénica pudiera ser lograda con el aumento de células dendríticas *in vivo* a través de novedosos métodos, durante el tiempo que se induzca la tolerancia oral (235).

Inmunización con epitopos reguladores

Se han identificado en varios autoantígenos además de epitopos patogénicos, epitopos capaces de inducir tolerancia. Por ejemplo, en la proteína descarboxilasa del ácido glutámico que es uno de los autoantígenos principales descritos en el modelo de diabetes conocido como NOD *mice* (del inglés *non-obese diabetic mice*), se ha identificado un péptido que protege contra la diabetes (239). En la proinsulina, otro

autoantígeno asociado con la diabetes, se ha comprobado que el péptido (p9-23) ubicado en la cadena β de esta hormona también protege contra esta enfermedad (240). Resultados similares se han hallado para otros autoantígenos descritos en otras enfermedades autoinmunes (241,242). Para la AR, los epitopos con potencialidades reguladoras se han identificado fundamentalmente en la HSP60 y el CII (186,243).

Algunos de estos epitopos reguladores han sido llevados a la clínica con resultados favorables en el tratamiento de varias enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, el tratamiento de pacientes con esclerosis múltiple con un péptido derivado de la proteína básica de la mielina humana (82-98) provocó una mejoría significativa en dichos pacientes, durante un ensayo fase II controlado (244). En el caso de la AR, los resultados de un ensayo clínico (fase I) empleando un péptido derivado de la HSP40 de *E. coli*, demostraron una disminución de las citocinas pro-inflamatorias (TNF- α e IFN- γ) y un aumento de la frecuencia de Treg en los pacientes tratados (245). Recientemente, estos autores concluyeron un estudio clínico (fase II) con la administración de 25 mg de este péptido por vía oral durante 6 meses a 160 pacientes con AR. Los resultados confirmaron que el tratamiento fue bien tolerado y que hubo una mejoría clínica significativa en los pacientes tratados. Dicha mejoría fue asociada con una disminución de las células T productoras de TNF α y a un aumento de las células T productoras de IL-10 (24).

1.5 Ligandos peptídicos modificados. Mecanismos moleculares y resultados en la clínica

Los APLs son análogos de péptidos inmunogénicos con una o varias sustituciones en las posiciones esenciales de contacto con el TCR o con el MHC, lo cual interfiere o modifica la cascada de eventos necesarios para la completa activación de las células T (39). La capacidad de manipular experimentalmente las propiedades intrínsecas de ligandos peptídicos conocidos permite alterar apropiadamente la naturaleza, el curso y la potencia de la respuesta celular inmune.

Conceptualmente pueden diseñarse APLs con propiedades similares al péptido inmunogénico (agonistas) entre cuyos efectos se encuentra incrementar la respuesta de células T hacia antígenos específicos. Este efecto es ventajoso en condiciones patológicas como enfermedades neoplásicas e infecciosas. También pueden diseñarse péptidos con propiedades antagónicas (antagonistas o agonistas parciales) al péptido

inmunogénico, lo cual podría resultar beneficioso en el control de enfermedades autoinmunes. Los APLs clasificados como nulos, son aquellos que pueden ser presentados por las APCs, pero no causan efecto en los linfocitos T (39).

El mecanismo de acción de los APLs se ha tratado de explicar sobre la base de los componentes bioquímicos involucrados en la activación de las células T. El TCR heterodimérico $\alpha\beta$ reconoce específicamente el complejo MHC-péptido. En tanto, la multicadena invariante del complejo CD3 es responsable de la transducción de las señales de activación (246). Las cadenas del CD3 ($\gamma, \delta, \epsilon, \zeta$) no tienen capacidad enzimática propia por lo que para la transmisión de la señal se requiere del reclutamiento y/o activación de quinasas y otras moléculas efectoras (247). Las quinasas activadas fosforilan los motivos ITAM (del inglés, “immunoreceptor tyrosine-based activation motif”) presentes en todas las cadenas del CD3, lo cual permite la unión de proteínas con dominios SH2 que están involucradas en la cascada de señalización del TCR, como la ZAP70 (248).

La unión de un ligando agonista al TCR conlleva al reclutamiento de las quinasas y a la fosforilación completa de los ITAM de todas las cadenas del CD3 lo que produce la activación de las funciones efectoras de las células T. Sin embargo, la unión del complejo MHC-APL al TCR puede provocar alteraciones en el patrón de fosforilación lo que resulta en una modulación de la actividad tirosina quinasa y por lo tanto genera cambios en la respuesta de estas células (249). En este sentido, la modulación de la respuesta inmune mediada por APLs ha sido descrita ampliamente en algunos modelos experimentales de enfermedades autoinmunes. En varios trabajos se ha demostrado que estos péptidos inducen la anergia o la muerte mediada por apoptosis de linfocitos T activados, debido a la expresión de FasL y TNF- α (42,43).

Además, se ha propuesto que los APLs pueden mediar *in vivo* una supresión circunstante a través de la inducción de Treg que secretan citocinas supresoras (35,44).

Desde la década anterior para el tratamiento de la esclerosis múltiple se ha usado con éxito el Copaxone[®], el cual es un polímero compuesto por los aminoácidos: L-Ala, L-Tyr, L-Lys y L-Glu. Este compuesto se sintetiza por la combinación al azar de los cuatro monómeros que lo componen. El Copaxone[®] o copolimero-1 se ha clasificado como un APL según su mecanismo de acción. Este fármaco actúa como un antagonista del epitopo inmunodominante de la proteína básica de la mielina. La unión del co-polímero-

1 con el TCR de las células T auto-reactivas específicas al epítipo inmunodominante de la proteína básica de la mielina induce en estas efectos tolerogénicos (250). Se ha comprobado además que este fármaco induce un cambio en el perfil de citocinas proinflamatorias a reguladoras, las cuales median el mecanismo de supresión circunstante (251,252).

En el año 2000 en pacientes con esclerosis múltiple se realizaron dos ensayos clínicos con dos APLs derivados de un epítipo de células T de la proteína básica de la mielina (epítipo 83-99). Ambos estudios fueron interrumpidos debido a exacerbaciones de la enfermedad en tres pacientes y a reacciones de hipersensibilidad sistémica (253,254). Los investigadores a cargo de estos ensayos concluyeron que estos resultados fueron producto del protocolo de inmunización empleado, en el que se administró una dosis alta de los dos APLs (50 mg), lo cual pudo haber contribuido a una respuesta heteroclítica patogénica que favoreció la expansión de clones de células T con un fenotipo TH1. Estos resultados estuvieron influenciados además por una inadecuada evaluación preclínica de los efectos de estos APLs, ya que aunque fueron efectivos en bloquear algunos clones de células T auto-reactivos, pudieron haber activado otros (255).

Los resultados negativos obtenidos en estos dos ensayos, han hecho que los investigadores profundicen en los mecanismos moleculares a través de los cuales se puede inducir tolerancia antigénica con estas moléculas, en el diseño de nuevas variantes de APL y en sus evaluaciones preclínicas.

Recientemente se han desarrollado APLs cíclicos derivados también del epítipo 83-99 de la proteína básica de la mielina con evaluaciones preclínicas promisorias (43).

En el año 2006 se publicaron los resultados de un ensayo clínico en pacientes con *diabetes mellitus* tipo 1, donde se evaluó un APL derivado de la insulina humana. En este ensayo se demostró que el tratamiento fue seguro, bien tolerado y que logra cambiar la respuesta TH1 patogénica de la enfermedad a un fenotipo TH2 regulador (256).

En el caso de la AR se han diseñado APLs a partir de tres autoantígenos: HSP60, CII y la glicoproteína 39 del cartílago. Un APL derivado de la HSP60 humana se diseñó a partir del epítipo inmunodominante de este autoantígeno (180-188). La evaluación de este APL en un modelo animal para esta enfermedad evidenció la inducción de células reguladoras secretoras de IL-10 que inhibieron el curso de la artritis (32)

Boots y col. hallaron que el péptido 263-275 de la glicoproteína 39 del cartílago se une a la molécula HLA-DR4 (B1*O401) e induce citocinas proinflamatorias en ratones transgénicos, que expresan en sus APCs dicha molécula. Además, hallaron células T que reconocen este péptido en el líquido sinovial de los pacientes. A partir de este epitopo diseñaron un APL que presenta potencialidades inmunomoduladoras para el tratamiento de la AR (257).

A partir del colágeno tipo II se han diseñado varios APLs. Li y col. tomaron el epitopo 263-272 de este autoantígeno y diseñaron tres APLs diferentes. Estos péptidos fueron evaluados en ensayos *ex vivo* con células mononucleares de sangre periférica de pacientes con AR. El péptido original induce proliferación celular en el 41% de las muestras analizadas. Sin embargo, los APLs no inducen proliferación celular en la muestras y disminuyen la respuesta TH1 que induce el péptido original (258).

Otro grupo de autores obtuvieron dos APLs a partir del epitopo 256-276 del CII, los cuales suprimen el curso de la enfermedad en el modelo de AIC en ratones transgénicos que expresan la molécula humana HLA-DR4 (DRB1 * 0401). Este efecto terapéutico fue asociado con un aumento de la secreción de IL-4 y una disminución de la secreción de interferón- γ (259).

En el modelo de AIC en ratones DBA-1 el epitopo inmunodominante es el péptido 245-270 del CII. A partir de dicho péptido, un grupo de autores obtuvieron un APL que suprime la artritis en este modelo. Este efecto fue asociado con un aumento del perfil de citocinas TH2 (260).

1.5.1 Topografía de la unión de péptidos a moléculas MHC clase II

Entre los elementos claves a considerar para el diseño de los APLs a través de las herramientas bioinformáticas está las interacciones entre el péptido y la molécula MHC clase II.

El MHC es un locus genético que se encuentra en todas las especies de mamíferos, y está localizado en el cromosoma 6 en el humano. Las moléculas codificadas por el MHC son receptores de superficie celular que se unen a péptidos antigénicos, presentados a varias células del sistema inmunitario, siendo las más importantes los linfocitos T CD4+ y CD8+, las células asesinas naturales y los linfocitos $\gamma\delta$. Existen dos familias del MHC denominados clase I y II que participan en esta función.

Las moléculas MHC clase II están constituidas por un heterodímero que contiene una cadena α y una β unidas no covalentemente. Cada cadena posee 2 dominios globulares externos. Estas moléculas a diferencia de las MHC clase I poseen una

distribución celular muy restringida, se expresan en los linfocitos T y B, los monocitos, las células dendríticas, los precursores eritroides, las células de *Langerhans*, el epitelio tímico, las células de *Kupffer* (261) .

En las moléculas de MHC II los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ forman en el espacio una estructura en fosa similar a las MHC clase I. La diferencia más sobresaliente es que los extremos izquierdo y derecho del sitio de unión están más abiertos y no tan ocluidos como los de MHC clase I. Esta diferencia determina que puedan unir habitualmente péptidos más largos (14-18 aminoácidos) (262) o aun más extensos (hasta 30 aminoácidos) que se extienden por fuera de los extremos (263).

El sitio de unión al péptido en una molécula de MHC posee una topología específica, debido a la formación de numerosos bolsillos, depresiones y hendiduras que dependen de la naturaleza de los aminoácidos dentro del bolsillo, y que varía de un haplotipo a otro. Ambas moléculas, MHC I y MHC II, tienen 6 bolsillos denominados A, B, C, D, E, F. Los bolsillos A y F definen los extremos derecho e izquierdo del sitio de unión e interactúan con las posiciones P1 y P9 del péptido, respectivamente. La unión de péptidos a determinadas moléculas de MHC depende de la naturaleza de las cadenas laterales del péptido y de su complementariedad con los aminoácidos que conforman el bolsillo de unión al péptido.

Está descrito en la literatura científica, que los péptidos unidos a cada alelo en particular poseen patrones o motivos estructuralmente conservados. Estos péptidos tienen una polaridad uniforme y están en una forma extendida: los residuos del N-terminal o P1 a la izquierda y los residuos del C-terminal o P9 a la derecha, los que se acomodan en los bolsillos correspondientes. Habitualmente las posiciones 8 o 9 determinan la especificidad de la unión. La restricción de secuencia aminoacídica no es absoluta, sin embargo, sustituciones tanto de residuos conservados como de no conservados influyen en la afinidad de unión del péptido (264). La figura 2 ilustra la presentación de un péptido por una APC al TCR de una célula T CD4+ y el complejo trimolecular HLA clase II- péptido- TCR.

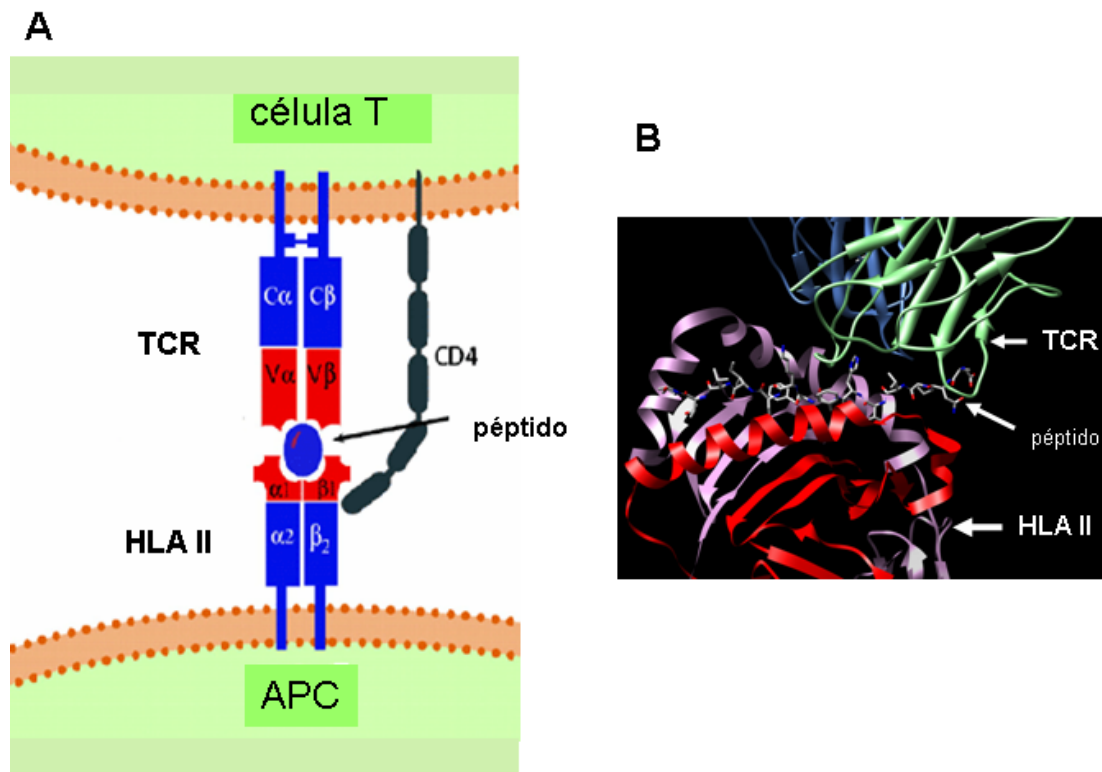


Figura 2. A. Péptido presentado por una APC a un TCR de un linfocito T CD4+.

B. Representación de la estructura tridimensional del complejo trimolecular HLA clase II-péptido- TCR. Péptido "GSDWRFLRGYHQYA" presentado por la molécula HLA DR1.

Los programas computacionales que permiten predecir posibles epitopos presentados por las moléculas HLA clase II se encuentran en constante desarrollo (265,266,267). Dentro de ellos, está el programa Proped (268). Este, selecciona siempre nonapéptidos y en la región P1 se encuentra siempre un residuo aromático o hidrofóbico (Tyr, Trp, Leu, Ile, Met y Phe). Las restantes posiciones importantes son P4, P6 y P9 como se muestran en la figura 3, aunque en estos casos no existe un consenso sobre los residuos de aminoácidos favorecidos y dependen mucho del alelo específico de la molécula HLA clase II.

p 1 4 6 9

PTV**F**RQMRP**V**SRVLAP

Figura 3. Representación de las posiciones (p) importantes en la unión de un péptido a una molécula de HLA clase II según el programa Proped. En rojo se indica el aminoácido en posición P1 y en azul los restantes aminoácidos del epitopo.

Aun cuando la predicción de epitopos para moléculas de MHC clase II es en general poco efectiva, el programa Proped se considera uno de los mejores (269).

MATERIALES Y MÉTODOS

II. Materiales y Métodos

II.1 Predicción de epitopos de células T a partir de la HSP60 humana y diseño de ligandos peptídicos modificados

II.1.1 Predicción de epitopos de células T para humanos

Los epitopos de células T a partir de la HSP60 humana se predijeron con el uso del programa Proped (268). Se tuvieron en cuenta los alelos de la molécula HLA clase II: DR1 (DRB1*01 y DRB*02) y DR4 (DRB*0401, DRB*0404, DRB*0405 y DRB*0408). Se fijaron los umbrales de 2% y 3%.

II.1.2 Diseño de los ligandos peptídicos modificados

El péptido seleccionado como un epitopo de células T fue modificado en uno o dos de los probables sitios de contacto con la molécula HLA clase II. Los APLs obtenidos fueron analizados con el programa Proped (268). Se tuvieron en cuenta los alelos de la molécula HLA clase II: DR1 (DRB1*01 y DRB*02) y DR4 (DRB*0401, DRB*0404, DRB*0405 y DRB*0408). Se fijaron los umbrales de 2% y 3%.

II.1.3 Predicción de epitopos de células T para murinos

Se predijeron los epitopos de células T para los ratones BALB/c, DBA-1 y ratas Lewis de un péptido de la HSP60 humana y de un APL derivado de este, según los programas que se indican en la tabla I. Se indican además las moléculas MHC clase II utilizadas en la predicción.

Tabla I. Programas utilizados en la predicción de epitopos de células T para murinos.

Espece	Línea	Programas	Molécula MHC II
Ratón	BALB/c	RANKPED (270 y 271) MHCPRED (272)	IA ^d
Rata	Lewis	MHC2PRED (273).	RT1.B ^l
Ratón	DBA-1	RANKPED (270 y 271)	IA ^q .

II.2 Péptidos

Los péptidos se sintetizaron en la Unidad de Síntesis de Péptidos del CIGB. Brevemente, los péptidos se sintetizaron manualmente en jeringuillas a través de la

estrategia Fmoc/tBu, con el uso de la resina Fmoc-AM-MBHA (0,54 mmol/g). Después del tratamiento con ácido trifluoroacético, los péptidos se liofilizaron y analizaron por HPLC y espectrometría de masas.

II.3 Características de los pacientes con artritis reumatoide y de los donantes sanos

Los pacientes con AR incluidos en el estudio provienen del Servicio Nacional de Reumatología, ubicado en el Hospital Clínico Quirúrgico “10 de Octubre” de La Habana. Todos los pacientes cumplen con los criterios del Colegio Americano de Reumatología para el diagnóstico de la AR. Los pacientes dieron el consentimiento informado por escrito para participar en el ensayo.

Los datos fundamentales de los pacientes se muestran en la tabla II. El tiempo de evolución de la enfermedad se refiere al tiempo de diagnosticada la misma según las historias clínicas de los pacientes. Además se muestra las moléculas HLA tipo II (DRB1* y DQB1*) que expresan estos. El genotipaje de estas moléculas se efectuó por la Unidad de Genómica del CIGB con un juego de reactivos de la firma *Dynal RELI SSO HLA typing* (Dynal Biotech, The Wirral, Reino Unido). La asignación de los alelos se realizó con el uso de un programa de la misma firma (*Pattern Matching Program*) en su versión 5.12 y 5.4.

Los donantes sanos son trabajadores del CIGB. Estos se sometieron a una encuesta para saber su estado de salud en el momento de la toma de muestra. Ninguno de los donantes padecía de enfermedades inflamatorias crónicas o relacionadas con el sistema inmunitario, tampoco se encontraban bajo tratamiento médico.

Tabla II. Características de los pacientes con AR incluidos en el estudio.**(Duración: tiempo de diagnosticada la enfermedad. m: meses. a: años)**

Pacientes	Sexo	Edad	Duración	HLA II	
				DRB1	DQ
1	F	49	5 m	0401	0501
2	F	40	2 a	0405	0501
3	F	54	5 a	0308	0301
4	F	18	8 a	0102	0501
5	F	56	4a	0108	0302
6	M	54	1a	0101	0301
7	F	28	2a	0102	0501
8	F	45	2a	0404	0501
9	M	68	7a	0404	0201
10	F	58	12a	0401	0301
11	F	51	15a	0102	0501
12	F	46	3a	0408	0309
13	F	39	1a	0404	0301

II.4 Animales de experimentación

En los experimentos se emplearon ratones machos BALB/c, con una edad de ocho semanas y un peso promedio de 20 g. Los ratones fueron suministrados por el Instituto *Charles River S.A.S* de Francia. Estos ratones se manipularon en la unidad de experimentación con animales, del Laboratorio de Biología y Terapia para las Enfermedades Inmunes del Hospital *Pitié-Salpêtrière* en París.

Además, se utilizaron ratas isogénicas hembras, pertenecientes a la línea Lewis (haplotipo RT1.B^l) suministradas por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana). Las ratas se seleccionaron aleatoriamente, con una edad de ocho semanas y un peso promedio de 101 a 120 g. Estos animales se manipularon en el Bioterio del CIGB.

También se usaron ratones isogénicos machos, pertenecientes a la línea DBA-1 suministradas por el Instituto *Charles River S.A.S de Francia*. Estos animales se seleccionaron aleatoriamente, con una edad entre siete y ocho semanas y un peso

promedio de 20 g. El experimento se realizó en el área de experimentación con animales del Centro de Biotecnología Molecular (Turín, Italia).

Los ratones se mantuvieron en cajas con filtros bajo condiciones libres de patógenos.

Todos los experimentos realizados con los animales estuvieron en correspondencia con las regulaciones aprobadas por el Comité Nacional de Ética y Regulación de la República de Cuba y por la Unión Europea.

II.5 Ensayos

II.5.1 Determinación de la proliferación inducida por los péptidos en células T CD4⁺ aisladas de donantes sanos

Para este ensayo se aislaron primeramente las PBMC de un donante sano. La sangre se obtuvo por punción venosa y se depositó en tubos estériles de 50 mL que contenían una solución anticoagulante (citrato de sodio 0.123 mol/L, fosfato de sodio monobásico 0.0185 mol/L, ácido cítrico 0.017 mol/L y dextrosa 0.141 mol/L). La sangre se diluyó 1:2 con una solución amortiguadora de fosfato (PBS-del inglés, “phosphate buffer solution”) y se añadieron 5 mL de esta dilución a 3 mL de *Ficoll-PageTM PLUS* (Amersham Biosciences AB, Suecia) en tubos de centrifuga de 15 mL. Los tubos se centrifugaron a 1200 rpm en una centrifuga de mesa (Hitachi, Japón) durante 30 min. Posteriormente se extrajo el anillo correspondiente a las células mononucleares (2 mL aproximadamente) y se realizaron dos lavados con PBS con centrifugaciones intercaladas a 1200 rpm por 10 min. El precipitado celular se resuspendió en medio RPMI (del inglés “Roswell Park Memorial Institute Medium”) 1640 conteniendo 10 % de suero fetal bovino (SFB) y suplementado con gentamicina (100U/mL), HEPES 0.025 mol/L y L-glutamina 0.002 mol/L (todos adquiridos de *Gibco BRL*, EUA). El número de células se contó en una cámara de *Neubauer* a partir de una dilución 1/20 en RPMI y 1/2 con tripán azul (*Boehringer Mannheim*, Alemania).

Posteriormente se procedió a la eliminación de los monocitos presentes en las PBMC aisladas por selección negativa mediante perlas magnéticas. Para esto las PBMC se resuspendieron a una concentración de 10^8 en 100 μ L de PBS y se incubaron con 200 μ L del reactivo CD14/MACS (*Miltenyi Biotech GmbH*, Alemania) durante 15 min a 6°C. Las células marcadas se aplicaron a una columna LD (*Miltenyi Biotech GmbH*, Alemania) sometidas a un campo magnético. De esta forma, la fracción celular compuesta por las células CD14⁺ quedó retenida en la columna, mientras que la

fracción no marcada que fluyó se colectó. Para la purificación de las células T CD4⁺, la fracción celular libre de monocitos se sometió a centrifugación a 2500 rpm por 10 min y la fracción soluble se desechó. Seguidamente, las células se resuspendieron en 160 µL de PBS y se incubaron durante 15 min a 6°C con una solución de AcM anti-CD4 conjugado a microperlas. Las células marcadas se aplicaron a una columna LS+ (*Miltenyi Biotech GmbH*, Alemania) sometidas a un campo magnético. La fracción celular compuesta por las células CD4⁺ quedó retenida en la columna, mientras que la fracción eluyente con las posibles células contaminantes se descartó. Finalmente, se eluyeron las células CD4⁺ al desacoplar la columna del campo magnético. Para comprobar el grado de pureza de las células CD4⁺ obtenidas, una alícuota de la fracción resultante (50 µL) se marcó con 20 µL del AcM anti-CD4-FitC (*eBiosciences*, EUA), y el volumen se completó hasta 100 µL con PBS. La reacción se incubó durante 30 min a 4°C en la oscuridad. Se lavó con 1 mL de PBS, se centrifugó a 4°C durante 10 min a 2500 rpm y se desechó el sobrenadante. El precipitado celular se resuspendió en el volumen residual y se analizó por citometría de flujo empleando el programa *Partec Flomax* (Finlandia).

Las células T CD4⁺ aisladas se incubaron, por triplicado, con células dendríticas (DC) alogénicas que expresan el alelo DRB1*0102. La línea de DC fue gentilmente suministrada por el Prof. David Klatzmann del Laboratorio de Biología y Terapia de las Enfermedades Inmunes del Hospital *Pitié-Salpêtrière* de París. En detalle, 10⁴ DC se cocultivaron en placas de 96 pozos (*NUNCTM*, Canadá) con 5x10⁴ células T CD4⁺, en presencia de los péptidos a las concentraciones de 10, 20, 40 y 80 µg/mL en un volumen final de 200 µL. Al quinto día de cultivo se añadió 1 µCi/pozo de [3H]-TdR (Amersham, Inglaterra), pasadas 18 h los niveles de proliferación de las células T CD4⁺ se determinaron midiendo la incorporación del isótopo. La radiactividad se determinó en un contador de centelleo para microplacas *Topcount* (*Wallac*, Finlandia).

El índice de estimulación (IE) se calculó como el cociente entre el valor promedio (tres réplicas) de las cpm (conteos por minuto) emitidas por las células CD4⁺ estimuladas con los péptidos y las no estimuladas. El resultado se consideró positivo para un IE>2.

II.5.2 Cuantificación de los niveles de TNFα e INFγ inducidos por los péptidos en ensayos *ex vivo* con PBMC aisladas de pacientes con artritis reumatoide

10⁶ PBMC aisladas de los pacientes con AR se cultivaron en placas de 24 pozos (Costar, EUA), a 37°C en atmósfera húmeda de CO₂ al 5 %, con el péptido E18-3 o el

APL1 a una concentración de 40 µg/mL. Las células sin estimular se emplearon como control de los niveles basales de las citocinas en los pacientes. Se colectaron las PBMC en tubos de 1.5 mL y se centrifugaron a 12000 rpm por 10 min. Los sobrenadantes de cultivo se tomaron para los ensayos de determinación de las citocinas TNFα e INFγ, a través de los respectivos juegos de reactivos comerciales tipo ELISA (del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*) (*Quantikine® R&D Systems*, EUA), siguiendo estrictamente las recomendaciones del fabricante.

Estos ensayos consisten en un ELISA cuantitativo tipo “sandwich”, donde los patrones de las citocinas y las muestras se añaden a placas de 96 pocillos (*Costar*, EUA) pre-recubiertas con AcMs específicos para las citocinas en evaluación. En detalle, se añadió 50µl del diluyente especificado para cada citocina en los pocillos y a continuación 200µl del estándar, muestra o control. Se incubó durante 2h a temperatura ambiente (21 °C + 2°C) y se desechó el contenido de cada pocillo. Luego se realizaron tres lavados. Posteriormente, se añadió 200µl del conjugado para el TNF-α o INF-γ a cada pocillo y se incubó durante 1hr a temperatura ambiente (21 °C + 2 °C). El proceso de lavado se repitió como se describe anteriormente. Se añadió 200µl de la solución sustrato a cada pocillo y se incubó durante 20min a temperatura ambiente (21 °C + 2 °C), en la oscuridad. Finalmente, se añadió 50µl de la solución de parada en cada pocillo y se determinó la densidad óptica al cabo de 30min, en un lector de microplacas a 450nm. Se realizó la lectura a 540nm o 570nm y se sustrajeron estos valores a la lectura de 450nm para corregir las imperfecciones ópticas en la placa. La determinación de la concentración de cada citocina se realizó por triplicado para el control negativo y las muestras evaluadas.

El límite de detección para el TNFα humano fue de 4.4 pg/mL y para el INF-γ humano fue de 8 pg/mL.

II.5.3 Evaluación por citometría de flujo de la frecuencia de células T reguladoras (CD4+Foxp3+) inducidas por los péptidos en ratones BALB/c

Ratones machos de la línea BALB/c se separaron aleatoriamente en tres grupos de 12 ratones cada uno. El primer grupo se inoculó con 50 µg del péptido original. El segundo grupo se trató con 50 µg del APL1. Los péptidos se diluyeron en PBS a una concentración de 1mg/mL. En ambos casos los ratones se inocularon con 50µL del péptido correspondiente por vía subcutánea. Se incluyó un tercer grupo de ratones que

se inocularon por la misma vía con 50µL de PBS (grupo placebo). Cinco días después, los ratones recibieron una segunda dosis en idénticas condiciones. Seis animales por grupo se sacrificaron los días cuatro y nueve después de recibir la primera inoculación. Posterior a la disociación mecánica, las células del bazo y los LN periféricos de los ratones se preincubaron con el AcM 2.4G2 (*eBiosciences*, EUA), para bloquear las uniones no específicas a los receptores FC. Seguidamente, las células se marcaron en PBS conteniendo 3% de suero de ternero y cantidades saturantes de los siguientes AcM (*eBiosciences*, EUA): APC-Cy7-conjugado anti-CD4 (clon RM4-5) y APC-conjugado anti-CD25 (PC61). El factor transcripcional Foxp3 se evaluó a través del uso de un AcM anti-Foxp3 conjugado a PE (FJK-16s; *eBioscience*, EUA), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Un AcM con isotipo irrelevante (PE-Cy5 IgG2a de rata; *eBioscience*, EUA) se utilizó como control. La región correspondiente a los linfocitos se enmarcó de acuerdo a las características de distribución de estos en los histogramas de citometría de flujo en un citómetro LSR-II™ (BD Biosciences, EUA). Los análisis se efectuaron empleando el programa *FlowJo®* (*Tree Star*, EUA).

II.5.4 Evaluación por citometría de flujo de la frecuencia de Treg (CD4+CD25^{high}Foxp3+) inducidas por los péptidos en ensayos *ex vivo* con células mononucleares aisladas de pacientes con AR y de donantes sanos

Para la determinación de la inducción de Treg se empleó el juego de reactivos para marcaje de Treg humanas (conteniendo Foxp3 PCH 101) (*eBioscience*, EUA). Las PBMC aisladas de pacientes con AR o donantes sanos se cultivaron a una concentración de 1×10^6 células por pocillo y se estimularon con los péptidos E18-3 o el APL1 a una concentración de 40 µg/mL, en placas de 24 pozos (Costar, EUA) durante cinco días a 37°C en atmósfera húmeda de CO₂ al 5 %. Posteriormente las células se colectaron y centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en 1 mL de PBS. Se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones y se decantó el sobrenadante. El precipitado celular se resuspendió en el volumen residual, se añadieron 20 µL de los AcMs anti-CD4-FitC y anti-CD25-PE y el volumen se completó hasta 100 µL con PBS. Las muestras se incubaron durante 30 min a 4°C en la oscuridad. Se lavaron con 1 mL de PBS, se centrifugaron a 4°C durante 10 min a 2500 rpm y se desechó el sobrenadante. El precipitado celular se resuspendió en el volumen residual, se les añadió 1 mL de la solución de fijación/permeabilización 1X (preparado previamente) a cada tubo y se

incubó durante una hora a 4°C en la oscuridad. Se bloqueó con 2 µL de suero de rata, en 100 µL de volumen final, durante 15 min en la oscuridad a 4°C. Se añadieron 20 µL del AcM anti-Foxp3 (PCH 101) o su control de isotipo (APC-IgG2a de rata) y se incubó a 4°C durante 30 min en la oscuridad. Las células se lavaron con la solución de permeabilización 1X y se centrifugaron a 4°C por 10 min a 2500 rpm. Se resuspendió en el volumen mínimo permisible de PBS y las muestras se analizaron por citometría de flujo empleando el *programa Partec Flomax* (Finlandia). La región correspondiente a los linfocitos CD4⁺ se enmarcó de acuerdo al grado de expresión del antígeno CD25 (“*low o high*”) en los *diagramas de puntos* obtenidos del análisis por citometría de flujo. Foxp3 se representó sobre la población celular previamente enmarcada en los *dots blot* como Treg CD4⁺ CD25^{high}. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células T que expresan el fenotipo CD4⁺ CD25^{high} Foxp3⁺.

Para el caso de las SFMC (del inglés “synovial fluid mononuclear cells”) aisladas de pacientes con AR. El fluido sinovial se extrajo a través de punción articular en una de las rodillas afectadas del paciente. El líquido obtenido se transfirió a un tubo cónico estéril de 50 ml y se incubó con 10 µg de hialuronidasa (*Sigma*, EUA) por mL de líquido, durante 1 h a 25°C. Posteriormente se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min y se descartó la fracción líquida. El precipitado celular obtenido se procesó de la misma forma que se describió previamente para las PBMC.

II.6 Evaluación terapéutica de los péptidos en dos modelos animales para la artritis reumatoide

II.6.1 Obtención de los inductores de la artritis

El *Mt* H37Ra liofilizado (*Difco*, EUA) en AIF (*Sigma*, EUA) se empleó como inductor de la AA. La mezcla del *Mt* en AIF se preparó a una concentración de 10mg/mL. La cantidad correspondiente de *Mt* liofilizado se colocó en un mortero esmerilado y paulatinamente se le fue añadiendo gotas del AIF, contenido en una jeringuilla de 10 ml. Cada tres gotas de AIF añadidas al *Mt* se maceró fuertemente la emulsión, hasta que alcanzó un color amarillo oscuro. Posteriormente el preparado se mantuvo en agitación durante 16 horas a 4°C antes de ser inoculado a los animales.

Se utilizó como inductor de la AIC dos preparaciones comerciales de CII de pollo (*Hooke*, EUA). Ambas conteían 50 µg de CII en Adyuvante Completo de Freud o AIF.

II.6.2 Inducción experimental de la artritis por adyuvante y por colágeno. Evaluación de los signos clínicos

La AA se indujo en las ratas *Lewis* mediante la administración de 100 μ L del inductor (conteniendo 1mg de *Mt*) por vía subcutánea en la base de la cola.

Para la inducción de la AIC se siguió el protocolo de la firma comercial *Hooke* (EUA) (192). En detalle, la AIC se indujo en los ratones DBA/1 mediante la administración de 50 μ L por vía subcutánea de 50 μ g de CII de pollo en Adyuvante Completo de Freund. La inoculación se realizó en la cola, a dos cm de separación de la base de esta. Los ratones recibieron una segunda dosis del inductor, conteniendo 50 μ g de CII de pollo en AIF, por vía subcutánea, el día 21 después de recibir la primera administración.

En ambos modelos, los signos clínicos se evaluaron cada 2 días después de inducida la enfermedad, hasta el día 50 en las ratas y hasta el día 46 en los ratones, con la siguiente escala de puntos:

- (0): pata normal, sin inflamación ni enrojecimiento.
- (1): inflamación ligera, pero definitivo enrojecimiento del tobillo o muñeca, o aparente enrojecimiento e inflamación de un dedo individual, independientemente del número de dedos afectados.
- (2): moderado enrojecimiento e inflamación del tobillo o la muñeca.
- (3): severo enrojecimiento e inflamación de toda la pata incluyendo los dedos.
- (4): inflamación máxima y deformidad de la pata involucrando múltiples articulaciones.

Se evaluaron las cuatro patas por separado. Por lo tanto, cada animal podía recibir un máximo de 16 puntos.

II.6.3 Esquema terapéutico para las ratas con artritis inducida por adyuvante

Las ratas *Lewis* se dividieron aleatoriamente en tres grupos de tratamiento y dos grupos controles, con 14 animales cada uno, el día 10 después de inducida la AA. El primer grupo de ratas se trató con el péptido E18-3 por vía intradérmica. El segundo grupo se inoculó con el APL1 por vía intradérmica. El tercer grupo se trató también con este péptido pero por vía subcutánea. Se incluyeron además dos grupos controles. El primero correspondió a las ratas enfermas sin tratamiento peptídico (se les administró 100 μ L de PBS) y el segundo a las ratas sanas. La tabla III refleja los diferentes grupos de estudio.

Los péptidos se administraron los días: 11, 14 y 18, después de inducida la enfermedad. Cada dosis contenía 200 μ g del péptido correspondiente en 100 μ L de

PBS. Las ratas se anestesiaron con ketamina (50 mg /Kg, intramuscular) antes de la administración de los péptidos.

Tabla III. Grupos de tratamientos incluidos en el esquema terapéutico para las ratas con AA.

Grupos	Tratamiento
I	E18-3 por vía intradérmica
II	APL1 por vía intradérmica
III	APL1 por vía subcutánea
IV	Enfermas sin tratamiento Placebo (PBS)
V	Sanas sin tratamiento

II.6.4 Esquema terapéutico para los ratones con artritis inducida por colágeno

Los ratones DBA-1 se dividieron aleatoriamente en tres grupos de tratamientos y dos grupos controles, con 12 animales cada uno, el día 26 después de inducida la enfermedad. El primer grupo correspondió a los animales que no recibieron tratamiento (placebo), a los que se le administró 100µl de PBS. El segundo grupo de ratones se trató con el APL1 por vía subcutánea. El otro grupo se inoculó con el MTX por vía intraperitoneal. El cuarto grupo se trató simultáneamente con el APL1 por vía subcutánea y con el MTX por vía intraperitoneal. Se incluyó un quinto grupo correspondiente a los animales sanos. La tabla IV refleja los diferentes grupos de estudio.

El péptido y el MTX se administraron los días: 28, 31, 34, 37, 40 y 43, después de inducida la enfermedad. Cada dosis contenía 50µg del APL1 en 50µl de PBS ó 60µg de MTX en 120 µl de PBS o ambos.

Tabla IV. Grupos de tratamiento incluidos en el esquema terapéutico para ratones con AIC.

Grupos	Tratamiento
I	Enfermos sin tratamiento Placebo (PBS)
II	APL1 por vía subcutánea
III	MTX por vía intraperitoneal
IV	APL1 por vía subcutánea y MTX por vía intraperitoneal
V	Sanos sin tratamiento

II.6.5 Análisis histológico

Cuatro animales se sacrificaron los días 21 y 46 después de inducida la AA y la AIC, respectivamente. A los animales se les tomó una muestra de tejido correspondiente al tobillo de la pata derecha trasera. Las muestras se sumergieron en una solución tampón neutra de formalina al 10% y se descalcificaron. Los tejidos se deshidrataron en un gradiente de alcohol, se embebieron en parafina y se cortaron en secciones de 2-3µm. Posteriormente las muestras se montaron en portaobjetos, se tiñeron con una mezcla de hematoxilina-eosina y se analizaron al microscopio óptico. El grado de daño histológico en la articulación asociado con el desarrollo de la artritis se evaluó con la siguiente escala:

Grado 0: Sin alteraciones.

Grado 1: Hipertrofia sinovial y/o hiperplasia del epitelio. Angiogénesis ligera o no evidente.

Grado 2: Hipertrofia sinovial con angiogénesis moderada. Erosión focal del cartílago y/o hueso. Reacción inflamatoria focal.

Grado 3: Hipertrofia sinovial en cavidad articular con abundante *pannus*. Angiogénesis exuberante. Erosión del cartílago y/o hueso. Erosión del periostio. Matriz extracelular con marcada desorganización.

II.6.6 Evaluación por citometría de flujo de la frecuencia de Treg inducidas por la terapia con los péptidos en ratas Lewis y ratones DBA-1

El bazo de cada rata o ratón sacrificado se colocó en una placa Petri (P-60) con 10 mL de medio D'MEM (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) conteniendo SFB al 5% (v/v) y suplementado con gentamicina 100 U/mL, Hepes 0.025 mol/L y L-glutamina 0.002 mol/L, todos adquiridos de *Gibco BRL* (Inglaterra). Se procedió a perfundirlos hasta que perdieron parcialmente la coloración rojiza y se colectó el medio de lavado en un tubo Corning de 50 mL. Posteriormente se maceraron en 5 mL de medio D'MEM y esta fracción se unió a la anterior.

A continuación se centrifugó a 1500 rpm en una centrífuga de mesa (*Hitachi*, Japón) durante 10 min. Luego se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 6 mL de una solución de Tris-NH₄Cl al 0.83 %, pH 5.6, refrigerada y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se le adicionó igual volumen de PBS y se centrifugó en idénticas condiciones. Este último paso se repitió dos veces y finalmente se disolvió el precipitado en un volumen de 15 mL de medio D'MEM.

El número de células se contó en una cámara de *Neubauer* a partir de una disolución 1/40 con tripán azul (*Boehringer Mannheim*, Alemania). 10^6 células se resuspendieron en PBS, conteniendo 3% de SFB. En el caso de las ratas, las células se marcaron con los AcMs: anti-CD4-FITC (clon OX35) y anti-CD25-PE (clon OX39). Para los ratones se usaron los AcMs: anti-CD4-FITC (clon RMA-5) y anti-CD25-PE (clon PC61.5). El marcaje de las células se realizó durante 30 min a 4°C, según las instrucciones de los fabricantes.

Las células marcadas se lavaron dos veces con la solución de marcaje y se resuspendieron en el buffer de fijación/ permeabilización y se incubaron a 4°C durante 45 min. Posteriormente, fueron marcadas con un anticuerpo anti-Foxp3 (clon FJK-16s) o su control de isotipo (PE-Cy5 IgG2a de rata) durante 30 min a 4°C. Todos los anticuerpos utilizados provienen de la firma comercial *eBioscience* (EUA).

Las células se lavaron con la solución de permeabilización 1X y se centrifugaron a 4°C por 10 min a 2500 rpm. Seguidamente, se resuspendieron en el volumen mínimo permisible de PBS y las muestras se analizaron por citometría de flujo a través del programa *Partec Flomax* (Finlandia).

En el caso de las ratas, la región correspondiente a los linfocitos CD4+ se enmarcó de acuerdo al grado de expresión del antígeno CD25 (*low* o *high*) en los diagramas de puntos obtenidos del análisis por citometría de flujo. La proteína intracelular Foxp3 se representó sobre la población celular previamente enmarcada en los diagramas de puntos como Treg CD4+ CD25^{high}. Los resultados se representaron como el porcentaje de células T que expresan el fenotipo CD4+ CD25^{high} Foxp3+.

Para los ratones DBA-1, se seleccionó la región correspondiente a los linfocitos T CD4+. La proteína intracelular Foxp3 se representó sobre la población celular previamente enmarcada en los diagramas de puntos como CD4+. Los resultados se representaron como el porcentaje de células T que expresan el fenotipo CD4+ Foxp3+.

II.6.7 Medición de los niveles de TNF α e IL-10

10^6 células mononucleares aisladas del bazo de las ratas se estimularon por 24 horas *in vitro* con 40 μ g/mL del péptido E18-3 o el APL1. Pasado este tiempo, se homogenizó el contenido de cada pocillo y se centrifugaron durante 5 min a 1200 rpm. Por último, se tomó el sobrenadante de cultivo para realizar la cuantificación de los niveles de las citocinas: TNF α e IL-10 a través de un ensayo tipo ELISA (*Quantikine® R&D Systems*, EUA), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. En detalle, se utilizaron

placas de 96 pocillos (*Costar*, EUA) y se añadieron 50 μ l del diluyente especificado para cada citocina en los pocillos y a continuación 50 μ l del estándar, muestra o control. Se incubó durante 2h a temperatura ambiente (21 °C + 2°C) y se desechó el contenido de cada pocillo. Luego se realizaron tres lavados. Posteriormente, se añadió 100 μ l del conjugado para la IL-10 o el TNF- α a cada pocillo y se incubó durante 2 hr a temperatura ambiente (21 °C + 2 °C). El proceso de lavado se repitió como se describe anteriormente. Se añadió 100 μ l de la solución sustrato a cada pocillo y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente (21°C + 2°C), en la oscuridad. Finalmente, se añadió 100 μ l de la solución de parada en cada pocillo y se determinó la densidad óptica al cabo de 30min, en un lector de microplacas a 450nm. Se realizó la lectura a 540nm o 570nm y se sustrajeron estos valores a la lectura de 450nm para corregir las imperfecciones ópticas en la placa. La determinación de la concentración de cada citocina fue realizada por triplicado para el control negativo y las muestras. Los límites de detección para el TNF α e IL-10 fueron de 5 pg/mL y 10 pg/mL, respectivamente. En el caso de los ratones DBA-1, los cambios en los niveles del TNF α se cuantificaron directamente en el suero de los animales sacrificados a través del ensayo tipo ELISA, descrito anteriormente. Los límites de detección para el TNF α de ratón fueron de 5.1 pg/mL.

II.7. Análisis Estadístico

Para todos los análisis estadísticos realizados, se utilizó el programa *GraphPad Prism* versión 5.00 (*GraphPad Software*, San Diego California, EUA, www.graphpad.com).

En todas las muestras se comprobó la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza mediante la prueba de Bartlett.

Para evaluar la significación estadística de las diferencias entre los niveles de las citocinas TNF- α e IFN γ inducidas por el péptido E18-3, en los cultivos de las PBMC aisladas de pacientes con AR y los cultivos sin estímulo peptídico se utilizó la prueba paramétrica de *t-student* pareado. Para analizar las diferencias entre los grupos de datos derivados de la inducción de Treg en los cultivos de las PBMC aisladas de los pacientes con AR o de donantes sanos y estimuladas con el APL1 o el péptido E18-3 y los cultivos sin estímulo peptídico, se utilizó la prueba de análisis de varianzas (ANOVA simple). Cuando se detectaron diferencias generales entre los grupos analizados, se pasó a comparar las medias entre grupos con la prueba de comparaciones múltiples de *Tukey*. Estas pruebas también se usaron para evaluar la significación estadística de las

diferencias entre los grupos de datos obtenidos en la medición de los signos clínicos de los animales de los modelos de AA y AIC. En la comparación de los niveles basales de las Treg en las PBMC aisladas de pacientes con AR y de donantes sanos se utilizó la prueba estadística paramétrica *t-student* independiente.

Los datos provenientes de los experimentos de evaluación de las Treg y cuantificación de citocinas en los modelos de AA y AIC no mostraron distribución normal u homogeneidad de varianzas, aún después de transformados los datos y se analizaron mediante la prueba no paramétrica de *Kruskal-Wallis*. Cuando se detectaron diferencias generales, se compararon las medianas entre grupos con la prueba de comparaciones múltiples de *Dunn*. Estas pruebas también se utilizaron en los experimentos con los ratones BALB/c.

Las diferencias se consideraron significativas cuando $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

III. Resultados

III.1 Selección de un epitopo de células T derivado de la HSP60 humana

III.1.1 Predicción de epitopos de células T derivados de la HSP60 humana

El programa Proped (268) predijo varios epitopos de células T (anexo 1) que ya habían sido publicados (45,46,48) y además una nueva región entre los aminoácidos 90 y 109, no identificada anteriormente. Esta región resultó muy interesante por cuanto aparece un posible epitopo para los alelos DRB1*0101 y DRB1*0102 (YKNIGAKLV) y a continuación un epitopo para el alelo DRB1*0405 (VQDVANNTN). Además de dos epitopos superpuestos en el alelo DRB1*0401 (LVQDVANNT y VANNTNEEA) como se muestra en la figura 4.

```

      83-----90-----100-----110
DRB1*0101: SIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEA
DRB1*0102: SIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEA
DRB1*0401: SIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEA
DRB1*0404: SIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEA
DRB1*0405: SIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEA
DRB1*0408: SIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEA

```

Figura 4. Predicción de epitopos de células T en la región entre los aminoácidos 90 y 109 de la HSP60 humana, para los alelos DRB1 de la moléculas HLA clase II relacionados con la AR. En rojo se indican los aminoácidos en posición P1 y en azul los restantes aminoácidos del epitopo.

Basado en estos factores se seleccionó el péptido con la secuencia: SIDLKDKYKNI**GAKLVQDVANNTNEEA**, que contiene varios epitopos con probabilidades de ser presentados por las moléculas HLA clase II relacionadas con la AR. Este péptido se denominó E18-3 y presenta una similitud en su secuencia de 100% entre humano, rata y ratón, pero solamente 50% de homología con el *Mt*.

III.1.2 El péptido E18-3 induce la proliferación de células T CD4+

Las células T CD4+ con más de 95 % de pureza se obtuvieron de un donante sano. Como se observa en la figura 5, el péptido E18-3 induce la proliferación de estas células en las cuatro concentraciones analizadas, ya que el IE que se obtuvo fue mayor que dos.

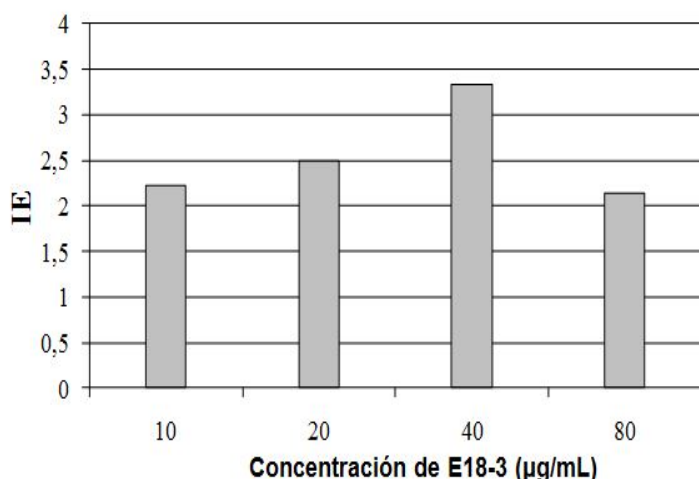


Figura 5. Inducción de la proliferación de células T CD4+ por el péptido E18-3. Las células T CD4+ aisladas de un donante sano fueron cocultivadas con APCs alogénicas y estimuladas con las concentraciones indicadas del péptido E18-3, durante 5 días. La figura representa la incorporación de timidina tritiada (3H-TdT) expresada como IE. Los datos se representan como las medias correspondientes a las mediciones realizadas en un experimento representativo de otros dos.

Este análisis se repitió con células T CD4+ aisladas de otros dos donantes sanos, obteniéndose resultados similares. Estos resultados sugieren que el péptido E18-3 puede contener un epítipo para células T CD4+.

III.1.3 El péptido E18-3 aumenta significativamente los niveles de las citocinas TNF- α e IFN γ en las PBMC aisladas de pacientes con artritis reumatoide

Posteriormente, se evaluó el efecto que el péptido E18-3 podría causar sobre los niveles de las citocinas proinflamatorias TNF α e IFN γ en los cultivos de las PBMC aisladas de los pacientes con AR. Se incluyeron un total de 12 pacientes cuyas características principales se describen en el epígrafe III.3 de Materiales y Métodos y en la tabla II.

Como se observa en la figura 6A, el péptido E18-3 aumentó de forma significativa los niveles del TNF α en los sobrenadantes de cultivo de las PBMC, en comparación con las PBMC que no recibieron estímulo peptídico ($P < 0.001$).

Por otra parte, el péptido E18-3 aumentó también de forma significativa los niveles de IFN γ en los sobrenadantes de cultivo de las PBMC aisladas de los pacientes analizados (figura 6B), en comparación con los cultivos de las PBMC que fueron cultivadas sin péptido ($P < 0.0001$).

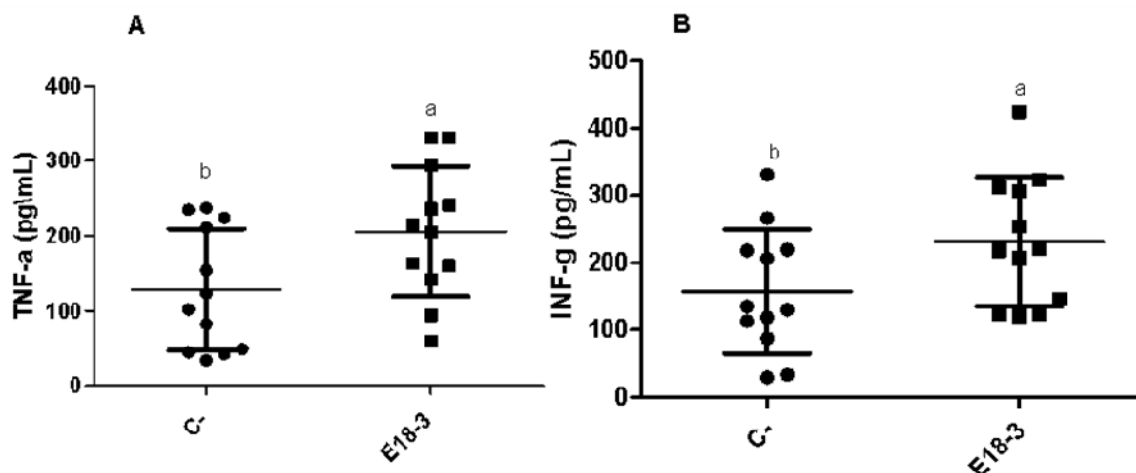


Figura 6. Niveles de TNF α (A) e INF γ (B) inducidos por el péptido E18-3 en los sobrenadantes de cultivos de las PBMC aisladas de 12 pacientes con AR. Las células fueron estimuladas *in vitro* con 40 μ g/mL del péptido E18-3 o cultivadas sin el péptido (C-), por 24 horas. Ambas citocinas fueron cuantificadas en los sobrenadantes de cultivo con un ELISA comercial. Se representa la media de cada grupo \pm la desviación estándar. La comparación entre los dos grupos se realizó a través de la prueba estadística *t-student* pareado. Letras diferentes significan diferencias estadísticamente significativas para una $P < 0.001$ en el caso de los niveles del TNF α y una $P < 0.0001$ en el caso de los niveles del INF γ .

Estos resultados sugieren que el péptido E18-3 induce un fenotipo TH1 en las células T CD4 $^{+}$ presentes en las PBMC aisladas de pacientes con AR.

III.2 Selección de un ligando peptídico modificado derivado del péptido E18-3 con potencialidades terapéuticas para la artritis reumatoide

III.2.1 Diseño de ligandos peptídicos modificados derivados del péptido E18-3

A partir de la secuencia del péptido E18-3 se diseñaron tres APLs, con el objetivo de seleccionar uno con propiedades antagónicas respecto al epítipo nativo, que pudiera tener potencialidades terapéuticas para la AR. En el diseño de los APLs se tuvo en cuenta que aun cuando se realizaran cambios en sitios que pudieran ser importantes para la interacción con la molécula HLA clase II, estos no afectarían las posibilidades de unión del péptido. Adicionalmente nos propusimos lograr que los APLs pudieran ser presentados por todas las moléculas HLA clase II relacionadas con la AR incluidas en el estudio.

Para el diseño de los APLs se consideraron algunas generalidades de aminoácidos frecuentemente encontrados en los péptidos presentados por las moléculas HLA clase II que tiene en cuenta el programa Proped (268). En la posición P1 se encuentra invariablemente un residuo aromático o hidrofóbico como: Tyr, Trp, Leu, Ile, Met y Phe.

Otras posiciones importantes son P4, P6 y P9, aunque en estos casos no existen definiciones claras sobre los residuos de aminoácidos favorecidos y depende mucho del alelo específico de la molécula HLA clase II.

Como muestra la figura 7 en el APL1 se sustituyó el Asp18 por Leu. Este cambio corresponde con la posición 4 de uno de los epitopos que es presentado por el alelo DRB1*0401. En el APL2 se modificó además la Thr 23 por Ala, que corresponde con la posición 9 de dicho epitopo. La modificación del APL3 consistió también en el cambio del Asp18 pero por Ala. La Ala es un aminoácido con propiedades físico-químicas (hidrofobicidad, carga y polaridad) poco marcadas al tener como cadena lateral al grupo metilo. Esto hace que sea muy usada en las modificaciones de péptidos para estudiar la influencia del aminoácido que se sustituye.

E18-3: SIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEA
 APL 1: SIDLKDKYKNIGAKLVQ**L**VANNTNEEA
 APL 2: SIDLKDKYKNIGAKLVQ**L**VANN**A**NEEA
 APL 3: SIDLKDKYKNIGAKLVQ**A**VANNTNEEA

Figura 7. APLs diseñados a partir del péptido E18-3. En negritas se indican los cambios propuestos en cada APL con respecto al péptido original.

En la figura 8 se muestran los resultados de la predicción del programa Proped para los APLs frente a cada uno de los alelos incluidos en el estudio.

Los cambios propuestos permiten predecir que estos tres APLs contienen posibles epitopos para todos los alelos considerados. En el APL1 la sustitución del Asp18 por Leu crea un nuevo epitopo que pudiera ser presentado por todos los alelos DRB1 analizados, además de varios epitopos superpuestos. En el caso del APL2 el cambio adicional de la Thr 23 por Ala modifica los epitopos superpuestos identificados en el APL1. Para el APL3 la modificación del Asp18 por Ala modifica varios epitopos de los identificados en los APL1 y APL2. Los resultados que se muestran en la figura 8 se obtuvieron fijando el umbral estándar del 3% en el programa Proped.

La predicción se repitió para los tres APLs pero fijando un umbral más restrictivo del 2%. El umbral se define como el “porcentaje de los péptidos naturales de mejor puntuación”. Al usar un menor umbral se logran reducir los falsos positivos y por tanto la predicción es más confiable.

El resultado se muestra en la figura 9. Los APLs 1 y 2 son los más atractivos por cuanto la predicción anterior se mantiene aun en estas condiciones de mayor exigencia, no así para el APL 3.

Nativo (E18-3)

DRB1*0101: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**DVANNTNEEA
 DRB1*0102: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**DVANNTNEEA
 DRB1*0401: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**DVANNTNEEA
 DRB1*0404: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**DVANNTNEEA
 DRB1*0405: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**DVANNTNEEA
 DRB1*0408: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**DVANNTNEEA

APL1

DRB1*0101: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNTNEEA
 DRB1*0102: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNTNEEA
 DRB1*0401: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNTNEEA
 DRB1*0404: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNTNEEA
 DRB1*0405: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNTNEEA
 DRB1*0408: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNTNEEA

APL2

DRB1*0101: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNANEEA
 DRB1*0102: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNANEEA
 DRB1*0401: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNANEEA
 DRB1*0404: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNANEEA
 DRB1*0405: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNANEEA
 DRB1*0408: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNANEEA

APL3

DRB1*0101: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**AVANNTNEEA
 DRB1*0102: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**AVANNTNEEA
 DRB1*0401: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**AVANNTNEEA
 DRB1*0404: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**AVANNTNEEA
 DRB1*0405: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**AVANNTNEEA
 DRB1*0408: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**AVANNTNEEA

Figura 8. Predicción de epitopos de células T según el programa Proped para el péptido original y los tres APLs. En rojo se indican los aminoácidos en posición P1 y en azul los restantes aminoácidos del epitopo. Se consideró el umbral de 3% del programa.

APL1 2% -----10-----20-----

DRB1*0101: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNTNEEA
 DRB1*0102: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNTNEEA
 DRB1*0401: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNTNEEA
 DRB1*0404: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNTNEEA
 DRB1*0405: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNTNEEA
 DRB1*0408: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNTNEEA

APL2 2% -----10-----20-----

DRB1*0101: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNANEEA
 DRB1*0102: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNANEEA
 DRB1*0401: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNANEEA
 DRB1*0404: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNANEEA
 DRB1*0405: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNANEEA
 DRB1*0408: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**LVANNANEEA

APL3 2% -----10-----20-----

DRB1*0101: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**AVANNTNEEA
 DRB1*0102: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**AVANNTNEEA
 DRB1*0401: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**AVANNTNEEA
 DRB1*0404: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**AVANNTNEEA
 DRB1*0405: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**AVANNTNEEA
 DRB1*0408: SIDLKDKYKNI**GA**KL**VQ**AVANNTNEEA

Figura 9. Predicción de epitopos de células T según el programa Proped para los tres APLs. En rojo se indican los aminoácidos en posición P1 y en azul los restantes aminoácidos del epitopo. Se consideró el umbral de 2% del programa Proped. Este umbral es más restrictivo y por tanto los resultados son más confiables al reducir los falsos positivos.

III.2.2 El APL2 induce la proliferación de células T CD4+ mientras que el APL1 no tiene este efecto

El efecto de los APL1 y APL2 sobre la proliferación de células T CD4+ fue evaluado en condiciones idénticas al descrito para el E18-3. En este caso se analizó el efecto por separado del péptido nativo y los dos APLs, a concentraciones de 10, 20, 40 y 80 µg/mL, sobre el cocultivo de células T CD4+ (con más del 95 % de pureza) aisladas de un donante sano y APCs de una línea alogénica que expresan el alelo DRB1*0102. Como se observa en la figura 10 el APL2 induce la proliferación de las células T CD4+ con un IE superior al del péptido nativo, para las cuatro concentraciones peptídicas analizadas. Sin embargo, el APL1 no induce la proliferación de estas células.

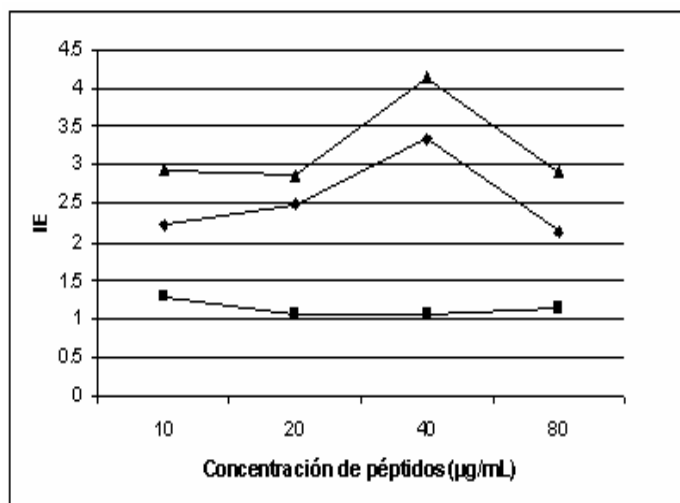


Figura 10. Inducción de la proliferación de células T CD4+ por los APL1 (■), APL2 (▲) y el péptido E18-3 (◆). Las células CD4+ aisladas de un donante sano se cocultivaron con APCs alogénicas y se estimularon con las concentraciones indicadas de cada péptido, durante 5 días. La figura representa la incorporación de timidina tritiada ($^3\text{H-TdT}$) expresada como IE. Los datos se representan como las medias correspondientes a las mediciones realizadas en un experimento representativo de otros dos.

Este análisis se repitió también con células T CD4+ aisladas de otros dos donantes sanos con resultados similares. Estos resultados sugieren que el APL1 no es presentado por las APC a las células T CD4+ o se convirtió en un ligando nulo. Mientras que el APL2 tiene un efecto similar al péptido nativo E18-3, al inducir la proliferación de células T CD4+.

III.2.3 El APL1 induce un incremento significativo de células T reguladoras con fenotipo CD4+Foxp3+ en los linfonodos y el bazo de ratones BALB/c

El diseño de APLs que mantengan propiedades similares al péptido inmunogénico (agonistas), entre cuyos efectos se encuentra incrementar la proliferación de células T hacia antígenos específicos, es más propicio para el tratamiento de enfermedades neoplásicas e infecciosas (39) que para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. El experimento anterior sugiere que el APL2 tiene un efecto agonista respecto al péptido nativo, por lo que quedó excluido en este trabajo.

Por su parte el APL1 no tuvo efecto sobre la proliferación de células T CD4+. Sin embargo, existe información en la literatura científica, que describe como determinados APLs median su mecanismo de acción a través de la inducción de Treg (35,44). Con el objetivo de estudiar si el APL1 es capaz de inducir Treg se inocularon ratones BALB/c con el APL1 y el péptido nativo E18-3 y se analizaron las variaciones de estas células y de las células T CD4+ efectoras por citometría de flujo.

Según la predicción de los programas RANKPED (270, 271) y MHCPRED (272) ambos péptidos contienen varios epitopos que pudieran ser presentados por la molécula I-A^d (MHC clase II) de los ratones BALB/c. Este análisis se muestra en la tabla V.

Tabla V. Predicción de epitopos para la molécula I-A^d de los ratones BALB/c, en el péptido original E18-3 y el APL1, según los programas RANKPED y MHCPRED. En rojo se indican los aminoácidos en la posición P1 y en azul los restantes aminoácidos del epitopo. El cambio efectuado en el APL1 se resalta en un color más intenso.

Péptidos	Programas	Epitopos
E18-3	RANKPED	SIDLKDKY K <u>NIGAKLVQ</u> DVANNTNEEA
	MHCPRED	SIDLKDKYKN I <u>GAKLVQ</u> DVANNTNEEA SIDL K <u>DKYKNIGA</u> KLVQDVANNTNEEA
APL1	RANKPED	SIDLKDKY K <u>NIGAKLVQ</u> L VANNTNEEA SIDLKDKYKNIG A <u>KLVQ</u> L VANNTNEEA
	MHCPRED	SIDLKDKYKN I <u>GAKLVQ</u> L VANN T NEEA SIDL K <u>DKYKNIGA</u> KLVQ L VANNTNEEA

Los ratones inoculados con el APL1 presentaron un incremento significativo de la población de Treg con fenotipo CD4+Foxp3+ en los dLN (del inglés “draining lymph nodes”) el día nueve del análisis, en comparación con el grupo de ratones inoculados con el E18-3 y con el grupo placebo ($P<0.05$). Este grupo de ratones también presentó un incremento significativo de esta población de células en el bazo el día nueve (figura 11).

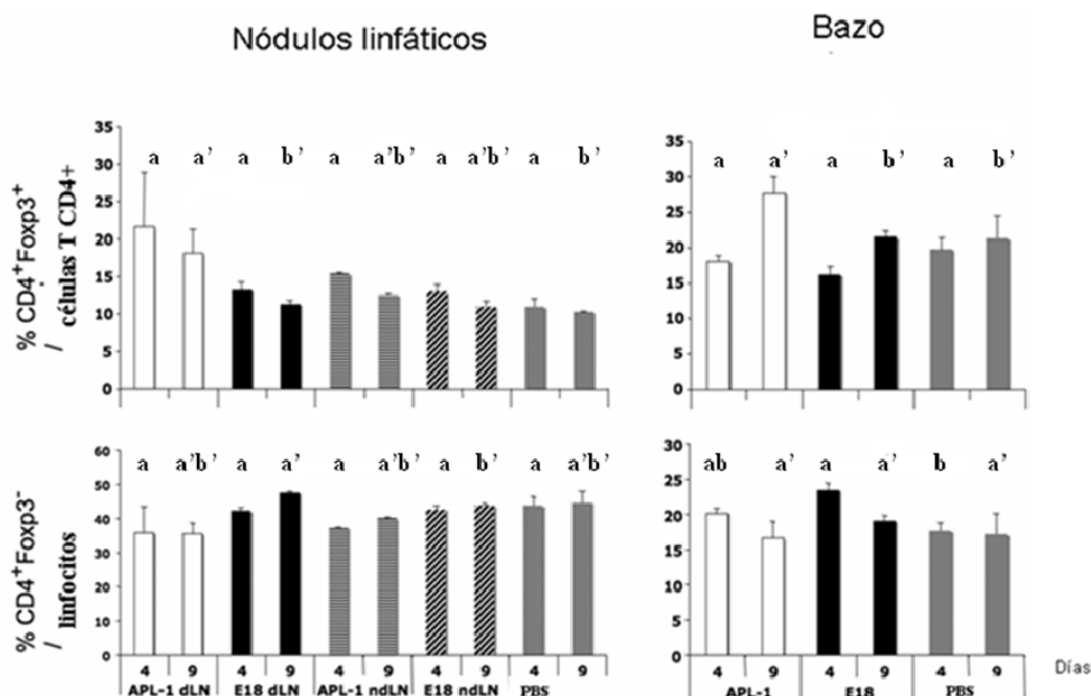


Figura 11. Porcentaje de células T cuantificados por citometría de flujo que expresan el fenotipo CD4⁺ Foxp3⁺ o CD4⁺ Foxp3⁻, aisladas del bazo y los linfonodos de ratones BALB/c, después ser inoculados con el APL1 o el péptido E18-3 (E18). Un grupo de ratones se inoculó con PBS como control negativo del ensayo. Las barras representan el promedio de los datos obtenidos para seis ratones analizados por grupo de estudio + la desviación estándar. dLN: linfonodos conectados con el sitio de inoculación. ndLN: linfonodos no conectados con el sitio de inoculación. Para el análisis de los datos se emplearon las pruebas estadísticas *Kruskal-Wallis* y *Dunn*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). Las letras sin y con apóstrofe indican la comparación correspondiente al día cuatro y nueve, respectivamente.

Los ratones tratados con el péptido nativo E18-3 presentaron el día cuatro un incremento significativo de la proporción de células T efectoras con fenotipo CD4⁺Foxp3⁻ en el bazo, en comparación con los animales inoculados con PBS. Además los ratones inoculados con este péptido presentaron un incremento significativo de las células T CD4⁺Foxp3⁻ en los dLN en comparación con esta población celular cuantificada en los ndLN, el día 9 del análisis ($P < 0.05$) (figura 11).

Estos resultados sugieren que el péptido E18-3 induce un aumento de las células T CD4⁺ efectoras *in vivo*. Además indican que el APL1 induce un incremento de células T CD4⁺ con fenotipo regulador (274).

Los resultados que se representan en la figura 12 muestran como no hay variación significativa en la expresión de la molécula CD25 en todos los grupos de estudio ($P > 0.05$). El porcentaje de expresión de este marcador en la población de células CD4⁺Foxp3⁺ fue aproximadamente de 80 % en todos los casos.

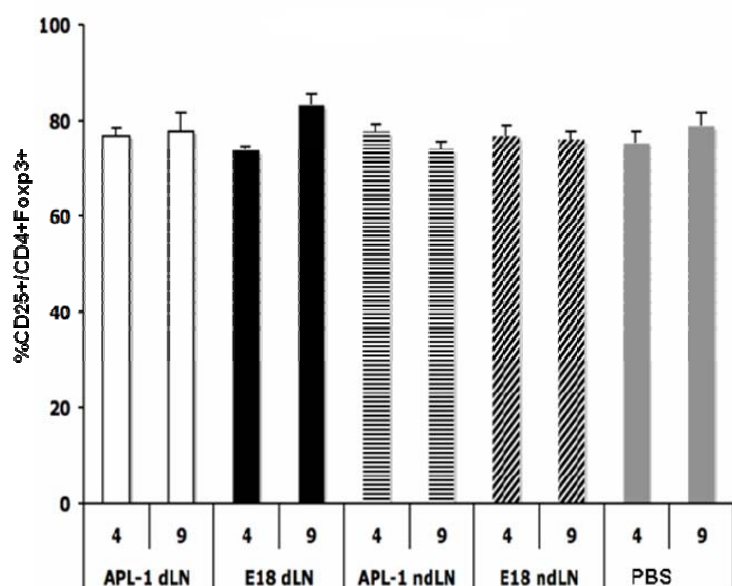


Figura 12. Porcentaje de expresión del marcador CD25 sobre las células CD4⁺ Foxp3⁺ aisladas del bazo y los linfonodos de ratones BALB/c, después de ser inoculados con el APL1 o el E18-3 (E18), cuantificados por citometría de flujo. Un grupo de ratones se inoculó con PBS como control negativo del ensayo. Las barras representan el promedio de seis ratones analizados por grupo de estudio + la desviación estándar. dLN: linfonodos conectados con el sitio de inoculación. ndLN: linfonodos no conectados con el sitio de inoculación. Para el análisis de los datos se emplearon las

pruebas estadísticas *Kruskal-Wallis* y *Dunn*. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$).

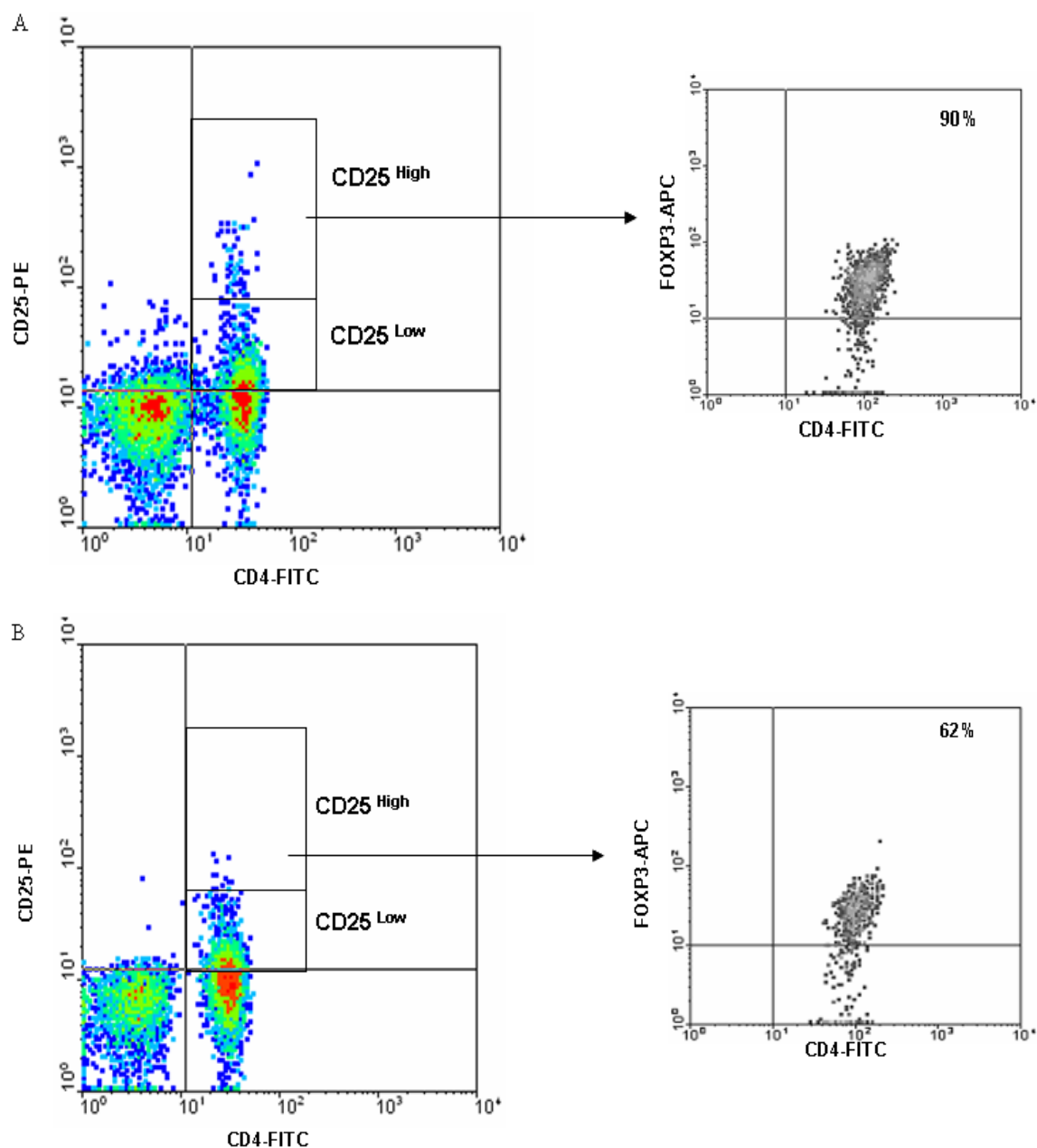
III.2.4.1 El APL1 induce un incremento significativo de las células T reguladoras con fenotipo CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ en ensayos *ex vivo* con PBMC aisladas de pacientes con artritis reumatoide

Los resultados anteriores indicaron que el APL1 induce un incremento de células T CD4⁺ con fenotipo regulador en ratones vírgenes. La obtención de un péptido que induzca Treg en pacientes con AR tendría potencialidades terapéuticas excelentes para esta enfermedad. Las Treg tienen una función fundamental en el mantenimiento de la tolerancia periférica y la prevención de las enfermedades autoinmunes (133, 134, 135). En el caso de la AR, las Treg presentan un deterioro en sus funciones (175, 176)

Con el objetivo de evaluar si el APL1 tiene la posibilidad de inducir un incremento de las células T CD4⁺ con fenotipo regulador en pacientes con AR, se utilizaron PBMC aisladas de 13 pacientes con AR cuyas características principales se describen en el epígrafe III.3 de Materiales y Métodos. La figura 13 ilustra el marcaje representativo de las muestras correspondientes al paciente P8.

La frecuencia de las células T CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ en las PBMC que fueron estimuladas con el APL1 (figura 13A) fue mayor al compararlas con el cultivo sin estímulo peptídico (figura 13C). Por el contrario, la frecuencia de células T CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ en las PBMC cultivadas con el péptido original E18-3 fue similar

al de estas células sin estímulo (figura 13 B y C). Los datos primarios obtenidos para el resto de los pacientes incluidos en este estudio se muestran en la tabla VI.



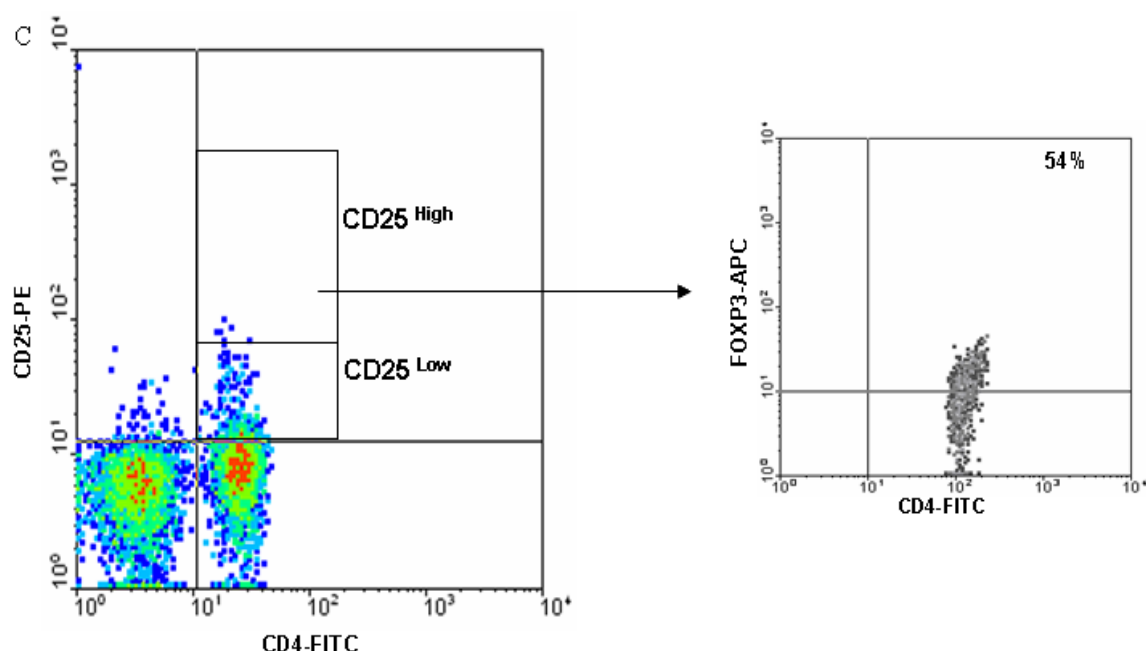


Figura 13. Análisis por citometría de flujo de la inducción de células T reguladoras por el péptido APL1 en ensayos *ex vivo* con PBMC aisladas de un paciente con AR. Las células se estimularon durante cinco días con 40 μ g/ml de los péptidos APL1 o E18-3. Células sin estímulo peptídico se usaron como control de los niveles basales en cada paciente. Posteriormente, las células se marcaron con anticuerpos monoclonales de un Kit comercial para el marcaje de Treg humanas. La región correspondiente a los linfocitos CD4⁺ fue enmarcada de acuerdo al grado de expresión del antígeno CD25 (*low* o *high*). Foxp3 fue representado sobre la población celular previamente enmarcada en los diagramas de puntos como CD4⁺ CD25^{high}. La figura ilustra el marcaje representativo de un paciente (P8). A: células estimuladas con el APL1. B: células estimuladas con el péptido E18-3. C: células sin estímulo peptídico. El número en negro representa el porcentaje de células T Foxp3⁺ del total de células T CD4⁺CD25^{high}.

Tabla VI. Porcentaje de Treg con fenotipo CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ inducidas por los péptidos APL1 y E18-3 en pacientes con AR.

Pacientes	%Células T CD4 ⁺ CD25 ^{high} Foxp3 ⁺ Sin estímulo peptídico	% Células T CD4 ⁺ CD25 ^{high} Foxp3 ⁺ Estimuladas con el APL1	% Células T CD4 ⁺ CD25 ^{high} Foxp3 ⁺ Estimuladas con el E18-3
1	2.78 (2.7-3.02)	4.52 (4.52-4.9)	2.97 (2.97-3.0)
2	1.85 (1.80-1.90)	3.0 (2.97-3.02)	1.90 (1.63-2.17)
3	1.65 (1.56-1.75)	3.1 (2.9-3.3)	nd
4	1.69 (1.63-1.75)	3.67 (3.13-4.2)	nd
5	1.27 (1.22-1.32)	2.25 (2.15-2.35)	1.88 (1.63-2.12)
6	0.83 (0.81-0.85)	3.04 (2.64-3.44)	1.57 (1.48-1.66)
7	0.73 (0.7-0.75)	0.93 (0.90-0.96)	0.95 (0.8-1.07)
8	1.9 (1.85-2.02)	3.2 (2.99-3.36)	2.1 (1.9-2.25)
9	3.1 (3.05-3.08)	4.30 (4.1-4.43)	3.7 (3.51-3.95)
10	2.32 (2.25-2.4)	4.30 (4.1-4.5)	2.20 (2.1-2.3)
11	1.28 (1.22-1.34)	4.34 (4.18-4.50)	nd
12	0.82 (0.74-0.90)	4.78 (4.55-4.92)	nd
13	0.57 (0.44-0.69)	1.18 (1.06-1.26)	nd

Para confirmar el enriquecimiento de la población de Treg con un fenotipo $CD4+CD25^{high}Foxp3+$ inducidas por el APL1 en cada individuo, se calculó el incremento relativo de esta población celular, cuando las PBMC se cultivaron con el APL1 en comparación con las PBMC que no se estimularon o las cultivadas con el péptido original E18-3. Este análisis se efectuó a partir de los datos que se muestran en la traba VI. Como indica la figura 14, en todos los casos, con excepción del paciente P7, se observó un incremento en la frecuencia de la población celular estudiada de más de 1.5, cuando las PBMC se estimularon con el APL1.

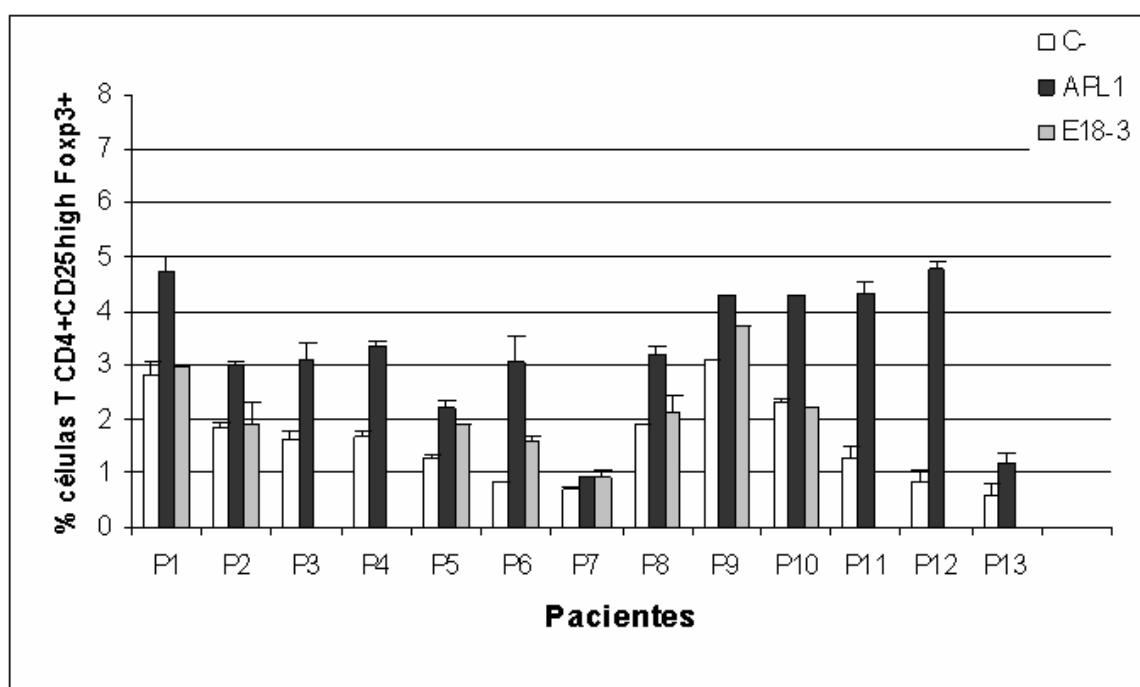


Figura 14. Incremento del porcentaje de las células T $CD4+CD25^{high}Foxp3+$ (cuantificados por citometría de flujo) en los cultivos de PBMC aisladas de 13 pacientes con AR. Las PBMC se estimularon durante cinco días con 40 $\mu\text{g/mL}$ de los péptidos APL1 o E18-3. Células sin estímulo peptídico fueron usadas como control de los niveles basales en cada paciente (C-). Las barras representan el promedio + la desviación estándar de tres réplicas independientes por paciente.

La figura 15 representa los resultados del análisis de la inducción de Treg con fenotipo $CD4+CD25^{high}Foxp3+$ por el APL1 en los cultivos de las PBMC aisladas de los 13 pacientes con AR, en comparación con el porcentaje de estas Treg obtenidos en los cultivos estimulados con el péptido E18-3 y los cultivos sin estímulo peptídico. Como se muestra en esta figura, existen diferencias estadísticamente significativas, entre los cultivos estimulados con el APL1 y los que no recibieron estímulo peptídico ($P < 0.001$).

Sin embargo, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los cultivos estimulados con el péptido original y los cultivos sin péptido ($P>0.05$).

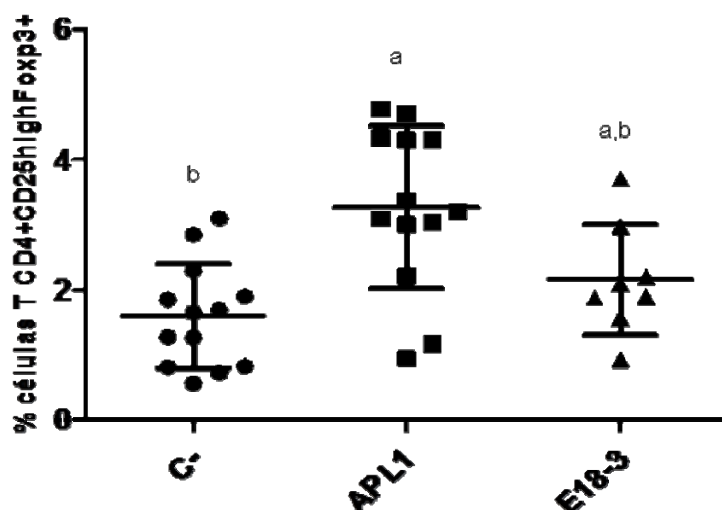


Figura 15. Análisis de la inducción de Treg con fenotipo CD4+CD25^{high}Foxp3+ por el APL1 en los cultivos de las PBMC aisladas de los pacientes con AR, en comparación con los cultivos estimulados con el péptido E18-3 y sin estímulo peptídico. Las PBMC se estimularon durante cinco días con 40 μ g/mL de los péptidos APL1 o E18-3. PBMC sin estímulo peptídico se usaron como control de los niveles basales en cada paciente (C-). El análisis se efectuó por citometría de flujo. Se

representa la media de cada grupo \pm la desviación estándar. El análisis estadístico entre grupos se realizó con la prueba paramétrica ANOVA y las medias se compararon con la prueba *a posteriori* de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas $P<0.0001$.

Estos resultados nos indican que el APL1 induce incrementos significativos en el porcentaje de Treg con fenotipo CD4+CD25^{high}Foxp3+ en los cultivos de las PBMC aisladas de pacientes con AR.

Se evaluó además las potencialidades del APL1 para inducir Treg en cultivos de SFMC aisladas de tres pacientes con AR. Los resultados de este experimento mostraron que el APL1 tiende a inducir *ex vivo* un aumento en la frecuencia de células T CD4+CD25^{high}Foxp3+ provenientes del líquido sinovial de los tres pacientes analizados (figura 16).

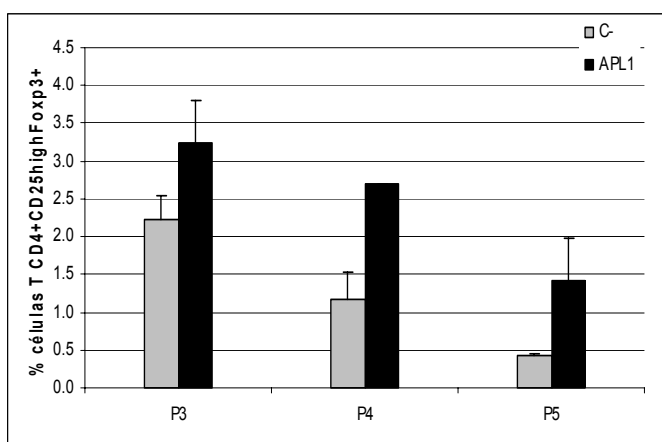


Figura 16. Análisis de la inducción de Treg con fenotipo CD4+CD25^{high}Foxp3+ por el APL1 en los cultivos de las SFMC aisladas de tres pacientes con AR, en comparación con los cultivos estimulados con el péptido E18-3 y sin estímulo peptídico. Las SFMC se estimularon durante cinco días con 40 μ g/mL del APL1. SFMC sin estímulo peptídico se usaron como control de los niveles basales en cada paciente (C-). Las barras representan el promedio + la desviación estándar de tres réplicas independientes por paciente.

III.2.4.2 El APL1 no incrementa las Treg con fenotipo CD4+CD25^{high}Foxp3+ en ensayos *ex vivo* con PBMC aisladas de donantes sanos

Los experimentos anteriores indican que el APL1 induce Treg en los cultivos de las PMBC aisladas de pacientes con AR. Con el objetivo de dilucidar si las Treg que induce este péptido están asociadas específicamente al curso de la AR, se analizó el efecto que pudiera tener el APL1 sobre esta fracción celular en los cultivos de PBMC aisladas de donantes sanos. En este caso se contó con la participación voluntaria de 8 donantes cuyas características principales se describen en el epígrafe III.3 de Materiales y Métodos.

Los resultados de este análisis indicaron que no hubo diferencias significativas entre las células estimuladas con los péptidos y las células cultivadas sin estímulo peptídico (figura 17), para una $P > 0.05$.

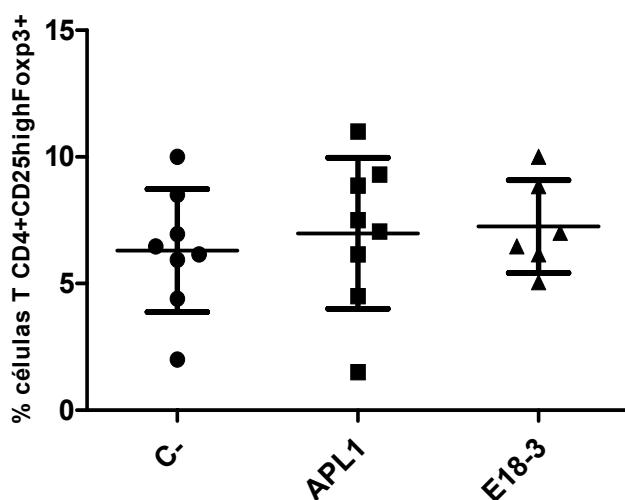


Figura 17. Efecto de los péptidos: APL1 y E18-3 sobre los niveles de células T CD4+CD25^{high}Foxp3+ (cuantificados por citometría de flujo) en cultivos de PBMC aisladas de 8 donantes sanos. Las PBMC se estimularon durante cinco días con 40 μ g/mL de los péptidos APL1 o E18-3. PBMC sin estímulo peptídico se usaron como control de los niveles basales en cada donante. Se representa la media de cada grupo \pm la desviación estándar. El análisis estadístico entre grupos se realizó con la prueba paramétrica ANOVA y las medias se compararon con la prueba *posteriori* de Tukey. No se encontraron diferencias significativas $P > 0.05$.

Estos resultados indican que ninguno de los dos péptidos en las condiciones analizadas modifican *ex vivo* la frecuencia de células T con fenotipo CD4+CD25^{high}Foxp3+ provenientes de donantes sanos.

En la AR existe un reclutamiento preferencial de las Treg en las articulaciones periféricas, lo cual disminuye el porcentaje de estas células en la sangre de los pacientes (168,169). En este estudio, se realizó una comparación de los niveles basales de la frecuencia de células T con fenotipo CD4+CD25^{high}Foxp3+ en las PBMC cultivadas sin estímulo peptídico, entre los pacientes cubanos con AR y los donantes sanos. Los resultados de la figura 18 indican niveles significativamente más bajos en el porcentaje de Treg para los pacientes que para los donantes sanos para una $P < 0.0001$.

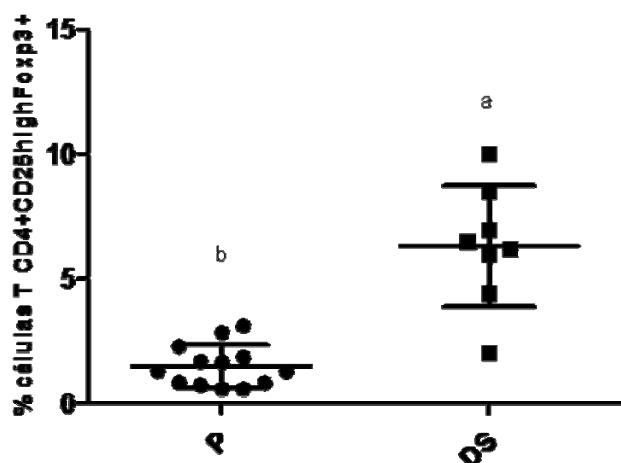


Figura 18. Comparación de los niveles basales de la frecuencia de Treg (cuantificados por citometría de flujo) en las PBMC aisladas de pacientes (P) con AR y de donantes sanos (DS). En este estudio se incluyeron 13 pacientes con AR y 8 donantes sanos. Se representa la media de cada grupo \pm la desviación estándar. La comparación entre los dos grupos se realizó a través de la prueba estadística *t-student* independiente. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas $P < 0.0001$.

III.3 Evaluación del efecto terapéutico del APL1 en dos modelos animales para la artritis reumatoide.

IV.3.1 EL APL1 atenúa la respuesta patogénica en el modelo de artritis inducida por adyuvante

Los resultados anteriores fundamentan las potencialidades terapéuticas del APL1 para el tratamiento de la AR, por lo que se evaluó el efecto terapéutico del APL1 en el modelo de AA en ratas Lewis, a través de dos vías de administración: intradérmica y subcutánea. Estudiamos dos vías de inoculación ya que uno de los factores que influye en los mecanismos de acción de los APLs y de los péptidos inmunogénicos es precisamente la vía de administración (24,44)

Primeramente se evidenció que el péptido original y el APL-1 contienen dos epitopos superpuestos que pudieran ser presentados por la molécula RT1.B^I, según la predicción del programa MHC2PRED (273). Los resultados de esta predicción se muestran en la tabla VII.

Tabla VII. Resultados de la predicción de epitopos para la molécula RT1.B^I de las ratas Lewis, en el péptido original E18-3 y el APL1, según el programa MHC2PRED. En rojo se indican los aminoácidos en posición P1 y en azul los restantes aminoácidos del epitopo. El cambio efectuado en el APL se resalta en negritas.

Péptidos	Programa	Epitopos
E18-3	MHC2PRED	SIDLKDKYK N IGAKLVQDVANNTNEEA
APL1	MHC2PRED	SIDLKDKYK N IGAKLVQ L VANNTNEEA

Los signos clínicos asociados con el desarrollo de la AA se hicieron evidentes en las ratas a partir del día 10, después de inducida la enfermedad. Inicialmente, estos signos se mostraron como un ligero enrojecimiento e inflamación de las extremidades posteriores. Los signos clínicos en los animales del grupo placebo se acentuaron de forma gradual hasta producir una severa inflamación que alcanzó su punto máximo el día 21.

El parámetro principal que se utilizó para la evaluación clínica del efecto terapéutico de los péptidos fue la medición de los signos clínicos asociados a la artritis el día 21, según una escala confeccionada para este fin, descrita en el epígrafe III.6.2 del capítulo de Materiales y Métodos. La administración del APL1 por cualquiera de las dos vías, provocó una reducción significativa de los signos clínicos de la AA como muestra la figura 19 ($P<0.0001$). En los grupos de animales tratados con el APL1, la puntuación clínica alcanzada ese día fue de 4 puntos. En contraste, el grupo de animales enfermos inoculados con PBS (grupo placebo) obtuvo 12 puntos. El tratamiento con el péptido original E18-3 muestra una tendencia a reducir los signos clínicos de la artritis, pero no se observó diferencias estadísticas significativas en relación con los animales del grupo placebo.

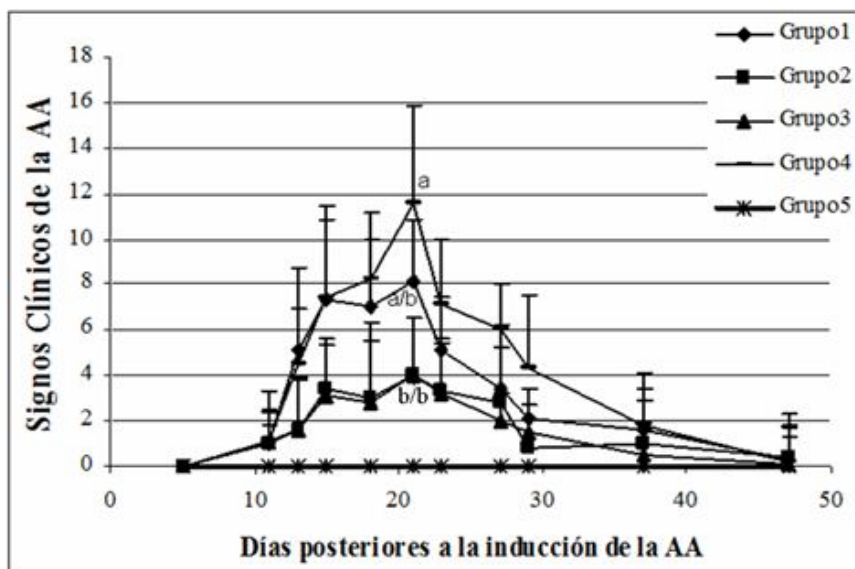


Figura 19. Evaluación de los signos clínicos de la AA en las ratas enfermas y tratadas con los péptidos: E18-3 y APL1. El día 10 posterior a la inducción de la enfermedad, las ratas se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos de tratamiento: Grupo 1: ratas inoculadas con el péptido E18-3 por vía intradérmica, Grupo 2: ratas inoculadas con el APL1 por vía intradérmica, Grupo 3:

ratas inoculadas con el APL1 por vía subcutánea, Grupo 4: placebo, Grupo 5: ratas sanas. Los valores graficados para los signos clínicos correspondiente a cada día representan el promedio por grupo de estudio + la desviación estándar. El gráfico representa los resultados de uno de los tres experimentos realizados. El análisis estadístico entre grupos se realizó con la prueba paramétrica ANOVA y las medias se compararon con la prueba *a posteriori* de Tukey. Letras diferentes significan diferencias estadísticamente significativas para $P<0.0001$.

La figura 20 muestra una imagen de una rata representativa de cada grupo incluido en este ensayo, tomada el día 21. En esta figura se puede observar la puntuación adjudicada a la pata derecha trasera de cada rata. La figura 20 A corresponde a un animal del grupo tratado con el péptido original E18-3, al cual se le asignó tres puntos para la extremidad especificada. Las figuras 20 B y C corresponden a dos ratas tratadas con el APL1 por vía intradérmica y subcutánea, respectivamente, a la primera se le asignó dos puntos y a la segunda un punto. En estos dos animales se puede observar como mantienen el reflejo de extensión en dicha extremidad, que se pierde en el animal del grupo placebo (figura 20 D). Esta rata recibió cuatro puntos en cada una de las extremidades debido a la inflamación que presentaba. Para la evaluación de los signos clínicos se tomó como referencia a los animales del grupo sano, uno de ellos se muestra en la figura 20 E.



Figura 20. Imágenes de una rata representativa de cada grupo, tomadas el día 21 después de inducida la AA. A: rata del grupo I (inoculada con el péptido E18-3 por vía intradérmica). B: rata del grupo II (inoculada con el APL1 por vía intradérmica). C: rata del grupo III (inoculada con el APL1 por vía subcutánea). D: rata del grupo IV: (placebo). E: rata del grupo V (sana).

Como parte de este estudio también se realizó el análisis histopatológico por microscopía óptica de la articulación correspondiente al tobillo de la pata derecha trasera, de cuatro ratas sacrificadas por grupo el día 21 después de inducida la AA.

Se encontró una estrecha correspondencia entre los resultados obtenidos durante la evaluación clínica y el análisis histopatológico. Las cuatro ratas del grupo placebo alcanzaron grado 3 en la escala confeccionada para medir el daño histopatológico, descrita en el epígrafe III.6.5 de materiales y métodos. Por su parte, de las ratas tratadas con el péptido original una obtuvo grado dos y las restantes obtuvieron grado tres. En contraposición, las ratas del grupo II (inoculadas con el APL1 por vía intradérmica) presentaron daños articulares muy ligeros. Las ratas correspondientes al grupo III (inoculadas con el APL1 por vía subcutánea) no presentaron ninguna alteración histopatológica al igual que las ratas sanas. Estos resultados se muestran en la tabla VIII.

Tabla VIII. Análisis histopatológico de las articulaciones de las ratas tratadas con el péptido E18-3 o el APL1, de las ratas enfermas no tratadas y de las ratas sanas.

Grupos	animal	grado de daño histopatológico
I tratamiento con el péptido E18-3 (vía intradérmica)	1	3
	2	2
	3	3
	4	3
II tratamiento con el APL1 (vía intradérmica)	1	0
	2	1
	3	1
	4	0
III tratamiento con el APL1 (vía subcutánea)	1	0
	2	0
	3	0
	4	0
IV Placebo	1	3
	2	3
	3	3
	4	3
V Sanas	1	0
	2	0
	3	0
	4	0

Los resultados del análisis histopatológico quedan ilustrados en la figura 21. La figura 21D corresponde a una imagen de microscopía óptica de una sección articular de un animal del grupo placebo. El *pannus* invade todo el espacio intra-articular, así como se evidencia la erosión del cartílago y el hueso. Esta imagen representa al grado tres en la escala que mide el daño histopatológico. La figura 21 B pertenece a un animal del grupo tratado con el APL1 por vía intradérmica (grado uno). La figura 21 C corresponde a un animal del grupo tratado con el APL1 por vía subcutánea (grado cero), esta imagen es muy similar a la del animal sano (21 E), en ambas se puede observar que el espacio intra-articular está bien definido, no se observa la presencia de *pannus* y no hay ninguna evidencia de degradación del cartílago o el hueso. La figura 21 A corresponde a un animal del grupo tratado con el péptido E18-3 (grado dos), en esta se observa el *pannus* que invade el cartílago y el hueso.

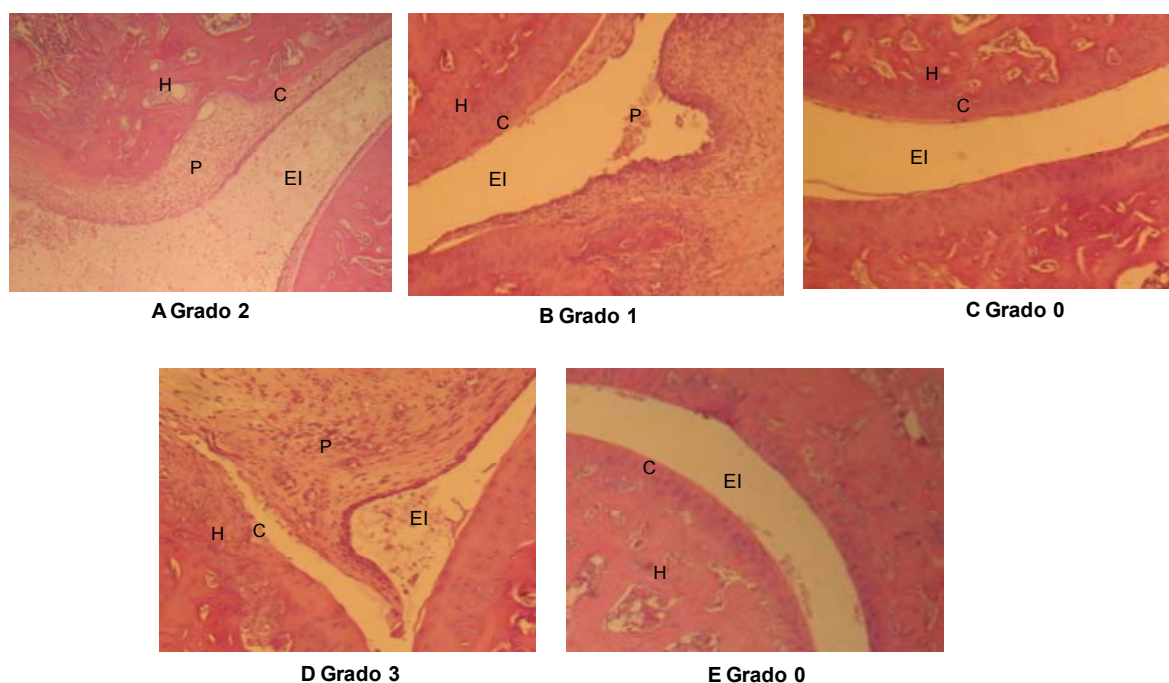


Figura 21. Imágenes correspondientes a la microscopía óptica de una sección de la articulación de un animal representativo de cada grupo. A: rata del grupo I (inoculada con el péptido E18-3 por vía intradérmica). B: rata del grupo II (inoculada con el APL1 por vía intradérmica). C: rata del grupo III (inoculada con el APL1 por vía subcutánea). D: rata del grupo IV: (placebo). E: rata del grupo V (sana). Tinción hematoxilina-eosina. Magnificación original de 10 X. EI: Espacio Intra-articular; H: Hueso; C: Cartílago; P: *pannus*. Se representa además el grado asignado a cada imagen de acuerdo a la escala confeccionada para medir el daño histológico.

Con el objetivo de analizar si el efecto terapéutico del APL1 en el modelo de AA está asociado con un aumento de la frecuencia de Treg, se determinó la variación de estas células con fenotipo: $CD4+CD25^{high}Foxp3+$ en el bazo de tres ratas sacrificadas por grupo de tratamiento el día 21. Las figuras 22A y 22B ilustran el marcaje representativo de las muestras correspondientes a una rata del grupo tratado con el APL1 por vía subcutánea y una del grupo placebo, respectivamente.

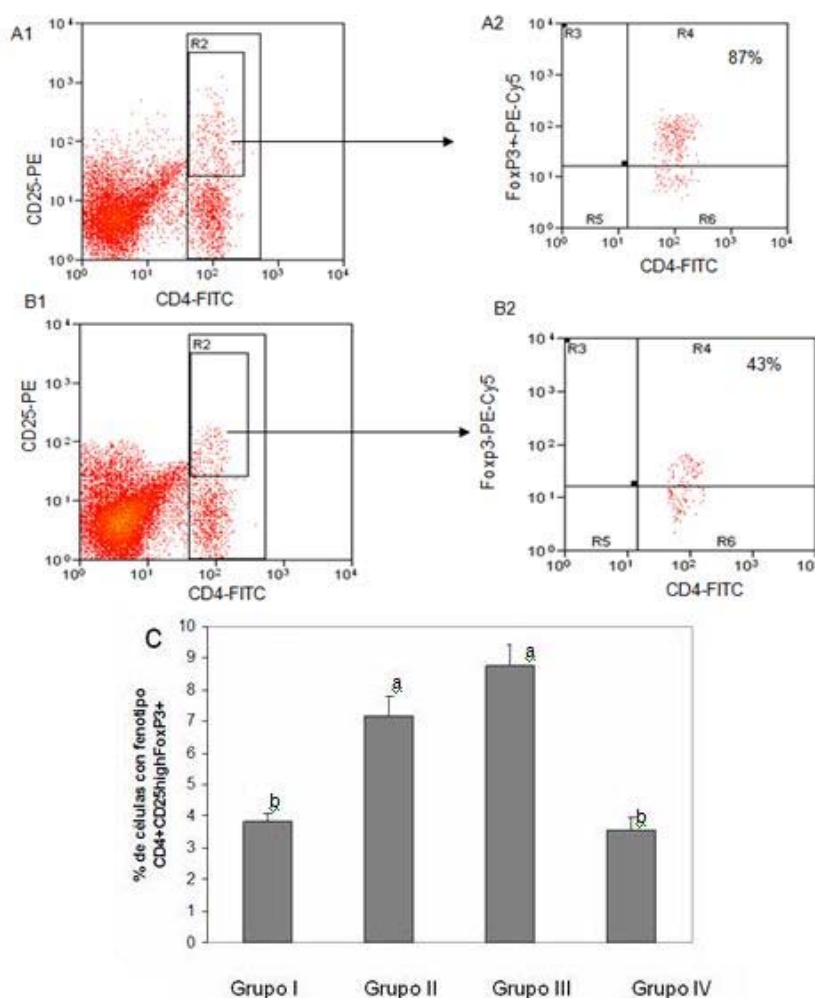


Figura 22. (A-B) Análisis por citometría de flujo de los esplenocitos marcados con AcM para CD4, CD25 y Foxp3. Los datos corresponden a una rata del grupo tratado con el APL1 por vía subcutánea (A) y una del grupo placebo (B), sacrificadas el día 21. En los diagramas de puntos sobre la población de linfocitos CD4⁺ se enmarcó la población correspondiente a CD25^{high} como R2 (A1 y B1), sobre la cual fue enmarcada la región correspondiente a Foxp3 como R4 (A2 y B2). Los números representan el porcentaje de células T Foxp3⁺ del total de células T CD4⁺CD25^{high}. (B) Porcentaje de células T que expresan el

fenotipo CD4⁺ CD25^{high} Foxp3⁺ aisladas del bazo. Los valores representados corresponden al promedio de tres ratas analizadas por grupo de estudio + la desviación estándar. Grupo I: ratas inoculadas con el péptido E18-3 por vía intradérmica, Grupo II: ratas inoculadas con el APL1 por vía intradérmica. Grupo III: ratas inoculadas con el APL1 por vía subcutánea, Grupo IV: ratas enfermas sin tratamiento. Para el análisis de los datos se emplearon las pruebas estadísticas *Kruskal-Wallis* y *Dunn*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

En este análisis promediamos el porcentaje de Treg con fenotipo CD4+CD25^{high}Foxp3+ en cada grupo de tratamiento. Los resultados revelaron un incremento significativo de esta población celular en las ratas tratadas con el APL1 por las dos vías de inoculación estudiadas, en comparación con el grupo placebo ($P<0.05$). Por el contrario en el grupo de ratas tratada con el péptido original el porcentaje de Treg con fenotipo CD4+CD25^{high}Foxp3+ fue similar al encontrado en el grupo placebo (figura 22C).

En la patogénesis de la AR el TNF- α tiene un papel crucial (62), así como en el modelo de AA (190). Los cambios en los niveles de esta citocina fueron cuantificados en los sobrenadantes de cultivo de las células mononucleares aisladas del bazo de tres ratas sacrificadas por grupo de estudio el día 21 después de inducida la enfermedad.

Los niveles del TNF α disminuyeron significativamente en las ratas tratadas con el APL1 por ambas vías, en comparación con los del grupo placebo ($P<0.05$) (figura 23).

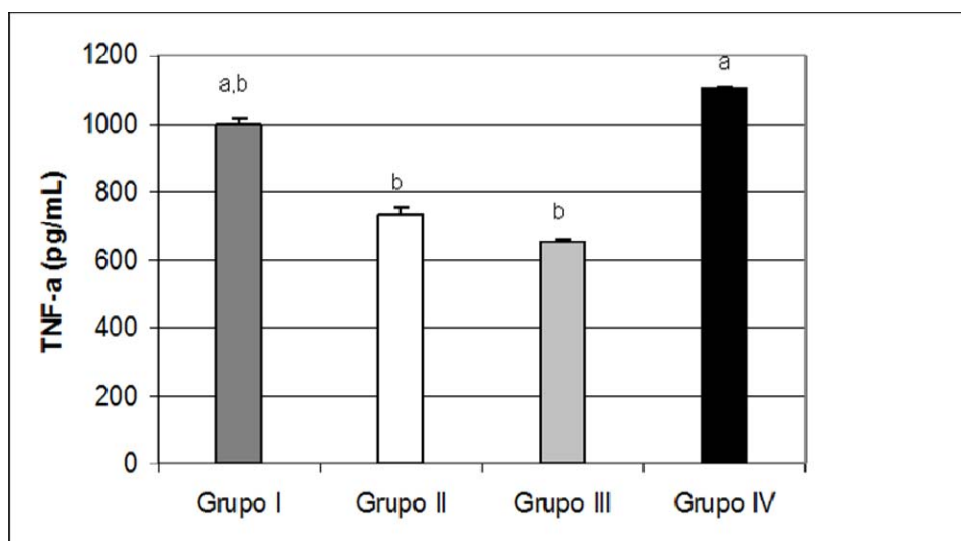


Figura 23. Cuantificación de los niveles del TNF α el día 21 después de inducida la AA. Las células mononucleares fueron aisladas del bazo y estimuladas *in vitro* con 40 μ g/mL del péptido correspondiente al grupo de tratamiento por 24 horas. El TNF α en el sobrenadante se determinó por un ELISA comercial. Grupo I: ratas inoculadas con el péptido E18-3 por vía intradérmica, grupo II: ratas inoculadas con el APL1 por vía intradérmica, grupo III: ratas inoculadas con el APL1 por vía subcutánea, grupo IV: ratas del grupo placebo. Las barras representan el promedio + la desviación estándar de tres réplicas a partir de tres animales por grupo. Para el análisis de los datos se emplearon las pruebas estadísticas *Kruskal-Wallis* y *Dunn*. Letras diferentes significan diferencias estadísticamente significativas para $P<0.05$.

La IL-10 es una citocina con funciones inmunosupresoras que participa en el control de los procesos autoinmunes (275). Ulmansky y col. encontraron altos niveles de esta citocina en la fase de remisión del modelo de AA (276). Por otra parte, otros autores hallaron en este modelo un aumento de la IL-10, después del tratamiento con péptidos derivados de la HSP60 (26,32) y con fragmentos de DNA derivados de esta proteína

(27). Sin embargo, no encontramos variación en los niveles de esta citocina entre los diferentes grupos estudiados ($P>0.05$), como se muestra en la figura 24. La cuantificación de los niveles de IL-10 se realizó de forma similar a la del TNF- α .

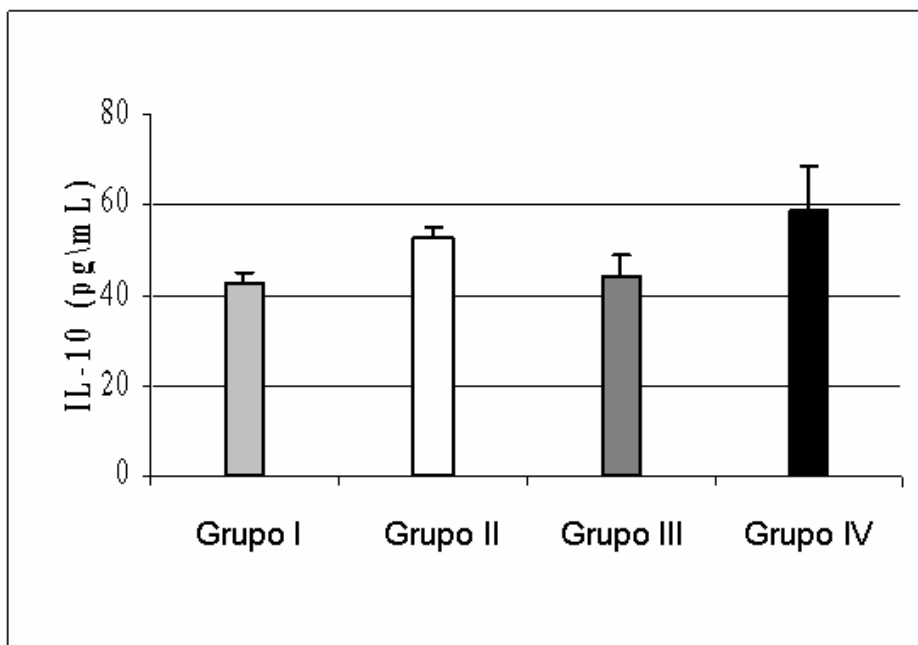


Figura 24. Cuantificación de los niveles de IL-10 el día 21 después de inducida la AA. Las células mononucleares fueron aisladas del bazo y estimuladas *in vitro* con 40 μ g/mL del péptido correspondiente al grupo de tratamiento por 24 horas. La IL-10 en el sobrenadante se determinó por un ELISA comercial. Grupo I: ratas inoculadas con el péptido E18-3 por vía intradérmica, grupo II: ratas inoculadas con el APL1 por vía intradérmica, grupo III: ratas inoculadas con el APL1 por vía subcutánea, grupo IV: ratas enfermas sin tratamiento. Las barras representan el promedio + la desviación estándar de tres réplicas a partir de tres animales por grupo. Para el análisis de los datos se emplearon las pruebas estadísticas *Kruskal-Wallis* y *Dunn*. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P>0.05$).

III.3.2 EL APL1 atenúa la respuesta patogénica en el modelo de artritis inducida por colágeno

Los resultados anteriores demostraron un buen efecto terapéutico del APL1 en el modelo de AA. En este modelo la enfermedad es mediada por células T y la respuesta principal es hacia la HSP60 (45). Al ser el APL1 derivado de la HSP60, se imponía la evaluación de este péptido en otro modelo animal para AR, en cuya inducción esta proteína no sea primordial. Con este objetivo se escogió el modelo de AIC, en el cual la artritis es inducida con CII. Además, este modelo reúne una serie de características que lo convierten en el modelo de referencia para los estudios de AR (189).

Previamente, evidenciamos que el APL1 contiene un epítipo que pudiera ser presentado por la molécula IA^q presente en los ratones DBA-1, según la predicción del

programa RANKPED (270,271). El resultado de dicha predicción se muestra en la tabla IX.

Tabla IX. Resultados de la predicción de epitopos para la molécula IA^q de las ratones DBA-1 en el APL1, según el programa RANKPED. En rojo se indican los aminoácidos en posición P1 y en azul los restantes aminoácidos del epitopo.

Péptido	Programa	Epitopo
APL1	RANKPED	SIDLKDKYKNI ^G AKLVQLVA ^N NTNEEA

El efecto terapéutico del APL1 en el modelo de AIC se comparó con el MTX, que es el medicamento de primera línea para el tratamiento de la AR (277). Usualmente, la evaluación terapéutica de un nuevo fármaco para la AR en un modelo animal, conlleva una comparación con el MTX. Los signos clínicos asociados con el desarrollo de la artritis en este modelo se hicieron evidentes a partir del día 26, después de inducida la enfermedad. Inicialmente, estos signos se mostraron como un ligero enrojecimiento e inflamación de los dedos de alguna extremidad de los ratones. Los signos de la AIC en los animales del grupo placebo se acentuaron de forma progresiva hasta producir una severa inflamación en las cuatro extremidades. La evaluación de los signos clínicos de los ratones de este grupo fue de más de seis puntos a partir del día 31 como se muestra en la figura 25.

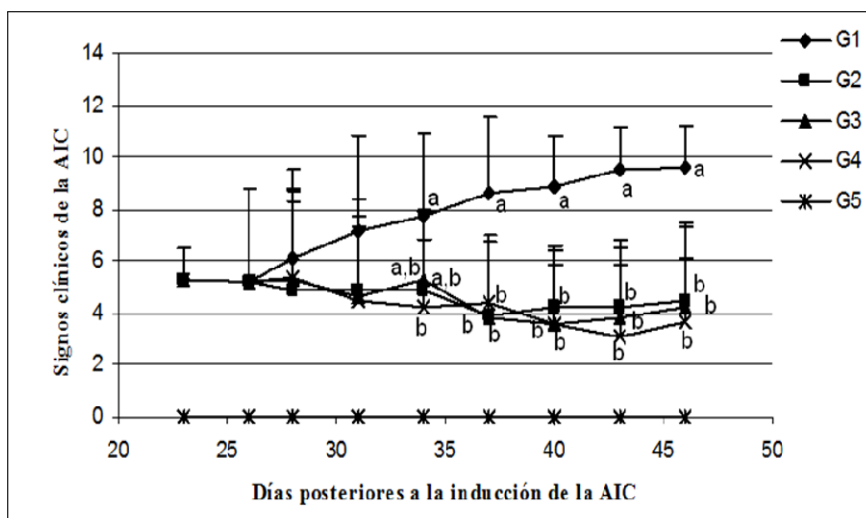


Figura 25. Evaluación de los signos clínicos de la AIC en los ratones. Los valores para los signos clínicos representan el promedio de los 12 ratones por grupo de estudio + la desviación estándar. G1: animales enfermos inoculadas con PBS (placebo), G2: animales tratados con el APL1, G3: animales tratados con MTX, G4: animales tratados con la combinación APL1 y MTX, G5: ratones sanos sin tratamiento. El

gráfico representa los resultados de uno de los dos experimentos realizados. El análisis estadístico entre grupos se realizó con la prueba paramétrica ANOVA y las medias se compararon con la prueba *a posteriori* de Tukey. Letras diferentes significan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para $P < 0.05$.

En este estudio, el parámetro principal que se utilizó para la evaluación clínica del efecto terapéutico del APL1 y el MTX fue la medición de los signos clínicos asociados

a la artritis los días: 34, 37, 40, 43 y 46, según una escala confeccionada para este fin descrita en el epígrafe III.6.2 del capítulo de Materiales y Métodos.

La administración simultánea del APL1 y el MTX, redujo significativamente la severidad de la AIC a partir del día 34 después de inducida la enfermedad, con respecto a los animales del grupo placebo ($P<0.05$). El tratamiento individual con el APL1 como con el MTX provocó una reducción significativa de los signos clínicos de la AIC en comparación con el grupo placebo, a partir del día 37 ($P<0.05$). Entre los grupos de animales tratados con el péptido, con el MTX o la combinación no hubo diferencias significativas en la puntuación clínica que obtuvieron (figura 25).

La figura 26 contiene imágenes de un ratón representativo de cada grupo, tomadas el día 46 después de inducida la AIC. En la 27A se muestra un animal perteneciente al grupo I (placebo) donde se puede observar el grado de inflamación y la deformidad de las patas, lo cual le impide la movilidad y le afecta la locomoción. Las figuras 27B, 27C y 27D muestran ratones de los grupo II (tratado con el APL-1), grupo III (tratado con MTX) y IV (tratado con el APL1 y MTX), respectivamente. Nótese que el grado de inflamación en las extremidades de estos ratones es muy ligero.

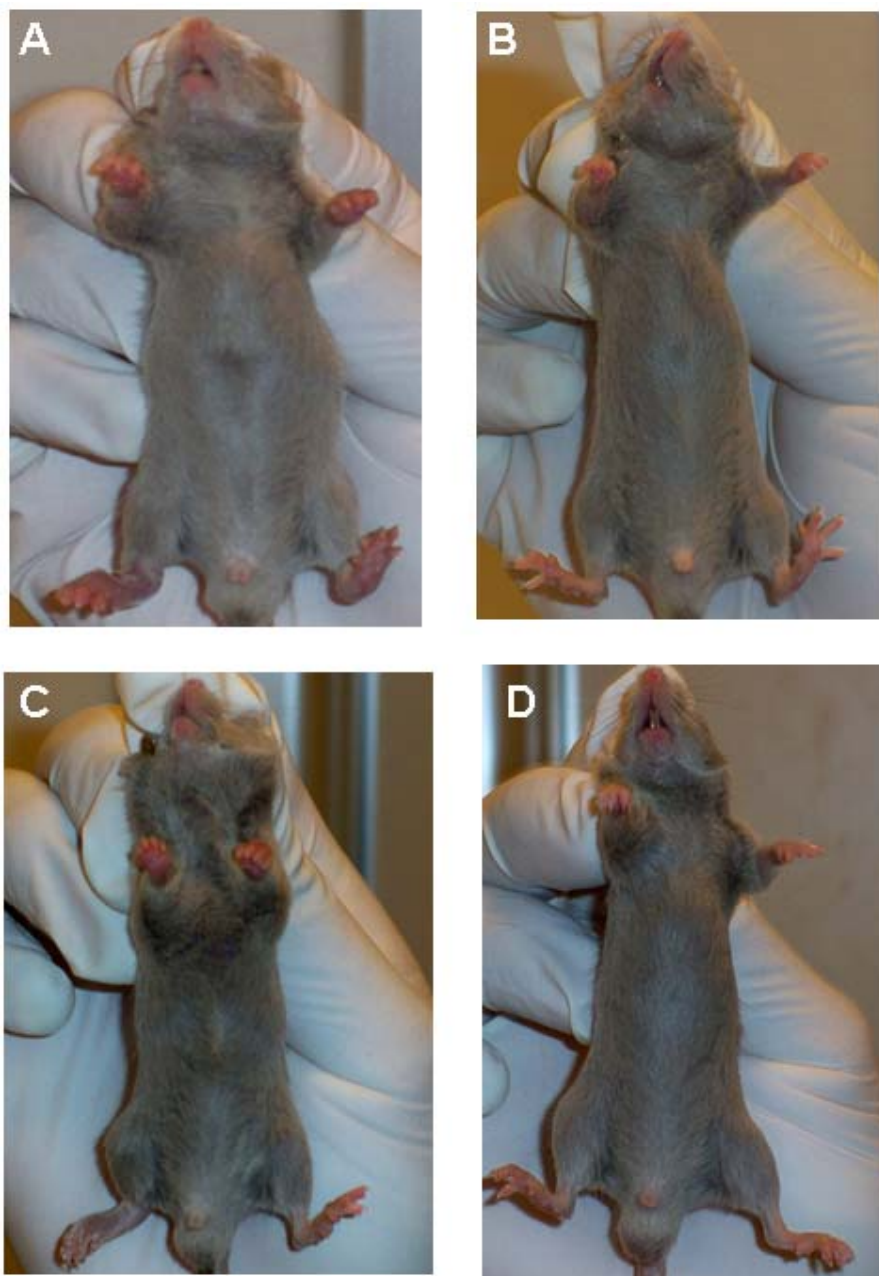


Figura 26. Imágenes de ratones con AIC el día 46 después de inducida la enfermedad. **A:** ratón del grupo I (placebo), **B:** ratón del grupo II (tratado con el APL1), **C:** ratón del grupo III (tratado con MTX), **D:** ratón del grupo IV (tratado con la combinación APL1 y MTX).

Estos resultados demuestran que el tratamiento con el APL1, el MTX y la combinación reducen significativamente la severidad de la AIC en los ratones.

La evaluación de los signos clínicos de la AIC fue complementada con el análisis histopatológico de las articulaciones de cuatro ratones sacrificados por grupo de estudio, el día 46 después de inducida la enfermedad. Los animales del Grupo V (sanos) no presentaron alteraciones histológicas en las articulaciones. En contraste, los

ratones del Grupo I (placebo) presentaron las alteraciones histológicas características de la enfermedad. Los cuatro animales de este grupo presentaron grado 3. Los ratones tratados con el APL1 y/ o el MTX presentaron daños histopatológicos articulares leves. Los resultados del análisis histológico se representan en la tabla X. Estos resultados concuerdan con la evaluación clínica y confirmaron el efecto terapéutico del APL1, ya sea administrado de forma individual o combinado con el MTX.

Tabla X. Análisis histopatológico de las articulaciones de los ratones tratados con el péptido APL1 y/o MTX, de los ratones enfermos no tratados y de los ratones sanos.

Grupos	animal	grado de daño histopatológico
I Placebo	1	3
	2	3
	3	3
	4	3
II tratamiento con el APL1	1	1
	2	0
	3	0
	4	2
III tratamiento con MTX	1	0
	2	1
	3	2
	4	0
IV tratamiento con el APL1 y MTX	1	0
	2	0
	3	1
	4	0
V Sanas	1	0
	2	0
	3	0
	4	0

Los resultados del análisis histopatológico quedan ilustrados en la figura 27. En la figura 27A se muestra una imagen de la articulación de un animal del grupo sano, donde se puede observar el espacio intra-articular bien definido así como el cartílago y el hueso intactos. En la figura 27 B se muestran los daños articulares en uno de los ratones del grupo placebo (grado 3). En las figuras 27 C, D y E se muestran imágenes

de las articulaciones de animales representativos de los grupos tratados con el APL-1, el MTX y con ambos, respectivamente, en los cuales se denota que los daños histológicos en las articulaciones son leves.

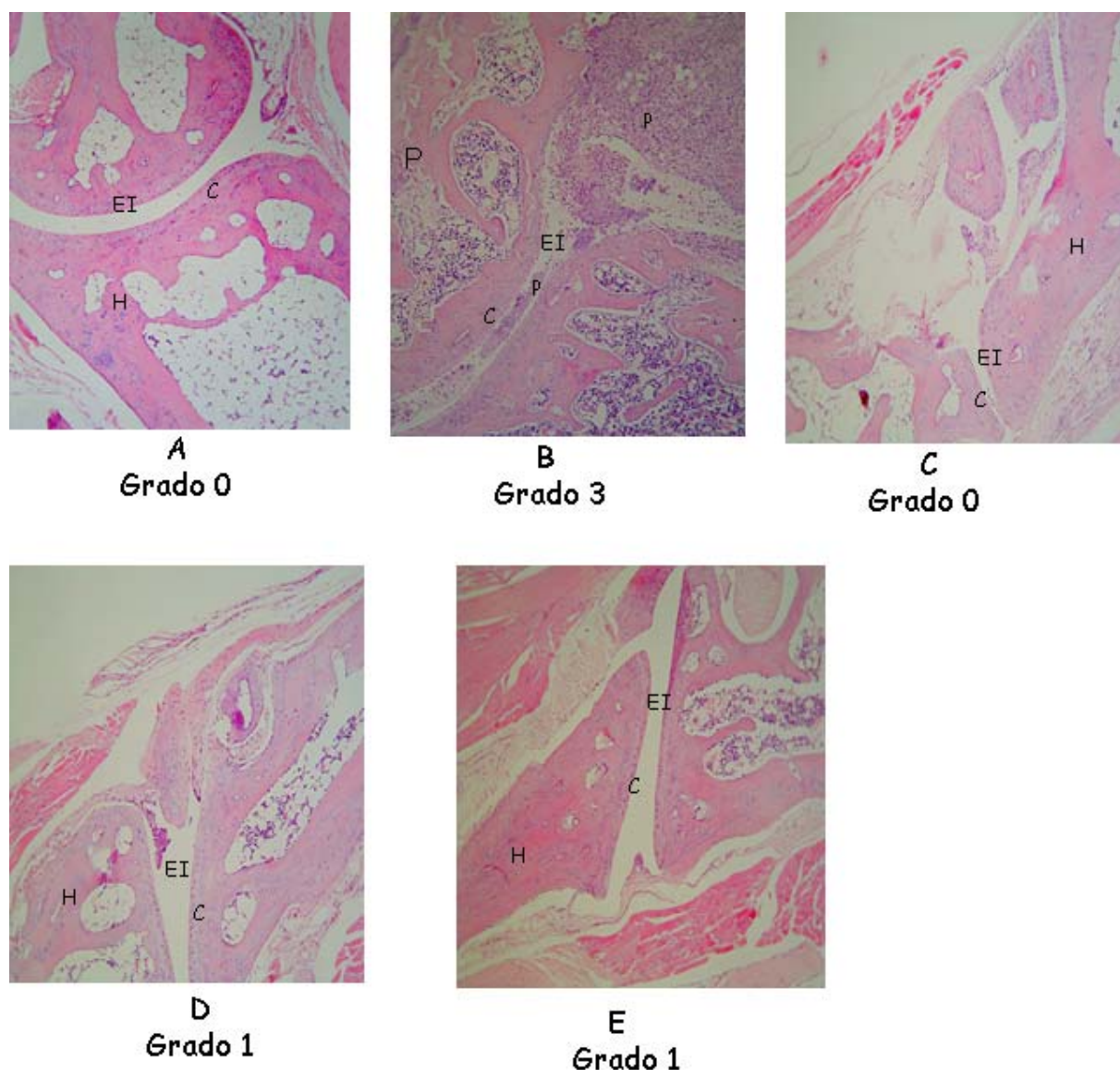


Figura 27. Imágenes correspondientes a la microscopía óptica de una sección de la articulación de un animal representativo de cada grupo. A: sano. B: placebo. C: tratado con el APL1. D: tratado con MTX. E: tratado con la combinación APL1 y MTX. Tinción hematoxilina-eosina. Magnificación original de 10 X. EI: Espacio Intra-articular; H: Hueso; C: Cartílago; P: *pannus*. Se representa además el grado asignado a cada imagen de acuerdo a la escala confeccionada para medir el daño histológico.

Las Treg son importantes en la patogénesis de la AIC. La inmunización de los ratones DBA-1 con CII provoca que las Treg pierdan en parte su actividad supresora (278). Previamente, demostramos que el tratamiento de las ratas con el APL1 en el modelo

de AA aumentó el porcentaje de las Treg en el bazo. Igualmente se analizó la variación en la frecuencia de Treg con fenotipo $CD4^+Foxp3^+$ en tres ratones de cada grupo de tratamiento, sacrificados el día 46 después de inducida la AIC. Las figuras 28A y 28B ilustran el marcaje representativo de las muestras correspondientes a un ratón del grupo tratado con la combinación APL1 y MTX y un ratón del grupo placebo, respectivamente.

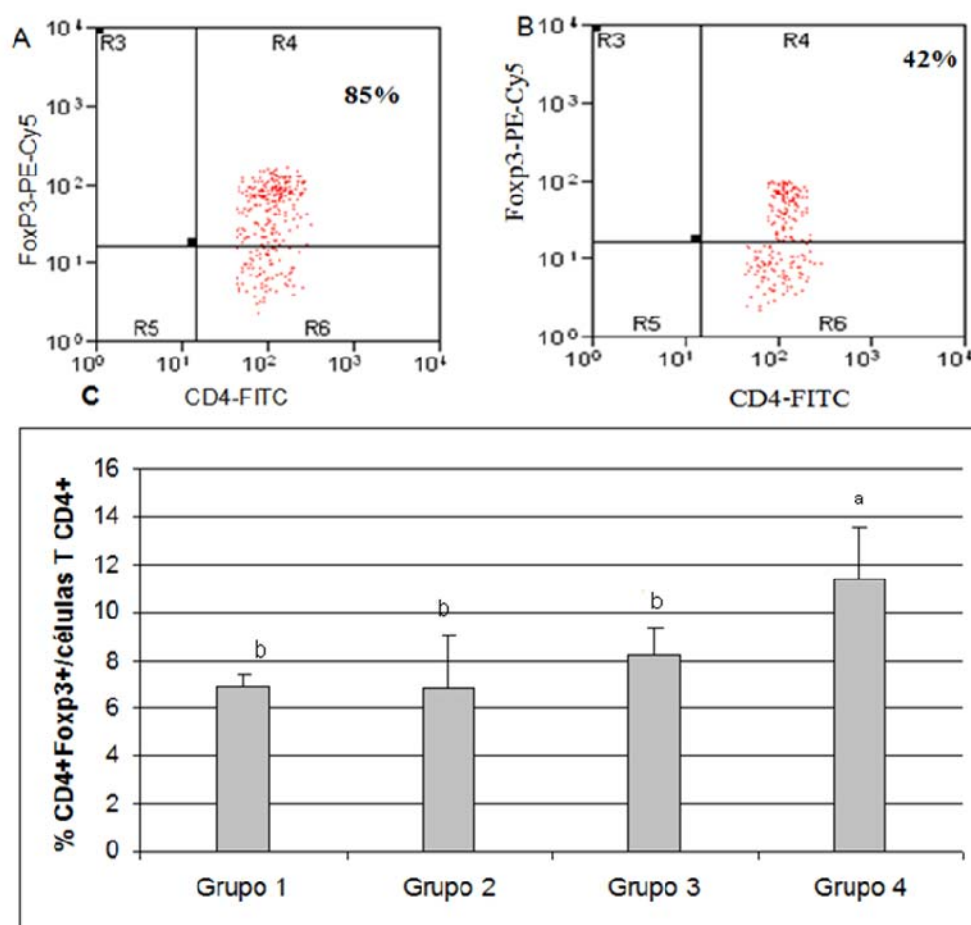


Figura 28 (A-B) Análisis por citometría de flujo de los esplenocitos marcados con los anticuerpos monoclonales para CD4 y Foxp3. Los datos corresponden a un ratón del grupo tratado simultáneamente con el APL1 y MTX (A) y a un ratón del grupo placebo (B). La región representada como R4 en los diagramas de puntos corresponde a las células dobles positivas para ambos marcadores. Los números representan el porcentaje de células T Foxp3⁺ del total de células T CD4⁺. (C) Porcentaje de células T que expresan el fenotipo CD4⁺ Foxp3⁺ aisladas del bazo de los ratones sacrificados el día 46 después de inducida la AIC. Las barras representan el promedio de tres ratones analizados por grupo de estudio + la desviación estándar. Grupo 1: animales enfermos inoculados con PBS (placebo), Grupo 2: animales tratados con el APL1, Grupo 3: animales tratados con MTX, Grupo 4: animales tratados con la combinación del APL1 y MTX. Para el análisis de los datos se emplearon las pruebas estadísticas *Kruskal-Wallis* y *Dunn*. Letras diferentes significan diferencias estadísticamente significativas para $P < 0.05$.

En este análisis promediamos el porcentaje de Treg con fenotipo CD4+Foxp3+ en cada grupo de tratamiento. Los resultados mostraron que el tratamiento de los animales con la combinación del APL1 y el MTX incrementa significativamente el porcentaje de Treg con fenotipo CD4+Foxp3+ respecto al grupo placebo, al grupo tratado con el APL1 y al tratado con MTX ($P<0.05$) (figura 28 C).

En este experimento no encontramos variación significativa en la expresión de la molécula CD25 entre los grupos de estudio ($P>0.05$). El porcentaje de expresión de este marcador en la población de células CD4+Foxp3+ fue aproximadamente de 75 % en todos los casos

El TNF α está también involucrado en la patogénesis de la AIC (279). En este ensayo se cuantificaron los niveles de esta citocina en el suero de tres animales de los sacrificados por grupo el día 46, después de inducida la enfermedad. Tanto el tratamiento con el APL1 o con el MTX, así como la combinación de estos disminuyeron significativamente los niveles de TNF α con relación al grupo placebo. Por otra parte, los tratamientos con el MTX y con la combinación disminuyeron significativamente los niveles de TNF α respecto al grupo de animales tratados con el APL1, para una $P<0.05$ (figura 29). No se observaron diferencias entre los grupos de animales tratados con el MTX o su combinación con el APL1 y los animales sanos ($P>0.05$).

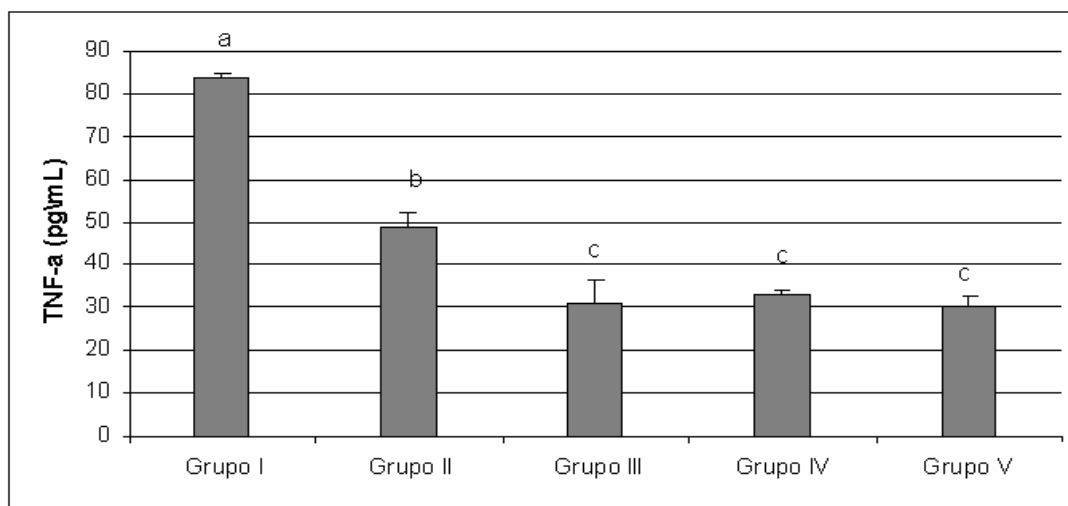


Figura 29. Cuantificación de los niveles del TNF α el día 46 después de inducida la AIC. Los niveles de esta citocina se cuantificaron por ELISA a partir del suero de cada animal. Las barras representan el promedio + la desviación estándar de tres réplicas a partir de tres animales por grupo. Grupo I: animales enfermos inoculadas con PBS (placebo), Grupo II: animales tratados con el APL1, Grupo III: animales tratados con MTX, Grupo IV: animales tratados con la combinación APL1 y MTX, Grupo V: ratas sanas sin tratamiento. Para el análisis de los datos se emplearon las pruebas estadísticas *Kruskal-Wallis* y *Dunn*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas $P<0.05$.

DISCUSIÓN

IV. Discusión

A partir de la década de los 90 del siglo pasado, se ha progresado notablemente en la comprensión de los mecanismos moleculares que median el curso de la AR. Estos conocimientos sirvieron de base para la generación de varios fármacos incluidos en la denominada terapia biológica. Dentro de esta terapia, los fármacos dirigidos a interferir las funciones del TNF α son considerados los más exitosos (18). Sin embargo, los inhibidores del TNF α presentan un conjunto de reacciones adversas (20,21) y aproximadamente el 50 % de los pacientes no responden al tratamiento (19).

El reto principal en la obtención de nuevos fármacos para la AR está en el desarrollo de estrategias terapéuticas que inhiban las células T CD4+ involucradas en la patogénesis de la enfermedad, sin afectar al resto de las células T y de otras que forman parte de la respuesta inmune innata y adquirida.

El concepto terapéutico presentado en este trabajo está basado en la inducción de tolerancia periférica, a través del uso de un APL derivado de la HSP60 humana. Esta estrategia se dirige precisamente a atenuar la actividad de las células T CD4+ involucradas en la respuesta autoinmune patológica. Por tanto, no debe causar la marcada inmunosupresión que generan las terapias biológicas actuales (280,281,282,283).

La estrategia que proponemos se basa en la posibilidad de manipular las propiedades intrínsecas de ligandos peptídicos, identificados como epitopos de células T para alterar apropiadamente el curso de la respuesta autoinmune e inducir tolerancia periférica.

Para el diseño de los APLs, entre todas las moléculas identificadas como autoantígenos en la AR, se seleccionó la HSP60, debido a varias características de esta proteína:

- La HSP60 es considerada como un autoantígeno, que está involucrado en la patogénesis de varias enfermedades autoinmunes como: AR, artritis idiopática juvenil, diabetes tipo I y la enfermedad de Cronh (25).
- La familia de las HSPs agrupa a las proteínas más conservadas en la escala evolutiva, sin embargo son muy inmunogénicas de una especie a otra (29).
- La HSP60 puede ser usada como un inductor de AR en el modelo de AA. Pero, la inmunización de las ratas con un epitopo conservado de esta proteína, aumenta la resistencia a una posterior inducción de la enfermedad (26).

- La presencia de anticuerpos y células T que reconocen a la HSP60 en pacientes con artritis idiopática juvenil oligoarticular, se asocia con la remisión total de la enfermedad (284).

-Los seres humanos estamos en contacto repetidos con esta proteína, por ejemplo: durante las infecciones, vacunaciones y en la convivencia con las bacterias comensales. Estos contactos pudieran inducir una respuesta inmune reguladora hacia este antígeno (29).

Por último, varios autores han planteado que péptidos derivados de la HSP60 pueden tener un papel en la amplificación de los procesos autoinmunes fisiológicos (30,285,286). Estos péptidos pudieran ser identificados como una señal de peligro e inducir una respuesta inflamatoria fisiológica, que contribuye a la eliminación del patógeno. Pero a su vez, pudieran inducir clones de células T con función reguladora (287).

A partir de la secuencia de la HSP60, con el uso del programa Proped, identificamos una nueva región con posibles epitopos de células T ubicado hacia la región N-terminal de la proteína. Los ensayos *in vitro* corroboraron los resultados de la predicción, ya que demostraron que el péptido era capaz de inducir la proliferación de células T CD4+ provenientes de tres donantes sanos y aumentar significativamente los niveles de las citocinas TNF α e IFN γ en los cultivos de PBMC aisladas de pacientes con AR. Estos hechos sugieren que este péptido induce un fenotipo TH1 en las células T CD4+ presentes en los cultivos de PBMC aisladas de los pacientes.

Es de esperar que este péptido pudiera inducir tolerancia en pacientes con AR. Lograr este efecto depende fundamentalmente de la dosis, la frecuencia y la vía de administración del antígeno. La vía más apropiada es la oral, debido a las características de las APCs presentes en el intestino delgado (236,237,238). Varios ensayos clínicos se han ejecutado con el uso de autoantígenos por vía oral para el tratamiento de la AR y otras enfermedades autoinmunes, pero los resultados obtenidos no han demostrado una mejoría significativa en los pacientes (231,232,233,288,289). Contrario a estos resultados, Koffeman y col. concluyeron con resultados satisfactorios un ensayo clínico (fase II) con un péptido derivado de la HSP40 de *E. coli*, administrado por vía oral a pacientes con AR. En este caso, el péptido fue formulado en condiciones tales que evade la degradación gástrica y es liberado en el intestino. Este péptido fue clasificado como un TH1 antes del ensayo clínico, ya que en ensayos *ex vivo* con

PBMC aisladas de pacientes con AR aumenta significativamente los niveles de IL-2 e IFN γ (24).

En el CIGB no contamos con el desarrollo de formulaciones que permitan la liberación entérica de los péptidos. Por otra parte, inducir tolerancia en pacientes con un péptido TH1 variando la dosis o la frecuencia de administración, pudiera ser engorroso ya que es difícil extrapolar los resultados que pudiéramos obtener en los modelos animales hacia el tratamiento de pacientes. Uno de los factores fundamentales que influyen en este hecho, es el polimorfismo de las moléculas HLA clase II.

Tomando en consideración estos factores, decidimos explorar el concepto de inducción de tolerancia con APLs y no con el péptido original. Estos ligandos peptídicos modificados, permiten modular el curso de la respuesta por diversos mecanismos. En el caso de las enfermedades autoinmunes, lo apropiado sería un APL que actúe como un agonista parcial o antagonista del epitopo original de células T (249). Las células T CD4 $^{+}$ son activadas por un determinado antígeno peptídico cuando lo reconocen al ser presentado por las APC competentes. No obstante, si estas células T CD4 $^{+}$ se encuentran primero con una forma diferente del antígeno en el que los residuos que contactan con el TCR o con la molécula MHC clase II están ligeramente alterados, puede modificarse la cascada de eventos intracelulares para la activación del linfocito en cuestión, llevándolo a un estado de inactivación (39). Otro mecanismo que puede mediar un APL es la inducción de Treg (35,44).

Clínicamente, el ejemplo representativo del uso de los APLs, lo constituye el Copaxone® en el tratamiento de la esclerosis múltiple. Este fármaco se considera un APL según su mecanismo de acción (250, 251, 252).

Diseñamos tres APLs a partir del epitopo de células T identificado. Se realizaron solamente uno o dos cambios en los posibles sitios de contacto del péptido con la molécula HLA clase II, con el objetivo principal de obtener un APL que modificara el patrón TH1 que induce el péptido original en los experimentos *ex vivo* con las PBMC aisladas de pacientes con AR.

En el diseño de nuestros APLs se tuvo en cuenta también que estos pudieran ser presentados por todas las moléculas HLA clase II relacionadas con la AR que se incluyeron en el estudio. La AR es una enfermedad multifactorial donde el componente genético es importante. Desde la década de los 80 se demostró una asociación entre varios alelos de la molécula HLA clase II y el desarrollo de la enfermedad (83). Cuando identificamos el epitopo de células T derivado de la HSP60, hubo dos alelos (de los 6

incluidos en el estudio) de la molécula HLA clase II que de acuerdo a la predicción no eran capaces de presentar este péptido. La obtención de un candidato terapéutico que pudiera ser presentado por un grupo amplio de moléculas HLA clase II tiene importancia desde el punto de vista práctico, ya que permitiría tratar un mayor número de pacientes. Previamente se comprobó que los pacientes expresaban los alelos incluídos en el análisis, a través del genotipaje de las moléculas HLA clase II.

Los tres APL que se diseñaron podían ser presentados por los seis alelos DR de la molécula HLA clase II incluídos en el estudio, según la predicción del programa Proped. Sin embargo, el APL3 perdió la probabilidad de ser presentado por dos de los alelos, cuando la predicción se repitió fijando un umbral más restrictivo (2%), con el objetivo de reducir los falsos positivos y aumentar la confiabilidad de la predicción. Por lo cual descartamos este péptido. Los APL1 y 2 mantuvieron la probabilidad de ser presentados por todos los alelos aun en condiciones de mayor exigencia.

El APL2 tuvo un efecto similar al péptido nativo sobre la proliferación de células T CD4⁺ aisladas de tres donantes sanos (figura 10). Por su parte el APL1 no tuvo ningún efecto sobre la proliferación de dichas células. El cambio efectuado en el APL1 pudo provocar que las APC utilizadas en el ensayo no lo presentaran a las células T CD4⁺ o que se convirtiera en un ligando nulo.

Otra posibilidad es que el cambio del Asp18 por Leu en el APL1 originara un epitopo que pudiera ser reconocido por células T CD4⁺ con fenotipo regulador. De acuerdo con estos resultados se continuó solamente la evaluación del APL1.

Al inocular ratones BALB/c con el APL1 comprobamos que este indujo un incremento significativo de células T CD4⁺Foxp3⁺, potencialmente supresoras, en el bazo y los dLN (figura 11). Contrario a las Treg humanas, la expresión de Foxp3 correlaciona con la actividad supresora de las Treg en ratones, independientemente de la expresión del marcador CD25 (274).

Por el contrario, el péptido original aumentó el porcentaje de células T CD4⁺ efectoras en los ratones. Según la predicción efectuada a través de los programas RANKPED (270,271) y MHCPRED (272) ambos péptidos contienen epitopos que pudieran ser presentados por la molécula IA^d de los ratones BALB/c. El cambio efectuado en el APL1 crea un nuevo epitopo, según el programa RANKPED, y dos nuevos epitopos según el programa MHCPRED para la molécula IA^d.

Los resultados obtenidos en los ratones BALB/c sugieren que la modificación efectuada en el péptido nativo originó un epitopo capaz de inducir Treg. Estos resultados indican

posibilidades terapéuticas para el APL1 en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, ya que las Treg son capaces de reducir la inflamación e inducir tolerancia (135,143).

Por otra parte, estudios recientes han informado sobre alteraciones en la frecuencia de las Treg en el curso de la AR (169). Así como el reclutamiento de estas hacia el sinovio inflamado de los pacientes y afectaciones en sus funciones supresoras (175). Existen trabajos que demuestran que las funciones supresoras de las Treg pueden restaurarse en los pacientes con AR, después del tratamiento con infliximab (290). Este hallazgo sin dudas fortaleció el mecanismo de acción de los fármacos anti-TNF. Sin embargo, fue encontrado sólo para los pacientes que responden al tratamiento. Obtener un fármaco que induzca Treg con acción supresora para el tratamiento de AR, pero que no afecten otras células que intervienen en la respuesta inmune, sería muy ventajoso.

En nuestro trabajo encontramos que el APL1 induce incrementos en la frecuencia de célula T con fenotipo regulador CD4+CD25^{high}Foxp3+ en los cultivos de las PBMC aisladas de pacientes con AR. Este efecto lo hallamos en los cultivos de las PBMC provenientes de 12 de los 13 pacientes analizados. En el único caso que no encontramos este resultado fue en la paciente 7 (figura 14). Esta paciente se encontraba en la semana 11 de gestación y no presentaba ningún signo ni síntoma de la enfermedad. Hay varios estudios en la literatura que demuestran que el embarazo modifica el curso de la AR en las pacientes (291,292,293).

El APL1 induce Treg en los cultivos de las PBMC aisladas de pacientes con AR, en comparación con los cultivos estimulados con el péptido original y los no estimulados (figura 15). Aunque nos queda por dilucidar si las Treg que induce el APL1 tienen actividad supresora, estos resultados avalan las potencialidades terapéuticas del APL1 ya que el aumento de las Treg en la periferia puede contribuir significativamente a restaurar la tolerancia que se pierde durante el curso de la AR. En nuestro estudio encontramos resultados que indican niveles significativamente más bajos en el porcentaje de Treg derivadas de la sangre de los pacientes con AR en comparación con los donantes sanos (figura 18). Estos resultados coinciden con los encontrados por los grupos de Jiao y Cao (171,175).

La AR, como muchas enfermedades autoinmunes, cursa con períodos de actividad/remisión (3). Es posible que los períodos de remisión sean mediados por Treg específicas hacia epitopos autoantigénicos, dentro de los cuales pueden estar determinados péptidos de la HSP60 (286). Con el objetivo de tener una aproximación

del mecanismo de acción del APL1 y comprobar si las Treg que induce este péptido son específicas para la AR, analizamos la capacidad de este para inducir Treg en cultivos de PBMC aisladas de donantes sanos. Comprobamos que el APL1 no induce incrementos significativos en la frecuencia de Treg en los cultivos de las PBMC aisladas de donantes sanos (figura 17). Estos resultados pueden parecer contradictorios con los encontrados por Zanin-Zhorov y col. Estos autores comprobaron en ensayos *in vitro* que la HSP60 y un péptido derivado de ella potencian la actividad supresora de Treg con fenotipo CD4+CD25+, sobre células T CD4+CD25- aisladas de donantes sanos. Este efecto es mediado por la señalización a través del TLR2 de las Treg. Pero para lograr este efecto es necesario que ambos tipos de células T CD4+ sean fuertemente estimuladas a través de sus TCRs (187). En nuestros ensayos usamos como estímulo solamente el APL1. Previamente habíamos comprobado que el APL1 no induce proliferación de células T CD4+ aisladas de donantes sanos, donde predominan las células T efectoras, por lo que inferimos que no representa un estímulo fuerte para esta población celular. Otra posibilidad podría ser que el mecanismo que media la inducción de las Treg por el APL1 no es a través del TLR2 o que en nuestras condiciones de cultivo no existan las fuentes óptimas de IL-2 necesarias para la expansión de las Treg. Está bien establecido que la expansión de las Treg *in vitro* es dependiente de la señalización por el receptor de IL-2 (135).

Hay un conjunto de evidencias en la literatura científica que fundamentan que la HSP60 controla la actividad de las células T a través de mecanismos dependientes del TCR. Por ejemplo, la vacunación con epitopos de la HSP60 activa Treg específicas, que atenúan la respuesta de las células T efectoras a varios autoantígenos asociados con la diabetes tipo I (insulina, descarboxilasa del ácido glutámico y la propia HSP60). Este efecto es mediado por un cambio de la secreción de IFN γ y a IL-10 (294).

Otro mecanismo que explica como la HSP60 contribuye a la disminución de la inflamación argumenta que péptidos derivados de la Hsp60 pueden ser presentados por células T efectoras activadas a Treg, las cuales pueden provocar la disminución de los efectos proinflamatorios de las células T efectoras tanto *in vitro* como *in vivo*. En este caso el mecanismo es mediado por el TCR (186). La inducción de Treg por el APL1 se encontró para las PBMC aisladas de pacientes, donde la activación de las células T efectoras es marcada debido a la inflamación. En estos momentos no tenemos ninguna evidencia experimental que nos indique que las propias células T CD4+ efectoras actúen como presentadoras del APL1 y activen a las Treg, pero no

podemos descartar esta posibilidad. Estas células T efectoras también pudieran ser la fuente principal de IL-2 para las Treg que induce el APL1.

Otro factor que pudiera influir en estos resultados es las moléculas HLA clase II que expresan los donantes sanos. En el diseño de los APLs incluimos seis moléculas HLA clase II que se asocian con la AR. A diferencia de los pacientes no tenemos genotipadas estas moléculas para los donantes sanos. Es lógico pensar que las APC de estos donantes de no coincidir con las incluidas en el diseño de los APLs, no tengan posibilidades de presentar el péptido a las células CD4⁺ en los ensayos *ex vivo*. Sin embargo, según se puede apreciar en la figura 14, el APL1 induce Treg en estos ensayos cuando se utilizaron PBMC aisladas de los pacientes P3 y P5. Estos pacientes expresan las moléculas DRB1*0308 y DRB1*0108 (tabla II), respectivamente, las cuales no fueron incluidas en el diseño de los APLs. A partir de estos resultados, nosotros nos inclinamos a pensar que la modificación que se realizó en el APL1 lo convirtió en un péptido de los denominados pan-DR. Estos son péptidos que pueden ser presentados por una gama amplia de moléculas HLA clase II. Anterior a nuestro estudio, Kamphuis y col. con el empleo de un programa computacional identificaron cuatro péptidos pan-DR derivados de la HSP60 humana, los cuales aumentan los niveles de IL-10 y TGF- β en ensayos *ex vivo* con células aisladas de pacientes con artritis idiopática juvenil, independientemente de las moléculas HLA clase II que expresan estos (188). Recientemente, de Jong y col. encontraron resultados similares al identificar péptidos pan-DR derivados de esta proteína en pacientes con AR (48).

Pudiera resultar además contradictorio que el APL1 no induzca incrementos significativos en la frecuencia de Treg en los cultivos de PBMC aisladas de donantes sanos y si indujera Treg en ratones BALB/c sanos. Es obvio que para desvanecer esta contradicción hay que considerar que se trata de modelos diferentes. En el caso de los ratones nos encontramos con un sistema que cuenta con los órganos linfoides que garantizan la presentación del antígeno y la amplificación de la respuesta inmune. De hecho la inducción de Treg por el APL1 se encontró en los dLN y el bazo, en el día nueve después que los ratones recibieron la primera dosis del péptido. Sin embargo, el aumento de esta población celular no se encontró en los ndLN. En el caso de los ensayos *in vitro* con PBMC aisladas de los donantes sanos la acción del APL1 es sobre células T CD4⁺ ya existentes en la circulación periférica de estos.

El hecho de que el APL1 induzca células T CD4⁺ con fenotipo regulador en los cultivos de las PBMC aisladas de pacientes con AR se puede explicar sobre la base del papel

que tiene la HSP60 y sus péptidos en la inducción de células T con función reguladora durante la inflamación crónica (30); aspecto que se tuvo en cuenta en la selección de esta proteína como candidato de partida para la inducción de tolerancia. Es posible que la modificación realizada en el péptido original creara un epitopo que puede ser reconocido por Treg que estén circulando en la periferia de los pacientes con AR y que se pueden expandir *in vitro*. La presencia de estas células en la sangre de los pacientes puede deberse a contactos previos con un péptido similar derivado de bacterias.

Contrario al péptido original, el APL1 no aumentó los niveles del TNF α en los sobrenadantes de cultivo de las PBMC de los 13 pacientes analizados. Los niveles de esta citocina fueron muy similares a los cuantificados en los sobrenadantes de los cultivos que no recibieron estímulo peptídico. Este hecho es ventajoso para el posible uso clínico del APL1, debido al rol crucial que tiene el TNF α en la patogénesis de la AR (62). Además nos refuerza las evidencias anteriores que la modificación realizada en el epitopo original cambia sus propiedades inmunogénicas.

Por otra parte, comprobamos en estos ensayos que el APL1 tampoco aumentó los niveles de la citocina IL-10. Esta citocina puede ser secretada por las Treg y mediar su actividad supresora (145,146). Pero, las Treg pueden ejercer sus funciones supresoras a través de otros mecanismos dependientes de contacto celular o asociado con la dependencia del consumo de IL-2 exógena, los cuales pueden inducir apoptosis en las células T efectoras (141,142, 150).

También encontramos que el APL1 tiende a incrementar el porcentaje de células T con fenotipo CD4+CD25^{high}Foxp3+ en los cultivos de SFMC de los tres pacientes analizados (figura 16). Aunque el número de muestras analizadas es bajo y no nos permite arribar a una conclusión, estos resultados preliminares sugieren que el APL1 pudiera aumentar la frecuencia de las Treg en el sinovio de un paciente con AR, sitio en el cual prevalece un ambiente proinflamatorio (175). Es posible que las Treg que induce el APL1 puedan tener funciones supresoras en el sinovio como se ha encontrado para los pacientes que responden al tratamiento con infliximab (176,177).

La capacidad del APL1 para inducir células T CD4+ con fenotipo regulador tanto *in vivo* como *in vitro*, lo convierte en un posible candidato terapéutico para AR y otras enfermedades autoinmunes. Comúnmente el desarrollo de nuevos fármacos impone la evaluación de estos en modelos animales para la enfermedad en cuestión. El efecto terapéutico del APL1 se evaluó en el modelo de AA. La similitud entre el proceso

inflamatorio de la AR y el de la AA en ratas Lewis, han convertido a este modelo animal en una herramienta útil en la evaluación de fármacos para el tratamiento de la artritis autoinmune (190). Por otra parte, las ratas Lewis isogénicas son susceptibles a diversas enfermedades autoinmunes bien caracterizadas, por lo que proveen excelentes modelos para estudiar la inmunoterapia mediada por péptidos (295). En estas ratas la mayoría de las enfermedades asociadas a la respuesta de células T CD4⁺ son restringidas por la molécula RT1.B^I (MHC clase II), que es equivalente a la I^A de ratón (296). La molécula RT1.B^I dentro de las moléculas MHC clase II, parece ser que actúa presentando la mayoría de los epitopos autoantigénicos en las ratas Lewis (297). No tenemos resultados *in vitro* que nos indiquen que el péptido original y el APL1 pueden ser presentados por la molécula RT1.B^I que expresan las ratas Lewis. Pero, ambos péptidos contienen un epitopo que pudiera ser presentado por esta molécula, según el programa MHC2PRED (273).

La terapia con el APL1 provocó un excelente control clínico de la AA en las ratas. La mejoría clínica en los animales fue independiente de la vía de inoculación utilizada (intradérmica o subcutánea) (figura 19). Usualmente, en este modelo la gravedad de la artritis es monitoreada a través del nivel de inflamación en las patas de las ratas y del daño histológico de las articulaciones, mediado por la presencia del *pannus*. A diferencia de la AR, el modelo de AA tiene un curso reversible ya que las ratas se recuperan espontáneamente. La recuperación es mediada por la formación de nuevo tejido óseo (298). Debido a esta característica del modelo animal, la evaluación histológica de los animales tratados con un fármaco en estudio debe realizarse los días donde la inflamación es más grave. En tales condiciones de análisis, demostramos que el tratamiento con el APL1 redujo el daño histológico en las articulaciones de las ratas a niveles prácticamente indetectables (Tabla VIII).

La erosión del cartílago en el modelo de AA es mediado por la activación de células T auto-reactivas (190). En este modelo animal se comprobó que la respuesta fundamental de las células T es contra el péptido 180-188 de la HSP60 del *Mt*. Estas células reconocen de forma cruzada a un autoantígeno presente en el cartílago (26). Sin embargo, una vez que las ratas se recuperan, inmunizaciones posteriores con *Mt* no inducen la artritis. Esta protección es mediada por células T, que reconocen un epitopo conservado de la HSP60 (péptido 256-270), aparentemente con un fenotipo regulador ya que producen IL4 e IL-10 (46). Contrario al péptido original, el APL1 indujo

en el bazo de las ratas un aumento de células T CD4⁺ con fenotipo regulador (figura 22). Estas Treg pudieran migrar a las articulaciones de las ratas y reducir considerablemente la respuesta patológica hacia los autoantígenos, lo cual se corresponde con la marcada reducción del daño histológico articular encontrada en las ratas tratadas con el APL1, por ambas vías de administración.

Por otra parte, el tratamiento con el APL1 reduce significativamente los niveles del TNF α en el bazo de las ratas. Considerando estos resultados, podemos sugerir que el potente efecto terapéutico del APL1 en la reducción de la AA, se debe a que cuando este es procesado y presentado por las APCs a los linfocitos T en la periferia, induce la expansión de células T con fenotipo regulador. Dichas células pueden migrar al sitio de la inflamación y pudieran reconocer al epitopo nativo derivado de la HSP60 endógena. En las articulaciones el epitopo original pudiera estar en altas concentraciones debido al proceso inflamatorio. Este nuevo contacto con el autoantígeno puede provocar un potente efecto inmunoregulador, con la consiguiente atenuación de las células T auto-reactivas, responsables de la patogénesis de la AA. Este evento contribuiría a inhibir la expresión del TNF α en periferia. Adicionalmente, la demostración que el APL1 inhibe la expresión del TNF α en un modelo animal para AR, refuerza sus potencialidades terapéuticas, debido al rol fundamental que tiene esta citocina en la patogénesis de la enfermedad (62).

Contrario a otros autores, no encontramos un aumento de IL-10 en el bazo de las ratas, sacrificadas el día de mayor nivel de inflamación. Prakken y col. demostraron que la terapia con un APL derivado del epitopo 180-188 de la HSP60, administrado por vía intranasal, induce una protección efectiva contra la AA en las ratas Lewis. Esta protección es mediada por la inducción de células T posiblemente reguladoras ya que secretan IL-10 (32). Quintana y col. identificaron un epitopo derivado de la HSP60 humana (péptido 31-50) que reduce la respuesta inflamatoria en el modelo de AA en las ratas Lewis. Este efecto es mediado por células T aparentemente reguladoras, ya que producen IL-10 y TGF β (27). Probablemente el mecanismo que induce el APL1 no es mediado por IL-10. Las células T CD4⁺ con fenotipo regulador que induce el APL1 pueden ejercer su actividad supresora a través de otros mecanismos que no son dependientes de citocinas (141-144, 148 y 149). Pero también pudieran actuar a través de la secreción de las citocinas TGF β (145) e IL-35 (147), las cuales no fueron determinadas en nuestro estudio.

Una vez que las ratas Lewis son inmunizadas con *Mt*, el curso de la AA es mediado por células T CD4+ que reconocen tanto a la HSP60 del *Mt* como a la endógena (46). El APL1 es derivado de la HSP60 humana, pero esta región tiene un 100% de homología con la de rata. Tomando en consideración estos dos factores, es lógico pensar que el efecto terapéutico que ejerce el APL1 en el modelo de AA, puede estar favorecido por el papel regulador de las células T CD4+ específicas a la HSP60 endógena en el curso de la enfermedad (26).

En este punto, es obvio preguntarse si el APL1 puede tener algún efecto terapéutico en un modelo animal para la AR donde la enfermedad se induzca con otro autoantígeno. Para dar respuesta a esta interrogante seleccionamos el modelo de AIC en ratones DBA-1. El CII constituye el componente mayoritario del cartílago articular y es considerado uno de los autoantígenos fundamentales involucrados en la patogénesis de la AR (299,300). La similitud de la AIC con la AR ha convertido a este modelo en el de referencia para los estudios de evaluación de nuevos fármacos para esta patología (189).

Tanto la AR como la AIC son caracterizadas por la presencia de depósitos de fibrina, hiperplasia de la membrana sinovial y la formación del *pannus*, que conllevan a la degradación del cartílago y del hueso. A diferencia de la AA, en la AIC se observa la presencia del factor reumatoide (301). En la progresión de la AIC tienen un papel fundamental tanto los linfocitos B que producen anticuerpos contra el CII endógeno, como células T CD4+ específicas a esta molécula (189).

La AIC como la AR están asociadas con la expresión de determinados alelos de las moléculas MHC clase II. En ratones la susceptibilidad a la AIC se asocia predominantemente con la molécula I-A^q. Esta molécula une la misma región del péptido inmunodominante del CII que presenta el alelo DRB1*0401 de la molécula HLA clase II, la cual se asocia con una predisposición a padecer la AR (302). No tenemos evidencias *in vitro* que demuestren que el APL1 puede ser presentado por la molécula I-A^q de los ratones DBA-1, pero este péptido tiene un epitopo que pudiera ser presentado por dicha molécula, según la predicción del programa RANKPED (270,271). El posible epitopo que pudiera ser presentado por la molécula I-A^q está localizado hacia la región central del APL1, que coincide con la región donde se localizan los posibles epitopos del péptido original y el APL1 que pudieran ser presentados por las moléculas

HLA clase II (incluidas en el estudio), por la molécula I-A^d de los ratones BALB/c y la molécula RT1.B^I de las ratas Lewis.

La terapia con el APL1 redujo el curso de la AIC en los ratones. Esta reducción estuvo al mismo nivel de la que provocó el MTX (figura 25). En el modelo de AIC, la gravedad de la artritis es también monitoreada a través del nivel de inflamación en las patas de los ratones y del daño histológico en las articulaciones. Lurros y William plantean que los altos niveles de TNF α e IL-1 que producen los macrófagos y neutrófilos que infiltran la membrana sinovial tienen un papel muy importante, en la patogénesis de la AIC. El TNF α pasa a la circulación periférica contribuyendo a la patogénesis de la enfermedad. Por su parte, la IL-1 contribuye a aumentar la infiltración de células fagocíticas, que progresivamente dan lugar a la formación del *pannus* (193). En los ratones tratados con el APL1, con el MTX o la combinación de ambos no se evidenció la presencia del *pannus* y los daños articulares fueron leves (tabla X). Estos resultados sugieren que no se produjo una infiltración masiva de macrófagos y neutrófilos en la membrana sinovial. Esto se corresponde con la disminución de los niveles del TNF α encontrada en el suero de los animales tratados con respecto al grupo placebo. Neurath y col. demostraron que el tratamiento con MTX por vía intraperitoneal reduce los niveles del TNF α e IFN γ en el suero de los ratones con AIC (303). Nuestros resultados coinciden con estos autores, ya que detectamos una disminución de los niveles del TNF α en el suero de los ratones tratados con MTX. Esta disminución está al mismo nivel que la detectada en los ratones tratados con la combinación y los ratones sanos (figura 29). Este hecho apunta que aun cuando el APL1 se combine con el MTX, no debe causar la inmunosupresión que generan los fármacos anti-TNF α .

Sin embargo, no encontramos un aumento de células T CD4⁺ con fenotipo regulador en el bazo de los animales tratados con el APL1, como en el modelo de AA. La terapia con el MTX tampoco aumentó los niveles de Treg. Contrario a estos resultados, el tratamiento combinado del APL1 y el MTX indujo un aumento significativo de células T CD4⁺ con fenotipo regulador en el bazo de los animales (figura 28). Es posible que el mecanismo de acción del MTX que conlleva a la disminución de los neutrófilos y macrófagos que conforman el *pannus* en la AR y que secretan los altos niveles de TNF α e IFN γ (198), facilite la expansión de Treg por el APL1 que fueron detectadas el día que se realizó el análisis. El tratamiento con la combinación produjo una disminución significativa de los niveles del TNF α en el suero, en comparación con la

que provocó el tratamiento con el APL1. Por otra parte, la terapia combinada originó en los animales una reducción significativa de los signos clínicos en el día 34 respecto al grupo placebo, o sea con tres días de antelación en relación a los otros dos grupos de animales tratados con el APL1 o el MTX (figura 25). Estos resultados sugieren que los mecanismos de acción del MTX y el APL1 pueden tener un efecto complementario que potencien sus efectos terapéuticos en el modelo de AIC.

Aunque el MTX se ha evaluado en el modelo de AIC su mecanismo de acción no se asocia con un aumento de Treg (199,304). Tomando en consideración este hecho, es lógico pensar que el incremento de esta población celular encontrada en la terapia combinada sea debido al mecanismo de acción del APL1.

Por otra parte, no hallamos una reducción de los signos clínicos en los ratones tratados con la combinación en comparación con los tratados con el APL1 o el MTX, en los restantes días en que se evaluaron estos, incluido el día 46, en cual encontramos un aumento de los niveles de Treg. Es posible que la segunda dosis de CII administrada el día 21, la cual contribuye a potenciar el curso crónico de la AIC, unido al hecho de iniciar la terapia cuando el grado de inflamación en los ratones superaba los cinco puntos (figura 25) no permitieron la reducción de los signos clínicos el día 46 en los animales tratados con la combinación, respecto a los otros dos grupos de tratamiento. Usualmente en este biomodelo la evaluación terapéutica de nuevos candidatos, se inicia una vez que la AIC está establecida en los ratones, es decir cuando estos alcanzan uno o dos puntos en la escala que mide los signos clínicos (259, 260). Con el objetivo futuro de evaluar el potencial terapéutico de la combinación respecto a los tratamientos individuales sería oportuno continuar con la evaluación clínica después del día 46, evaluar otros esquemas terapéuticos para el APL1, así como evaluar otras vías de administración para el MTX, ya que la vía intraperitoneal no es factible para el tratamiento de la AR e incluso variar las dosis del MTX.

En el caso de la terapia con el APL1 en el modelo de AIC, sería conveniente analizar la población de Treg en los dLN o en las propias articulaciones de los ratones, o en otros días del tratamiento. Es posible que la terapia con el APL1 pudiera inducir células T CD4+ con fenotipo regulador como sucedió en el modelo de AA y en la terapia combinada, que pudieran reducir la inflamación por diversos mecanismos (141-149), pero que no detectamos en el bazo el día seleccionado. Es probable que estas células quedaran reclutadas en la articulación de los ratones debido a la cronicidad de la AIC,

proceso similar al descrito para los pacientes con AR, donde las Treg quedan retenidas en el sinovio inflamado (170). Al combinar el APL1 con el MTX, hay una reducción mayor de los niveles del TNF α en el suero en comparación con los animales tratados con el APL1. Esto puede ser un reflejo de que el ambiente proinflamatorio en el sinovio de los ratones tratados con el APL1 y el MTX es menor y por tanto no hay retención de las Treg inducidas por el APL1.

La evaluación terapéutica del APL1 en el modelo de AIC evidenció que este reduce la respuesta patogénica en los ratones DBA-1, aun cuando el antígeno inductor de la enfermedad no es la HSP60. Por otra parte, el modelo de AIC es considerado el modelo de referencia para los estudios de AR (189). La demostración clínica e histológica de que el APL1 reduce la gravedad de la AIC al nivel del MTX, avalan las posibilidades terapéuticas de este péptido ya que este medicamento es considerado el de primera línea para el tratamiento de la AR (305). Además el MTX se ha usado ampliamente de forma combinada con los medicamentos clasificados como biológicos en el tratamiento de la AR. Existe información en la literatura de numerosos ensayos clínicos que demostraron que estos fármacos biológicos son más eficaces cuando se combinan con el MTX (18,19,204).

Nuestros resultados demostraron que la terapia combinada del APL1 con el MTX es efectiva en el tratamiento de los ratones con AIC. Aunque es necesario profundizar en los mecanismos moleculares que induce tanto el tratamiento con el APL1 como su combinación con el MTX en este modelo. Estos resultados sustentan futuras investigaciones para el uso de esta combinación en el tratamiento de la AR.

La inducción de tolerancia hacia antígenos propios es indispensable para la homeostasis inmune y el control de las células T auto-reactivas responsables del inicio y curso de las enfermedades autoinmunes. Los resultados de este trabajo indican que el mecanismo de acción del APL1 está relacionado con la inducción de Treg en varios modelos experimentales. Es posible que este mecanismo pueda interferir la respuesta de las células T auto-reactivas y contribuir al restablecimiento de la tolerancia periférica que se pierde como parte del curso de la AR, sin causar inmunosupresión. Las potencialidades terapéuticas del APL1 pudieran ser extensivas a otras enfermedades autoinmunes donde la HSP60 es un autoantígeno como: diabetes tipo I, artritis idiopática juvenil y la enfermedad de Crohn.

Los resultados compilados en este documento han contribuido a respaldar el uso del APL1 en el tratamiento de pacientes con AR. Actualmente disponemos de una formulación estable de este péptido y se concluyeron satisfactoriamente los estudios de toxicología. Está en preparación el documento de solicitud de autorización al CECMED para la ejecución de un ensayo clínico (fase I) en pacientes con artritis reumatoide.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Se identificó un péptido (E18-3) de la HSP60 humana que contiene nuevos epitopos de células T, que pudieran ser presentados por varios alelos de la molécula HLA clase II, asociados con la artritis reumatoide. Este péptido induce un fenotipo TH1 en las células T CD4+ presentes en los cultivos de PBMC aisladas de pacientes con artritis reumatoide.
2. El cambio de un aminoácido en una de las probables posiciones esenciales de contacto del péptido E18-3 con la molécula HLA clase II, determinado a partir de predicción computacional, dio lugar a un APL que fue capaz de modificar la respuesta TH1 inducida por el péptido original hacia una respuesta de fenotipo regulador, lo que confirma la relevancia de un solo aminoácido en una secuencia peptídica en la regulación de la respuesta inmune.
3. El APL1 ejerce un potente efecto terapéutico en el modelo de artritis inducida por adyuvante. Además reduce la respuesta patogénica en el modelo de artritis inducida por colágeno de forma similar al MTX. En ambos modelos la reducción de la enfermedad estuvo en correspondencia con una disminución de los niveles del TNF α y la inducción de Treg, lo cual sugiere el uso del APL1 en el tratamiento de otras enfermedades autoinmunes donde la HSP60 es considerada un autoantígeno como: diabetes tipo I, artritis idiopática juvenil y la enfermedad de Crohn.
4. La combinación del APL1 y el MTX es efectiva en el tratamiento de los ratones con artritis inducida por colágeno e induce Treg en el bazo de los animales. Esta combinación podría ser aplicable a los pacientes con artritis reumatoide, al combinar el efecto anti-inflamatorio del MTX con el efecto regulador del APL1 y sustenta la posible inserción de este péptido en la primera línea de tratamiento de dicha enfermedad.

RECOMENDACIONES

Recomendaciones

1. Evaluar la afinidad relativa del péptido E18-3 y el APL1 por las moléculas HLA clase II relacionadas con la artritis reumatoide.
2. Evaluar la capacidad supresora de las Treg que induce el APL1 en los ensayos *ex vivo* y en los modelos animales, así como el mecanismo de inmunosupresión involucrado.
3. Analizar el efecto combinado del APL1 y la IL-2 en la inducción de Treg en los ensayos *ex vivo* con PBMC aisladas de donantes sanos.
4. Evaluar los niveles de las citocinas IL-17, IL-35 y TGF- β en las ratas con artritis inducida por adyuvante y los ratones con artritis inducida por colágeno tratados con el APL1, además de los niveles de IL-10 en estos últimos.
5. Analizar el porcentaje de Treg en los dLN de los ratones con artritis inducida por colágeno tratados con el APL1. Evaluar otros protocolos terapéuticos con el APL1 y la combinación de este con el MTX en el modelo de artritis inducida por colágeno.
6. Ejecutar un ensayo clínico (fase I) con el APL1 en pacientes con artritis reumatoide.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXO

AUTOBIBLIOGRAFÍA

Referencias Bibliográficas

- ¹ **Prattm AG, Isaacs J D y Matthey DL** (2009). Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis. *Best.Pract.Res.Clin.Rheumatol* 23: 37-48.
- ² **Shiozawa S y Tsumiyama K** (2009). Pathogenesis of rheumatoid arthritis and Fos/AP-1. *Cell Cycle* 8: 1539-43.
- ³ **Sokka T y col.** (2009). Women, men, and rheumatoid arthritis: analyses of disease activity, disease characteristics, and treatments in the QUEST-RA study. *Arthritis Res.Ther.*11: R7.
- ⁴ **Zanelli E, Breedveld FC y de Vries R** (2000). HLA Class II Association with Rheumatoid. Arthritis. Facts and Interpretations. *Human Immunology* 61:1254-1261.
- ⁵ **Albert LJ** (1999). Mechanisms of Disease: Molecular Mimicry and Autoimmunity. *N Eng J Med* 341: 2068-2074.
- ⁶ **Cope A. P** (2008). T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.Ther.* 10 Suppl 1: S1.
- ⁷ **Myew-Ling T y Pierre M** (2007). The role of T cells in rheumatoid arthritis: new subsets and new targets. *Current Opinion in Rheumatology* 19:284-288.
- ⁸ **Gaffen SL.** (2009). The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.*11: 365-70.
- ⁹ **Nanki T y col.** (2009). Chemokine receptor expression and functional effects of chemokines on B cells: implication in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.Ther.* 11: R149.
- ¹⁰ **Cascao R, Rosario HS y Fonseca JE.** (2009). Neutrophils: warriors and commanders immune mediated inflammatory diseases. *Acta Reumatol.Port.* 34.2B: 313-26.
- ¹¹ **Zautra AJ, Parrish BP, Van Puymbroeck MC, Tennen H, Davis MC, Reich JW y col** (2007). Depresión history, stress, and pain in rheumatoid arthritis patient. *J Beba Med* 30:187-197.
- ¹² **Feldmann M, Bernnan FM, Foxwell BM y Maini RN** (2001). The role of TNF alpha and IL-1 in rheumatoid arthritis. *Curr Dir Autoimmune* 3: 188-199.
- ¹³ **Jiang Y y col.** (2000). A multicenter, double-blind, doseranging, randomized, placebo controlled study of recombinant human interleukin1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis: radiologic progression and correlation of Genant and Larsen scores. *Arthritis Rheum.* 43:1001–1009
- ¹⁴ **Maini RN y col.** (2006). Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, tocilizumab, in European patients with rheumatoid

arthritis who had an incomplete response to methotrexate. *Arthritis Rheum.* 54: 2817–2829

¹⁵ **Emery P y col.** (2008). IL-6 receptor inhibition with tocilizumab improves treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumour necrosis factor biologicals: results from a to 24 week multicentre randomised Placebo-controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* 67:1516–1523

¹⁶ **Genovese MC y col.** (2005). Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition. *N Engl J. Med.* 353:1114–1123

¹⁷ **Schiff M y col** (2008). Efficacy and safety of abatacept or infliximab vs placebo in ATTEST: a phase III, multi-centre, randomised, double-blind, placebo controlled study in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate. *Ann. Rheum. Dis.* 67:1096–1103

¹⁸ **van Vollenhoven RF** (2009). Treatment of rheumatoid arthritis: state of the art. *Nat. Rev. Rheumatol.* 5: 531–541.

¹⁹ **Breedveld FC, Weisman MH, Kavanaugh AF, Cohen SB, Pavelka K, van Vollenhoven R y col.** (2006) The PREMIER study: a multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis Rheum* 54: 26-37.

²⁰ **Kooloos WM, de Jong DJ, Huizinga TWJ y Guchelaar HJ** (2007). Potential role of pharmacogenetics in anti-TNF treatment of rheumatoid arthritis and Crohn's disease. *Drug Discovery Today* 12: 125-31.

²¹ **Welsing PM, Severens JL, Hartman M, van Riel PL y Laan RF** (2004). Modeling the 5-years cost effectiveness of treatment strategies including tumor necrosis factor-blocking agents and leflunomide for treating rheumatoid arthritis in the Netherlands. *Arthritis Rheum* 51:964-973.

²² **Kobayashi M y col.** (2007). Altered B:9-23 insulin, when administered intradermally with cholera toxin adjuvant, suppresses the expression of insulin autoantibodies and prevents diabetes. *J.Immunol* 179:2082-88.

²³ **Satpute S R, Durai M y Moudgil K D** (2008). Antigen-specific tolerogenic and immunomodulatory strategies for the treatment of autoimmune arthritis. *Semin.Arthritis Rheum.* 38:195-207.

²⁴ **Koffeman EC y col.** (2009). Epitope-specific immunotherapy of rheumatoid arthritis: clinical responsiveness occurs with immune deviation and relies on the expression of a cluster of molecules associated with T cell tolerance in a double-blind, placebo-controlled, pilot phase II trial. *Arthritis Rheum.* 60: 3207-16.

²⁵ **Rajaiah R y Moudgil KD.** (2008). Heat-shock proteins can promote as well as regulate autoimmunity. *Autoimmun Rev* 8: 388-93.

-
- ²⁶ **Anderton SM, Zee R, Prakken B, Noordzij A y van Eden W.** (1995). Activation of T cells recognizing self 60- kD heat shock protein can protect against experimental arthritis. *J. Exp. Med.* 181: 943-952.
- ²⁷ **Quintana FJ, Carmi P, Mor F e Cohen IR.** (2003) DNA fragments of the human 60-kDa heat shock protein (HSP60) vaccinate against adjuvant arthritis: identification of a regulatory HSP60 peptide. *J Immunol* 171: 3533-41.
- ²⁸ **Cohen IR, Quintana FJ y Mimran A** (2004). T regs in T cell vaccination: exploring the regulation of regulation. *J Clin Invest* 114:1227–1232.
- ²⁹ **van Eden W, van der Zee R y Prakken B.** (2005). Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 5: 318–330.
- ³⁰ **van Eden W, Prakken AB y Albani S.** (2007). Immunological tolerance in the therapy of rheumatoid arthritis. *Discov. Med.* 7:46-50.
- ³¹ **Huurman VAL y col.** (2008). Immunological efficacy of heat shock protein 60 peptide DiaPep277™ therapy in clinical type I diabetes. *Clinical and Experimental Immunology* 152: 488-497.
- ³² **Prakken BJ y col.** (2002). Inhibition of adjuvant-induced arthritis by interleukin-10-driven regulatory cells induced via nasal administration of a peptide analog of an arthritis-related heat-shock protein 60 T cell epitope. *Arthritis Rheum.* 46: 1937-46.
- ³³ **Ohnishi Y y col.** (2006). Altered peptide ligands control type II collagen-reactive T cells from rheumatoid arthritis patients. *Mod.Rheumatol* 16: 226-28.
- ³⁴ **Mantzourani ED y col.** (2006). A putative bioactive conformation for the altered peptide ligand of myelin basic protein and inhibitor of experimental autoimmune encephalomyelitis [Arg91, Ala96] MBP87-99. *J.Mol.Graph.Model.* 25: 17-29.
- ³⁵ **Ben David H y col.** (2007). A dual altered peptide ligand inhibits myasthenia gravis associated responses by inducing phosphorylated extracellular-regulated kinase 1,2 that upregulates CD4+CD25+Foxp3+ cells. *Scand.J.Immunol.* 65: 567-76.
- ³⁶ **Myers LK y col.** (2007). An altered peptide ligand of type II collagen suppresses autoimmune arthritis. *Crit Rev.Immunol.* 27:345-56.
- ³⁷ **Li R, Li X y Li Z** (2009). Altered collagen II 263-272 peptide immunization induces inhibition of collagen-induced arthritis through a shift toward Th2-type response. *Tissue Antigens* 73: 341-47.
- ³⁸ **Wakamatsu E y col.** (2009). Altered peptide ligands regulate type II collagen-induced arthritis in mice. *Mod.Rheumatol* 19: 366-71.
- ³⁹ **Bielekova B y Martin R.** (2001). Antigen-specific immunomodulation via altered peptide ligands. *J Mol Med.* 79: 552-565.

-
- ⁴⁰ **Brogdon J, Leintenberg D y Bottomly K.** (2002). The potency of TCR signaling differentially regulates NFATc/p activity and early IL-4 transcription in naïve CD4+ T cells. *The Journal of Immunol* 168: 3825-3832.
- ⁴¹ **Paas-Rozner M, Sela M y Mozes E.** (2003). A dual altered peptide ligand down-regulates myasthenogenic T cell responses by up-regulating CD25- and CTLA-4-expressing CD4 + T cells. *PANS* 100: 6676 -81
- ⁴² **Ben-David H, Sela M y Mozes E** (2005). Down-regulation of myasthenogenic T cell response by a dual altered peptide ligand via CD4+CD25+-regulated events leading to apoptosis. *PNAS* 102: 2028:2033.
- ⁴³ **Katsara M, Deraos G, Tselios T, Matsoukas J, Friligou I, Apostolopoulos V y col.** (2008). Design of Novel Cyclic Altered Peptide Ligands of Myelin Basic Protein MBP₈₃₋₉₉ That Modulate Immune Responses in SJL/J Mice. *J Med Chem* 51: 3971-3978.
- ⁴⁴ **Zhao J, Li R, He J, Shi J, Long L y Li Z** (2008). Mucosal administration of an altered CII263-272 peptide inhibits collagen-induced arthritis by suppression of Th1/Th17 cells and expansion of regulatory T cells. *International Rheumatol* 29:9-16.
- ⁴⁵ **van Eden W, Thole JER, van der Zee R, Noordzij A, van Embden JDA, Hensen J y col.** (1988). Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* 331:171.
- ⁴⁶ **Alberta G.A. Paul, Peter J.S. van Kooten, van Eden W y Ruurd van der Zee.** (2000). Highly Autoproliferative T cells specific for 60-kDa heat shock protein produce IL-4/IL-10 and IFN γ and are protective in adjuvant arthritis. *The journal of Immunology*. 165: 7270-7277.
- ⁴⁷ **Albers H M y col.** (2009). Association of the autoimmunity locus 4q27 with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 60:901-04.
- ⁴⁸ **de Jong H. y col.** (2009). Pan-DR-binding Hsp60 self epitopes induce an interleukin-10-mediated immune response in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 60:1966-76
- ⁴⁹ **Drexler S. K y col** (2008). Cell signalling in macrophages, the principal innate immune effector cells of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 10.5 216.
- ⁵⁰ **Brennan FM y McInnes I B** (2008). Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J.Clin Invest* 118: 3537-45.
- ⁵¹ **Okamoto H.** (2008). Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines, environmental factors and transcription factors. *FEBS J.* 275: 4447.
- ⁵² **Im CH y col.** (2009). Anti-cyclic citrullinated peptide antibody is associated with radiographic erosion in rheumatoid arthritis independently of shared epitope status. *Rheumatol Int.* 29: 251-56.
- ⁵³ **Auger I y col.** (2009). New autoantigens in rheumatoid arthritis (RA): screening 8268, protein arrays with sera from patients with RA. *Ann.Rheum.Dis.* 68: 591-94.

-
- ⁵⁴ **Ainola M y col.** (2008). Imbalanced expression of RANKL and osteoprotegerin mRNA in pannus tissue of rheumatoid arthritis. *Clin Exp.Rheumatol* 26: 240-46.
- ⁵⁵ **Furuzawa-Carballeda JP, ip-Rodriguez M y Cabral A R** (2008). Osteoarthritis and rheumatoid arthritis pannus have similar qualitative metabolic characteristics and pro-inflammatory cytokine response. *Clin Exp.Rheumatol* 26: 554-60.
- ⁵⁶ **JB Imboden (2008).** The Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.* 4: 417-434
- ⁵⁷ **Hoffmann M, Hayer S y Steiner G.** (2009). Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis; induction of arthritogenic autoimmune responses by proinflammatory stimuli. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1173: 391-400.
- ⁵⁸ **Boissier MC y col.** (2008). Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm. *Joint Bone Spine* 75: 373-75.
- ⁵⁹ **Zwerina J, Redlich K, Schett G y Smolen JS** (2005). Pathogenesis of rheumatoid arthritis: targeting cytokines. *Ann N Y Acad Sci* 1051:716:729.
- ⁶⁰ **Pelletier M y col.**(2010). Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cell. *Blood* 115: 335-43.
- ⁶¹ **Ishiguro N.** (2009). Cartilage degradation in rheumatoid arthritis. *Clin.Calcium* 19.3: 347-54.
- ⁶² **Feldmann M y Maini SR.** (2008). Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics. *Immunol Rev.* 223:7-19.
- ⁶³ **Herman S y col.** (2008). Induction of osteoclast-associated receptor, a key osteoclast costimulation molecule, in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 58: 3041-50.
- ⁶⁴ **Choi HM y col.** (2009). Differential effect of IL-1beta and TNF-alpha on the production of IL-6, IL-8 and PGE(2) in fibroblast-like synoviocytes and THP-1 macrophages. *Rheumatol.Int.* 52:160-72
- ⁶⁵ **Nakahara H, Song J, Sigilito M, Hagihara K, Kishimoto T, Yoshizaki K y col.** (2003). Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces endothelial grow factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48:1521-1529.
- ⁶⁶ **Nishimoto N y col** (2008). Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease. *Blood* 112.: 3959-64.
- ⁶⁷ **Buch M y Emery P** (2002). The etiology and pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Hospital Pharmacis* 9:250-260.

-
- ⁶⁸ **Moctezuma JF** (2002). Manifestaciones articulares de la artritis reumatoide. *Revista Mexicana de Reumatología* 17:211-219.
- ⁶⁹ **Paleolog EM** (2009). The vasculature in rheumatoid arthritis: cause or consequence?. *Int.J.Exp.Pathol* 90:249-61.
- ⁷⁰ **Yoshida, S y col** (2008). Downregulation of RCAS1 and upregulation of cytotoxic T cells affects synovial proliferation and apoptosis in rheumatoid arthritis. *J.Rheumatol* 35.9:1716-22.
- ⁷¹ **Vasiilopoulos D y Calíbrese LH** (2008). Virally associated arthritis 2008: clinical, epidemiologic, and pathophysiologic considerations. *Arthritis Research and Therapy* 10:1-8
- ⁷² **Toussiroit E y J. Roudier** (2008). Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. *Best.Pract.Res.Clin.Rheumatol* 22: 883-96.
- ⁷³ **Colmegna I. y Alberts-Grill N** (2009). Parvovirus B19: its role in chronic arthritis. *Rheum.Dis.Clin.North Am.* 35: 95-110.
- ⁷⁴ **Ebringer A. y Rashid T.** (2009). Rheumatoid arthritis is caused by Proteus: the molecular mimicry theory and Karl Popper. *Front Biosci.(Elite.Ed)*: 577-86.
- ⁷⁵ **Mikuls TR y col.** (2009). Antibody responses to Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis) in subjects with rheumatoid arthritis and periodontitis. *Int Immunopharmacol* 9: 38–42.
- ⁷⁶ **Albert LJ** (1999). Mechanisms of Disease: Molecular Mimicry and Autoimmunity. *N Eng J Med* 341:2068-2074.
- ⁷⁷ **Goodnow C** (1996). Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2264:2271.
- ⁷⁸ **Hemmer B, Vergelli M, Gran B, Ling N, Conlon P, Pinilla C y col.** (1998). Predictable TCR antigen recognition based on peptide scans leads to identifications of agonists ligands with no sequence homology. *J Immunol* 160: 3631-3636.
- ⁷⁹ **Wekerle H y Holfed R** (2003). Molecular Mimicry in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 349:185-190.
- ⁸⁰ **Root-Bernstein R** (2009). Autoreactive T-cell receptor (Vbeta/D/Jbeta) sequences in diabetes are homologous to insulin, glucagon, the insulin receptor, and the glucagon receptor. *J.Mol.Recognit* 22: 177-87.
- ⁸¹ **Bueno C, Criado G, McCormick JK y Madrenas J** (2007). T cell signalling induced by bacterial superantigens. *Chem Immunol Allergy* 93:161-180.

-
- ⁸² **Pratesi F, Tommasi C, Anzilotti C, Chimenti D y Migliorini P** (2006). Deiminated Epstein–Barr virus nuclear antigen 1 is a target of anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54:733–741.
- ⁸³ **Gregersen PK, Silver J y Winchester RJ** (1987). The shared epitope hypothesis: an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 30:1205–1213.
- ⁸⁴ **Brown MA y Wordsworth BP** (1998). Genetic studies of common rheumatologic diseases. *Br J Rheumatol* 37:818:822.
- ⁸⁵ **Holmdahl R** (2000). Association of MHC and rheumatoid arthritis. Why is rheumatoid arthritis associated with the MHC genetic region? An introduction. *Arthritis Res* 2 :203–204.
- ⁸⁶ **Lee HS y col.** (2008). Several regions in the major histocompatibility complex confer risk for anti-CCP-antibody positive rheumatoid arthritis, independent of the DRB1 locus. *Mol Med* 14:293–300.
- ⁸⁷ **Vignat C y col.** (2009). Genetic association of the major histocompatibility complex with rheumatoid arthritis implicates two non-DRB1 loci. *Arthritis Rheum* 60:53–62.
- ⁸⁸ **Ding B y col.** (2009). Different patterns of associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in the extended major histocompatibility complex region. *Arthritis Rheum* 60:30–38.
- ⁸⁹ **Hogquist K, Baldwin T y Jameson S** (2005). Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol* 5:772–82.
- ⁹⁰ **Ballotti S, Chiarelli F y Martino M** (2006). Autoimmunity: Basis Mechanisms and implications in endocrine diseases. *Hormone Research* 66:142-152.
- ⁹¹ **Kabelitz D y Schreiber S.** (2009). Autoimmunity. Physiological control mechanisms and pathways to autoimmune disease. *Internist (Berl)*.50:267-75.
- ⁹² **van Noort JM, van Sechel A, Boon J, Boersma WJ, Polman CH y Lucas CJ.** (1993). Minor myelin proteins can be major targets for peripheral blood T cells from both multiple sclerosis patients and healthy subjects. *J Neuroimmunol* 46:67–72.
- ⁹³ **Lohmann T, Leslie RD y Londei M.** (1996). T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes. *J Autoimmun* 9:385–389.
- ⁹⁴ **Kamradt T** (2001). Tolerance and Autoimmunity. *N Engl J Med* 344:52-60.
- ⁹⁵ **Westerberg LS, Klein C y Snapper SB.** (2008). Breakdown of T cell tolerance and autoimmunity in primary immunodeficiency--lessons learned from monogenic disorders in mice and men. *Curr.Opin.Immunol.* 20: 646-54.

-
- ⁹⁶ **Fife BT y Bluestone JA** (2008). Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathway. *Immunological Reviews* 224:166–182
- ⁹⁷ **Piccirillo CA** (2008). Regulatory T cells in health and disease. *Cytokine* 43: 395–401.
- ⁹⁸ **Chatila TA.** (2009). Regulatory T cells: key players in tolerance and autoimmunity. *Endocrinol.Metab Clin.North Am.* 38: 265–72.
- ⁹⁹ **Szekanecz Z y col.** (2010) Chemokines and chemokine receptors in arthritis. *Front Biosci (Schol.Ed)* 2: 153–67.
- ¹⁰⁰ **Hewagama A y Richardson B** (2009). The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. *J.Autoimmun.* 33: 3–11.
- ¹⁰¹ **Munz C y col** (2009). Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity. *Nat.Rev.Immunol.* 9: 246–58.
- ¹⁰² **Ohashi PS y De Franco AL** (2002). Making and breaking tolerance. *Curr Opin Immunol* 14:744–759.
- ¹⁰³ **Steinman RM, Turley S, Mellman I y Inaba K** (2002). The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 191:411–416.
- ¹⁰⁴ **Janeway CA y Medzhitov R** (2002). Innate Immune Recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197–216.
- ¹⁰⁵ **Arnett FC y col.** (1988). The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31:315–324.
- ¹⁰⁶ **Wegner N, Lundberg K, Kinloch A, Fisher B, Malmström V, Feldmann M y Venables PJ** (2010). Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews* 233: 34–54
- ¹⁰⁷ **van Boekel MA, Vossenaar ER, van den Hoogen FH y van Venrooij WJ.** (2002). Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res* 4:87–93.
- ¹⁰⁸ **van Venrooij WJ y Zendman AJ.** (2008). Anti-CCP2 antibodies: an overview and perspective of the diagnostic abilities of this serological marker for early rheumatoid arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol* 3:36–39.
- ¹⁰⁹ **Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ y Pruijn G.J.** (2003). PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *BioEssays* 25:1106–1118.
- ¹¹⁰ **Gyorgy B, Toth E, Tarcsa E, Falus A y Buzas EI** (2006) Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 38:1662–1677.

-
- ¹¹¹ **Masson-Bessiere C y col.** (2001). The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol* 166:4177–4184.
- ¹¹² **Vossenaar ER y col.** (2004). Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther* 6: R142–R150.
- ¹¹³ **Burkhardt H, Sehnert B, Bockermann R, Engstrom A, Kalden JR y Holmdahl R** (2005). Humoral immune response to citrullinated collagen type II determinants in early rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 35:1643–1652.
- ¹¹⁴ **Kinloch A y col.** (2005). Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7:R1421–R1429.
- ¹¹⁵ **Zhao X y col.** (2008). Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 10:R94.
- ¹¹⁶ **van Venrooij WJ y Pruijn GJ** (2008). An important step towards completing the rheumatoid arthritis cycle. *Arthritis Res Ther* 10:117.
- ¹¹⁷ **Uysal H y col.** (2009). Structure and pathogenicity of antibodies specific for citrullinated collagen type II in experimental arthritis. *J Exp Med* 206:449–462.
- ¹¹⁸ **Verpoort KN y col.** (2007). Fine specificity of the anti-citrullinated protein antibody response is influenced by the shared epitope alleles. *Arthritis Rheum* 56:3949–3952.
- ¹¹⁹ **Edwards JC y col.** (2004). Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350:2572–2581.
- ¹²⁰ **Wagner U, Kaltenhauser S, Pierer M, Wilke B, Arnold S. y Hantzsche H.** (2002). B lymphocytopenia in rheumatoid arthritis is associated with the DRB1 shared epitope and increased acute phase response. *Arthritis Res* 4:R1.
- ¹²¹ **Mizoguchi A y Bhan AK.** (2006). A case for regulatory B cells. *J Immunol* 176:705–710.
- ¹²² **Fillatreau S, Gray D, y Anderton SM.** (2008). Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat Rev Immunol* 8:391–397.
- ¹²³ **Anderton SM y Fillatreau S.** (2008). Activated B cells in autoimmune diseases: the case for a regulatory role. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4:657–666.
- ¹²⁴ **Bettelli E, Korn T y Kuchroo VK.** (2007). Th17: The third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 19:652–7.
- ¹²⁵ **Matsuzaki G y Umemura M** (2007). Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol Immunol.* 51:1139–47.

-
- ¹²⁶ **McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, y col.** (2007). TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T H-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 8:1390–7.
- ¹²⁷ **Ivanov II, Zhou L y Littman DR.** (2007). Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol*.19:409–17.
- ¹²⁸ **Zhu J y Paul WE** (2008). CD4T cells: Fates, functions, and faults. *Blood* 112:1557–69.
- ¹²⁹ **Korn T, Oukka M, Kuchroo V y Bettelli E.** (2007). Th17 cells: Effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 19:362–71.
- ¹³⁰ **Sato K, Suematsu A, Okamoto K. y col.** (2006). Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 203:2673–82.
- ¹³¹ **Roark CL, Simonian PL, Fontenot AP, Born WK y O'Brien RL.** (2008). gammadelta T cells: An important source of IL-17. *Curr Opin Immunol* 20:353–7.
- ¹³² **Yamada H, Nakashima Y, Okazaki K y col.** (2008). Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 67:1299–304.
- ¹³³ **Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itho M y col.** (2001). Immunologic tolerance maintenance by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cell: their common role in controlling autoimmunity, tumor and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 182, 18:32.
- ¹³⁴ **Wraith DC, Nicolson KS y Whitley NT .**(2004). Regulatory CD4⁺ T cells and the control of autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 16:695-701.
- ¹³⁵ **Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T y Ono M** (2008). Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* 133: 775-787
- ¹³⁶ **Sakaguchi S, Miyara M, Costantino MC y Hafler DA** (2010) FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews* 10:491.
- ¹³⁷ **Pacholczyk R, Ignatowicz H, Kraj P y Ignatowicz L.** (2006). Origin and T Cell Receptor Diversity of Foxp3⁺ CD4⁺CD25⁺ T cells. *Immunity* 25:249-259.
- ¹³⁸ **Picca, C.** (2006). Role of TCR specificity in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell selection. *Immunol. Rev.* 212:74–85
- ¹³⁹ **Malek TR y Bayer AL** (2004). Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Immunol* 4:665-674.
- ¹⁴⁰ **Roncarolo MG y Battaglia** (2007). Regulatory T cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Immunology* 7:585-598.

-
- ¹⁴¹ **Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S y Noelle R J.** (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 174:1783.
- ¹⁴² **Cao X, Cai SF, Fehniger TA y col.** (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27:635.
- ¹⁴³ **Von Boehmer H** (2005). Mechanisms of suppression by T cells. *Nat Immunol* 6: 338-344.
- ¹⁴⁴ **Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM y Ivars F.**(2006). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 118:240.
- ¹⁴⁵ **Marie JC, Letterio JJ, Gavin M y Rudensky AY.** (2005). TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 201:1061.
- ¹⁴⁶ **Suri-Payer E y Cantor H** (2001). Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4+CD25+ T cells. *J. Autoimmun* 16:115.
- ¹⁴⁷ **Collison LW, Workman CJ, Kuo TT y col.** (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450:566.
- ¹⁴⁸ **Lee SS, Gao W y Mazzola S** (2007). Hemeoxygenase1, carbonmonoxide, and bilirubin induce tolerance in recipients toward islet allografts by modulating T regulatory cells. *FASEB J.* 21:3450.
- ¹⁴⁹ **Gariñ MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morolloñ E, Wait R, y Lechler R I** (2007). Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 109:2058.
- ¹⁵⁰ **Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J y Lenardo MJ** (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* 8:1353.
- ¹⁵¹ **Verbsky JW** (2007). Therapeutic use of T regulatory cells. *Current Opinion in Rheumatology* 19:252:258.
- ¹⁵² **Levings MK y Roncarolo MG** (2005). Phenotypic and functional differences between human CD4⁺CD25⁺ and type 1 regulatory T cell. *Curr Top Microbiol Immunol* 293:303-326.
- ¹⁵³ **Curotto MA y Lafaille JJ** (2009). Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity* 30: 22.
- ¹⁵⁴ **Tang X, Smith RF y Kumar V** (2005). Specific Control of Immunity by Regulatory CD8 T cells. *Cellular & Molecular Immunology.* 2:11-19.

- ¹⁵⁵ **Fontenot JD, Gavin MA y Rudensky AY** (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 330-336.
- ¹⁵⁶ **Zheng Y, y Rudensky AY.** (2007). Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat. Immunol.* 8:457–462.
- ¹⁵⁷ **Costantino MC, Baecher-Allan C y Hafler DA.** (2009) Human Regulatory T cells and Autoimmunity. *Eur J Immunol* 25:1-8.
- ¹⁵⁸ **McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M y col.** (2002) CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16: 311-323.
- ¹⁵⁹ **Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N y col.** (2000) Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cell constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp Med* 192: 303-310.
- ¹⁶⁰ **Leipe J, Skapenko A, Lipsky PE y Schulze-Koops H** (2005). Regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 7: 93.
- ¹⁶¹ **Herbelin A, Gorbert JM, Lepault F, Bach JF y Chatenoud L** (1998). Mature mainstream TCR alpha beta+CD4+ thymocytes expressing L-selectin mediate “active tolerance” in the nonbese diabetic mouse. *J. Immunol* 161:2620-2628.
- ¹⁶² **Liu W y col.** (2006). CD127 expression inversely correlatos with Foxp3 and suppressive fucction of human CD4+ Treg cells. *J Exp Med* 203: 1701-1711.
- ¹⁶³ **Dieckmann D, Plottner H, Berchotold S, Berger T y Schuler G.** (2001). Ex vivo isolation and characterization of CD25+CD4+ T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp Med* 193:1303-1310
- ¹⁶⁴ **Miyara M y col** (2009). Functional delineation and differentiation Dynamics of Human CD4+ T Cells Expressing the Foxp3 Transcription Factor. *Immunity* 30: 899–911
- ¹⁶⁵ **Soyoung Oh, Andrew LR y Caton AJ** (2010). CD4+CD25+ regulatory T cells in autoimmune arthritis. *Immunological Reviews* 233: 97–111
- ¹⁶⁶ **Mottonen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomaki P, Luukkainen R y Lassila O** (2005). CD4+CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 140:360–367.
- ¹⁶⁷ **Ruprecht CR y col** (2005). Coexpression of CD25 and CD27 identifies Foxp3+ regulatoryT cells in inflamed synovia. *J Exp Med* 201:1793–1803.

- ¹⁶⁸ **Cao D, Börjesson, Larsson P, Rudin A, Gunnarson I, Klareskog L y col** (2006). FOXP3 identifies regulatory CD25^{bright} CD4⁺ T cells in rheumatic joints. *Scand J Immunol* 63:444–452.
- ¹⁶⁹ **Van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber F y Taams LS** (2004). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum* 50: 2775-2785.
- ¹⁷⁰ **Cao D, Van Vollenhoven R, Klareskog L, Trollmo C y Malmstrom V** (2004). CD25^{bright}CD4⁺ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res Ther* 6: 335-346.
- ¹⁷¹ **Jiao Z y col** (2007). Accumulation of Foxp3-expressing CD4⁺ CD25⁺ T cells with distinct chemokine receptors in synovial fluid of patients with active rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 3:428–433.
- ¹⁷² **Radstake TR, van Der Voort R, ten Brummelhuis M, de Waal Malefijt M, Looman M, Figdor CG y col.** (2005). Increased expression of CCL8, CCL9, and CCL17 by dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis and regulation by Fc gamma receptor. *Ann Rheum Dis* 64: 359-367.
- ¹⁷³ **Buckley CD, Amft N, Bradfield PF, Pilling D, Ross E, Arenzana-Seisdedos F y col.** (2000). Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-beta 1 on synovial T cells contribute to their accumulation within the rheumatoid synovium. *J Immunol* 165: 3423-3429.
- ¹⁷⁴ **Nanki T, Hayashida K, El-Gabalawy HS, Suson S, Shi K, Girschick HJ y col.** (2000). Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4⁺ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* 165: 6590-6598.
- ¹⁷⁵ **Cao D, Malmstrom V, Baecher-Allan C, Hafler D, Klareskog L y Trollmo C** (2003). Isolation and functional characterization of regulatory CD25^{bright}CD4⁺ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 33:215-223.
- ¹⁷⁶ **Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA y col.** (2004). Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF {alpha} therapy. *J Exp Med* 200: 277-285.
- ¹⁷⁷ **Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM y Lipsky PE** (2006). TNF down modulates the function of human CD4⁺CD25^{hi} T-regulatory cells. *Blood* 108: 253-261.
- ¹⁷⁸ **Pasare C y Medzhitov R.** (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299: 1033-1036.

-
- ¹⁷⁹ **Flores-Borja F, Jury EC, Mauri C y Ehrenstein MR** (2008). Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *PNAS* 105:19396–19401.
- ¹⁸⁰ **Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y y Sakaguchi S** (2002). Stimulation of CD25(+) CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3:135–142.
- ¹⁸¹ **Ji HB y col.** (2004). Cutting edge: the natural ligand for glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein abrogates regulatory T cell suppression. *J Immunol* 172: 5823–5827.
- ¹⁸² **Tsan, M. y Baochong G.** (2004). Cytokine function of heat shock proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C739-C744.
- ¹⁸³ **Habich C, Kempe K, van der Zee R, Rumenapf R, Akiyama H, Kolb H y col.** (2005). Heat Shock Protein 60: Specific Binding of Lipopolysaccharide. *J Immunol* 174:1298-1305.
- ¹⁸⁴ **van Eden** (2000). Stress proteins as targets for anti-inflammatory therapies. *DDT* 5:115-120.
- ¹⁸⁵ **van Eden W, van der Zee R, Paul AG, Prakken BJ, Wendling U, Anderton SM y col.** (1998). Do heat shock proteins control the balances of T-cells regulation in inflammatory diseases? *Immunol Today* 19: 303-307.
- ¹⁸⁶ **Quintana FJ, Mimran A, Carmi P, Mor F y Cohen IR** (2008). HSP60 as a Target of Anti-Ergotypic Regulatory T Cells. *PLoS ONE* 3 (12):4026.
- ¹⁸⁷ **Zanin-Zhorov A, Cahalon L, Tal G, Margalit R, Lider O y Cohen IR** (2006). Heat shock protein 60 enhances CD4+CD25+ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J Clin Invest* 116: 2022-2032.
- ¹⁸⁸ **Kamphuis S, Kuis W, de Jager W, Teklenburg G, Massa M, Godon G y col.** (2005). Tolerogenic immune responses to novel T-cell epitopes from heat-shock protein 60 in juvenile idiopathic arthritis. *Lancet* 366:50-56.
- ¹⁸⁹ **Asquito DL y col.** Animal models of rheumatoid arthritis. (2009). *Eur.J.Immunol* 39: 2040-44.
- ¹⁹⁰ **Kannan K, Ortmann RA y Kimpel D.** (2005) Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology* 12: 167–181.
- ¹⁹¹ **Waksman B.H** (2002). Immune Regulation in adjuvant Disease and other Arthritis models: Relevance to Pathogenesis of chronic Arthritis. *Scandinavian Journal of Immunology* 56:12-34.
- ¹⁹² CIA Induction in DBA/1 Mice. <http://hookelabs.com>

-
- ¹⁹³ **Luross JA y Williams NA** (2001). The genetic and immunopathological processes underlying collagen-induced arthritis. *Immunology* 103: 407-416
- ¹⁹⁴ **Kinder AJ, Hassell AB, Brand J, Brownfield A, M. Grove and M. F. Shadforth** (2005) The treatment of inflammatory arthritis with methotrexate in clinical practice: treatment duration and incidence of adverse drug reactions. *Rheumatology* 44:61–66
- ¹⁹⁵ **Klareskog L, van der Heijde D, de Jager JP, Gough A, Kalden J, Malaise M y col** (2004). Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial *Lancet* 363: 675–81.
- ¹⁹⁶ **Emery P, Breedveld FC, Lemmel EM y col.** (2000). A comparison of the efficacy and safety of leflunomide and methotrexate for the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 39:655–65.
- ¹⁹⁷ **Patlak, Margie.** (2002). Targeting Leukemia: From Bench to Bedside. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16:273E-273e
- ¹⁹⁸ **Ravi Rajagopalan PT, Zhang Z, McCourt L, Dwyer M, Benkovic SJ, y Gordon G** (2002). Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: Ensemble and single-molecule kinetics. *PNAS* 99: 13481–13486.
- ¹⁹⁹ **Montesinos M C y col.** (2007) The anti-inflammatory mechanism of methotrexate depends on extracellular conversion of adenine nucleotides to adenosine by ecto-5'-nucleotidase: findings in a study of ecto-5'-nucleotidase gene-deficient mice. *Arthritis Rheum.* 56:1440–1445.
- ²⁰⁰ **Weinblatt HE.** (1996). Methotrexate in rheumatoid arthritis: toxicity issues. *Br J Rheumatol* 35: 403-6.
- ²⁰¹ **Fautrel B y col.** (2009) Choice of second-line disease-modifying antirheumatic drugs after failure of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: a decision tree for clinical practice based on rheumatologists' preferences. *Arthritis Rheum.* 61: 425-34.
- ²⁰² **Moreland LW, Schiff MH, Baumgartner SW, Tindall EA, Fleischmann RM, Bulpitt KJ y col.** (1999). Etanercept therapy in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *Ann Intern Med* 130:478-486.
- ²⁰³ **Klareskog L y col** (2004). Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double blind randomised controlled trial. *Lancet* 363: 675–681.
- ²⁰⁴ **Emery P y col.** (2008). Comparison of methotrexate monotherapy with a combination of methotrexate and etanercept in active, early, moderate to severe rheumatoid arthritis (COMET): a randomised, double blind, parallel treatment trial. *Lancet* 372: 375–382

-
- ²⁰⁵ **St Clair E W y col** (2004). Combination of infliximab and methotrexate therapy for early rheumatoid arthritis: a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum.* 50: 3432–3443
- ²⁰⁶ **Furst DE, Schiff MH, Fleishemann RM, Strand V, Birbara CA, Compagnone D y col.** (2003). Adalimumab, a fully human anti tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody, and concomitant standard antirheumatic therapy for the treatment of rheumatoid arthritis: results of STAR (Safety Trial of Adalimumab in Rheumatoid Arthritis). *J Rheumatol* 30: 2563-2571.
- ²⁰⁷ **Breedveld F C y col** (2006). The PREMIER study: a multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis Rheum.* 54: 26–37
- ²⁰⁸ **Salliot C, Gossec L y Ruysen-Witrand A.** (2007). Infections during tumour necrosis factor-alpha blocker therapy for rheumatic diseases in daily practice: a systematic retrospective study of 709 patients. *Rheumatology* 46: 327-34.
- ²⁰⁹ **Benucci M, Li GF, Fossi F y col.** (2005). Drug-induced lupus after treatment with infliximab in rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol* 11: 47-9
- ²¹⁰ **Chadha T y Hernandez JE.** (2006). Infliximab-related lupus and associated valvulitis: a case report and review of the literature. *Arthritis Rheum* 55: 163-6
- ²¹¹ **Kalden JR y Smolen JS** (2004). Non-TNF α therapeutic principles in the therapy of RA. *Annual European Congress of Rheumatology* June 9-12; Berlin, Germany. Netherlands: *Annals of the Rheumatic Diseases*.
- ²¹² **Welsing PM, Severens JL, Hartman M, van Riel PL y Laan RF** (2004). Modeling the 5-years cost effectiveness of treatment strategies including tumor necrosis factor-blocking agents and leflunomide for treating rheumatoid arthritis in the Netherlands. *Arthritis Rheum* 51:964-973.
- ²¹³ **Jiang Y. y col** (2000). A multicenter, double-blind, doseranging, randomized, placebo controlled study of recombinant human interleukin1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis: radiologic progression and correlation of Genant and Larsen scores. *Arthritis Rheum* 43:1001–1009
- ²¹⁴ **Maini RN y col** (2006). Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, tocilizumab, in European patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate. *Arthritis Rheum.* 54: 2817–2829
- ²¹⁵ **Emery, P. y col** (2008). IL-6 receptor inhibition with tocilizumab improves treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumour necrosis factor biologicals: results from a to 24 week multicentre randomised Placebo-controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* 67:1516–1523

-
- ²¹⁶ **Edwards JC, Leandro MJ y Cambridge GL** (2002)- B lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders. *Biochemical Society Transactions* 30:824-828.
- ²¹⁷ **Emery P y col.** (2006). The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase IIB randomized, double-blind, Placebo-controlled, dose-ranging trial. *Arthritis Rheum.* 54:1390–1400
- ²¹⁸ **Cohen SB y col.** (2006). Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty four weeks. *Arthritis Rheum.* 54: 2793–2806
- ²¹⁹ **Keystone y col.** (2007). Safety and efficacy of additional courses of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis: an open-label extension analysis. *Arthritis Rheum.* 56: 3896–3908
- ²²⁰ **Genovese MC y col.** (2005). Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition. *N Engl J. Med.* 353: 1114–1123.
- ²²¹ **Schiff M y col.** (2008). Efficacy and safety of abatacept or infliximab vs placebo in ATTEST: a phase III, multi-centre, randomised, double-blind, placebo controlled study in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate. *Ann. Rheum. Dis.* 67:1096–1103
- ²²² **Yamada R, Suzuki A, Chang X y col.** (2005). Citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Front Biosci* 10:54 -64
- ²²³ **Massa M, Passalia M, Manzoni SM y col.** (2007). Differential recognition of heat-shock protein DNAJ-derived epitopes by effector and Treg cells leads to modulation of inflammation in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 56: 1648 -57
- ²²⁴ **Kamphuis S, Albani S y Prakken BJ.** (2006): Heat-shock protein 60 as a tool for novel therapeutic strategies that target the induction of regulatory T cells in human arthritis. *Expert Opin Biol Ther* 6: 579 -89
- ²²⁵ **Faria AM y Weiner HL** (2006) Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol* 13: 143 -57
- ²²⁶ **Inobe J, Slavin AJ y Komagata Y y col.** (1998). IL-4 is a differentiation factor for transforming growth factor-beta secreting Th3 cells and oral administration of IL-4 enhances oral tolerance in experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 28: 2780 -90
- ²²⁷ **Baggi F, Andreetta F, Caspani E y col.** (1999). Oral administration of an immunodominant T-cell epitope downregulates Th1/Th2 cytokines and prevents experimental myasthenia gravis. *J Clin Invest* 104: 1287 -95

-
- ²²⁸ **Hultkrantz S, Ostman S y Telemo E.** (2005). Induction of antigen-specific regulatory T cells in the liver-draining celiac lymph node following oral antigen administration. *Immunology* 116: 362 -72
- ²²⁹ **Battaglia M, Gianfrani C, Gregori S y col.**(2004). IL-10-producing T regulatory type 1 cells and oral tolerance. *Ann NY Acad Sci* 1029:142 -53.
- ²³⁰ **Mizrahi M y Ilan Y** (2009). The gut mucosa as a site for induction of regulatory T-cells. *Curr.Pharm.Des* 15:1191-202.
- ²³¹ **Pozzilli P, Pitocco D, Visalli N y col.** (2000) No effect of oral insulin on residual beta-cell function in recent-onset type I diabetes (the IMDIAB VII). IMDIAB Group. *Diabetologia* 43:1000-4
- ²³² **Suzuki A, van de Water J, Gershwin ME y col** (2002). Oral tolerance and pyruvate dehydrogenase in patients with primary biliary cirrhosis. *Dev Immunol* 9: 55 -61
- ²³³ **Graus TA, Toy L, Chan L y col.**(2004). Failure to induce oral tolerance in Crohn's and ulcerative colitis patients: possible genetic risk. *Ann NY Acad Sci* 1029: 225 -38.
- ²³⁴ **Wei W y col.** (2009) A multicenter, double-blind, randomized, controlled phase III clinical trial of chicken type II collagen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.Ther.* 11:6 R180.
- ²³⁵ **Ichim T, Zheng X, Suzuki M, Kubo N, Zhang L y Beduhn M y col** (2008). Antigen-specific therapy of rheumatoid arthritis *Expert Opin. Biol. Ther.* 2:191-199
- ²³⁶ **Min SY, Park KS, Cho ML y col.** (2006). Antigen-induced, tolerogenic CD11c + , CD11b + dendritic cells are abundant in Peyer's patches during the induction of oral tolerance to type II collagen and suppress experimental collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 54: 887 -98
- ²³⁷ **Zhang Y, Chung Y, Bishop C y col.** (2006). Regulation of T cell activation and tolerance by PDL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 11695 -700.
- ²³⁸ **Mason KL y col.** (2008). Overview of gut immunology. *Adv.Exp.Med.Biol* 635:1-14.
- ²³⁹ **Wang R y col** (2009). CD8+ regulatory T cells are responsible for GAD-IgG gene-transferred tolerance induction in NOD mice. *Immunology* 126:123-31.
- ²⁴⁰ **Gottlieb PA y Eisenbarth GS.** (2002). Insulin-specific tolerance in diabetes. *Clin.Immunol* 102: 2-11.
- ²⁴¹ **Kaushansky N y col.** (2008). Activation and control of pathogenic T cells in OSP/claudin-11-induced EAE in SJL/J mice are dominated by their focused recognition of a single epitopic residue (OSP58M). *Int.Immunol* 20: 1439-49.
- ²⁴² **Sela M y Mozes E.** (2004). Therapeutic vaccines in autoimmunity." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101 Suppl 2: 14586-92.

-
- ²⁴³ **Mackay I.R y Rowley MJ.** (2008). Collagen of articular cartilage: the neglected autoantigen of rheumatoid arthritis. *J.Rheumatol* 35: 731-33.
- ²⁴⁴ **Warren KG, Catz I y Ferenczi LZ y col.** (2006). Intravenous synthetic peptide MBP8298 delayed disease progression in an HLA class II-defined cohort of patients with progressive multiple sclerosis: results of a 24-month double-blind placebo-controlled clinical trial and 5 years of follow-up treatment. *Eur J Neurol* 13:887-95.
- ²⁴⁵ **Prakken BJ, Samodal R, Le TD, Giannoni F, Yung GP, Sacavulli y col.** (2004). Epitopo specific immunotherapy induces immune deviation of proinflammatory T cells in rheumatoid arthritis. *PNAS* 101: 4228-33.
- ²⁴⁶ **Weiss A y Littman DR** (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76:263:274.
- ²⁴⁷ **Weiss A** (1993). T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. *Cell* 73: 209:212.
- ²⁴⁸ **Chan AC, Desai DM y Weiss A** (1994). The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu Rev Immunol* 12: 555:592.
- ²⁴⁹ **Madrenas J, Wange RL, Wang JL, Isakov N, Samelson LE y Germain RN** (1995). Zeta phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. *Science* 267: 459-460.
- ²⁵⁰ **Aharoni R, Teitelbaum D, Arnon R y Sela, M.** (1999). Copolymer 1 acts against the immunodominant epitopo 82–100 of myelin basic protein by T cell receptor antagonism in addition to majohistocompatibility complex blocking. *PNAS* 96: 634 -9
- ²⁵¹ **Duda PW, Schmied MC, Cook SL y col.** (2000). Glatiramer acetate (Copaxone) induces degenerate, Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* 105: 967-76
- ²⁵² **Neuhaus O, Farina C, Yassouridis A y col.** (2000) Multiple sclerosis: comparison of copolymer-1- reactive T cell lines from treated and untreated subjects reveals cytokine shift from T helper 1 to T helper 2 cells. *PNAS* 97: 7452 -7
- ²⁵³ **Bielekova B, Goodwin B, Richert N, Cortese I, Kondo T, Afshar G y col.** (2000). Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (aminoacids 83-89) in multiple sclerosis: Results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nat Med* 6:1167:1175.
- ²⁵⁴ **Kappos L, Comi G, Panitch H, Oger J, Antel J y Conlon P** (2000). Induction of a response a non-encephalitogenic type 2 T-helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide ligand in a placebo-controlled, ramdomized phase II trial. *Nat Med* 6:1176-82.

-
- ²⁵⁵ **Katsara M, Minigo G, Plebanski M y Apostolopoulos V.** (2008). The good, the bad and the ugly: how altered peptide ligands modulate immunity. *Expert Opin. Biol. Ther* 8:1873-1884
- ²⁵⁶ **Alleva DG, Maki RA, Robinson JM, Kipnes MS, Dandona P, Marks JB y col.** (2006). Immunomodulation in type 1 diabetes by NBI-6024, an altered peptide ligand of the insulin B (9-23) epitope. *Scand J of Immunol* 63:59-69.
- ²⁵⁷ **Boots AM, Hubers H, Kouwijzer M, y col.** (2007) Identification of an altered peptide ligand based on the endogenously presented, rheumatoid arthritis-associated, human cartilage glycoprotein-39(263–275) epitope: an MHC anchor variant peptide for immune modulation. *Arthritis Res Ther* 9: R71
- ²⁵⁸ **Li R, Li X y Li, Z.** (2006). Altered collagen II peptides inhibited T-cell activation in rheumatoid arthritis. *Clin Immunol* 118: 317-23.
- ²⁵⁹ **Sakurai Y, Brand DD, Tang B y col.** (2006). Analogue peptides of type II collagen can suppress arthritis in HLA-DR4 (DRB1 * 0401) transgenic mice. *Arthritis Res Ther* 8: R150
- ²⁶⁰ **Myers LK, Tang B, Rosioniec EF y col.** (2007). An unaltered peptide ligand of type II collagen suppresses autoimmune arthritis. *Crit rev immunol* 27:345 -56.
- ²⁶¹ **Harris P** (1994) Self- peptides to HLA molecules. *Critical Reviews in Immunology* 41: 61- 87
- ²⁶² **Lippolis JD, White FM, Marto JA, Luckey CJ, Bullock TN, Shabanowitz J, Hunt DF y Engelhard VH.** (2002). Analysis of MHC class II antigen processing by quantitation of peptides that constitute nested sets. *J Immunol* 169:5089-5097.
- ²⁶³ **Suri A, Lovitch SB y Unanue ER.** (2006) The wide diversity and complexity of peptides bound to class II MHC molecules. *Curr Opin Immunol* 18:70-77.
- ²⁶⁴ **Rotzschke O.** (1994). Origin, structure and motifs of naturally processed class II ligands. *Curr Op Immunol* 6: 45-51
- ²⁶⁵ **Tong JC, Tan TW y Ranganathan S** (2007). Methods and protocols for prediction of immunogenic epitopes. *Brief Bioinform* 8:96-108.
- ²⁶⁶ **Davies MN y Flower DR.** (2007) Harnessing bioinformatics to discover new vaccines. *Drug Discov Today* 12:389-395.
- ²⁶⁷ **Lundegaard C, Lund O, Kesmir C, Brunak S y Nielsen M.** (2007). Modeling the adaptive immune system: predictions and simulations. *Bioinformatics* 23:3265-3275.
- ²⁶⁸ **Singh H y Raghava G.P.S.** (2001). ProPred: Prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics* 17:1236-1237.

- ²⁶⁹ **HH Lin, Zhang GI, Tongchusak S, Reinherz EL y Brusic V** (2008). Evaluation of MHC-II peptide binding prediction servers: applications for vaccine research. *BMC Bioinformatics* 9 (suppl 12):S22
- ²⁷⁰ **Reche PA y col.** (2004) Enhancement to the RANKPEP resource for the prediction of peptide binding to MHC molecules using profiles. *Immunogenetics* 56:405-419.
- ²⁷¹ **Reche PA y Reinherz EL.**(2007). Prediction of peptide-MHC binding using profiles. *Methods Mol Biol* 409:185-200.
- ²⁷² **Guan P, Doytchinova IA, Zygouri C y Flower DR.** (2003). MHCPreD: A server for quantitative prediction of peptide-MHC binding. *Nucleic Acids Res.* 31:3621-3624.
- ²⁷³ <http://www.imtech.res.in/raghava/mhc2pred/index.html>
- ²⁷⁴ **Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM y col.** (2005) Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity* 22: 329–341.
- ²⁷⁵ **Roncarolo MG, Battaglia M y Gregori S.** (2004) The role of interleukin 10 in the control of autoimmunity. *J. Autoimmun* 20: 269–72.
- ²⁷⁶ **Ulmansky R, Cohen CJ, Szafer F, Moallem E, Fridlender ZG, Kashi y Naparstek Y.** (2002). Resistance to adjuvant arthritis is due to protective antibodies against heat shock protein surface epitopes and the induction of IL-10 secretion. *J Immunol* 168: 6463-69.
- ²⁷⁷ **Kinder A. J, Hassell A B, Brand J, Brownfield A, Grove M y Shadforth M F.** (2005) The treatment of inflammatory arthritis with methotrexate in clinical practice: treatment duration and incidence of adverse drug reactions. *Rheumatology* 44:61–66
- ²⁷⁸ **Kelchtermans H, Klerck B, Mitera T, Van Balenm M, Bullens D, Billiau A, Leclercq G y Matthys P.** (2005). Defective CD4+CD25+ regulatory T cell functioning in collagen-induced arthritis: an important factor in pathogenesis, counter-regulated by endogenous IFN- γ . *Arthritis Res Ther* 7: 402-415
- ²⁷⁹ **Malfait A M , Williams R O, Malik AS, Maini RN y Feldmann M.** (2001) Chronic Relapsing Homologous Collagen-Induced Arthritis in DBA/1 Mice as a Model for Testing Disease- Modifying and Remission-Inducing Therapies. *Arthritis and Rheumatism* 5 :1215–1224
- ²⁸⁰ **Larche M.** (2006). Peptide immunotherapy. *Immunol Allergy Clin North Am* 26: 321-332.
- ²⁸¹ **Garrood T y Pitzalis C.** (2006). Targeting the inflamed synovium: the quest for specificity. *Arthritis Rheum* 54:1055-60.
- ²⁸² **Tarzi M, Klunker S, Texier C, Verhoef A, Stapel SO y col.** (2006). Induction of interleukin-10 and suppressor of cytokine signalling-3 gene expression following peptide immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 36: 465-474.

- ²⁸³ **Manzo BA, Sundstedt A, Minaee S, Symonds A y col.** (2006). Persistent antigenic stimulation alters the transcription program in T cells, resulting in antigenic-specific tolerance. *Eur J Immunol* 36: 1374-85.
- ²⁸⁴ **Praken AB, Van Eden W, Rijkers GT, Kuis W, Toebes EA, De Graeff-Meeder ER y col.** (1996). Autoreactivity to human heat shock protein 60 predicts disease remission in oligoarticular juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39:1826-1832.
- ²⁸⁵ **Roord ST, Zonneveld-Huijssoon E, Le T, Puga G, Koffeman E, Ronaghy A y col.** (2006). Modulation of T cell function by combination of epitope specific and low dose anticytokine therapy controls autoimmune arthritis. *PLoS ONE* 87 Suppl 1:1-9
- ²⁸⁶ **Tremoulet AH y Albani S.** (2006): Novel therapies for rheumatoid arthritis. *Expert Opin Investig Drugs* 15:1427-41.
- ²⁸⁷ **Hauet-Broere F, Wieten L, Guichelaar T, Berlo S, van der Zee R y van Eden W.** (2006) Heat shock proteins induce T cell regulation of chronic inflammation. *Ann Rheum Dis* 65: 65-68.
- ²⁸⁸ **Trentham DE y col.** (1993) Effects of oral administration of type II collagen in rheumatoid arthritis. *Science* 261: 1727-1730.
- ²⁸⁹ **Sieper J y col.** (1996) Oral type II collagen treatment in early rheumatoid arthritis: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Arthritis Rheum* 39: 41-51.
- ²⁹⁰ **Nadkarni S, Mauri C y Ehrenstein RM** (2007). Anti-TNF- α therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF- β . *The J Exp Med* 204: 33-39.
- ²⁹¹ **Zrour SH y col.** (2010). The impact of pregnancy on rheumatoid arthritis outcome: The role of maternofetal HLA class II disparity. *Joint Bone Spine*. 77:36-40.
- ²⁹² **Borchers AT y col.** (2010). The implications of autoimmunity and pregnancy. *J. Autoimmun.* 34: 287-299.
- ²⁹³ **van de Geijn FE y col.** (2009). Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: results from a large prospective cohort study. *Arthritis Res. Ther.* 11.6 R193.
- ²⁹⁴ **Quintana FJ, Carmi P, Cohen IR** (2002). DNA vaccination with HSP60 inhibits cyclophosphamide-accelerated diabetes. *J Immunol* 169: 6030-6035.
- ²⁹⁵ **Zhao W.** (1994) Identification of an N-terminally acetylated encephalolipogenic epitope in myelin proteolipid apoprotein for the Lewis rat. *J. Immunol* 153: 901.
- ²⁹⁶ **Diamond A.** (1989). The class II genes of the rat MHC. *J. Immunol.* 142: 3268.

-
- ²⁹⁷ **Reizis B.** (1996) The peptide binding specificity of the MHC class II I-A molecule of the Lewis rat, RT1.BI. *Int Immunol.* 8:1825-1832.
- ²⁹⁸ **Wim B van den Berg** (2009). Lessons from animal models of arthritis over the past decade. *Arthritis Research & Therapy.*11:250
- ²⁹⁹ **Burkhardt H, Sehnert B, Bockermann R, Engstrom A, Kalden JR y Holmdahl R.** (2005).Humoral immune response to citrullinated collagen type II determinants in early rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 35:1643–1652.
- ³⁰⁰ **Uysal H y col.** (2009). Structure and pathogenicity of antibodies specific for citrullinated collagen type II in experimental arthritis. *J.Exp.Med.* 206: 449-62.
- ³⁰¹ **Luross JA y Williams NA.** (2001) The genetic and immunopathological processes underlying collagen-induced arthritis. *Immunology* 103:407-416.
- ³⁰² **Andersson EC, Hansen BE, Jacobsen H y col** (1998). Definition of MHC and T cell receptor contacts in the HLA-DR4-restricted immunodominant epitope in type II collagen and characterization of collagen-induced arthritis in HLA-DR4 and human CD4 transgenic mice. *PNAS* 95:7574-9.
- ³⁰³ **Neurath MF, Hildner K, Becker C, Schalaak JF, Barbulescu K, Germann T y col.** (1999). Methotrexate specifically modulates cytokine production by T cells and macrophages in murine collagen-induced arthritis (CIA): mechanism for methotrexate-mediated immunosuppression. *Clin Exp Immunol* 115:42-55.
- ³⁰⁴ **Chan ESL y Cronstein BN.** (2001). Molecular action of metrotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Research* 4: 266-273.
- ³⁰⁵ **Braun J y Rau R.** (2009). An update on methotrexate. *Curr.Opin.Rheumatol.* 21 216-23.

Anexo1. Predicción de epitopos de células T a partir la HSP60 humana para los alelos DRB1 de moléculas HLA clase II relacionados con la AR. En rojo se indican los aminoácidos en posición P1 y en azul los restantes aminoácidos del epitopo. Se consideró el umbral de 3% del programa

```

-----10-----20-----30-----40-----50-----60-----70-----80-----90-----100-----110
DRB1_0101:MLRLPTVFFRQMRPVSRVLAPHLTRAYAKDVKFGADARALMLQGVDLLADAVAVTMGPKGRTVIEQSWGSPKVTKDGVTVAKSIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEAG
DRB1_0102:MLRLPTVFFRQMRPVSRVLAPHLTRAYAKDVKFGADARALMLQGVDLLADAVAVTMGPKGRTVIEQSWGSPKVTKDGVTVAKSIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEAG
DRB1_0401:MLRLPTVFFRQMRPVSRVLAPHLTRAYAKDVKFGADARALMLQGVDLLADAVAVTMGPKGRTVIEQSWGSPKVTKDGVTVAKSIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEAG
DRB1_0404:MLRLPTVFFRQMRPVSRVLAPHLTRAYAKDVKFGADARALMLQGVDLLADAVAVTMGPKGRTVIEQSWGSPKVTKDGVTVAKSIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEAG
DRB1_0405:MLRLPTVFFRQMRPVSRVLAPHLTRAYAKDVKFGADARALMLQGVDLLADAVAVTMGPKGRTVIEQSWGSPKVTKDGVTVAKSIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEAG
DRB1_0408:MLRLPTVFFRQMRPVSRVLAPHLTRAYAKDVKFGADARALMLQGVDLLADAVAVTMGPKGRTVIEQSWGSPKVTKDGVTVAKSIDLKDKYKNIGAKLVQDVANNTNEEAG

-----120-----130-----140-----150-----160-----170-----180-----190-----200-----210-----220
DRB1_0101:DGTTTATVLARSSIAKEGFEEKISKGANPVEIRRGVMLAVDAVIAELKKQSKPVTTPEEIAQVATISANGDKEIGNIISDAMKKVGRKGVITVKDGKTLNDELEIIEGMKF
DRB1_0102:DGTTTATVLARSSIAKEGFEEKISKGANPVEIRRGVMLAVDAVIAELKKQSKPVTTPEEIAQVATISANGDKEIGNIISDAMKKVGRKGVITVKDGKTLNDELEIIEGMKF
DRB1_0401:DGTTTATVLARSSIAKEGFEEKISKGANPVEIRRGVMLAVDAVIAELKKQSKPVTTPEEIAQVATISANGDKEIGNIISDAMKKVGRKGVITVKDGKTLNDELEIIEGMKF
DRB1_0404:DGTTTATVLARSSIAKEGFEEKISKGANPVEIRRGVMLAVDAVIAELKKQSKPVTTPEEIAQVATISANGDKEIGNIISDAMKKVGRKGVITVKDGKTLNDELEIIEGMKF
DRB1_0405:DGTTTATVLARSSIAKEGFEEKISKGANPVEIRRGVMLAVDAVIAELKKQSKPVTTPEEIAQVATISANGDKEIGNIISDAMKKVGRKGVITVKDGKTLNDELEIIEGMKF
DRB1_0408:DGTTTATVLARSSIAKEGFEEKISKGANPVEIRRGVMLAVDAVIAELKKQSKPVTTPEEIAQVATISANGDKEIGNIISDAMKKVGRKGVITVKDGKTLNDELEIIEGMKF

-----230-----240-----250-----260-----270-----280-----290-----300-----310-----320-----330
DRB1_0101:DRGYISPYFINTSKGQKCEFDAYVVLLSEKKISSIQSIPALEIANAHRKPLVIIAEDVDGEALSTLVNRLKVGLQVVAVKAPGFGDNRKNQLKDMAIATGGAVFGEEG
DRB1_0102:DRGYISPYFINTSKGQKCEFDAYVVLLSEKKISSIQSIPALEIANAHRKPLVIIAEDVDGEALSTLVNRLKVGLQVVAVKAPGFGDNRKNQLKDMAIATGGAVFGEEG
DRB1_0401:DRGYISPYFINTSKGQKCEFDAYVVLLSEKKISSIQSIPALEIANAHRKPLVIIAEDVDGEALSTLVNRLKVGLQVVAVKAPGFGDNRKNQLKDMAIATGGAVFGEEG
DRB1_0404:DRGYISPYFINTSKGQKCEFDAYVVLLSEKKISSIQSIPALEIANAHRKPLVIIAEDVDGEALSTLVNRLKVGLQVVAVKAPGFGDNRKNQLKDMAIATGGAVFGEEG
DRB1_0405:DRGYISPYFINTSKGQKCEFDAYVVLLSEKKISSIQSIPALEIANAHRKPLVIIAEDVDGEALSTLVNRLKVGLQVVAVKAPGFGDNRKNQLKDMAIATGGAVFGEEG
DRB1_0408:DRGYISPYFINTSKGQKCEFDAYVVLLSEKKISSIQSIPALEIANAHRKPLVIIAEDVDGEALSTLVNRLKVGLQVVAVKAPGFGDNRKNQLKDMAIATGGAVFGEEG

-----340-----350-----360-----370-----380-----390-----400-----410-----420-----430-----440
DRB1_0101:LTLNLEDVQPHDLGKVGEVIVTKDDAMLLKGKGDKAQIEKRIQEIIEQLDVTTSEYEKEKLNERLAKSDGVAVLKVGGTSDVEVNEKKDRVTDALNATRAAVEEGIVLG
DRB1_0102:LTLNLEDVQPHDLGKVGEVIVTKDDAMLLKGKGDKAQIEKRIQEIIEQLDVTTSEYEKEKLNERLAKSDGVAVLKVGGTSDVEVNEKKDRVTDALNATRAAVEEGIVLG
DRB1_0401:LTLNLEDVQPHDLGKVGEVIVTKDDAMLLKGKGDKAQIEKRIQEIIEQLDVTTSEYEKEKLNERLAKSDGVAVLKVGGTSDVEVNEKKDRVTDALNATRAAVEEGIVLG
DRB1_0404:LTLNLEDVQPHDLGKVGEVIVTKDDAMLLKGKGDKAQIEKRIQEIIEQLDVTTSEYEKEKLNERLAKSDGVAVLKVGGTSDVEVNEKKDRVTDALNATRAAVEEGIVLG
DRB1_0405:LTLNLEDVQPHDLGKVGEVIVTKDDAMLLKGKGDKAQIEKRIQEIIEQLDVTTSEYEKEKLNERLAKSDGVAVLKVGGTSDVEVNEKKDRVTDALNATRAAVEEGIVLG
DRB1_0408:LTLNLEDVQPHDLGKVGEVIVTKDDAMLLKGKGDKAQIEKRIQEIIEQLDVTTSEYEKEKLNERLAKSDGVAVLKVGGTSDVEVNEKKDRVTDALNATRAAVEEGIVLG

-----450-----460-----470-----480-----490-----500-----510-----520-----530-----540-----550
DRB1_0101:GGCALLRCIPALDSLTPANEDQKIGIEIIKRTLKIPAMTIAKNAGVEGSLIVEKIMQSSSEVGYDAMAGDFVNMVEKGIIDPTKVVRTALLDAGVASLLTTAEVVVTEI
DRB1_0102:GGCALLRCIPALDSLTPANEDQKIGIEIIKRTLKIPAMTIAKNAGVEGSLIVEKIMQSSSEVGYDAMAGDFVNMVEKGIIDPTKVVRTALLDAGVASLLTTAEVVVTEI
DRB1_0401:GGCALLRCIPALDSLTPANEDQKIGIEIIKRTLKIPAMTIAKNAGVEGSLIVEKIMQSSSEVGYDAMAGDFVNMVEKGIIDPTKVVRTALLDAGVASLLTTAEVVVTEI
DRB1_0404:GGCALLRCIPALDSLTPANEDQKIGIEIIKRTLKIPAMTIAKNAGVEGSLIVEKIMQSSSEVGYDAMAGDFVNMVEKGIIDPTKVVRTALLDAGVASLLTTAEVVVTEI
DRB1_0405:GGCALLRCIPALDSLTPANEDQKIGIEIIKRTLKIPAMTIAKNAGVEGSLIVEKIMQSSSEVGYDAMAGDFVNMVEKGIIDPTKVVRTALLDAGVASLLTTAEVVVTEI
DRB1_0408:GGCALLRCIPALDSLTPANEDQKIGIEIIKRTLKIPAMTIAKNAGVEGSLIVEKIMQSSSEVGYDAMAGDFVNMVEKGIIDPTKVVRTALLDAGVASLLTTAEVVVTEI

-----560-----570-----
DRB1_0101:PKEEKDPGMGAMGGMGGMGGGMF
DRB1_0102:PKEEKDPGMGAMGGMGGMGGGMF
DRB1_0401:PKEEKDPGMGAMGGMGGMGGGMF
DRB1_0404:PKEEKDPGMGAMGGMGGMGGGMF
DRB1_0405:PKEEKDPGMGAMGGMGGMGGGMF
DRB1_0408:PKEEKDPGMGAMGGMGGMGGGMF

```