Efecto terapéutico de dos APL derivados de la HSP60 en modelos experimentales de artritis reumatoide

Corrales-Vázquez O, Lorenzo-Pérez N, Torres-Lima AM, Hernández-Cuellar MV, Prada-Hernández D, Gil-Armenteros R, Garay-Pérez H, Pérez-Hernández E, López-Abad M, Ancizar J, Padrón-Palomares G, González-López LJ, Domínguez-Horta MC
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba.
Email: mcarmen.dominguez@cigb.edu.cu

RESUMEN

La inducción de tolerancia inmunológica como terapia para las enfermedades autoinmunes constituye una alternativa promisoria en la actualidad. En este trabajo, tuvo como objetivo evaluar dos ligandos peptídicos modificados (APL, del inglés *Altered Peptide Ligands*) como inductores de tolerancia periférica en modelos de artritis reumatoide (AR). Se identificaron mediante herramientas bioinformáticas dos nuevos epítopos de células T de la proteína de estrés celular de 60 kilo daltons (HSP60, del inglés *heat-shock protein 60*) humana, un autoantígeno involucrado en la patogénesis de la AR; y se diseñaron dos APLs a partir de estos epítopos (APL1 y APL2). El APL1 incrementa la proporción de células T reguladoras con fenotipo $CD4^{+}CD25^{high}Foxp3^{+}$ en ensayos *ex vivo* con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de pacientes con AR. Mientras que el APL-2 incrementa los niveles de IL-10, suprime la secreción de IL-17 e induce la activación de las células T a través de su capacidad para modificar la distribución de las fases del ciclo celular de las células $CD4^{+}$ de pacientes con AR. Adicionalmente, se evaluó el efecto terapéutico de estos APLs en dos modelos animales: artritis inducida por adyuvante (AA) en ratas Lewis y artritis inducida por colágeno (CIA) en ratones DBA/1. Nuestro enfoque se comparó con el metrotexato (MTX), medicamento de referencia para la AR. Se realizó la evaluación clínica e histopatología de los animales y se cuantificaron los niveles del TNF-α. Ambos APLs inhibieron eficientemente el curso de la AA y

la CIA, con una reducción significativa de los signos clínicos e histopatológicos. Comprobamos que el efecto terapéutico inducido por los APLs está mediado por diferentes mecanismos moleculares, asociados con la tolerancia inmunológica. Estos resultados indican las potencialidades terapéuticas de estos APLs y sustentan investigaciones futuras de dichos candidatos para el tratamiento de la AR.

Palabras clave: artritis reumatoide, tolerancia, HSP60, APL, células T reguladoras.

INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune sistémica que afecta al 1 % de la población mundial, con un índice mujer/hombre de 3:1.Su desarrollo se asocia a factores hormonales, ambientales y genéticos. 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 el hueso. Esto genera una marcada discapacidad en los pacientes, la cual afecta considerablemente su vida familiar y social. Tradicionalmente la AR se ha tratado con fármacos que actúan como potentes inmunosupresores no específicos, por lo que no constituyen una terapia eficiente. Los avances en el conocimiento de la fisiopatología de la AR y en la biotecnología, han propiciado el surgimiento de la terapia biológica, basada en el bloqueo de elementos claves en la patogenia de la enfermedad. Estos incluyen citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), la interleucina (IL) 1, IL-6, IL-17 y moléculas coestimuladoras como CD80/86. Dentro de estos fármacos los anti-TNF constituyen los de mayor éxito en la clínica, no obstante, cerca del 50 % de los pacientes no responden a esta terapia. Además, debido a que inhiben una citocina crucial involucrada en la respuesta inmune innata y adaptativa, provocan en muchos pacientes alta susceptibilidad a contraer infecciones y neoplasias.

El desarrollo de variantes terapéuticas que eliminen específicamente células T patogénicas sin provocar una inmunosupresión generalizada, constituye un reto en la actualidad. En ese sentido, la inducción de tolerancia periférica con autoantígenos involucrados en la patogénesis de la AR,

constituye una alternativa para este propósito. La proteína de estrés celular de 60 kDa (HSP60, del inglés *Heat Shock Protein 60*) se considera un autoantígeno para la AR y otras enfermedades autoinmunes. 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. Por otra parte, se ha descrito que la HSP60 puede inducir células T reguladoras (Treg) en determinadas condiciones como los procesos inflamatorios. Estos elementos señalan a la HSP60 como un candidato atractivo para la inducción de tolerancia periférica en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes. Además de péptidos que contienen epitopos originales de autoantígenos, la inducción de tolerancia periférica también se ha abordado en varios modelos experimentales con el uso de ligandos peptídicos modificados (APL, del inglés *Altered Peptide Ligands*). Los APL son análogos de los péptidos inmunogénicos de los cuales se derivan. Presentan una o varias sustituciones en las posiciones esenciales de contacto con el receptor de células T o con las moléculas HLA, que interfieren o modifican la cascada de eventos intracelulares para la activación de las células T. Para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, los APL deben tener propiedades antagónicas al péptido inmunogénico original. Se ha descrito que los APL pueden bloquear o atenuar la respuesta de las células T autorreactivas a través de mecanismos como la supresión activa mediada por células Treg, la anergia clonal y la apoptosis, los cuales pueden actuar individualmente o de manera combinada.

OBJETIVOS

1. Evaluar el efecto terapéutico de dos APL en ensayos *ex vivo* con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de pacientes con AR.
2. Evaluar el efecto terapéutico de dos APL en el modelo de artritis inducida por colágeno (AIC) en ratones DBA-1.
3. Evaluar el efecto terapéutico de dos APLen el modelo de AA en ratas Lewis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de los APL: Los epítopos de células T se predijeron a partir de la HSP60 humana con el uso del programa ProPred. Se seleccionaron dos péptidos correspondientes a los aminoácidos 90-109 y 55-75, los cuales se denominaron E18-3 y E18-12, respectivamente. En cada uno se modificó un aminoácido involucrado en la interacción con lamolécula HLA clase II. Se consideraron las moléculas HLA clase II expresadas frecuentemente por pacientes con AR. Los dos nuevos péptidos obtenidos se denominaron APL-1 y APL-2.

Evaluación de las Treg inducidas por el APL-1 en las PBMC de pacientes con AR: Se analizó la inducción de Treg por el péptido APL-1 en ensayos*ex vivo* con las PBMCde 13 pacientes con AR. Las PBMC se aislaron a través de un gradiente de Ficoll y se estimularon con 40 µg/mL del péptido CIGB-814 o el E18-3 por cinco días. Se marcaron con anticuerpos específicos para CD4, CD25 y Foxp3 y se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células T con el fenotipo $CD4^{+}CD25^{high}Foxp3^{+}$.

Cuantificación de la concentración de IL-10 e IL-17inducida por el APL-2 en las PBMC de pacientes con AR: Las PBMC aisladas de 15 pacientes con AR se cultivaron en presencia de 40 µg/mL de los péptidos APL-2 o E18-12 durante 24 h. La concentración de las citocinas IL-10 e IL-17 se cuantificó en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISAs comerciales.

Análisis de las fases del ciclo celular de los linfocitos T CD4+ aislados de pacientes con AR: Las PBMC provenientes de 15 pacientes con AR se cultivaron durante 72 h en presencia de 40 µg/mL de los péptidos APL-2, E18-12 o 5 µg/mL de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 como control positivo. Se purificaron las células T CD4+ mediante perlas magnéticas, se tiñeron con yoduro de propidio (100 µg/mL) y RNAsa (50 µg/mL) y se analizaron mediante citometría de flujo.

Evaluación terapéutica de los APL en el modelo de AA: Los APL se evaluaron comparándolos con los péptidos originales en el modelo de AA. Las ratas se dividieron al azar en varios grupos (n=12) el día 11, cuando se hicieron evidentes los signos asociados al desarrollo de la artritis. La

puntuación media de la artritis en el día 21 (día de máxima severidad) fue el parámetro principal usado para medir los resultados clínicos y la evaluación de los efectos terapéuticos. Se sacrificaron cuatro animales por grupo el día 21 y se cuantificó la producción de TNF-α en el bazo, se colectaron las articulaciones del tobillo y se determinó el grado de daño histológico.

Evaluación terapéutica de los APL en el modelo de CIA: El efecto terapéutico de los APL se evaluó y se comparó con el metrotexato (MTX) en otro modelo animal donde la artritis es inducida por un autoantígeno diferente. La CIA se indujo en ratones DBA/1 por inmunización subcutánea con colágeno tipo II. Los animales desarrollaron la artritis entre los días 23 y 26.Se dividieron al azar en cuatro grupos (n=12) y se trataron con el APL-1, APL-2, MTX o PBS, este último como control negativo. En el día 46, se sacrificaron cuatro ratones por grupo para el examen histológico y para cuantificar la concentración de las citocinas TNF-α, IL-17 e IL-10.

RESULTADOS

Evaluación de las Treg inducidas por el APL-1 en las PBMC de pacientes con AR: La estimulación *ex vivo* de las PBMC aisladas de pacientes con AR con el péptido APL-1 incrementó la proporción de Treg con fenotipo $CD4^{+}CD25^{high}Foxp3^{+}$, en comparación con el péptido E18-3 original.

Cuantificación de la concentración de IL-10 e IL-17 y análisis de las fases del ciclo celular inducidas por el APL-2 en las PBMC de pacientes con AR: La estimulación *ex vivo* de las PBMC aisladas de pacientes con AR con el péptido APL-2 incrementó la concentración de IL-10 más de tres veces y suprimió la secreción de IL-17 en más de un 50 % en comparación con el control negativo. Asimismo, el péptido indujo la activación de las células T $CD4^{+}$ con fenotipo regulador al modificar la distribución de las fases de su ciclo celular.

Evaluación terapéutica de los APL en el modelo de AA: El tratamiento de las ratas con el APL-1 o el APL-2 redujo significativamente la puntuación de la AA en el día 21, en comparación con los animales tratados con PBS. La mejoría inducida por ambos APL fue comparable con la de animales sanos, y se correspondió con una disminución de la destrucción de la articulación por el proceso artrítico. El examen histológico de las articulaciones mostró una erosión severa del

cartílago y el hueso, así como una infiltración masiva de células y una evidente formación de pannus en todas las ratas inoculadas con PBS. En contraste, la administración subcutánea del APL-1 o el APL-2 dio lugar a la supresión de estas características histológicas de la AA. Sin embargo, todas las ratas tratadas con los péptidos E18-3 o E18-12 presentaron una puntuación histológica de 3 (valor máximo), con infiltración celular masiva, sinovitis y erosiones moderadas del hueso y el cartílago. Estos resultados indican que ambos APL suprimieron eficientemente la AA. Además, la administración de ambos APL redujo significativamente la concentración de TNF-α. Por otro lado, la capacidad del APL-1 para inducir Treg fue confirmado por un aumento significativo de los porcentajes de células T $CD4^{+}CD25^{high}FoxP3^{+}$ en las ratas tratadas con este péptido, en comparación con las ratas no tratadas o tratadas con el E18-3.

Evaluación terapéutica de los APL en el modelo de CIA: El tratamiento de los ratones con los APL redujo la severidad de la CIA en comparación con los animales tratados con PBS, a partir del día 37 después de la primera inmunización y hasta el final del protocolo. Resultados similares se observaron en los animales tratados con MTX. Los resultados del examen histológico mostraron una estrecha correlación con los signos clínicos de la enfermedad. Todos los ratones sin tratamiento presentan una puntuación histológica de 3, mientras que los inoculados con los APL solo presentaron daños histológicos leves en las articulaciones. Por otro lado, el tratamiento con el APL-2 redujo significativamente la secreción de IL-17 y TNF-αen comparación con los ratones inoculados con PBS. Los niveles de estas citocinas en este grupo fueron similares a las obtenidas en los animales sanos. La administración del MTX o el APL-1 redujo significativamente la secreción de TNF-α, pero no modificó la de IL-17. Solo la combinación del APL-1 con el MTX aumentó en los ratones los porcentajes de células T $CD4^{+}CD25^{high}FoxP3^{+}$.

CONCLUSIONES

1. El APL-1 ejerce un potente efecto terapéutico en el modelo de AA, asociado con la inducción de Treg. Además, reduce la respuesta patogénica en el modelo de AIC al nivel del MTX. En ambos modelos la reducción de la enfermedad estuvo en correspondencia con una disminución de los niveles del TNF-α.

2. La combinación del APL-1 y el MTX es efectiva en el tratamiento de los ratones con AIC e induce células Treg en el bazo de los animales. Esta combinación podría ser aplicable a los pacientes con AR, al combinar el efecto anti-inflamatorio del MTX con el efecto regulador del APL-1.
3. Al inducir Treg en varios modelos experimentales, elAPL-1 podría aplicarse a otras enfermedades autoinmunes donde la HSP60 se considera un autoantígeno, como: espondiloartropatías, diabetes tipo I y enfermedad de Crohn.
4. El APL-2 activa células T $CD4^{+}$con fenotipo regulador ya que incrementa los niveles de IL-10 y suprime la IL-17.Esto indica que la sustitución de un aminoácido realizada en el péptido E18-12 induce un cambio del perfil de citocinas inflamatorio hacia uno regulador. La administración del APL-2 inhibe eficientemente la progresión de la AA en las ratas, asociado con una disminución de los niveles de TNF-α, lo cual convierte al APL-2 en un candidato terapéutico para el tratamiento de pacientes con AR.
5. El APL-2 reduce la respuesta inflamatoria en el modelo de AIC de forma similar al MTX, asociado con una disminución de citocinas inflamatorias, lo que sustenta su posible uso en la primera línea de tratamiento de los pacientes con AR.

RECOMENDACIONES

1. Evaluar la inducción de Treg por el APL-1 y el patrón de citocinas inducido por el APL-2 en las PBMC de pacientes con espondiloartropatías, diabetes tipo I y enfermedad de Crohn.
2. Evaluar el APL-1 y el APL-2 en modelos animales de espondiloartropatías, diabetes tipo I y enfermedad de Crohn, comparándolos con los respectivos medicamentos de referencia para estas enfermedades. 3) Evaluar la combinación del APL-1 con el APL-2 en los modelos animales de espondiloartropatías, diabetes tipo I y enfermedad de Crohn.

BIBLIOGRAFÍA

1. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthtritis. Lancet.2016; 388(10055):2023-38.
2. Rajaiah R, Moudgil KD. Heat-shock proteins can promote as well as regulate autoimmunity. Autoimmun. Rev. 2009; 5: 388-93.

3. Candia M, Kratzer B, Pickl WF. On Peptides and Altered Peptide Ligands: From Origin, Mode of Action and Design to Clinical Application (Immunotherapy). Int Arch Allergy Immunol.2016; 170:211-33
4. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity.Nat.Immunol.2010; 11(1): 7-13.
5. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and Maintenance of Regulatory T cells. Immunity. 2013, 38(3): 414-23.