

Revista Cubana de *Reumatología*

Órgano oficial de la Sociedad Cubana de Reumatología y el Grupo Nacional de Reumatología
Volumen XI Número 14, 2009 ISSN: 1817-5996

www.revreumatologia.sld.cu



ARTÍCULO ORIGINAL

Un ligando peptídico alterado como novedoso fármaco para el tratamiento de la artritis idiopática juvenil

Lorenzo Pérez Noraylis *, Barberá Betancourt Ariana *, Cantera Ocegüera Dolores ****, Alonso Amarys **, Chall Elsy ***, Franco Lourdes ***, Padrón Palomares Ramón Gabriel *, Domínguez Horta María del Carmen *

*Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

**Hospital William Soler, La Habana, Cuba.

***Hospital Pediátrico de Centro Habana, La Habana, Cuba.

****Hospital Pedro Borrás, La Habana, Cuba.

RESUMEN

La inducción de tolerancia periférica usando autoantígenos constituye una terapia muy atractiva para las enfermedades autoinmunes. El objetivo de este trabajo es demostrar el potencial terapéutico de un ligando peptídico alterado derivado de la proteína de estrés térmico de 60 humana en el modelo animal de artritis inducida por adyuvante y en ensayos in vitro con células mononucleares en pacientes con artritis idiopática juvenil. Se comprobó a través del examen clínico e histopatológico de las ratas, que el péptido inhibe eficientemente el desarrollo de la enfermedad; además, la terapia de los animales con el péptido induce una reducción significativa de la expresión del TNF alfa. Por otra parte, la estimulación con ligandos peptídicos alterados de las células mononucleares de pacientes con artritis idiopática juvenil incrementó significativamente la frecuencia de células T reguladoras CD4+CD25+Foxp3+. Estos resultados avalan el potencial terapéutico de esta molécula para el tratamiento de la artritis idiopática juvenil y otras enfermedades autoinmunes.

Palabras clave: ligando peptídico, artritis idiopática juvenil, células T reguladoras

INTRODUCCIÓN

La artritis idiopática juvenil (AIJ) es una enfermedad heterogénea autoinmune, que afecta a la población infantil. Esta enfermedad está caracterizada por la inflamación crónica de una o más articulaciones lo cual trae como resultado la destrucción articular y una severa limitación funcional en cerca del 49% de los niños afectados.¹ Puede acompañarse o no de manifestaciones extra-articulares y representa del 1.3 al 1.6 % de la morbilidad pediátrica.² El impacto que produce la AIJ depende de la forma de presentación por tratarse de siete formas distintas que incluye desde entidades simples hasta patología de pronóstico reservado, que no solo afectan la funcionalidad sino ponen en riesgo la vida del niño. Las causas que la originan son desconocidas aunque incluye un conjunto de factores genéticos, inmunológicos y ambientales.

En la actualidad no existe un tratamiento efectivo para esta enfermedad. Tradicionalmente, las enfermedades autoinmunes se han tratado con fármacos que tienden a la paralización de los síntomas, o con el uso de potentes inmunosupresores no

específicos que no constituyen una terapia eficiente. Esto ha llevado en los últimos años a algunos investigadores a retomar el uso de estrategias antígeno-específicas para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, tratando de regular la respuesta inmune, no de suprimirla. Para ello, se han empleado péptidos de autoantígenos o ligandos peptídicos alterados (APL), del inglés, altered peptide ligands administrados en condiciones tales que permitan la inducción de mecanismos inductores de la tolerancia periférica (anergia, apoptosis, células T reguladoras).^{3,4}

La proteína de estrés térmico 60 humana (HSP60), del inglés heat-shock protein 60, uno de los autoantígenos fundamentales involucrado en la patogénesis de la AIJ, es considerada como un candidato para el restablecimiento de la tolerancia basada en las posibilidades de activar células Treg. Algunos autores han identificado epitopos en la HSP60 involucrados en los mecanismos de regulación en un modelo animal de artritis.^{5,6} Además, otros autores han seleccionado epitopos de la HSP60

humana con el objetivo de inducir tolerancia en pacientes con enfermedades autoinmunes.⁷⁻⁹

En este trabajo, se evaluó un péptido tipo APL (denominado CIGB814) derivado de la HSP60 humana en un modelo animal válido para la AIJ. Este APL inhibe eficientemente el curso de la artritis en este modelo e induce un incremento de las células Treg en ensayos in vivo usando células mononucleares de pacientes con AIJ.

MÉTODO

Se emplearon ratas isogénicas hembras, pertenecientes a la línea Lewis (haplotipo RT1.BL) suministradas por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba).

La enfermedad se indujo en 2 grupos de animales (Grupo I y II) mediante la administración a cada rata de 100 µL del *Mycobacterium tuberculosis* en AIF por vía subcutánea en la base de la cola.

El primer grupo fue tratado con 200 µg del péptido APL por vía intradérmica los días 10, 14 y 18, y el otro quedó como control de la inducción de la enfermedad (enfermos no tratados).

El tercer grupo quedó como control negativo del ensayo (animales sanos).

EL grado de inflamación asociado con el desarrollo de la artritis se evaluó con la siguiente escala:

0. Normal.

1. Inflamación ligera y enrojecimiento del tobillo e inflamación de los dedos.

2. Moderado enrojecimiento e inflamación del tobillo.
3. Severo enrojecimiento e inflamación de toda la pata.
4. Inflamación máxima y deformidad de las múltiples articulaciones.

Para el análisis histológico las articulaciones fueron descalcificadas y teñidas con una mezcla de hematoxilina-eosina.

El grado de afectación en la articulación se realizó a través de una escala semicuantitativa:

Grado 0: Sin alteraciones

Grado 1: hiperplasia del epitelio y angiogénesis discreta

Grado 2: Hipertrofia sinovial con angiogénesis moderada. No erosión del cartílago y/o hueso

Grado 3: Hipertrofia sinovial con formación de pannus. Angiogénesis exuberante. Erosión del cartílago y/o hueso.

Se cuantificaron los niveles de TNF alfa mediante un ensayo comercial tipo ELISA específico, siguiendo las recomendaciones del fabricante. El límite de detección para el TNF alfa fue de 5 pg/mL.

Los pacientes con AIJ incluidos en el estudio provienen del Hospital Pediátrico "Pedro Borrás".

Se cuenta con el consentimiento informado por escrito de cada uno de los tutores de los pacientes para participar en el ensayo.

Los datos fundamentales de los pacientes con AIJ se muestran en la tabla 1.

Tabla 1 Principales características de los pacientes con AIJ incluidos en el estudio.

No	Edad	Sexo	Raza	Síndromes clínicos	Evolución en años	Estado clínico	Tratamientos
P1	8	F	N	AIJ Poliarticular FR(-)	7	Actividad	Metotrexate, ácido fólico
P2	6	F	M	AIJ Poliarticular FR(-)	4	Actividad	Metotrexate, Sales de Oro, Indometacina

El aislamiento de las células mononucleares de la sangre periférica se realizó siguiendo el protocolo descrito por Domínguez y col.¹⁰ La proliferación celular fue determinada por el empleo del marcaje celular con 5-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), según describen Lyons y Parish.¹¹

La determinación de las células Treg se realizó con un kit comercial para marcaje de estas células siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, las muestras fueron leídas y analizadas en un citómetro Partec Pass II usando el programa Partec Flomax, respectivamente.

Para el análisis de los resultados se empleó el programa estadístico GraphPad Prism versión N° 4 siguiendo las instrucciones del mismo. Las pruebas estadísticas empleadas fueron la de Kruskal-Wallis, Mann-Whitney Rank Sum Test, test de Dunn y el test t pareado.

RESULTADOS

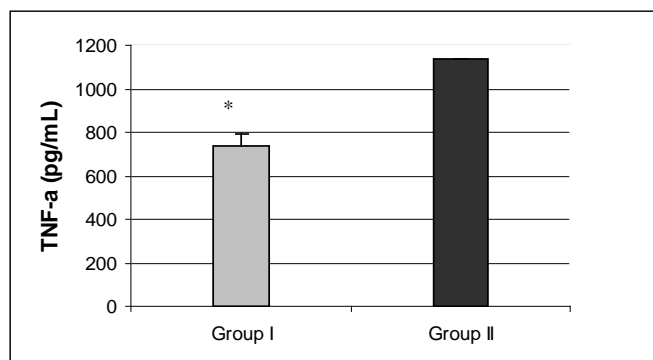
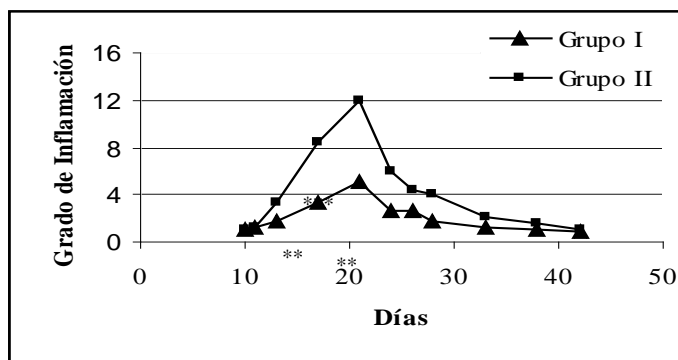
El día 11 después de inducida la enfermedad los animales de los grupos I y II comenzaron a manifestar los signos clínicos de la artritis, observándose una diferencia importante a partir del día 17 con respecto al Grupo II.

Las manifestaciones más severas se observaron alrededor del día 21 para ambos grupos de animales enfermos y la capacidad locomotora se afectó considerablemente. Sin embargo, los animales tratados con el APL presentaron una reducción significativa ($p < 0.001$) de los signos clínicos de la artritis.

A partir del día 21 comenzó el proceso de reversión de la enfermedad característico del modelo animal.^{Figura 1A}

En la figura 1B se presentan los niveles de TNF alfa inducidos por el péptido APL en las células mononucleares de las ratas de los grupos I y II sacrificadas el día 21.

Figura 1. La administración del péptido CIGB814 previene el desarrollo de la artritis por una disminución en los niveles de TNF α en el modelo animal de AA. (A) Evaluación de los signos clínicos. (B) Cuantificación de los niveles de TNF alfa el día 21 después de inducida la artritis. Grupo I: Animales tratados con el péptido APL, Grupo II: Animales enfermos no tratados; Grupo III: Animales sanos. , $p \leq 0.05$; **, $p < 0.002$; ***, $p = 0.001$ versus Grupo II.



Como puede observarse el tratamiento con el péptido disminuye significativamente los niveles de TNF alfa con respecto al Grupo II.

Los animales del Grupo II presentaron las alteraciones histológicas características de la enfermedad, los tres animales sacrificados el día 21 presentaron grado 3. ^{Figura 2A}

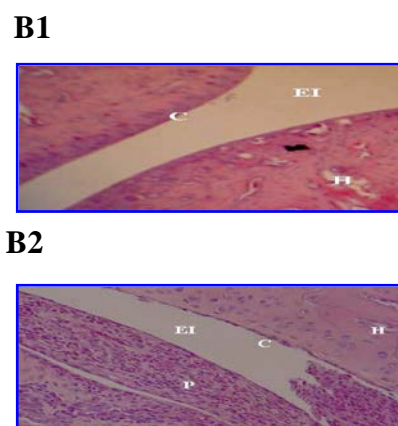
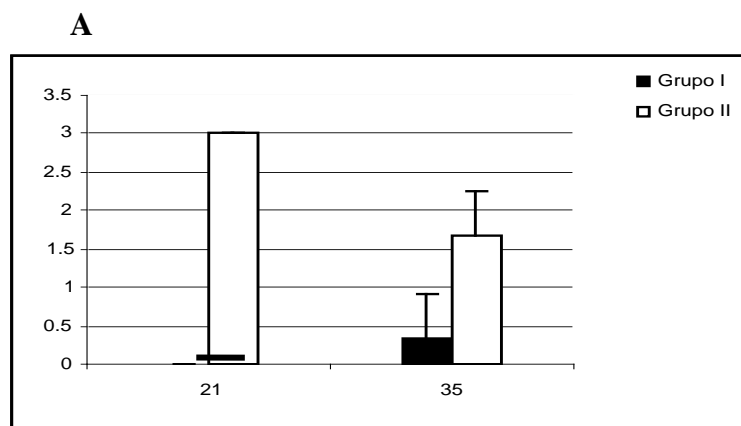
En estas articulaciones se observó una hipertrofia sinovial en la cavidad articular con formación de pannus, la erosión del cartílago y el hueso. ^{Figura 2B2}

En el día 35 los animales sacrificados del Grupo II presentaron grados inferiores a los del día 21. En contraste, los animales

sacrificados del Grupo I, los días 21 y 35, no presentaron alteraciones histológicas con excepción de un animal que presentó grado 1 el día 35. ^{Figura 2A}

En la microscopía óptica de la sección articular de un animal de este grupo con grado 0 se puede apreciar el espacio intra-articular bien definido y no se observa la formación del pannus. ^{Figura 2B1}

Figura 2. (A) Análisis histológico. (*) Representa diferencias estadísticamente significativa ($P = 0.029$). (B) Tinción representativa de Hematoxilina y Eosina de una sección del tejido de la articulación de las ratas del grupo I (B1) y grupo II (B2). Cavidad intraarticular (EI), hueso (H), cartílago (C), pannus (P).



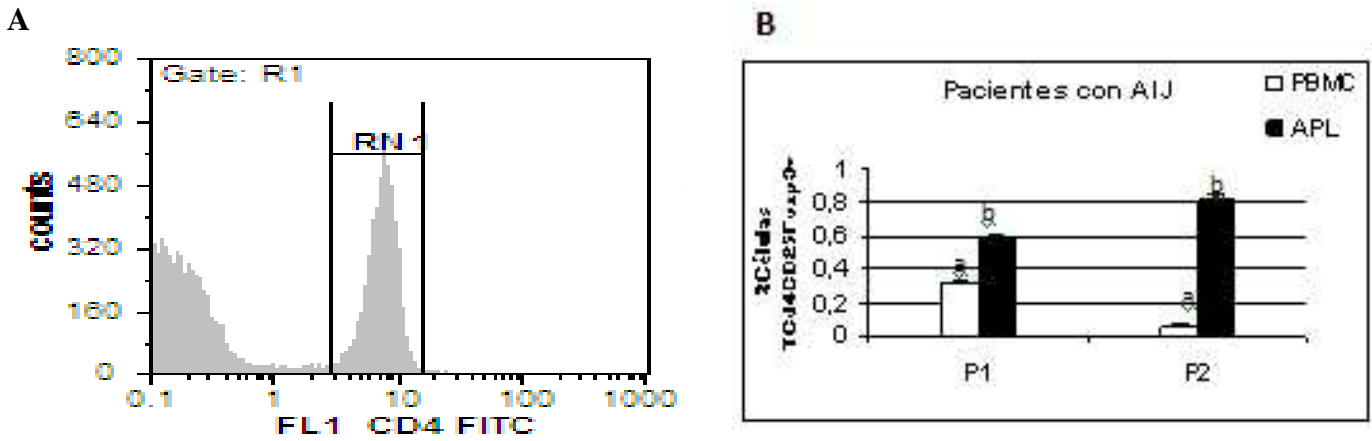
Previamente en nuestro grupo se demostró que el péptido CIGB814 induce un incremento significativo en los niveles de células Treg CD4+CD25+Foxp3+ en ensayos ex vivo con células mononucleares de pacientes con artritis reumatoide. ¹⁰

Teniendo en cuenta estos resultados, evaluamos las potencialidades del péptido APL en la inducción de células Treg en pacientes con AIJ. En los histogramas obtenidos a través del análisis por citometría de flujo se seleccionó la

región correspondiente a los linfocitos T CD4+ ^{Figura 3A} y se determinó la frecuencia de células Treg estimuladas con el péptido APL.

La frecuencia de las células T CD4+CD25+Foxp3+ en las células mononucleares que fueron estimuladas con el péptido fue mayor al compararlas con las células sin estímulo, lo que sugiere una inducción por el péptido de células Treg. ^{Figura 3B}

Figura 3. Incrementos en la frecuencia de células T CD4+CD25+Foxp3+ por el péptido APL en pacientes con AIJ A: Representación de la región correspondiente a los linfocitos T CD4+. El número dentro de la región representa el porcentaje de las células T CD4+. La figura ilustra el marcaje representativo de un paciente. B: Efecto del péptido CIGB814 sobre los niveles de células T CD4+CD25+Foxp3+ en dos pacientes con AIJ. Las barras representan el promedio ± la desviación estándar de tres réplicas independientes. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).



Las células mononucleares de sangre periférica del paciente (P2) con AIJ previamente marcadas con CFSE fueron estimuladas en cultivo con el péptido APL. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo empleando el AcM anti-Foxp3-APC. Se realizó el análisis del marcaje con el AcM anti-Foxp3-APC en las células que presentaron una menor intensidad de fluorescencia de CFSE (Proliferación).

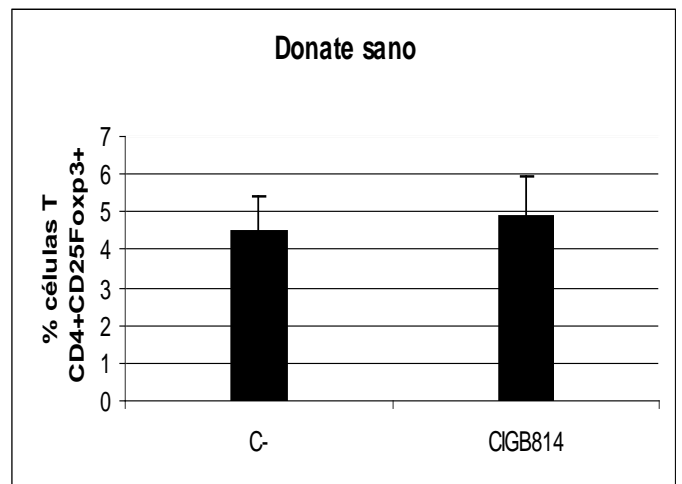
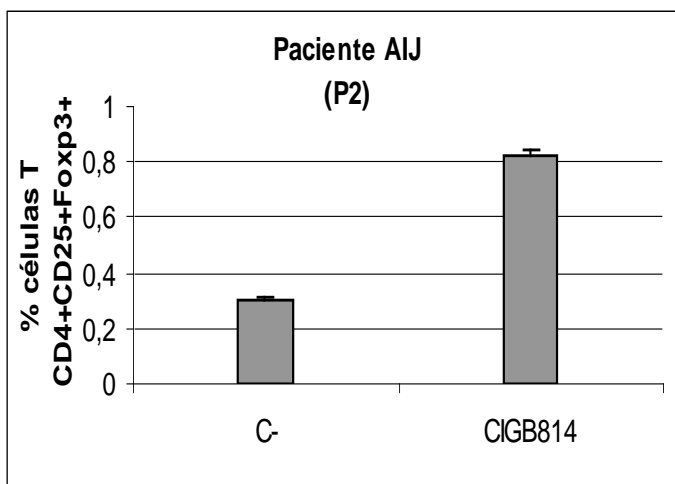
En este caso se observó un aumento significativo en la expresión de Foxp3+ en las células estimuladas con el péptido CIGB 814 en comparación con las células cultivadas sin estímulo. ^{Figura 4}

Figura 4. Inducción de la proliferación por el péptido APL CIGB 814 de células Foxp3+ en un paciente con AIJ (P2) y en un donante sano. Las células mononucleares de sangre periférica marcadas con CFSE fueron cultivadas con o sin el péptido. Posteriormente las células fueron marcadas con un AcM anti-Foxp3-APC y analizadas por citometría de flujo. El gráfico representa el por ciento de células Foxp3+ del total de células mononucleares que proliferaron (CFSEdim). Las barras representan el promedio ± la desviación estándar de tres réplicas independientes. El asterisco representa diferencias estadísticamente significativas (p = 0.02).

El IDC para este caso fue de 2.75. Se llevó a cabo además el mismo análisis para un donante sano.

No se observó un aumento significativo de la proliferación de células Foxp3+ en las células que fueron estimuladas con el péptido APL en comparación con las células cultivadas sin estímulo. ^{Figura 4}

Para este caso el IDC fue de 1.08, lo cual indica que el péptido APL no indujo proliferación de células Foxp3+ en el donante sano.



DISCUSIÓN

Previamente en nuestro grupo, se identificó por herramientas de la Bioinformática un nuevo epítipo de células T localizado

en la región N terminal de la HSP60 humana. El péptido correspondiente a esta región se denominó E18-3, a partir del cual se diseñó un péptido tipo APL (CIGB814).¹⁰

En este trabajo se evaluó la capacidad terapéutica de este APL en el modelo animal de AA y en ensayos ex vivo. El tratamiento con el APL redujo significativamente la severidad de la AA, desde el punto de vista clínico e histopatológico.

Existen numerosos reportes en la literatura científica en los que se ha comprobado que varios péptidos de las Hsp65 del *Mycobacterium tuberculosis* administrados por vía nasal u oral tienen un efecto protector en este modelo. Específicamente, el grupo de van Eden, que ha trabajado intensamente en este campo, ha demostrado que el efecto protector de dichos péptidos se debe a la inducción de células T reguladoras secretoras de IL-10, TGF- β e IL-4, capaces de reaccionar de forma cruzada con los proteoglicanos que se encuentran altamente expresados en las articulaciones de las ratas.¹²⁻¹⁴

El tratamiento con el péptido CIGB814 disminuye significativamente los niveles de TNF alfa con respecto a los animales sin tratamiento. Esta citocina es responsable en gran medida de inducir y/o perpetuar el proceso inflamatorio en los animales del modelo de AA. Lo anterior pudiera explicar las diferencias clínicas e histopatológicas observadas entre los animales tratados con el APL y los animales enfermos sin tratamiento. Diferentes estudios han demostrado que el TNF alfa provoca una disminución de las funciones de las células Treg CD4+CD25+ en humanos.¹⁵

Por otra parte, el tratamiento de pacientes con AR con antagonistas del TNF alfa provoca un aumento en los niveles de células Treg CD4+CD25+ y revierte el defecto de estas células para inhibir la producción de citocinas proinflamatorias por células T CD4+CD25-.¹⁶ El hecho de que el péptido APL, provoque una disminución de los niveles de TNF alfa en el modelo animal representa un efecto beneficioso en el control del proceso inflamatorio y puede contribuir a la restauración de la tolerancia debido a la inhibición de citocinas inflamatorias y de esta forma permitir la expansión de poblaciones de células Treg.

Otros autores, han comprobado en ensayo ex vivo en pacientes con AIJ oligoarticular la inducción de células T con un fenotipo regulador inducido por la Hsp60 o péptidos derivados de ella, que pudiera contribuir a la remisión espontánea de la enfermedad.¹⁷

Previamente, en nuestro grupo se había demostrado que el péptido APL CIGB814 induce un incremento significativo en los niveles de células Treg con fenotipo CD4+CD25+Foxp3+ en ensayos ex vivo con células mononucleares de pacientes con AR.¹⁰

En este trabajo se comprobó que el péptido APL aumenta significativamente los niveles de células Treg CD4+CD25+Foxp3+ en los pacientes con AIJ evaluados, así mismo se demostró que este aumento puede deberse a la inducción de la proliferación de las células Foxp3+. Sin embargo, en un donante sano no se observó este efecto. Esto podría indicarnos un mecanismo específico de acción del péptido.

La inducción de células Treg CD4+CD25+Foxp3+ por el péptido CIGB814 refuerza las potencialidades terapéutica de este péptido en el tratamiento de pacientes con AIJ. Estas células son capaces de reducir la respuesta inflamatoria por mecanismos supresores, los cuales involucran tanto la producción de citocinas anti-inflamatorias como el contacto celular.^{18,19} El tratamiento con el péptido APL podría ser extendido a otras enfermedades autoinmunes donde la Hsp60 constituya un autoantígeno.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zlacka D, Vavrincova P, Hien Nguyen TT, Hromadnikova I. Frequency of anti-hsp60, -65, y -70 antibodies in sera of patients with juvenile idiopathic arthritis. *J Autoimmunity* 2006; 27: 81-88.
2. Cassidy JT y Petty R. *An introduction to the study of the rheumatic disease of children. Thrid Edition Philadelphia, Pennsylvania, W B Saunders Company* 1995; 1:15.
3. Bielekova B y Martin R. Antigen-specific immunomodulation via altered peptide ligands. *J Mol Med* 2001; 79: 552-565.
4. Prakken B, Samodal R, Le T, Giannoni F, Yung GP, Scavulli J et al. Epitope-specific immunotherapy induces immune deviation of proinflammatory T cells in RA. *PNAS* 2001; 12(101): 4228-4233.
5. Prakken BJ, Roord s, Ronaghy A, Wauben M, Albani S y van Eden W. Heat shock protein 60 and adjuvant arthritis: a model for T cell regulation in human arthritis. *Springer Semin Immunop* 2003; 25: 47-63.
6. Van Eden W, van der Zee R y Prakken B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 318-330.
7. Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, Metzger M y Cohen I. β -cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double blind, phase II trial. *Lancet* 2001; 358, 1749-1753.
8. Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich N, Bachor O y Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 1999; 50: 213-219.
9. Singh H y Raghava G. PproPed: prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics* 2001; 17(12): 1236-1237.
10. Domínguez MC, Padrón GR, López NM, Lorenzo N, Barberá A, Hernández A et al. Péptidos y derivados tipo APL de la Hsp60 y

- composiciones farmacéuticas. No. De Solicitud Internacional: PCT/CU2005/000008 2005.
11. Lyons AB y Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994; 171: 131-135.
 12. Lorenzo N, Domínguez MC, Hernández A, Barberá A, Merino N, Vazquéz A, Suárez J, Morera V y Padrón G. Characterization of two experimental rodent models for evaluating novel drugs for Rheumatoid Arthritis. *Biotechnología Aplicada* 2008; 25: 236-241.
 13. Cai X, Wong YF, Zhou H, Xie Y, Liu ZQ, Jiang ZH et al. The comparative study of Sprague-Dawley and Lewis rats in adjuvant-induced arthritis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* .2006; 373(2):140-147.
 14. Cobelens PM, Heijnen CJ, Nieuwenhuis EE, Kramer PP, van der Zee R, van Eden W et al. Treatment of adjuvant-induced arthritis by oral administration of mycobacterial Hsp65 during disease. *Arthritis Rheum* 2000; 43(12):2694-70.
 15. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM y Lipsky PE. TNF down modulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood* 2006; 108, 253-261.
 16. Nadkarni S, Mauri C y Ehrenstein RM. Anti-TNF- α therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF- β . *The J Exp Med* 2007; 204(1): 33-39.
 17. Kamphuis S, Kuis W, de Jager W, Teklenburg G, Massa M, Godon G et al. Tolerogenic immune responses to novel T-cell epitopes from heat-shock protein 60 in juvenile idiopathic arthritis. *Lancet* 2005; 366: 50-56.
 18. Zanin-Zhorov A, Cahalon L, Tal G, Margalit R, Lider O y Cohen IR. Heat shock protein 60 enhances CD4+CD25+ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J Clin Invest* 2006; 116: 2022-2032.
 19. Von Boehmer H. Mechanisms of suppression by T cells. *Nat Immunol* 2005; 6: 338- 44.

Los autores refieren no tener conflicto de intereses

Recibido: 14 de julio del 2009

Aceptado: 18 de septiembre del 2009

Contacto para correspondencia: Lic. Noraylis Lorenzo Pérez

División de Química Física, Dirección de Investigaciones Biomédicas

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, La Habana, Cuba. CP: 11600