



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE
LOS TRABAJADORES DEL ESTADO**
HOSPITAL GENERAL REGIONAL "LIC. ADOLFO LÓPEZ MATEOS"

**"EMPLEO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS COMO
TRATAMIENTO PARA SUPRIMIR LAS RESPUESTAS DE
LINFOCITOS AUTORREACTIVOS EN PORTADORES DE
DIABETES MELLITUS TIPO 1"**

**TRABAJO DE INVESTIGACION QUE PRESENTA:
DR. MOISÉS SÁNCHEZ DÍAZ**

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA ESPECIALIDAD EN:
PEDIATRÍA**

**ASESOR DE TESIS:
DRA. MARTHA EUNICE RODRÍGUEZ ARELLANO
DRA. MARIA CARMEN SANCHEZ TORRES**



REGISTRO: 244. 2012

México, D.F. 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DR. FÉLIX OCTAVIO MARTÍNEZ ALCALÁ
COORD.DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

DR. GILEBALDO PATIÑO CARRANZA
JEFE DE ENSEÑANZA

DRA. MARTHA EUNICE RODRÍGUEZ ARELLANO
JEFE DE INVESTIGACION

DR BALTAZAR BARRAGAN HERNANDEZ
PROFESOR TITULAR

DRA. MARIA CARMEN SANCHEZ TORRES
ASESOR DE TESIS

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis la dedico a los niños (mis pacientes), mis verdaderos maestros, que día con día y a pesar de sus dolencias, padecimientos y miedos, me mostraron el gran valor de la pediatría y me hicieron responsable en cuanto a mis actos, gracias a ellos puedo darle otro giro y sentido a mi vida.

A todos mis profesores del ISSSTE por las enseñanzas, los consejos, los regaños y las experiencias vividas, que ahora utilizaré para formar parte de este gran gremio.

Gracias al IPN y CINVESTAV por ser mi casa desde el principio y ahora permitirme conocer a personas buenas y, sobre todo, con tantos conocimientos y preparación los cuales me brindaron siempre, para poder realizar este proyecto de tesis.

Quiero hacer un agradecimiento especial para mi madre y mi padre, gracias a su trabajo, entrega, constancia, consejos, principios y educación que me brindaron, yo ahora puedo tener este logro, gracias por enseñarme a trabajar, a ser responsable y a tener libertad.

Gracias a las personas que creyeron en mí y me dieron su amistad y apoyo en todo, al Dr. Luis Manola (gracias Luis), Dr. Jorge Arabi, Dra. Alma Ponce, Dra. Miriam Mendoza, Dr. Marco Corona, Dra. Eunice Rodríguez y más personas que me aconsejaron y tendieron la mano, así como me brindaron su experiencia en los momentos que más lo necesité.

Ahora soy más fuerte, más responsable, más consciente, más seguro y gracias a Dios por ponerme los medios para encontrar esto.

Moisés Sánchez Díaz

ÍNDICE

Portada.....	1
Firmas.....	2
Agradecimientos.....	3
Índice.....	4
Resumen.....	5
Introducción.....	6
Marco Teórico.....	7
Objetivo General.....	13
Objetivos Específicos.....	14
Material y Métodos.....	15
Metodología Estadística.....	20
Resultados.....	20
Discusión.....	22
Conclusiones.....	24
Apéndice.....	26
Bibliografía.....	29
Anexos.....	32

RESUMEN

La Diabetes Mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia, consecuencia de defectos en la secreción y/o en la acción de la insulina. La DM autoinmune tipo 1 (DM1) se caracteriza por una destrucción de las células beta pancreáticas, deficiencia absoluta de insulina y tendencia a la cetoacidosis. Para prevenir el aumento de la glucosa en sangre hasta niveles patológicos, los pacientes con DM1 tienen que recibir tratamiento con insulina exógena de por vida. La DM1 se diagnostica predominantemente en niños y adultos jóvenes.

La Organización Mundial de la Salud estima que más de 180 millones de personas en el mundo tienen diabetes (de ellos, 5-15% tienen DM1), y es posible que este número se duplique para 2030. Aunque la frecuencia de DM1 representa alrededor del 2% del total de los casos de diabetes en México, constituye un serio problema de salud, ya que a pesar de la suplementación de insulina, los niveles variablemente elevados de glucosa en sangre incrementan el riesgo de complicaciones severas, como enfermedades cardiovasculares, nefropatías, neuropatías y retinopatías. Estos datos refuerzan la necesidad de diseñar nuevos tratamientos que curen la enfermedad, o al menos retrasen o prevengan su inicio. Tales tratamientos requieren una delicada manipulación de la respuesta inmunitaria. La etiología que conduce al desarrollo de DM1 es desconocida, y tanto factores ambientales como genéticos juegan un papel en la misma.

El inicio de la enfermedad y los signos clínicos vienen precedidos de una fase no clínica prolongada, durante la cual tiene lugar una reacción autoinmune muy agresiva. Por ejemplo, en un 85-95% de los casos, los pacientes presentan anticuerpos anti-islotos beta (ICAs), anti-GAD65 (glutamato decarboxilasa, variante de 65 kDa) y anti-insulina, entre otros. La patología de la DM1 viene dictada por la activación de clonas T autorreactivas de fenotipo efector/memoria, tanto CD4+ como CD8+, contra antígenos diabetogénicos que contribuyen a la destrucción pancreática con anterioridad a las manifestaciones clínicas, por lo que es importante también desarrollar metodologías que nos permitan detectar esta fase silenciosa de la enfermedad. Si bien los linfocitos de memoria son responsables del desarrollo y mantenimiento de patologías autoinmunes, los estudios encaminados a diseñar estrategias para la supresión de la función de estas células (tolerización) son muy escasos.

El uso de las DC como inmunoterapia para DM1 se ha estudiado en modelos de ratón con el fin de prevenir la aparición de la enfermedad o mejorar su evolución, pero hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio para evaluar si estas DC pueden tener un impacto en la inducción de

tolerancia de linfocitos T humanos frente a autoantígenos diabetogénicos, y si la aplicación in vivo de DC autólogas tolerogénicas a pacientes con DM1 puede ayudar al tratamiento o a la prevención de su aparición en sujetos con alto riesgo genético de desarrollarla. Por ello, en este proyecto nos proponemos generar in vitro DC tolerogénicas a partir de monocitos provenientes de pacientes con DM1 y familiares sanos que no han desarrollado la enfermedad, y analizar su efecto en la inducción de anergia específica de antígeno sobre linfocitos T de memoria CD4+ y CD8+ autorreactivos. Para ello emplearemos dos antígenos diabetogénicos bien definidos que son reconocidos por estas poblaciones linfocitarias, insulina y GAD65. Además, se intentarán definir los mediadores que causan el estado de anergia en los linfocitos mediante la evaluación de los factores mencionados anteriormente.

Finalmente, con el fin de analizar el momento en que las DC tolerogénicas ejercen su acción más eficientemente, se investigará si su capacidad de inducción de anergia puede variar entre el momento del diagnóstico y después de transcurrido un año con tratamiento de insulina. Este conocimiento, en conjunto, nos permitirá diseñar un tratamiento de DC para pacientes pre-diabéticos de alto riesgo y para pacientes que ya han desarrollado síntomas clínicos, así como evaluar si la detección de linfocitos T autorreactivos en familiares sanos puede representar un factor pronóstico para el desarrollo de DM1.

Palabras clave: *diabetes mellitus tipo 1 (DM1), Células dendríticas (CD), Autoinmunitario, Anergia, tolerogenicidad, insulina.*

INTRODUCCIÓN

La regulación de la respuesta inmunitaria hacia los antígenos (Ag) propios es un proceso complejo que depende del mantenimiento de la tolerancia a lo “propio” mientras se mantiene la capacidad de montar una respuesta inmunitaria adecuada frente a Ag foráneos. Los linfocitos T (LT) específicos para estos auto-Ag están presentes en la mayoría de los individuos, pero son mantenidos bajo control por medio de múltiples mecanismos de tolerancia periférica. La tolerancia periférica se refiere a los eventos que ocurren después de que los LT maduran en el timo y migran a los tejidos periféricos y a los órganos linfoides secundarios, donde pueden entrar en contacto con el auto-Ag que algunos reconocen (1). Estos mecanismos periféricos juegan un papel esencial en el mantenimiento de la tolerancia y la prevención de enfermedades autoinmunes. Las terapias encaminadas a modular la inmunidad periférica pueden alterar sustancialmente la progresión de la autoinmunidad en pacientes con estas enfermedades, incluidos los que desarrollan diabetes mellitus de tipo 1.

MARCO TEÓRICO

1. Diabetes mellitus de tipo 1

La Diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia, consecuencia de los defectos en la secreción y/o en la acción de la insulina. La DM autoinmune de tipo 1 (DM1) se caracteriza por una destrucción de las células β pancreáticas, deficiencia absoluta de insulina y tendencia a la cetoacidosis. El ataque autoinmune dirigido contra las células β empieza varios años antes (5 años o más) de la presentación clínica de la diabetes (2). Incluso después del diagnóstico de diabetes existe todavía una función significativa de las células β , lo cual explica por qué después del tratamiento de la presentación aguda puede haber un período de remisión clínica denominado fase de la “luna de miel” (3). Desafortunadamente, la remisión es temporal, y la función de las células β declina, por lo que los pacientes necesitan terapia de reemplazo con insulina de por vida.

La DM1 se diagnostica predominantemente en niños y adultos jóvenes, aunque la enfermedad se puede manifestar a cualquier edad, y representa el desorden autoinmune más común durante la infancia. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que más de 180 millones de personas en el mundo tienen diabetes (de ellos, 5-15% tienen DM1), y es posible que este número se duplique para 2030. Aunque la frecuencia de DM1 representa alrededor del 2% del total de los casos de diabetes en México, constituye un serio problema de salud, ya que a pesar de la suplementación de insulina, los niveles variablemente elevados de glucosa en sangre incrementan el riesgo de complicaciones severas, como enfermedades cardiovasculares, nefropatías, neuropatías y retinopatías.

Existen personas con un riesgo genético incrementado de contraer la enfermedad, como las que tienen una historia familiar de DM1, y actualmente se conocen varios *loci* genéticos asociados a la misma, entre los que se encuentran los del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Individuos con alelos específicos de HLA DR/DQ [e.j., DRB1*03-DQB1*0201 (DR3) o DRB1*04-DQB1*0302 (DR4)] tienen mayor riesgo de contraer DM1. El genotipo asociado de mayor riesgo es el heterocigoto DR3/4-DQ8 (DQ8 es DQA1*0301, DQB1*0302); así mismo, existen alelos protectores, como DQB1*0602 (4). No obstante, sólo una fracción de estas personas (<10%) iniciará la respuesta autoinmune contra las células β . Los mediadores de la iniciación de esta respuesta se desconocen en la actualidad, pero se han involucrado factores ambientales, como la dieta o infecciones.

El inicio de la enfermedad y los signos clínicos vienen precedidos de una fase no clínica de duración muy variable (desde pocos meses hasta varios años), durante la cual tiene lugar una reacción autoinmune muy agresiva (5). La aparición de los auto-anticuerpos (auto-Ab) es el primer signo detectable de la autoinmunidad emergente frente a las células β . Por ejemplo, en un 85-95% de los casos, los pacientes presentan Ab anti-insulina (IAA), anti-islotos beta (ICA), anti-GAD65 (decarboxilasa del ácido glutámico, isoforma de 65 kDa, GADA), y anti-insulinoma Ag 2 (IA-2A), entre otros. Estos cuatro grupos de Ab son predictivos para el desarrollo de DM1 (6) y, en estudios familiares, la positividad para 3-4 auto-Ab se asocia con un riesgo de desarrollar DM1 en el rango de 60-100% durante los siguientes 5-10 años (7). Si bien no hay un consenso sobre cuál es el auto-Ag primario que desencadena la producción de Ab, se han propuesto tanto la proinsulina o la insulina como GAD65, dependiendo de la base genética del paciente (8).

La patología de la DM1 viene dictada por la activación de clonas T autorreactivas de fenotipo efector/memoria, tanto CD4+ como CD8+, contra Ag diabetogénicos que contribuyen a la destrucción pancreática con anterioridad a las manifestaciones clínicas (5, 9, 10), por lo que es importante desarrollar metodologías que nos permitan detectar esta fase silenciosa de la enfermedad. Durante el transcurso de esta fase asintomática, las células β se van destruyendo (insulinitis) y el páncreas va perdiendo progresivamente su capacidad para mantener la normoglicemia, hasta que se detectan anomalías metabólicas. Éstas progresan desde una respuesta de primera fase a la insulina (FPIR) alterada (en pruebas de tolerancia a glucosa intravenosa), hasta la ausencia de tolerancia a la glucosa en pruebas de administración oral, y finalmente hasta la diabetes.

Se ha comprobado que la alteración de la FPIR junto con la presencia de Ab frente a Ag de los islotes (y la carencia del alelo protector DQB1*0602) están asociados con un riesgo mayor del 50% de progresión a diabetes dentro de los siguientes 5 años (11). En el momento del diagnóstico, se ha estimado que sólo 10-20% de las células β son funcionales. Sin embargo, los pacientes continúan produciendo el péptido C, lo cual evidencia la función de las células β pancreáticas.

Existen estudios que muestran que la producción continuada de este péptido se asocia con un menor número de eventos hipoglicémicos y con un riesgo disminuido de complicaciones por la enfermedad.

2. Características de la autoinmunidad humoral en DM1

Como se ha mencionado anteriormente, existen varios Ag frente a los que se generan auto-Ab en los individuos con un alto riesgo genético de desarrollar DM1 y en los pacientes afectados por la enfermedad: insulina, GAD65, Ag de los islotes, IA-2, o el transportador de zinc Slc30A8. La

diversificación de los epítomos tanto dentro de los auto-Ag como entre un auto-Ag y otro (“epitope spreading”) es un fenómeno típico que se produce durante la fase pre-clínica de la enfermedad (13). Por ejemplo, los primeros Ab contra GAD65 se detectan en la región central de la molécula, y posteriormente se generan otros que reconocen la zona C-terminal. Prácticamente no se observan casos que produzcan auto-Ab frente a la región N-terminal. Los auto-Ab IA-2A reconocen la región citoplásmica de IA-2; los primeros auto-Ab que aparecen reconocen la región yuxtamenbranal (JM), y posteriormente se diversifican hacia múltiples epítomos en el dominio fosfatasa. La progresión hacia DM1 se ha asociado con la presencia de ambos tipos de Ab, en especial contra la región JM (14, 15).

La respuesta humoral frente a todos estos auto-Ag está determinada mayoritariamente por el isotipo IgG1, en algunos casos de manera prácticamente exclusiva (GADA, IA-2A), y en otros casos se aúnan (aunque en menor grado) con respuestas de IgG4 e IgG3 (IAA). IgG2 parece ser el isotipo menos frecuente. Estos datos, en conjunto, podrían asociarse con respuestas de tipo celular Th1, predominantes en DM1.

3. Características de la autoinmunidad celular en DM1

La destrucción de las células β de los islotes pancreáticos es mediada esencialmente por componentes de la inmunidad celular: LT, macrófagos y células dendríticas (DC). Los datos referentes a la respuesta inmune *in situ* en humanos con DM1 son limitados debido a la escasa disponibilidad de páncreas de los pacientes. Sin embargo, se ha demostrado que la insulinitis se caracteriza por una gran infiltración de células mononucleares, esencialmente LT CD8+, seguidos en número por macrófagos, LT CD4+, DC y linfocitos B (16). Si bien se desconoce el sitio inicial donde los LT son activados, se ha propuesto que éstos son estimulados por células presentadoras de Ag (APC) en los nódulos linfoides que drenan el páncreas, las cuales portan Ag derivados de los islotes pancreáticos. Se han descrito 155 epítomos derivados de Ag de las células β que son reconocidos por los LT CD4+ humanos (derivados de GAD65, insulina, IA-2, las proteínas choque térmico 60 y 70), y 22 para los LT CD8+ (GAD65, IA-2, insulina) (17).

Los datos más detallados acerca de la respuesta inmune celular en esta enfermedad se han obtenido de un modelo animal, el ratón NOD (non-obese diabetic). En estos animales, el inicio de la diabetes ocurre espontáneamente a las 12-14 semanas de vida. Desde las 3-4 semanas se puede observar un infiltrado de células mononucleares en el páncreas, esencialmente de macrófagos y DC, que se incrementa progresivamente e invade los islotes, hasta que a las 10 semanas se desarrolla una insulinitis severa. La composición de los infiltrados es compleja. La mayoría de las células son LT CD4+, y aunque en las lesiones se identifican también LT CD8+,

células NK, linfocitos B, DC y macrófagos (18), el desarrollo de la diabetes es totalmente dependiente de la presencia de LT CD4+ y CD8+, ya que ambos son capaces de transferir la enfermedad, al contrario que los auto-Ab (19). Un caso análogo en humanos es el desarrollo de DM1 en recipientes de médula ósea procedente de donantes con DM1 (20). Los LT CD4+ son esenciales tanto en los eventos tempranos como tardíos del desarrollo del daño (21), y pueden mediar directamente la destrucción de los islotes. Sin embargo, los LT CD8+ promueven también la enfermedad. Se ha apuntado un papel fundamental de estos LT en eventos tempranos de la enfermedad, provocando una destrucción importante de los islotes que favorecería una potente respuesta de LT CD4+ (22). Debido a las características de la respuesta inmune ya mencionadas, se cree que el perfil Th1 está asociado con la progresión de la enfermedad, y que las respuestas de tipo Th2 pueden colaborar con la supresión del desarrollo de DM1 (23).

La regulación inmunológica juega un papel esencial en el desarrollo de DM1. Existen una serie de datos que evidencian que la aparición de la diabetes puede detenerse por mecanismos que aún se desconocen. Por ejemplo, no todos los individuos que son seropositivos para Ag diabetogénicos desarrollan la enfermedad. Se considera que las células T reguladoras naturales o inducidas (Treg) pueden ser importantes en el control de la progresión de DM1, así como otras células reguladoras del tipo Tr1 [productoras de interleucina (IL)-10], e incluso los linfocitos Th2. Algunos trabajos han demostrado una función o frecuencia anómala de estas células en el modelo del ratón NOD y en humanos con DM1 (24, 25).

4. Tratamientos inmunoterapéuticos frente a DM1

Estos tratamientos están dirigidos a prevenir el desarrollo de la DM1 y, después del diagnóstico, a evitar la destrucción de las células β residuales. Las terapias que se han utilizado para DM1 han sido tanto específicas como no específicas de Ag.

4.1. Inmunoterapia no específica de Ag

Existe un amplio espectro de agentes como la ciclosporina, azatioprina o prednisona que inactivan a los LT patogénicos y que han sido utilizados en individuos recién diagnosticados con DM1 con el fin de prolongar la remisión clínica de la enfermedad (26). El efecto de estas drogas no ha resultado ser muy potente y, aunque en algunos casos han conseguido disminuir el requerimiento de insulina, muestran toxicidad a corto y a largo plazo. Aunque la inmunoterapia no específica de Ag no está dirigida directamente hacia la población de LT patogénicos, puede inducir tolerancia específica, como ocurre con los tratamientos con Ab anti-CD3. El concepto de esta terapia no específica de Ag es que sus células blanco son *LT activados*, por lo que en individuos con DM1

recién diagnosticados es posible que sea eficiente sólo en los LT pancreáticos debido a la actividad de la enfermedad.

4.2. Inmunoterapia específica de Ag

Las terapias específicas de Ag están dirigidas a controlar los procesos autoinmunes mediante la inducción de tolerancia frente a un Ag en particular, en lugar de establecer una inmunosupresión generalizada que pueda comprometer la respuesta inmunológica del individuo. El racional que está detrás de estas intervenciones es tolerizar a los LT patogénicos para que no respondan frente al auto-Ag, bien directamente a través del uso del Ag administrado de manera tolerogénica (oral) o de manera que induzca respuestas Th2 (usando alúmina como adyuvante), bien con APC tolerogénicas, o indirectamente a través de la generación de células Treg que induzcan anergia o la eliminación de los LT autorreactivos (27). Sin embargo, hasta el momento no se han realizado ensayos clínicos que involucren terapia celular. Al contrario, se ha intentado tolerizar a los LT patogénicos mediante la aplicación oral, parenteral o subcutánea de los propios Ag, como insulina o GAD65 (28, 29). Los ensayos se han realizado sobre grupos de riesgo y sobre individuos con diagnóstico de DM1, no encontrándose ningún beneficio contrastable tras las terapias.

4.2.1. Inmunoterapia con DC

La tolerancia frente a un Ag específico puede ser inducida muy eficientemente mediante la presentación de este Ag en el contexto de DC inmaduras, semi-maduras, o modificadas. La tolerancia periférica de los LT puede ser generada y mantenida por las DC mediante diversos mecanismos, como la inducción de anergia, la desviación inmunológica, la eliminación de clonas autorreactivas, o la generación de linfocitos Treg (30).

Las DC constituyen una familia heterogénea de APC profesionales implicadas tanto en la iniciación de la inmunidad como de la tolerancia inmunológica (31). En su versión como APC inmunogénicas, las DC son las únicas células capaces de iniciar las respuestas de los LT vírgenes, e incluso tienen un papel esencial en la reactivación de las respuestas de memoria (32), debido a su alta expresión de moléculas del MHC de clase I y II, y de moléculas de adhesión y co-estimulación (33). Las células precursoras de las DC se generan en la médula ósea y migran de la sangre a los tejidos periféricos, dando lugar a las DC inmaduras (iDC), las cuales actúan como centinelas del sistema inmune, ya que se encuentran continuamente muestreando el microambiente (33, 34). Las iDC captan los Ag mediante diversos mecanismos: macropinocitosis, fagocitosis, o endocitosis mediada por receptor (35). En respuesta a “señales de peligro” tales como daño tisular, productos derivados de patógenos, o citocinas inflamatorias, las DC maduran y migran hacia los órganos linfoides, donde interaccionan con los LT e inician una respuesta inmunitaria (33).

Por el contrario, las DC tolerogénicas (tDC) se caracterizan por su baja expresión constitutiva de moléculas co-estimuladoras positivas comparadas con la de factores inhibidores [ej. transcritos similares a inmunoglobulinas (ILT) 2, 3, 4, B7-H1, B7-H2], así como por su capacidad de suprimir un amplio rango de respuestas T efectoras (36). Distintos estadios de desarrollo de las DC (iDC, DC semi-maduras) y algunos subtipos de DC (DC plasmacitoides en reposo) son capaces de inducir anergia en los LT y la generación de Treg (37). Además, las DC “activadas alternativamente” o “modificadas” expuestas a varios agentes inmunosupresores o drogas inmunomoduladoras, están provistas de esta función tolerogénica. Para su generación se han utilizado diversos factores, como IL-10, factor de crecimiento transformante (TGF)- β 1, factor de crecimiento de hepatocitos, péptido intestinal vasoactivo, vitamina D3 o corticosteroides, entre otros (38, 39).

La terapia con DC más extendida para los humanos consiste en derivar *ex vivo* estas células a partir de monocitos sanguíneos, pulsarlas con el Ag de interés, y re-infundirlas de nuevo al paciente. Los tratamientos con DC inmunogénicas han tenido éxito en pacientes con cáncer o con enfermedades infecciosas; sin embargo, las DC tolerogénicas no se han utilizado todavía en humanos. Con respecto a la DM1, en el ratón NOD se han probado con éxito varias formas de DC que protegen a los animales del desarrollo de la enfermedad, a través de varios posibles mecanismos: inducción de células Treg [DC procedentes de los nódulos linfoides pancreáticos (40)], desviación inmunológica a favor del fenotipo Th2 [DC derivadas de médula ósea con factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) +/- IL-4 (41)], DC esplénicas pulsadas con α -globulina humana (42)], o inducción de tolerancia específica de Ag [iDC pulsadas con un péptido de insulina (43)].

5. Antecedentes directos

Nuestro grupo ha publicado recientemente un trabajo donde se describe la eficiente inducción de tolerancia (anergia) en linfocitos T CD4+ de memoria de individuos sanos vacunados con toxoide tetánico (TT), mediante el uso de DC autólogas tolerogénicas (tDC), generadas en presencia de las citocinas inmunosupresoras IL-10 y TGF- β 1. Factores como adenosina, prostaglandina (PG)E₂, trombospondina (Tsp)-1 o IL-10 mediaron el efecto de estas tDC en el modelo de TT (44). Es importante resaltar que los trabajos realizados sobre la tolerización de LT de memoria son escasos con respecto a los realizados para LT vírgenes; sin embargo, la importancia de los LT de memoria es clave en enfermedades autoinmunes o en el rechazo de trasplantes, ya que estas células son las que perpetúan la patología.

Hasta la fecha, apenas existen estudios que evalúen si estas DC pueden tener un impacto en la inducción de tolerancia de linfocitos T humanos frente a auto-Ag diabetogénicos. Además, todavía no se ha podido determinar si la aplicación *in vivo* de DC autólogas tolerogénicas a pacientes con DM1 puede ayudar al tratamiento o a la prevención de su aparición en sujetos con alto riesgo genético de desarrollarla. Nuestro grupo de trabajo analizó la inducción de anergia en LT CD4+ por parte de tDC pulsadas con insulina en algunos pacientes mexicanos con DM1. Si bien el número de pacientes analizado fue muy pequeño (4), pudimos observar inducción de anergia específica de insulina en 2 de ellos. Este trabajo fue continuado en una colaboración con el Dr. Yehuda Shoenfeld (Center for Autoimmune Diseases, Sheba Medical Center, Israel) por el Dr. Torres Aguilar, quién fue el responsable de realizar los dos trabajos descritos anteriormente durante su etapa de doctorado bajo mi dirección. Se analizaron los LT de memoria CD4+ de 8 pacientes israelíes, de los cuales las tDC fueron capaces de inducir anergia específica de insulina en 5 de ellos. La inducción de tolerancia correlacionó con el estado de activación de los LT CD4+ de memoria, ya que no se logró inducir un estado de anergia en aquellos que provenían de individuos que proliferaban en presencia de DC control en ausencia de Ag (45).

De acuerdo con estos antecedentes, en este proyecto nos proponemos ampliar estos resultados preliminares y generar *in vitro* DC tolerogénicas a partir de monocitos provenientes de pacientes con DM1 y familiares sanos que no han desarrollado la enfermedad, así como analizar su efecto en la inducción de anergia específica de antígeno sobre los LT de memoria CD4+ y CD8+ autorreactivos de estos individuos. Para ello emplearemos dos antígenos diabetogénicos bien definidos que son reconocidos por estas poblaciones linfocitarias, insulina y GAD65. Además, se intentarán definir los mediadores que causan el estado de anergia en los linfocitos mediante la evaluación de los factores mencionados anteriormente (adenosina, PGE₂, Tsp-1, IL-10). Con el fin de analizar el momento en que las DC tolerogénicas ejercen su acción más eficientemente, se investigará si su capacidad de inducción de anergia puede variar entre el momento del diagnóstico y después de transcurrido un año con tratamiento de insulina. Finalmente, es importante establecer en México el porcentaje de familiares sanos de pacientes con DM1 que desarrollan auto-Ab, ya que como se mencionó anteriormente, en estudios familiares la positividad para 3-4 auto-Ab se asocia con un riesgo de desarrollar DM1 en el rango de 60-100% durante los siguientes 5-10 años (7). Este conocimiento, en conjunto, nos permitirá diseñar un tratamiento de DC para pacientes pre-diabéticos de alto riesgo y para pacientes que ya han desarrollado síntomas clínicos, así como evaluar si la detección de linfocitos T autorreactivos en familiares sanos puede representar un factor pronóstico para el desarrollo de DM1.

OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar nuevas metodologías para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 y para su diagnóstico temprano en familiares sanos de los pacientes con esta enfermedad, mediante el uso de células dendríticas autólogas pulsadas con antígenos diabetogénicos.

Este Objetivo General se sustenta en los siguientes Objetivos Específicos:

1. Seleccionar 20 pacientes de nuevo ingreso con el diagnóstico de DM1, 20 familiares de primer grado sin manifestaciones de la enfermedad con presencia de Ab frente a Ag diabetogénicos, y 20 individuos sanos.
2. Purificar linfocitos T CD4+ y CD8+ con fenotipo efector/memoria (CD45RA-) y monocitos de sangre periférica de los pacientes al diagnóstico y un año después del mismo. En el caso de los familiares y de los individuos sanos se tomará una sola muestra de sangre de la cual se purificarán los linfocitos y los monocitos.
3. Generar células dendríticas (DC) maduras control y tolerogénicas a partir de los monocitos de cada individuo en los tiempos evaluados, pulsadas con insulina, GAD65, o en ausencia de antígeno. Estas DC se co-cultivarán con los LT de memoria.
4. Analizar el fenotipo de los LT después de su co-cultivo con las diferentes DC, su producción de citocinas (IL-2, IFN- γ , IL-10) y PGE₂ en los sobrenadantes de los co-cultivos, y su capacidad de proliferación. Los ensayos finalizarán en este punto en los individuos donde las DC control no induzcan proliferación de los linfocitos, ya que estos resultados indican que no presentan clones T autorreactivos para insulina y GAD65. Se espera que los linfocitos de pacientes con DM1 y de algunos o todos los familiares sanos proliferen, mientras que los de los individuos sanos y algunos de los familiares analizados no lo hagan.
5. Evaluar la posible inducción de anergia en los linfocitos cultivados con DC tolerogénicas, mediante ensayos de proliferación con DC control, pulsadas con insulina o GAD65 (de acuerdo con la primera estimulación), con candidina (como Ag irrelevante), en presencia o ausencia de IL-2. Se realizará sólo con los linfocitos de los individuos que proliferaron frente a insulina y/o GAD65 en el primer ensayo y se evaluará la capacidad de proliferación de los linfocitos.
6. Determinar la participación de las moléculas PGE₂, adenosina, Tsp-1 e IL-10 en la posible inducción de anergia de los linfocitos autorreactivos de los pacientes, mediante el uso de inhibidores farmacológicos o anticuerpos neutralizantes.
7. Correlacionar la detección de clones de linfocitos T autorreactivos en familiares sanos con las posibles manifestaciones clínicas de DM1 a lo largo del período del estudio.

METAS CIENTÍFICAS

La meta principal del proyecto es profundizar en el estudio de la respuesta inmune celular en pacientes con DM1 y familiares sanos, enfocada esencialmente a la tolerización de clonas autorreactivas frente a dos Ag diabetogénicos muy comunes en los pacientes, como son la insulina y GAD65. El propósito final de este estudio es aportar conocimiento para el eventual diseño de vacunas terapéuticas de DC tolerogénicas que sean infundidas en los pacientes y propicien la inactivación de las clonas de LT autorreactivos. DM1 es una enfermedad crónica que hoy en día no tiene cura. Si bien la suplementación con insulina permite la supervivencia de los pacientes, la calidad de vida de estas personas se ve alterada, especialmente en los casos donde se presentan complicaciones como cardiomiopatías, retinopatías, o nefropatías. La inactivación específica de las clonas de LT autorreactivos puede ayudar no sólo a detener la destrucción de las células β de los islotes pancreáticos en los pacientes con DM1 activa, sino que podría evitar el desarrollo de la enfermedad en familiares sanos. Por lo tanto, este trabajo sentará las bases para responder a dos preguntas esenciales: ¿Es posible tolerizar a los LT CD4+ y CD8+ específicos de insulina o GAD65 de pacientes con DM1 y de familiares sanos que presentan auto-Ab frente a estos Ag? ¿Cuáles son los mecanismos que median esta potencial inmunosupresión? Hasta el momento nuestro grupo de trabajo ha obtenido resultados promisorios con LT CD4+ de pacientes con DM1 utilizando insulina como Ag. Sin embargo, es importante incluir otros Ag en estos estudios para determinar si la tolerización puede ser eficiente para ellos, y eventualmente poder utilizar varios de estos Ag para pulsar a las DC tolerogénicas que se infundan a los pacientes. Por otra parte, si bien los LT CD4+ son fundamentales en el desarrollo de DM1, los LT CD8+ son unas de las células efectoras que median la destrucción pancreática. Es por ello que resulta imprescindible evaluar si estos LT son capaces de ser tolerizados con DC. Finalmente, la inclusión en el estudio de familiares sanos que presentan auto-Ab frente a Ag diabetogénicos nos permitirá determinar si tienen clonas T autorreactivas frente a estos Ag, y de ser así, si éstas pueden ser tolerizadas. De esta manera, los resultados derivados de este trabajo pueden colaborar eventualmente con el diseño de nuevos tratamientos terapéuticos para estas personas sanas, evitando o retrasando el desarrollo de DM1. Además, se comenzará a realizar una base de datos que contenga la información de estos individuos para su seguimiento, lo cual permitirá por una parte evaluar el porcentaje de familiares en situación de riesgo de contraer DM1 y, por otra, determinar el número de estas personas que eventualmente desarrollan la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos de estudio

Se reclutarán pacientes de las áreas de Endocrinología, Pediatría y Urgencias del Hospital Regional "Lic. Adolfo López Mateos" con diagnóstico de DM1 de acuerdo con los criterios de la OMS, que acepten firmar el consentimiento informado. Se incluirán sólo pacientes con Ab anti-

insulina y/o anti-GAD65, y familiares sanos de primer grado con presencia de al menos uno de estos tipos de Ab. En el Servicio de Endocrinología se realizará la recolección de datos (Anexo I) y la historia clínica de los pacientes y familiares sanos, el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con DM1, la firma del consentimiento informado para participar en el estudio (Anexo II), la extracción de sangre (5 ml) para el análisis de la presencia de auto-Ab frente a insulina y GAD65 de todos los individuos reclutados y la extracción de sangre para los estudios una vez que los individuos sean incluidos en el protocolo. Así mismo, se realizará un seguimiento anual de los familiares sanos que participen en el estudio para determinar una posible evolución hacia el desarrollo de DM1 (realización del test de tolerancia oral a la glucosa). Por cada paciente con DM1 se tomará una muestra de sangre de 50-100 ml (dependiendo de su edad) en el momento del diagnóstico y un año después del mismo para realizar los ensayos celulares. A los familiares sanos positivos para algún auto-Ab y a los individuos control se les tomará una sola muestra de sangre de este volumen.

Criterios de inclusión: Hombres o mujeres con diagnóstico de DM1, y familiares de primer grado (hermanos y padres) que no han desarrollado la enfermedad y que presenten Ab anti-insulina y/o GAD65, con consentimiento informado por escrito (Anexo II). Como controles se incluirán voluntarios sanos en el mismo rango de edades y sexo.

Criterios de exclusión: Pacientes y familiares sanos que sean negativos para Ab anti-insulina o anti-GAD65, con complicaciones severas como infección activa o crónica, presencia o sospecha de neoplasia, etc, embarazo, o tratamiento con inmunosupresores. Individuos sanos con antecedentes familiares de enfermedades autoinmunes o atopias.

Criterios de eliminación: Pacientes y familiares sanos de los cuales no se cuente con historia clínica completa, que no acudan a las citas para toma de muestra sanguínea, que no firmen el consentimiento informado, o por petición del paciente.

Tamaño de la muestra: Por tratarse de un proyecto experimental original se realizarán los estudios celulares en forma inicial con 20 pacientes con DM1, 20 familiares seropositivos de primer grado y 20 individuos sanos. La selección de los 20 familiares sanos que sean seropositivos se realizará entre todos los casos de DM1 que se monitoreen en el Servicio de Endocrinología del Hospital "Lic. Adolfo López Mateos", aunque los propios pacientes no formen parte de los estudios celulares. Esto es debido a que la frecuencia de familiares seropositivos es baja, entre 3-8% según los distintos trabajos publicados. De acuerdo con estos estudios, la estimación más conservadora es que se requerirá analizar la presencia de auto-Ab en al menos 500 familiares sanos. En el caso de que no se pueda reclutar un número suficiente de familiares en el Hospital López Mateos,

solicitaremos colaboración de los Servicios de Endocrinología, Pediatría y Urgencias de otros hospitales para este propósito.

Cabe señalar que para el establecimiento de las condiciones óptimas de los experimentos ya se han realizado los mismos con 15 individuos controles vacunados con toxoide tetánico.

Determinación de la presencia de auto-Ab anti-insulina y anti-GAD65

Se extraerán 5 ml de los pacientes, familiares sanos e individuos control que se integren al estudio con el fin de obtener el suero. La presencia de auto-Ab se realizará mediante la técnica de ELISA indirecto (Euroimmun). Un suero será considerado positivo cuando su capacidad de unión al Ag exceda la media + 3 SD del valor de individuos controles sanos sin historia de DM1. Este valor se determinará previamente con los sueros sin diluir de 40 controles sanos. Los títulos de Ab serán calculados en unidades arbitrarias como la dilución de suero con una OD 492 nm tres veces superiores a la OD media del pool de sueros de los 40 individuos sanos evaluados previamente.

Purificación de células

Las células se aislarán a partir de sangre total de pacientes con DM1, de familiares sanos y de individuos control. La sangre (150 ml) se someterá a un gradiente de Ficoll-Hypaque (Nycomed Pharma AS, densidad 1.077 g/l). Tras su centrifugación a 2,000 rpm durante 30 min, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) serán separadas de la interfase entre el Ficoll y el plasma.

La población de monocitos CD14+ se purificará por selección positiva mediante el sistema MACS ("Magnetic Cell Sorting"), utilizando un Ab anti-CD14 conjugado con microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec, Alemania). Los linfocitos CD4+ y CD8+ de memoria se obtendrán a partir de PBMC por selección negativa por el sistema MACS. Una vez aislados los linfocitos CD4+ y CD8+, serán incubados con Ab anti-CD45RA conjugados con perlas magnéticas, con el fin de eliminar los LT vírgenes. Las células resultantes CD4+CD45RA- o CD8+CD45RA- corresponden a los LT de memoria.

Diferenciación de monocitos hacia DC control inmunogénicas y tolerogénicas

La obtención de DC control (cDC) se realizará bajo las condiciones ya estandarizadas en nuestro laboratorio. Los monocitos serán cultivados a una densidad de 10^6 células/ml en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de plasma humano autólogo descomplementado, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM (Hyclone Laboratories), penicilina/estreptomina 1% y 2-mercaptoetanol 50 μ M (Gibco BRL). Las células serán cultivadas

en presencia de las citocinas humanas recombinantes GM-CSF (Probiomed, 1000 U/ml) e IL-4 (R & D Systems, 120 U/ml) durante 6 días. En el día 4 se congelará la mitad de los monocitos cultivados para realizar los ensayos posteriores de anergia. Al sexto día se obtendrán iDC, las cuales se colectarán y sembrarán a una concentración de 0.5×10^6 células/ml. Se añadirá entonces el Ag: insulina, GAD65, o candidina (donado amablemente por el Laboratorio de Micología básica de la UNAM, sólo en el caso de los ensayos de anergia), a una concentración de 0.1 µg/ml, y 6 h más tarde se adicionará el estímulo de maduración, PGE₂ (Calbiochem, 0.1 µg/ml) y TNF-α (R & D Systems, 40 ng/ml). Las células se cultivarán durante 48 h más en medio con GM-CSF e IL-4, y tras este tiempo se obtendrán las DC maduras (mDC) control o inmunogénicas. La obtención de DC tolerogénicas (tDC) se realizará de la manera descrita anteriormente a excepción de que los monocitos serán tratados desde el principio del cultivo con IL-10 (40 ng/ml) y TGF-β (20 ng/ml) (R & D Systems).

Estimulación de los LT de memoria por DC control y tolerogénicas

Para medir la capacidad de estimulación de las cDC y tDC se realizarán co-cultivos de cada tipo de DC pulsadas con insulina o GAD65 con LT CD4+ o CD8+ de memoria autólogos. Los LT serán teñidos con carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE, Molecular Probes). Los co-cultivos con las DC se realizarán en medio RPMI suplementado. Se utilizará una relación DC:LT de 1:10 (2×10^4 : 2×10^5), y como control de proliferación inespecífica de Ag se utilizarán DC en ausencia de Ag. Transcurridos 5 días de co-cultivo, se recogerán los LT y se medirá su proliferación por el método de dilución de CFSE. Se realizará además una caracterización fenotípica de los mismos con los marcadores CD25, CD127 y CD39, CD152 (CTLA-4) y Foxp3 cuando el número de células obtenidas lo permita.

Adicionalmente, los LT se recolectarán después de los 5 días de estimulación, se lavarán y se resuspenderán en medio fresco. Tras 8 días de cultivo en estas condiciones, se determinará el fenotipo de los LT con los marcadores mencionados anteriormente, con el fin de determinar la estabilidad del fenotipo después de este período de reposo.

La detección de LT autorreactivos en familiares sanos con Ab diabetogénicos podría representar un factor pronóstico para el desarrollo de DM1. Con el fin de evaluar esta premisa, los datos de proliferación de los LT obtenidos con las cDC frente a insulina y GAD65 se compararán con los datos clínicos procedentes del test de tolerancia oral a la glucosa que se realizará anualmente a estos individuos. Los niveles de probabilidad para esta correlación serán calculados mediante el test de rangos de Spearman (coeficiente de correlación: r_s).

Análisis de Anergia

Con el fin de demostrar el grado de respuesta de los LT tras su contacto primario con las cDC o tDC, se realizarán los siguientes ensayos. 3×10^6 linfocitos CD4+CD45RA- 0 CD8+CD45RA- sin marcar con CFSE se cultivarán con 3×10^5 cDC o tDC pulsadas con insulina o GAD65 durante 5 días. Después de este tiempo, los linfocitos serán cosechados, lavados con DPBS y dejados en reposo en medio RPMI fresco suplementado durante 4 días más, para posteriormente ser recogidos y utilizados para el análisis de anergia. En este momento se descongelarán los monocitos cultivados durante 4 días y se generarán las cDC a partir de los mismos. Los linfocitos que fueron estimulados con cDC se denominarán LT control (cLT) y los estimulados con las tDC, LT "tolerantes" (tLT). Como control se incluirán LT autólogos que no habían sido estimulados previamente *in vitro* (rLT). Los rLT, cLT y tLT serán cosechados, marcados con CFSE y estimulados nuevamente durante 5 días con cDC, pulsadas con a) insulina, b) GAD65, c) sin Ag, d) insulina o GAD65 más la adición exógena de IL-2 (20 U/ml, Gibco BRL), o e) candidina. Posteriormente, los LT serán colectados y se analizará su proliferación por dilución de CFSE.

Análisis fenotípico de las DC y los LT

En los casos en los que el número de células lo permita, se realizará el análisis fenotípico de los distintos tipos de DC y LT mediante citometría de flujo, empleando anticuerpos monoclonales (mAb) que reconocen los siguientes marcadores: HLA-DR (TU36) conjugado con ficoeritrina (PE), CD1a (HJ149), CD14 (M5E2), CD40 (BB1), CD83 (HB15a), CD86 (IT2.2), CD206 (19.3), CD163 (GHI/61), PE-CCR7 (150503), CLIP unido a HLA-DR (CerCLIP) marcado con fluoresceína (FITC), PE-CD25 (M-A251), PE-CD152 (CTLA-4, BNI3), PE-CD127 (M21), todos de BD Biosciences; foxp3 (PCH101) marcado con alofocianina (eBiosciences), trombospondina 1 (Tsp-1, C6.7, Neo Markers) y CD39 (Bu61, Sta. Cruz Biotechnology). Por cada marcador se incubarán 10^5 células con el mAb correspondiente en tampón FACS (PBS, BSA 0.1% azida sódica 0.01%) durante 30 min a 4°C y para los mAb que no estaban marcados directamente, se añadirá un Ab policlonal anti Igs de ratón [fracción F(ab')₂, Dako] conjugado con FITC durante 30 min a 4°C. Para la detección intracelular de CTLA-4 y Foxp3, las células se fijarán y permeabilizarán con el kit de marcaje para Foxp3 (eBioscience) y se marcarán con los mAb conjugados. Las células serán fijadas con PBS-paraformaldehído 1% y se analizarán en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson).

Análisis de la producción de citocinas en sobrenadantes de DC y LT

Para analizar el perfil de citocinas de cada subtipo de DC, se incubarán 1×10^5 DC/100 µl de medio en presencia de LPS (*Escherichia coli* 0111:B4, 0.5 µg/1 x 10^6 células/ml, Sigma). Después de 24 h de estimulación se recogerá el sobrenadante y se congelará a -80°C hasta su análisis. Por otra

parte, en las respuestas autólogas específicas de Ag de los LT de memoria con los distintos tipos de DC, se recogerá parte del sobrenadante en los días 1, 3 y 5 de cultivo y se congelará a -80°C hasta su análisis. En estos sobrenadantes se determinará la secreción de IL-10, IL-12, IL-6 y PGE_2 para las DC, e IL-10, IFN- γ , IL-2 y PGE_2 para los LT, utilizando kits de ELISA comerciales (BD Biosciences y R & D Systems).

Evaluación del efecto de IL-10, Tsp-1, adenosina y PGE_2 en la capacidad de estimulación de las DC

Para determinar el efecto de estos factores en la capacidad de estimulación de las cDC y tDC en los co-cultivos primarios, IL-10 y Tsp-1 serán bloqueadas con mAb neutralizantes frente a IL-10 (10 $\mu\text{g/ml}$, clona JES3-19F1, BD Bioscience), y Tsp-1 (25 $\mu\text{g/ml}$, clona C6.7, Thermo Scientific), se inhibirá la producción de PGE_2 con indometacina (10 μM , Sigma), y se inhibirá la producción de adenosina con el inhibidor de ecto-ATPasa ARL67155 (10 μM , Sigma) o el efecto de ésta sobre los LT mediante la adición del antagonista de los receptores A2 DMPX (10 μM , Sigma). Los mAb neutralizantes o los inhibidores se agregarán al inicio de los co-cultivos y después de 5 días, los LT se cosecharán y se medirá su proliferación por dilución de CFSE.

Análisis estadístico

El análisis incluirá las diferencias entre medias mediante la prueba t de student y las diferencias entre proporciones mediante prueba de χ^2 , siempre y cuando se cumpla el postulado de una distribución normal en los valores de interés. Los niveles de probabilidad para las correlaciones serán calculados mediante el test de rangos de Spearman (coeficiente de correlación: r_s). Una $p < 0.05$ se considerará una diferencia estadísticamente significativa entre dos grupos de valores.

RESULTADOS

1) Se han analizado los sueros de 26 pacientes y 28 familiares sanos con respecto a los títulos de anticuerpos anti-insulina y anti-GAD65. El 8% de los pacientes presentó anticuerpos anti-insulina, y un 27% presentó anticuerpos anti-GAD65. Sólo una paciente presentó anticuerpos frente a los dos antígenos. Ningún familiar presentó positividad para ninguno de los anticuerpos evaluados. No hubo una correlación entre los títulos de anticuerpos y la respuesta celular frente a los antígenos (apartado 3).

2) Se ha evaluado el fenotipo de las cDC y tDC de 9 pacientes, observándose una menor expresión de HLA-DR y de CD86 en estas últimas con respecto a las DC convencionales.

3) Se ha evaluado la respuesta de los linfocitos T CD4+ de 13 pacientes. Con respecto a los cultivos primarios, se detectó una menor proliferación de los linfocitos en presencia de células dendríticas tolerogénicas (tDC) comparado con las células dendríticas control (cDC) ($p < 0.004$ con insulina, $p < 0.001$ con GAD65). Los pacientes se pudieron subdividir en dos grupos: 1) aquellos en los que no se indujo una proliferación frente a insulina o GAD65 superior a la que se produjo en ausencia de antígeno (7), y 2) aquellos en los que se indujo una proliferación frente a insulina o GAD65 superior a la que se produjo en ausencia de antígeno (7). La sumatoria es de 14 pacientes, aunque en realidad se evaluaron 13. Esto es debido a que un paciente se incluyó en el primer grupo para insulina y en el segundo para GAD65. En ambos grupos, el porcentaje de blastos obtenidos en respuesta a insulina o GAD65 siempre fue mayor cuando los linfocitos se cultivaron con cDC con respecto a tDC. Sin embargo, una diferencia importante fue con respecto al porcentaje de células viables después de terminado el cultivo. Este porcentaje fue significativamente mayor en el grupo 2 cuando las células fueron expuestas a cDC pulsadas con insulina o GAD65, no así en ausencia de antígeno, con respecto a la exposición frente a tDC. Por el contrario, en el grupo 1 no se detectaron diferencias significativas en este parámetro, a excepción de la comparación cDC vs tDC en ausencia de antígeno.

Se determinó igualmente la producción de IL-2 en estos cultivos primarios, y se observaron niveles más altos de producción de esta citocina con las cDC con respecto a las tDC en todas las condiciones, encontrándose diferencias significativas con GAD65.

4) Se evaluó la respuesta de inducción de anergia en los linfocitos de todos los pacientes agrupados como se menciona en el punto 3). Con respecto a estos cultivos secundarios de los linfocitos T cultivados previamente con tDC:

a) Cultivo primario en presencia de insulina: En el reto con cDC pulsadas con insulina o GAD65 se produjo una proliferación significativamente menor (~25%) comparado con los cultivos primarios en los que las células se trataron con cDC pulsadas con insulina ($p < 0.02$ para insulina, $p < 0.04$ para GAD65) en el grupo 1. Estos datos indican que en este grupo no se indujo una anergia específica de insulina, sino que las células parecen haber sido inactivadas igualmente frente a GAD65. En el caso del grupo 2, la significación estadística sólo se produjo cuando las células fueron retadas con insulina ($p < 0.001$) y no así para el caso de GAD65 ($p < 0.10$), lo que sugeriría que en este grupo de pacientes sí se pudo inducir una anergia específica de insulina. Además, la disminución en el porcentaje de blastos fue mucho mayor que la encontrada en el grupo 1, alrededor del 65%.

Con respecto al porcentaje de células viables después del cultivo, no se detectaron diferencias significativas en el grupo 1, y sólo se observaron tras el reto con insulina en el grupo 2 ($p < 0.02$).

b) Cultivo primario en presencia de GAD65: Al contrario que con insulina, no se pudo inducir anergia en los linfocitos estimulados con GAD65 en el cultivo primario en el grupo 1 de pacientes. Por el contrario, en el grupo 2 se pudo establecer una inducción de anergia frente a GAD65

($p < 0.002$), pero igualmente se detectó esta anergia para el caso de insulina ($p < 0.04$), por lo que se concluye que la anergia inducida no parece ser específica de antígeno. Sin embargo, la disminución en el porcentaje de blastos fue mayor frente a GAD65 (71.5%) con respecto a insulina (58%).

Con respecto al porcentaje de células viables después del cultivo, no se detectaron diferencias significativas en el grupo 1, y sólo se observaron tras el reto con GAD65 en el grupo 2 ($p < 0.02$).

DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluaron pacientes con DT1 no debutantes, en su mayoría adultos. Los resultados obtenidos para los anticuerpos anti-insulina se encuentran dentro de lo esperado, ya que estos anticuerpos se detectan en el 50-70% de niños al inicio de la DT1, pero sólo en el 20-30% de pacientes de mayor edad. De igual manera, el porcentaje de pacientes con anticuerpos anti-GAD65 es del 80% al diagnóstico, y decrece con la progresión de la enfermedad, disminuyendo hasta un 30% a los 10 años del diagnóstico. Por lo tanto, nuestros datos concordarían con los estudios realizados en otras poblaciones mundiales. Es relevante poner de manifiesto que los pacientes que pudieron ser evaluados en los estudios celulares no presentaron anticuerpos anti-insulina ni anti-GAD65. Sin embargo, sí presentaron respuesta celular de los linfocitos CD4+ frente a esos antígenos, lo que sugiere que estos ensayos serían más relevantes para medir la actividad de la enfermedad en pacientes no debutantes comparados con la medición de los anticuerpos.

Con respecto al fenotipo de las células dendríticas, pudimos comprobar que los tratamientos empleados para generar las cDC y tDC son adecuados cuando se trata de los monocitos de los pacientes, ya que son similares a los encontrados en los individuos control. Este dato es muy relevante, ya que nos indica que los monocitos de los pacientes se encuentran con una funcionalidad no alterada, al menos para su uso como progenitores de cDC y tDC, y que, por lo tanto, no representarían un inconveniente para considerar una futura terapia con tDC.

Al evaluar las respuestas de los pacientes en los cultivos primarios con cDC y tDC pudimos detectar diferencias significativas en cuanto al porcentaje de blastos en todas las condiciones, incluyendo en ausencia de antígeno. Nosotros esperábamos este resultado con insulina y GAD65, ya que las tDC son células poco inmunogénicas que deben inducir una menor proliferación de los

linfocitos a los que estimulan, con respecto a las cDC. El hecho de que encontráramos diferencias también en ausencia de antígeno nos llevó a separar a los pacientes analizados en dos grupos:

1) aquellos en los que no se indujo una proliferación frente a insulina o GAD65 superior a la que se produjo en ausencia de antígeno, y 2) aquellos en los que se indujo una proliferación frente a insulina o GAD65 superior a la que se produjo en ausencia de antígeno.

Esta división nos permitió observar varias diferencias. En primer lugar, en el grupo 1 se detectaron diferencias mayores entre cDC y tDC en ausencia de antígeno que en el grupo 2, caso contrario a lo que ocurrió en presencia de insulina o GAD65, lo que indica que en el grupo 2 se daban las respuestas más esperadas. El hecho de que algunos pacientes tengan una basal de proliferación en ausencia de antígeno ya lo habíamos reportado previamente (45), y en ese estudio se determinó que en esos pacientes no se indujo tolerancia frente a insulina en los cultivos secundarios con cDC. Pudimos observar una diferencia adicional entre los grupos de pacientes, que recayó en el porcentaje de células viables al final del cultivo. En general, se debería detectar un menor porcentaje de estas células en los cultivos con tDC, ya que se induce una proliferación menor. En el caso de los linfocitos estimulados en ausencia de antígeno no se deberían apreciar diferencias, ya que no se está induciendo una proliferación específica de antígeno. Los resultados fueron muy reveladores, encontrándose diferencias significativas en el grupo 1 entre cDC y tDC sólo en ausencia de antígeno, mientras que en el grupo 2 se encontraron estas diferencias sólo en presencia de insulina o GAD65, que era lo esperado. El comportamiento del grupo 1 se podría explicar por su alta proliferación basal en ausencia de antígeno. Estas células podrían ser estimuladas adicionalmente por las citocinas y receptores que se encuentran en las cDC y en mucha menor medida en las tDC. Así, no estaríamos detectando una respuesta específica de antígeno *per se*, sino la proliferación de unas células que se encuentran previamente activadas en los pacientes y que el contacto con DC con una alta potencia inmunogénica coadyuva a su proliferación. En el caso del grupo 1 con respecto a las DC pulsadas con antígenos, se podría sugerir que las cDC pulsadas con insulina o GAD65 promueven una “super-activación” de células que ya se encontraban activadas, lo que podría promover la muerte por activación de las clonas de linfocitos T anti-insulina y anti-GAD65 de los pacientes que no ocurriría en el caso de la estimulación con tDC.

Finalmente, con respecto a los cultivos primarios, mencionar que se evaluó la producción de IL-2 en 3 pacientes del grupo 1 y 6 del grupo 2. En el primer grupo no se encontraron diferencias en la producción de esta citocina en los linfocitos tratados con cDC o tDC, aunque como el número de pacientes es bajo consideramos este resultado como preliminar. En el grupo 2 se encontraron diferencias significativas entre cDC y tDC pulsadas con GAD65. La producción de IL-2 en el resto de las condiciones, aunque fue superior en las condiciones de estimulación con cDC, no se detectaron diferencias significativas con respecto a las condiciones con tDC. De igual manera,

consideramos que se detectarán diferencias significativas en la producción de IL-2 frente al reto con insulina cuando incrementemos el número de donantes.

Con respecto a la inducción de anergia, en el grupo 1 ésta sólo se pudo observar cuando los linfocitos se tolerizaron con insulina. Sin embargo, esta tolerancia no parece ser específica, ya que las células tolerizadas frente a insulina también respondieron menos a GAD65. En ambos casos, la disminución del porcentaje de blastos en los linfocitos tolerizados frente a los controles fue pequeña, situándose alrededor del 25%. En este grupo no se observaron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de células viables entre las condiciones evaluadas, lo que refuerza la idea de que en estos pacientes no es posible la inducción de anergia de manera potente y específica.

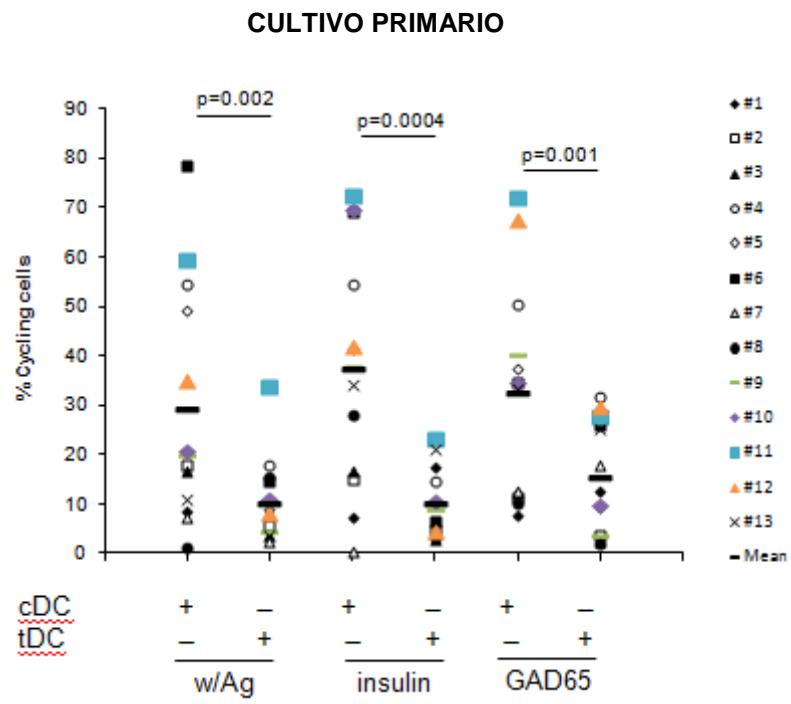
En el grupo 2 se indujo tolerancia específica de insulina, siendo la disminución de la proliferación alrededor del 65% al comparar los linfocitos tratados en el cultivo primario con cDC vs tDC. Además, el porcentaje de células viables comparando ambas condiciones fue el único que mostró valores significativamente diferentes, siendo mayor en los linfocitos previamente tratados con cDC pulsadas con insulina respecto al tratamiento con tDC. Al evaluar la tolerancia inducida frente a GAD65 en el grupo 2, los resultados mostraron una inequívoca inducción de anergia frente a este antígeno (>70% de reducción en la proliferación comparando cDC vs tDC). Sin embargo, al evaluar el antígeno alternativo, insulina, los datos arrojaron resultados similares, con un porcentaje de disminución de la proliferación del 58%. Estos resultados nos sugieren que para GAD65 falta especificidad en el proceso de inducción de tolerancia.

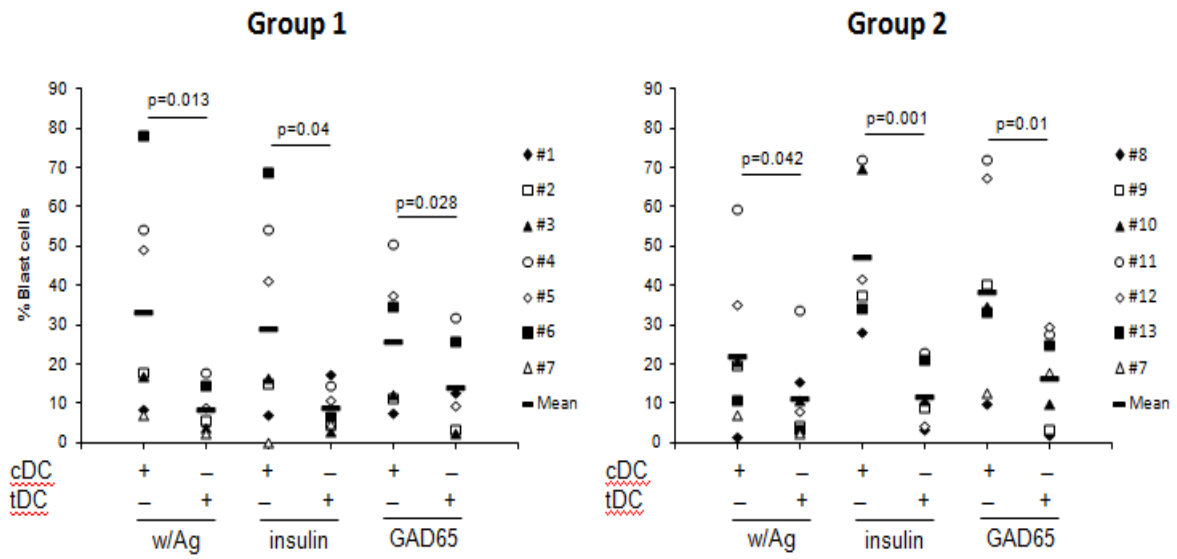
Hasta el momento no hemos introducido en nuestro sistema la evaluación de un antígeno irrelevante frente al que tengamos memoria. Consideramos que es imprescindible implementar el uso de estos antígenos (ej: candidina), que ya fueron programados en el proyecto, y que no hemos podido utilizar hasta el momento por la limitante del número de linfocitos disponibles. Sin embargo, es posible que en una enfermedad tan compleja, donde probablemente existen clones autorreactivos frente a distintos antígenos y que estén activadas en el momento de su extracción de los pacientes, el uso de tDC podría estar tolerizando linfocitos que estén estimulados en ese momento. Si esta hipótesis es cierta, no se debería inducir tolerancia frente a antígenos irrelevantes en el sistema de diabetes. Es por ello que, para aclarar los resultados surgidos a partir del uso de GAD65, en los siguientes pacientes se introducirá el empleo de candidina en todas las condiciones de los cultivos secundarios.

CONCLUSIONES

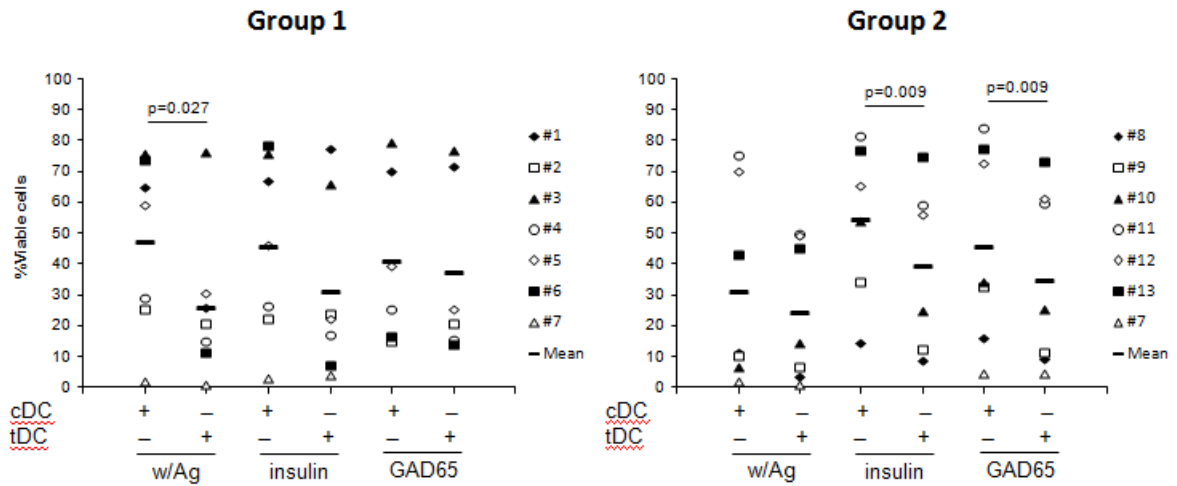
- 1) El 8% de los pacientes presentó anticuerpos anti-insulina, y un 27% presentó anticuerpos anti-GAD65. En ningún familiar sano evaluado se detectó la presencia de estos anticuerpos.
- 2) Las DC generadas a partir de los pacientes comparten las mismas características que las generadas de individuos control, por lo que su uso para estimular o tolerizar a los linfocitos no presenta problemas de base.
- 3) Las tDC inducen una menor respuesta de los linfocitos de los pacientes que las cDC en todas las condiciones evaluadas (pulsadas con insulina, con GAD65, o en ausencia de antígeno).
- 4) La proliferación primaria de los linfocitos indica la existencia de dos grandes grupos de pacientes: aquellos cuyos linfocitos proliferaron en igual o mayor medida en ausencia que en presencia de antígeno (grupo 1) y aquellos cuyos linfocitos proliferaron menos en ausencia que en presencia de antígeno (grupo 2). Las evaluaciones subsecuentes se realizaron teniendo en cuenta la existencia de estos grupos.
- 5) En el grupo 1 apenas se produjo inducción de tolerancia frente a insulina o GAD65 por las tDC, por lo que es posible que en este tipo de pacientes esta terapia no sea viable.
- 6) En el grupo 2 se indujo tolerancia específica de antígeno frente a insulina, y se indujo tolerancia frente a GAD65 de manera muy importante, pero ésta no resultó específica de antígeno, ya que se indujo también frente a insulina. Se requiere el empleo de un antígeno irrelevante en el sistema de diabetes para discernir si realmente la inducción de tolerancia frente a GAD65 no fue específica o bien es posible que se estén tolerizando todas las clonas de memoria activas en el momento de la evaluación.

APÉNDICE



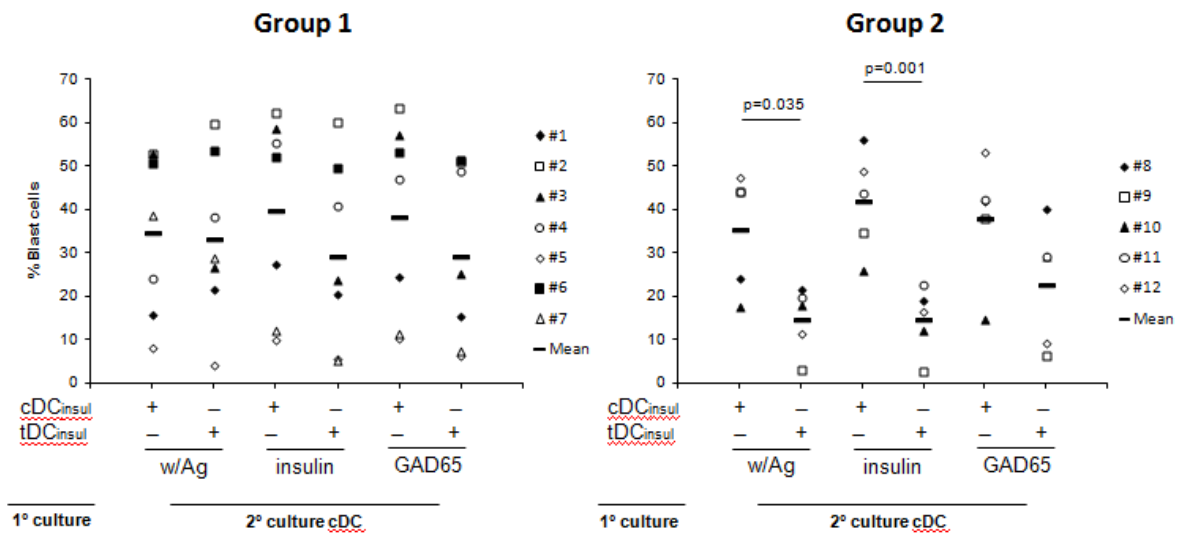


Porcentaje de células viables

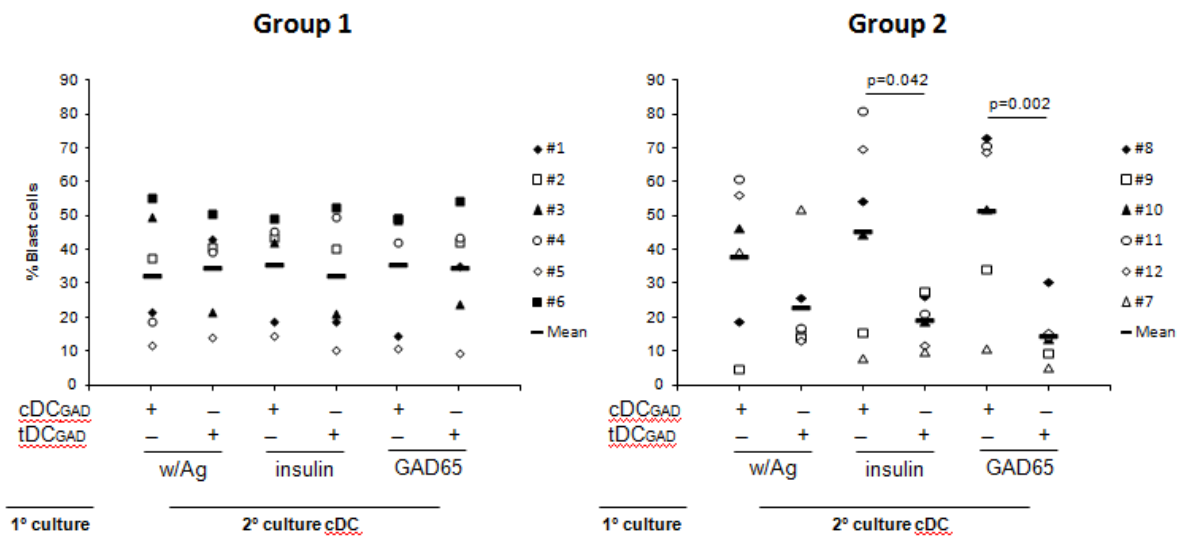


Cultivo primario: pulsos de insulina

Cultivo secundario: cDC, pulsos con insulina o GAD65



Cultivo: pulsos de GAD65 DC
Cultivo secundario: cDC, con pulsos o sin pulsos con insulina o GAD65



BIBLIOGRAFIA

1. Walker LS, Abbas AK. 2002. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 11-19.
2. Gianani R, Eisenbarth GS. 2005. The stages of type 1A diabetes: *Immunol. Rev.* 204: 232-49.
3. Martin S, Pawlowski B, Greulich B, *et al.* 1992. Natural course of remission in IDDM during 1st yr after diagnosis. *Diabetes Care* 15: 66-74.
4. Aly TA, Ide A, Jahromi MM, *et al.* 2006. Extreme genetic risk for type 1A diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103: 14074-9.
5. Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, *et al.* 2009. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* 155: 173-81.
6. Knip M. 2002. Can we predict type 1 diabetes in the general population? *Diabetes Care* 25: 623-5.
7. Siljander H, Veijola R, Reunanen A, *et al.* 2007. Prediction of type 1 diabetes among siblings of affected children and in the general population. *Diabetologia* 50:2272-5.
8. Knip M, Kukko M, Kulmala P, *et al.* 2001. Humoral beta-cell autoimmunity in relation to HLA defined disease susceptibility in preclinical and clinical type 1 diabetes. *Am. J. Med. Genet.* 115: 48-54.
9. Ou D, Jonsen LA, Metzger DL, *et al.* 1999. CD4+ and CD8+ T-cell clones from congenital rubella syndrome patients with IDDM recognize overlapping GAD65 protein epitopes. Implications for HLA class I and II allelic linkage to disease susceptibility. *Hum. Immunol.* 1999 60: 652-64.
10. Knip M, Siljander H. 2008. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmun. Rev.* 7: 550-7.
11. Skyler JS, Krischer JP, Wolfsdorf J, *et al.* 2005. Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial - Type 1. *Diabetes Care* 28: 1068-76.
12. Kishiyama CM, Chase HP, Barker JM. 2006. Prevention strategies for type 1 diabetes. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 7: 215-24.
13. Bonifacio E, Lampasona V, Bernasconi L, *et al.* 2000. Maturation of the humoral autoimmune response to epitopes of GAD in preclinical childhood type 1 diabetes. *Diabetes* 49: 202-8.
14. Achenbach P, Warncke K, Reiter J, *et al.* 2004. Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics. *Diabetes* 53: 384-92.
15. Hoppu S, Härkönen T, Ronkainen MS, *et al.* 2004. IA-2 antibody epitopes and isotypes during the prediabetic process in siblings of children with type 1 diabetes. *J. Autoimmun.* 23:361-70.

16. Roep BO. 2003. The role of T-cells in the pathogenesis of type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia* 46: 305-21.
17. Di Lorenzo TP, Peakman M, Roep BO. 2007. Translational mini-review series on type 1 diabetes: systematic analysis of T cell epitopes in autoimmune diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* 148: 1-16.
18. Kikutani H, Makino S. 1992. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv. Immunol.* 51: 285-322.
19. Bendelac A, Carnaud C, Boitard C, *et al.* 1987. Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *J. Exp. Med.* 166: 823-32.
20. Lampeter EF, McCann SR, Kolb H. 1998. Transfer of diabetes type 1 by bone-marrow transplantation. *Lancet.* 351: 568-569.
21. Shizuru JA, Taylor-Edwards C, *et al.* 1988. Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to T-helper lymphocytes. *Science* 240: 659-62.
22. Wang B, Gonzalez A, Benoist C, *et al.* 1996. The role of CD8+ T cells in the initiation of insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur. J. Immunol.* 26: 1762-69.
23. Rabinovitch A. 1994. Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes* 43: 613-21.
24. Anderson MS, Bluestone JA. 2005. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu. Rev Immunol.* 23: 447-85.
25. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, *et al.* 2005. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 54: 92-99.
26. Silverstein J, Maclaren N, Riley W, *et al.* 1988. Immunosuppression with azathioprine and prednisone in recent-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 319: 599-604.
27. Herold KC. 2004. Achieving antigen-specific immune regulation. *J. Clin. Invest.* 113: 346-49.
28. Skyler JS, Krischer JP, Wolfsdorf J, *et al.* 2005. Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial - Type 1. *Diabetes Care* 28: 1068-76.
29. Skyler JS. 2007. Prediction and prevention of type 1 diabetes: progress, problems, and prospects. *Clin. Pharmacol. Ther.* 81: 768-71.
30. Steinman RM, Hawinger D, Nussenzweig M. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 685-711.
31. Moser M. 2003. Dendritic cells in immunity and tolerance- do they display opposite functions? *Immunity* 19: 5-8.
32. Zammit DJ, Cauley LS, Pham QM, *et al.* 2005. Dendritic cells maximize the memory CD8 T cell response to infection. *Immunity* 22: 561-70.

33. Lipscomb MF, Masten BJ. 2002. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol. Rev.* 82: 97-130.
34. Shortman K, Liu YJ. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Rev. Immunol.* 2: 151-161.
35. Mellman I, Steinman RM. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell.* 106: 255-258.
36. Morelli AE, Thomson AW. 2007. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 610-621.
37. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, *et al.* 2001. Antigen-specific inhibitions of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* 193: 233-238.
38. Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, *et al.* 2002. CD4+ and CD8+ anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 99: 2468-2476.
39. Sato K, Yamashita N, Baba M, *et al.* 2003. Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells. *Blood* 101: 3581-3589.
40. Clare-Salzler MJ, Brooks J, Chai A, *et al.* 1992. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by dendritic cell transfer. *J. Clin. Invest.* 90: 741-8.
41. Feili-Hariri M, Falkner DH, Morel PA. 2002. Regulatory Th2 response induced following adoptive transfer of dendritic cells in prediabetic NOD mice. *Eur. J. Immunol.* 32: 2021-30.
42. Papaccio G, Nicoletti F, Pisanti FA, *et al.* 2000. Prevention of spontaneous autoimmune diabetes in NOD mice by transferring in vitro antigen-pulsed syngeneic dendritic cells. *Endocrinology* 141: 1500-5.
43. Haase C, Yu L, Eisenbarth G, *et al.* 2010. Antigen-dependent immunotherapy of non-obese diabetic mice with immature dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 160: 331-9.
44. Torres-Aguilar H, Aguilar-Ruiz SR, González-Pérez G, *et al.* 2010. Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4+ T cells. *J. Immunol.* 184: 1765-75.
45. Torres-Aguilar H, Sanchez-Torres C, Blank M, Shoefeld Y. 2010. IL-10/TGF- β -treated dendritic cells, pulsed with insulin, specifically reduce the response to insulin of CD4+ effector/memory T cells from type 1 diabetic individuals. *J. Clin. Immunol.* 30(5): 659-668.

ANEXOS

Anexo I. HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Datos Generales:

Nombre: _____

Edad: _____

Registro: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

A.P.N.P.

1. Lugar de nacimiento: _____

2. Escolaridad:

Analf.	Prim.	Sec.	Prep.	Univ.	Post.
--------	-------	------	-------	-------	-------

3. Lugar de residencia: _____

4. Ingreso Mensual: _____

5. Nº de dependientes económicos: _____

6. Realiza ejercicio dinámico con una frecuencia de 3 veces a la semana (o +) 30' (o +) sin interrupción.

SI	NO
----	----

7. Tabaquismo (+) (-) Índice de tabaquismo: _____

A.H.F.

Historia de DM tipo 1 en familiares de primer grado SI NO

En el momento de Dx de DM 1.

Peso: _____

Talla: _____

I.M.C. _____

T.A.: _____

Tx. _____

OBSERVACIONES: _____

Anexo II. CONSENTIMIENTO INFORMADO

TITULO DEL PROYECTO:

“EVALUACIÓN DEL EMPLEO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS COMO TRATAMIENTO PARA SUPRIMIR LAS RESPUESTAS DE LINFOCITOS AUTORREACTIVOS EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1”

¿Para qué se realiza este estudio?

Este estudio se realiza con el fin de determinar si es posible disminuir *in vitro* (a nivel de estudios en el laboratorio) la respuesta de los linfocitos T de memoria específicos para insulina y/o GAD65 de pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (DM1) y de familiares de primer grado sanos con riesgo de contraer la enfermedad, utilizando células dendríticas tolerogénicas producidas a partir de los monocitos provenientes del mismo paciente. En caso de se logre realizar a nivel de estudios de laboratorio, nos abriría la posibilidad de hacer los estudios subsiguientes *in vivo* (a nivel de los pacientes y de los familiares), para que esta estrategia pudiera ser utilizada tanto en la prevención como en el tratamiento de la DM1, e incluso en otras enfermedades autoinmunes.

¿Que son los linfocitos T de memoria?

Son células que pertenecen al sistema inmune (defensa contra agentes externos, como por ejemplo microorganismos), los cuales se forman después del primer encuentro con el agente extraño, y le permiten a nuestro cuerpo, responder de una manera más rápida y eficiente para la eliminación del microorganismo.

En la DM1, algunas proteínas del páncreas o producidas por él, como la insulina y GAD65, son reconocidas como extrañas por nuestro sistema inmune, y esto ocasiona tanto la destrucción del páncreas como la disminución o bloqueo en la producción de insulina, induciendo así la formación de linfocitos T de memoria específicos para insulina, GAD65 (y otras proteínas del páncreas), los cuales participan, entre otras cosas, en incrementar la destrucción del páncreas y así, dar lugar a las manifestaciones de la enfermedad.

¿Qué son las células dendríticas?

Son células que también pertenecen al sistema inmune, cuya función es la de participar en la captura y eliminación de los microorganismos que llegan a nuestro cuerpo. Sin embargo se ha visto que si se logra controlar su función, induciendo células dendríticas tolerogénicas, es posible utilizarlas para controlar a los linfocitos T de memoria, disminuyendo su respuesta hacia los antígenos por los cuales fueron generados (por ejemplo, la insulina en el caso de la DM1).

¿Qué se me solicitará que haga, si decido participar en el estudio?

Se le solicitará una muestra de sangre en ayuno de 10 ml para la medición de anticuerpos anti-insulina y anti-GAD65. Además, se le realizará una historia clínica acerca de las enfermedades que padece, se le medirá, pesará, y se le tomará la presión arterial. Si finalmente es reclutado para el estudio, se le solicitará otra muestra de sangre de aproximadamente 150 ml (lo cual no afecta en nada las funciones de su organismo). Esta sangre se obtendrá a partir de la punción de una vena

en el brazo que usted menos utilice. La sangre obtenida servirá para purificar los linfocitos T de memoria y los monocitos con los cuales se producirán las células dendríticas. En el caso de tener un diagnóstico de DM1, se le solicitará otra muestra de sangre de 150 ml transcurrido un año desde el diagnóstico.

¿Qué pasará si no participo en el estudio?

Si usted decide no participar, no tendrá ninguna consecuencia como derechohabiente de la institución, ni en ningún otro aspecto.

¿Qué ventajas obtendré si decido participar en el estudio?

Si usted decide participar con nosotros, la ventaja principal será que tendrá el orgullo de contribuir al desarrollo del conocimiento científico sobre la DM1, así como en el descubrimiento de una posible herramienta para la prevención y tratamiento de esta enfermedad. Además, podrá conocer la intensidad de la respuesta hacia la insulina y hacia GAD65 que ha desencadenado su cuerpo, debido a la enfermedad que padece. En el caso de los familiares sanos, podrán conocer si presentan anticuerpos frente a antígenos diabetogénicos y, por lo tanto, si están en riesgo de contraer la enfermedad, lo que les ayudará a decidir futuras acciones. No obtendrá ninguna remuneración económica.

¿Qué efectos colaterales puedo tener, si decido participar?

Ningún otro que no se relacione con la toma de muestra de sangre, a la que habitualmente se somete. Su muestra de sangre, así como las células que se obtengan, no serán manejadas con ningún otro fin que no sea los que se han descrito anteriormente.

¿Contaré con la confidencialidad absoluta y seriedad del estudio si decido participar?

Su confidencialidad será guardada absolutamente, y su nombre no aparecerá en ninguna publicación nacional o internacional. Solamente los investigadores que participan en el proyecto y los miembros del Comité de Ética del Hospital Regional Licenciado Adolfo López Mateos tendrán acceso a su archivo clínico y a los resultados obtenidos en este trabajo.

¿A quién puedo contactar, en caso de tener dudas acerca del estudio o de mis resultados?

A la Dra. Martha Eunice Rodríguez Arellano al Teléfono 53 22 23 00 (ext. 89203) de lunes a viernes de 9:00 a 18:00 h

A la Dra. M^a Carmen Sanchez Torres al Teléfono 57 47 33 28 de lunes a viernes de 9:00 a 18:00 h.

CARTA DE CONSENTIMIENTO

Evaluación del empleo de células dendríticas como tratamiento para suprimir las respuestas de linfocitos autorreactivos en pacientes con diabetes mellitus tipo 1

Investigadores responsables: Dra. Martha Eunice Rodríguez Arellano y Dra. María Carmen Sánchez Torres

Por medio de la presente autorizo mi participación en el proyecto de investigación registrado en el comité local de investigación del Hospital Regional “Licenciado Adolfo López Mateos”.

Adicionalmente, si el paciente es menor de edad: Por medio de la presente autorizo la participación de mi hijo(a) en el proyecto de investigación registrado en el comité local de investigación del Hospital Regional Licenciado Adolfo López Mateos.

El objetivo de este estudio es determinar *ex vivo* la eficacia de las células dendríticas como terapia para la diabetes mellitus tipo 1.

Se me ha explicado que mi participación en el estudio es voluntaria y que puedo retirarme de éste en cualquier momento que así lo considere, sin que la atención médica que en este hospital se me brinda se vea afectada.

Mi participación consistirá en acudir a la consulta para valoración médica y cumplir la extracción de sangre en los tiempos que se me indiquen.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio.

Los investigadores responsables se han comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo que pueda ser ventajoso para mi tratamiento, así como responder a cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que les planteé acerca de mi participación en el estudio; me han dado seguridades de que no se identificará a mi persona en las presentaciones o publicaciones que deriven del estudio, y que los datos relacionados con mi participación serán manejados en forma confidencial. También se han comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio aunque ésta pueda hacerme cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Nombre y firma del paciente

Nombre y firma del testigo

Firma del investigador principal

Firma del investigador co-responsable

Fecha de autorización

En el caso de que el paciente sea menor de edad

Firma del padre o representante paterno

Firma de la madre o representante materna

A T E N T A M E N T E

Dra. María Carmen Sánchez Torres

Investigador Principal

c.c.p. Subdelegación Médica
c.c.p. Unidad Sede
c.c.p. Investigador principal