



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

División de Estudios en Posgrado e  
Investigación

INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIO  
SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL  
ESTADO

“Inducción de citocinas en linfocitos T CD4+  
autorreactivos de pacientes con DM1 tratados  
con células dendríticas control y tolerogénicas”

Trabajo de investigación que presenta:  
Dr. Julio César Ramírez Reyes

Para obtener el Diploma de la Especialidad en:  
PEDIATRÍA

Asesores de Tesis:

Dra. Martha Eunice Rodríguez Arellano  
Dra. María Carmen Sánchez Torres

No. De Registro de Protocolo:  
244.2012

Año:  
2015





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA

División de Estudios en Posgrado e  
Investigación

INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIO  
SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL  
ESTADO

“Inducción de citocinas en linfocitos T CD4+  
autorreactivos de pacientes con DM1 tratados  
con células dendríticas control y tolerogénicas”

Trabajo de investigación que presenta:  
Dr. Julio César Ramírez Reyes

Para obtener el Diploma de la Especialidad en:  
PEDIATRÍA

Asesores de Tesis:  
Dra. Martha Eunice Rodríguez Arellano

No. De Registro de Protocolo:  
244.2012

Año:  
Ciudad Universitaria 2015  
Cd. Mx.



ISSSTE

---

DR. DANIEL RODRIGUEZ ARAIZA  
COORD. DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

---

DRA MARTHA EUNICE RODRÍGUEZ ARELLANO  
JEFE DE INVESTIGACIÓN

---

DR- GUILBALDO PATIÑO CARRANZA  
JEFE DE ENSEÑANZA

---

DR. BALTAZAR BARRAGÁN HERNÁNDEZ  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO

---

DRA. MARTHA EUNICE RODRÍGUEZ ARELLANO  
ASESOR DE TESIS

## RESUMEN

Las células dendríticas tolerogénicas (tDC) constituyen una terapia prometedora para enfermedades autoinmunes, ya que pueden anergizar linfocitos T que reconocen autoantígenos. Los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (DM1) tienen células T autorreactivas contra antígenos de los islotes pancreáticos (insulina, descarboxilasa del ácido glutámico 65 -GAD65-).

El objetivo fue determinar la capacidad de las tDC derivadas de los pacientes DM1 para inactivar sus células T reactivas a insulina y/o GAD65. Métodos: monocitos CD14+ y linfocitos T efectores/memoria CD4+CD45RA- fueron aislados de 25 pacientes. Se generaron células dendríticas (DC) derivadas de monocitos en ausencia (control DC, cDC) o presencia de IL-10 y TGF- $\beta$ 1 (tDC), y se cargaron con insulina o GAD65. Las DC se cultivaron con los linfocitos T (cultivo primario), y se determinó su proliferación y secreción de citocinas. Estos linfocitos fueron retados con cDC pulsadas con insulina, GAD65 o candidina (cultivo secundario) para evaluar si las tDC indujeron tolerización de los linfocitos T. Resultados: En los cultivos primarios, las tDC indujeron una proliferación significativamente inferior de linfocitos que las cDC, así como una producción disminuida de IL-2 e IFN- $\gamma$ ; en contraste, las tDC indujeron altos niveles de IL-10. Los linfocitos procedentes de un grupo de pacientes proliferaron específicamente contra la insulina o GAD65 (grupo 1, 60%), mientras que los linfocitos procedentes de otros pacientes no lo hicieron (grupo 2, 40%). Los cultivos secundarios mostraron la inducción de tolerancia a insulina o GAD65 en 14 y 10 pacientes, respectivamente. Un alto porcentaje de estos pacientes (70-80%) pertenecía al grupo 1. Es importante destacar que la hiporreactividad T inducida por las tDC fue específica de antígeno, ya que las respuestas contra un antígeno no relacionado (candidina) no se vieron afectadas. Conclusiones/interpretación: Estos resultados sugieren que la terapia con tDC contra múltiples antígenos podría ser útil en un subgrupo de pacientes DM1.

“A mis padres quienes me han apoyado todo este tiempo, ante las adversidades nunca carecí de su apoyo incondicional”

“A Karen, quien estuvo a mi lado todo este tiempo, caminando juntos hasta estas fechas y madurando mutuamente, dándole sentido al esfuerzo”

Julio César Ramírez Reyes

## **ÍNDICE**

1. MARCO TEÓRICO
  - 1.1 Definición de problema
  - 1.2 Hipótesis
  - 1.3 Antecedentes
  - 1.4 Objetivo general
  - 1.5 Justificación
  
- 2 MATERIAL Y MÉTODOS
  - 2.1 Objetivos específicos
  - 2.2 Diseño
  - 2.3 Grupo de Estudio
  - 2.4 Formato de muestra
  - 2.5 Cédula de recolección de datos
  - 2.6 Descripción general del estudio
  
3. ORGANIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN
  - 3.1 Programa de trabajo
  - 3.2 Análisis de datos
  
4. RECURSOS
  - 4.1 Humanos
  - 4.2 Físicos
  
5. FINANCIAMIENTO
  - 5.1 Costo de la investigación
  
6. ASPECTOS ÉTICOS
  
7. RESULTADOS
  
8. CONCLUSION





## 1. MARCO TEORICO

### 1.1. Definición del problema

¿Las células dendríticas tolerogénicas (tDC) derivadas a partir de pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (DM1) serán capaces de generar un ambiente de citocinas desfavorable para la activación de los linfocitos T autorreactivos autólogos?

### 1.2. Hipótesis

Las tDC generadas a partir de monocitos de pacientes con DM1 utilizando citocinas inmunosupresoras tendrán diferentes efectos sobre la inducción de anergia (falta de respuesta) en linfocitos T CD4+ de memoria específicos para los antígenos insulina y/o GAD65.

### 1.3. Antecedentes

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1), es una de las enfermedades crónicas más comunes en la infancia, es causada por la deficiencia de insulina después de la destrucción de las células beta pancreáticas productoras de insulina. Se presenta con mayor frecuencia en la infancia, pero una cuarta parte de los casos se diagnostican en adultos. DM1 sigue siendo la forma más común de diabetes en la infancia, lo que representa aproximadamente dos tercios de los nuevos diagnósticos de diabetes en pacientes  $\leq 19$  años de edad en los Estados Unidos, a pesar de la creciente tasa de DM 2 [1-4].

La DM1 es el resultado de la destrucción autoinmune de las células beta productoras de insulina localizadas en los islotes pancreáticos [5]. Este proceso ocurre en individuos predispuestos genéticamente, probablemente provocado por uno o más agentes ambientales, y por lo general progresa durante muchos meses o años durante el cual el sujeto es asintomático y euglucémico. Por lo tanto, los marcadores genéticos para la DM1 tipo A están presentes desde el nacimiento,

pero los marcadores inmunes son detectables después de la aparición del proceso autoinmune, y los marcadores metabólicos pueden ser detectados con pruebas sensibles una vez que ha ocurrido suficiente daño de las células beta, pero antes de la aparición de hiperglucemia sintomática [6]. Este largo periodo de latencia es un reflejo de la gran cantidad de funcionamiento de las células beta que debe perderse antes de presentarse hiperglucemia (Fig. 1).

La patogénesis de DM1 es bastante diferente de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), en la que tanto la disminución de la liberación de insulina (no en una base autoinmune) y resistencia a la insulina desempeñan un papel importante. Los estudios de asociación del genoma indican loci genéticos que reflejan que la DM1 y DM2 no se superponen, aunque la inflamación [por ejemplo, la mediada por interleucina (IL)-1] puede jugar un papel en la pérdida de las células beta de los islotes en ambos tipos.

Se han reportado múltiples polimorfismos de genes que influyen en el riesgo de desarrollar DM1 [incluyendo, HLA-DQalfa, HLA-DQbeta, HLA-DR, preproinsulina, el gen PTPN22, CTLA-4, helicasa inducida por interferón, receptor de IL2 (CD25), un gen similar a la lectina (KIA0035), ERBB3e, y el gen indefinido en 12q] [7-13].

## Evolución a Diabetes Mellitus tipo 1



Figura 1. Curso de tiempo del desarrollo de la diabetes de tipo 1. Los marcadores genéticos están presentes desde el nacimiento, los marcadores inmunes aparecen primero en el momento de los acontecimientos desencadenantes ambientales, y marcadores metabólicos sensibles de la secreción deficiente de insulina empiezan a aparecer poco después de la aparición de la disfunción de las células beta. Sin embargo, diabetes clínicamente evidente tipo 1 no se produce hasta que haya habido una mayor pérdida de funcionamiento la masa de células beta.

Un meta-análisis de los datos de los estudios de asociación del genoma confirmó las asociaciones anteriores e identificó cuatro loci asociados con un riesgo adicional para el desarrollo de DM1 (BACH2, PRKCQ, CSP, C1QTNF6) [14]. Además, algunos loci que confieren riesgo para la enfermedad celíaca (RGS1, IL18RAP, CCR5, TAGAP, SH2B3, PTPN2) han sido identificados como compartidos [15]. La mayoría de los loci tienen pequeños efectos, y las variantes estudiadas son comunes. Los alelos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) humano (HLA) tienen un gran efecto, seguido por los polimorfismos del gen de insulina y PTPN22. Aunque la asociación de ciertos alelos HLA con DM1 es fuerte, este locus genético se calcula que representa menos del 50 % de las contribuciones genéticas a la susceptibilidad a la enfermedad. Las asociaciones de otros loci son de una magnitud que no contribuyen a la predicción de la enfermedad, pero puede implicar vías importantes, como CCR5.

En particular, se estima que el 48 % de la agregación familiar ahora se puede atribuir a loci conocidos, y el MHC contribuye en un 41 % [9]. A modo de ejemplo, los hermanos con los alelos de más alto riesgo, HLA-DR y -DQ (por ejemplo, heterocigotos DR3/DR4), que heredan ambas regiones HLA pueden tener un riesgo de desarrollar autoinmunidad anti-islole hasta del 80 % y un riesgo similar a largo plazo de desarrollar DM1.

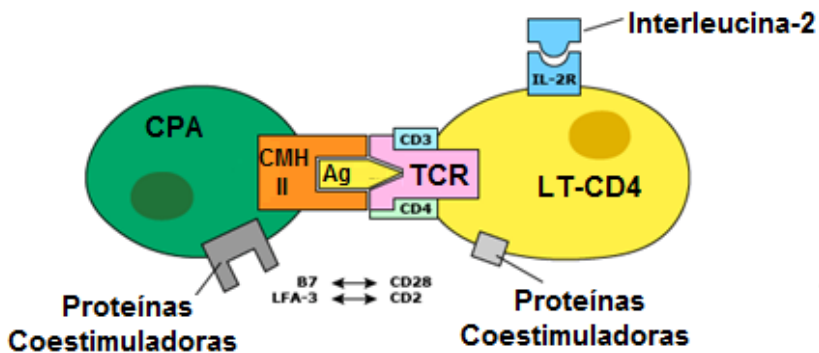
El riesgo de por vida de la DM1 se incrementa notablemente en los parientes cercanos de un paciente con DM1, con un promedio de 6 % en la descendencia, el 5 % en los hermanos, y el 50 % en los gemelos idénticos (frente al 0,4 % en los sujetos sin antecedentes familiares) [1, 16, 17]. Un gemelo monocigótico de un paciente con DM1 tiene un mayor riesgo de diabetes que un gemelo dicigótico, y el riesgo en un hermano gemelo dicigótico es similar a la de los hermanos no gemelos [16].

Los principales genes de susceptibilidad para la DM1 están en la región HLA de en el cromosoma 6p [18, 19]. Esta región contiene genes que codifican para las moléculas del MHC de clase II expresadas en la superficie celular de las células presentadoras de antígeno (Ag) tales como macrófagos y células dendríticas (DC). Estas moléculas consisten de cadenas alfa y beta que forman un surco de unión a los péptidos en el que Ag involucrados en la patogénesis de la DM1 está sujeto. La unión de un Ag al MHC permite que sea presentado a receptores de Ag en las células T, que son las principales células efectoras del proceso destructivo autoinmune (Fig. 2).

Figura 2. Representación esquemática de la iniciación de la respuesta inmunológica a un antígeno. El antígeno se une a una ranura en moléculas CMH de clase II en las células presentadoras de antígeno (tales como macrófagos). Esta unión permite que el antígeno que se presentará al antígeno receptores en inductoras CD4 o T helper células autorreactivas que, en el tipo 1 diabetes mellitus, iniciar lesión autoinmune de las células beta del páncreas. Además, la respectiva unión de proteínas B7 y LFA-3 en las células presentadoras de antígeno a CD28 y CD2 en las células T son importantes vías coestimuladoras que aumentan aún más la activación de células T. Otras moléculas también pueden participar en la respuesta inmune, tales como la unión de interleucina-2 a su receptor (IL-2R).

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad; LFA-3: antígeno-3 linfocitos funcional; IL-2R: interleucina-2 receptor, TCR: receptor de linfocito T.

### Representación de activación de linfocito



La capacidad de estas moléculas de clase II para presentar Ag depende en parte de la composición de aminoácidos de sus cadenas alfa y beta. Las sustituciones en una o dos posiciones críticas notablemente puede aumentar o disminuir la unión de auto-Ag relevantes y, por tanto, la susceptibilidad a la DM1 [20, 21]. En particular, más del 90% de los pacientes con DM1 son positivos para HLA-DR3, DQB1 \*0201 (también referido como DR3-DQ2) o HLA-DR4, DQB1 \*0302 (también denominado como DR4-DQ8), frente al 40% de los controles. Además, aproximadamente el 30 % de los pacientes tienen ambos haplotipos (heterocigotos DR3/4), que

confiere la mayor susceptibilidad. Además, el alelo HLA DQB1 \*0602 confiere protección contra el desarrollo de la DM1. Este alelo está presente en aproximadamente el 20% de la población general de Estados Unidos, pero sólo el 1% de los niños desarrollan DM1. La prevalencia de estos genes varía con el origen étnico, y explica en gran medida por qué la DM1 es relativamente común en los países escandinavos y Cerdeña, pero poco común en China.

Aunque importantes, los genes de susceptibilidad MHC no son suficientes para inducir DM1, lo que sugiere herencia poligénica en la mayoría de los casos [18]. Un componente importante de la susceptibilidad a la DM1 reside en ciertos genes no pertenecientes al MHC. En particular, los polimorfismos de un promotor del gen de insulina y un cambio de aminoácidos de una tirosina fosfatasa específica de linfocitos (denominada LYP, PTPN22) están asociados con el riesgo de DM1 en múltiples poblaciones [22-25]. Una secuencia de repetición en la región 5' del gen de la insulina se asocia con una mayor expresión de insulina en el timo y se plantea la hipótesis de que esto contribuye a disminuir el desarrollo de la DM1 [26]. El polimorfismo del gen de PTPN22 influye en la señalización del receptor de células T, y el mismo polimorfismo es un importante factor de riesgo para múltiples trastornos autoinmunes [27, 28]. Un polimorfismo en el gen que codifica el Ag 4 asociado a los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) ha demostrado estar asociado con el riesgo de DM1 en un meta-análisis de 33 estudios en el que participaron más de 5,000 pacientes [29]. Pruebas adicionales para el papel de los genes no MHC proviene de los estudios en ratones NOD (ratones diabéticos no obesos, un modelo importante de la DM1). Estos ratones desarrollan diabetes autoinmune espontánea con sorprendentes similitudes con la DM1 en los seres humanos [30].

La infiltración autoinmune de los islotes de Langerhans (insulinitis) comienza alrededor de los 50 días de edad y la diabetes clínica aparece alrededor de los 120 días en ratones NOD. Los linfocitos T que secretan interferón (IFN)- $\gamma$  (células Th1) parecen ser un importante mediador de la insulinitis en los ratones NOD, y la destrucción de las células de los islotes puede ser frenada por la

administración de anticuerpos (Ab) anti-IFN- $\gamma$ . El factor de inducción de IFN-  $\gamma$  (IGIF; también llamada IL-18) y la IL-12 son potentes inductores de IFN-  $\gamma$ , y la progresión de la insulinitis comienza en paralelo con el aumento de liberación de estas dos citocinas [31].

Inicialmente se pensó que, a diferencia de las células Th1, las células Th2 (que producen IL-4, -5, y -13) protegían contra la aparición y progresión de la DM1. Sin embargo, las células Th2 son también capaces de inducir la destrucción de células de los islotes y, por lo tanto, la aparición y progresión de la DM1 están probablemente bajo el control tanto de las células Th1 como de las Th2 [32].

Un concepto más generalizable es que la DM1 se evita mediante un equilibrio entre los linfocitos T patogénicos y reguladores [33]. Un subconjunto importante de los linfocitos T reguladores tienen los marcadores CD4 y CD25 en su superficie y carecen del receptor de IL-7 (CD127), y dependen del desarrollo en un factor de transcripción llamado Foxp3. Las mutaciones de Foxp3 conducen a autoinmunidad neonatal letal, como la DM1 en los recién nacidos. Esta condición, aunque extremadamente rara, es importante reconocer que el trasplante de médula ósea puede revertirla [34].

Los Ab anti-islotes se detectaron por primera vez en el suero de pacientes con el síndrome poliendocrino autoinmune; posteriormente se han identificado en el 85% de los pacientes con DM1 recientemente diagnosticados y en individuos prediabéticos [4]. Los niños con DM1 que no tienen Ab anti-islote u otros auto-Ab a su inicio tienen un grado similar de descompensación metabólica como lo hacen los niños que tienen estos Ab, aunque aquellos con un mayor número de tipos distintos de Ab parecen tener una destrucción más acelerada de los islotes y una mayor necesidad de insulina exógena durante el segundo año de la enfermedad clínica [35].

Una búsqueda en curso ha identificado varios auto-Ag dentro de las células beta pancreáticas que pueden desempeñar un papel importante en la iniciación o progresión de la lesión autoinmune de los islotes (Tabla 1) [4, 36]. Estudios en ratones NOD indican que la



proinsulina/insulina es el principal objetivo probable para los auto-Ab [37, 38]. La respuesta autoinmune a la proinsulina se extiende posteriormente a otros auto-Ag, como la proteína IGRP [38]. La diabetes en el ratón NOD se puede eliminar cambiando un aminoácido específico de la insulina [37].

Otros auto-Ag importantes son la descarboxilasa de ácido glutámico (GAD), proteína asociada insulinoma-2 (IA-2 y IA-2 beta), y el auto-Ag ZnT8, un transportador de zinc de las células beta de los islotes [39-42]. La aparición temprana de Ab anti-insulina sugiere que la insulina es un auto-Ag importante [43, 44]. La confirmación directa de esta hipótesis ha venido de estudios en ratones NOD. Las células T CD8 + reconoce un epítipo en la cadena B de la insulina [45] y un importante auto-Ag diana para las células T CD4+ de ratones NOD es el péptido de insulina en la cadena B (aminoácidos 9 a 23) [37]. Las respuestas de células T similares se encuentran en los linfocitos periféricos obtenidos a partir de pacientes con DM1 1 de reciente comienzo y de sujetos de alto riesgo para la enfermedad también se han comunicado [46].

Tabla 1. Anticuerpos más frecuentemente asociados a DM1 en humanos.

Insulina

Acido glutámico descarboxilasa

Antígenos asociados a insulinoma (alfa y beta)

ZNT8 (transportador de Zinc)

En consonancia con la importancia de la insulina como un auto-Ag es la demostración de que los ratones NOD deficientes de insulina presentan múltiples alteraciones en la progresión de la enfermedad [47], y la administración de insulina o de su cadena B durante la fase prediabética puede prevenir o retrasar la diabetes en ratones susceptibles y tal vez en humanos.

Los auto-Ab frente a insulina son a menudo los primeros en aparecer en los niños seguidos desde el nacimiento que progresaron a la diabetes, y son los más altos en los niños pequeños que desarrollan

diabetes. Cabe notar que una vez la insulina se administra por vía subcutánea, esencialmente todos los individuos desarrollan Ab frente a insulina, y por lo tanto las mediciones de auto-Ab de insulina después de aproximadamente dos semanas de inyecciones de insulina no pueden ser utilizados como un marcador de la diabetes mediada por mecanismos inmunes [44]. Otro importante auto-Ag contra el que se detectan Ab es la enzima GAD, que está presente en los islotes, así como en el sistema nervioso central y los testículos [39]. Los Ab frente a la isoforma de 65 kDa de GAD se encuentran en aproximadamente el 70% de los pacientes con DM1 en el momento del diagnóstico. Los auto-Ab que reaccionan frente a GAD65 ocupan un lugar destacado en los seres humanos con DM1.

Otro auto-Ag es una proteína llamada proteína asociada al insulinoma 2 (IA-2), que es una proteína fosfatasa de tirosina [43, 44]. IA-2 es una proteína de membrana de gránulos cuyo dominio citosólico se une a la sintrofina 2, una proteína asociada a la F-actina, y se escinde tras la exocitosis de gránulos. El fragmento escindido citosólico resultante, ICA512-CCF, alcanza el núcleo y regula positivamente la transcripción de genes de gránulos, incluyendo la insulina y ICA512 [49]. En un estudio, los Ab para este Ag se encontraron en el suero de 58% de los pacientes con DM1 en el momento del diagnóstico [50]. Los auto-Ab contra IA-2 suelen aparecer más tarde que los auto-Ab contra la insulina, y están altamente relacionados con la expresión de múltiples auto-Ab anti-islotes y la progresión de la diabetes. Uno de los mejores predictores de la progresión a DM1 es la expresión de dos o tres auto-Ab: GAD65, IA-2 o insulina [51].

El transportador de eflujo de cationes zinc (ZnT8) también ha sido identificado como un auto-Ag DM1 candidato [42]. Sesenta a 80 por ciento de los pacientes con DM1 recién diagnosticados tienen auto-Ab frente a ZnT8. Además, el 26% de los pacientes con Ab negativos (insulina, GAD65, IA-2 e ICA) tienen auto-Ab anti-ZnT8. En los niños seguidos desde el nacimiento hasta el desarrollo de diabetes en el Estudio de Autoinmunidad Diabetes Young, se demostró que los auto-Ab ZnT8 aparecen más tarde que los auto-Ab de insulina [43], y

el Ab típicamente se pierde muy temprano después de la aparición de la diabetes [52].

Como la autoinmunidad en la DM1 avanza desde la activación inicial a un estado crónico, a menudo hay un aumento en el número de auto-Ag de los islotes que son reconocidos por las células T y los Ab. Esta condición se denomina "la difusión de epítopo." Varias observaciones indican que las respuestas de auto-Ab dirigidas a múltiples auto-Ag de los islotes están asociadas con la progresión de la enfermedad [51]. Una serie adicional de auto-Ag relacionados con la diabetes han sido identificados, que incluyen auto-Ag de 69 kDa de las células de los islotes (ICA69), la IGRP, cromogranina A (CHGA), los receptores de insulina, proteínas de choque térmico, los Ag jun-B, 16, CD38, periferina y proteína ácida glial fibrilar (GFAP) [53].

La existencia de inmunoglobulinas (Ig) G dirigidas a los epítomos de auto-Ag de los islotes implica la influencia de la participación de células T en la respuesta autoinmune. Mientras que el papel de la autoinmunidad en la patogénesis de la DM1 y el desarrollo frecuente de auto-Ab no están en cuestión, existe una creciente evidencia de un papel importante de la inmunidad celular. La aparición de la DM1 en un niño de 14 años de edad con agamaglobulinemia ligada a X sugiere que las células B no son necesarios para el desarrollo de la enfermedad y que la destrucción de las células beta pancreáticas es mediada principalmente por las células T [54].

La regulación de la respuesta inmunitaria hacia los 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 externos. 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 [55]. 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.

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 [56-58], 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 beta 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 [59]. En el momento del diagnóstico, se ha estimado que sólo 10-20% de las células beta son funcionales. Sin embargo, los pacientes continúan produciendo el péptido C, lo cual evidencia la función de las células beta 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.

#### 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 [60]. 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 [61-63].

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 añan (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.

#### Características de la autoinmunidad celular en DM1

La destrucción de las células beta 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 insulitis se caracteriza por una gran infiltración de células mononucleares, esencialmente LT CD8+, seguidos en número por macrófagos, LT CD4+, DC y linfocitos B [64]. 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 beta 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) [65].

Como se mencionó anteriormente, los datos más detallados acerca de la respuesta inmune celular en esta enfermedad se han obtenido de un modelo animal, el ratón NOD. 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 [66], 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 [67]. Un caso análogo en humanos es el desarrollo de DM1 en recipientes de médula ósea procedente de donantes con DM1 [68]. Los LT CD4+ son esenciales tanto en los eventos tempranos como tardíos del desarrollo del daño [69], 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+ [70]. 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 [71].

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 [72, 73].

#### 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 beta residuales. Las terapias que se han utilizado para DM1 han sido tanto específicas como no específicas de Ag.

##### a) 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 [74]. 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.

##### b) 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 [75]. 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 [76, 77]. Los ensayos se han realizado sobre grupos de riesgo y sobre individuos con diagnóstico de DM1, no encontrándose ningún beneficio contrastable tras las terapias.

#### 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 [78].

Las DC constituyen una familia heterogénea de APC profesionales implicadas tanto en la iniciación de la inmunidad como de la tolerancia inmunológica [79]. 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 [80], debido a su alta expresión de moléculas del MHC de clase I y II, y de moléculas de adhesión y co-estimulación [81]. 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 [82, 83]. Las iDC captan los Ag mediante diversos mecanismos: macropinocitosis, fagocitosis, o endocitosis mediada por receptor [84]. 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 interactúan con los LT e inician una respuesta inmunitaria [84].

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 [85]. 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 [85]. 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)- $\beta$ 1, factor de crecimiento de hepatocitos, péptido intestinal vasoactivo, vitamina D3 o corticosteroides, entre otros [86, 87].

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 [88]), desviación inmunológica a favor del fenotipo Th2 (DC derivadas de médula ósea con factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) +/- IL-4 [89], DC esplénicas pulsadas con  $\alpha$ -globulina humana [90]), o inducción de tolerancia específica de Ag (iDC pulsadas con un péptido de insulina [91]).

## Antecedentes directos

El grupo de trabajo 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- $\beta$ 1. Factores como adenosina, prostaglandina (PG)E<sub>2</sub>, trombospondina (Tsp)-1 o IL-10 mediaron el efecto de estas tDC en el modelo de TT [92]. 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.

Los tratamientos con DC inmunogénicas han tenido éxito en pacientes con cáncer o con enfermedades infecciosas; sin embargo, las DC tolerogénicas sólo se han utilizado en humanos en un solo protocolo de fase I en pacientes con DM1, donde se probó la seguridad del tratamiento [93]. Nuestro grupo de trabajo evaluó 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, 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). 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 [94].

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 analizar su efecto sobre la función de los LT de memoria CD4+ autorreactivos de estos individuos. Para ello emplearemos dos antígenos diabetogénicos bien definidos que son reconocidos por estas poblaciones linfocitarias, insulina y GAD65. Este conocimiento, en conjunto, nos permitirá diseñar un tratamiento de DC para para pacientes que ya han desarrollado síntomas clínicos.

## REFERENCIAS

1. Lipton RB, Drum M, Burnet D, et al. Obesity at the onset of diabetes in an ethnically diverse population of children: what does it mean for epidemiologists and clinicians? *Pediatrics* 2005; 115:e553.
2. Fagot-Campagna A, Pettitt DJ, Engelgau MM, et al. Type 2 diabetes among North American children and adolescents: an epidemiologic review and a public health perspective. *J Pediatr* 2000; 136:664.
3. Duncan GE. Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose levels among US adolescents: National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2002. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2006; 160:523.
4. SEARCH for Diabetes in Youth Study Group, Liese AD, D'Agostino RB Jr, et al. The burden of diabetes mellitus among US youth: prevalence estimates from the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Pediatrics* 2006; 118:1510.
5. Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1994; 331:1428.
6. McCulloch DK, Palmer JP. The appropriate use of B-cell function testing in the preclinical period of type 1 diabetes. *Diabet Med* 1991; 8:800.
7. Smyth DJ, Cooper JD, Bailey R, et al. A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nat Genet* 2006; 38:617.
8. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007; 447:661.
9. Todd JA, Walker NM, Cooper JD, et al. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet* 2007; 39:857.
10. Hakonarson H, Grant SF, Bradfield JP, et al. A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene. *Nature* 2007; 448:591.
11. Lowe CE, Cooper JD, Brusko T, et al. Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat Genet* 2007; 39:1074.
12. Concannon P, Onengut-Gumuscu S, Todd JA, et al. A human type 1 diabetes susceptibility locus maps to chromosome 21q22.3. *Diabetes* 2008; 57:2858.
13. Concannon P, Rich SS, Nepom GT. Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med* 2009; 360:1646.
14. Cooper JD, Smyth DJ, Smiles AM, et al. Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci. *Nat Genet* 2008; 40:1399.
15. Smyth DJ, Plagnol V, Walker NM, et al. Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease. *N Engl J Med* 2008; 359:2767.
16. Aly TA, Ide A, Jahromi MM, et al. Extreme genetic risk for type 1A diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:14074.

17. Kaprio J, Tuomilehto J, Koskenvuo M, et al. Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia* 1992; 35:1060.
18. Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, et al. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* 1994; 371:130.
19. Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 1996; 85:291.
20. Khalil I, d'Auriol L, Gobet M, et al. A combination of HLA-DQ beta Asp57-negative and HLA DQ alpha Arg52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1990; 85:1315.
21. Rowe RE, Leech NJ, Nepom GT, McCulloch DK. High genetic risk for IDDM in the Pacific Northwest. First report from the Washington State Diabetes Prediction Study. *Diabetes* 1994; 43:87.
22. Barker JM, Barriga KJ, Yu L, et al. Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:3896.
23. Undlien DE, Friede T, Rammensee HG, et al. HLA-encoded genetic predisposition in IDDM: DR4 subtypes may be associated with different degrees of protection. *Diabetes* 1997; 46:143.
24. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 2004; 36:337.
25. Smyth D, Cooper JD, Collins JE, et al. Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes* 2004; 53:3020.
26. Pugliese A. Genetics of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2004; 33:1.
27. Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2004; 75:330.
28. Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA, et al. Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *Am J Hum Genet* 2004; 75:504.
29. Kavvoura FK, Ioannidis JP. CTLA-4 gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes mellitus: a HuGE Review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2005; 162:3.
30. Kolb H. Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab Rev* 1987; 3:751.
31. Rothe H, Jenkins NA, Copeland NG, Kolb H. Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, IGIF, which is located near Idd2. *J Clin Invest* 1997; 99:469.
32. Almawi WY, Tamim H, Azar ST. Clinical review 103: T helper type 1 and 2 cytokines mediate the onset and progression of type I (insulin-dependent) diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:1497.

33. Bluestone JA, Tang Q. Therapeutic vaccination using CD4+CD25+ antigen-specific regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101 Suppl 2:14622.
34. Wildin RS, Freitas A. IPEX and FOXP3: clinical and research perspectives. *J Autoimmun* 2005; 25 Suppl:56.
35. Sabbah E, Savola K, Kulmala P, et al. Diabetes-associated autoantibodies in relation to clinical characteristics and natural course in children with newly diagnosed type 1 diabetes. The Childhood Diabetes In Finland Study Group. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:1534.
36. Boitard C. The differentiation of the immune system towards anti-islet autoimmunity. *Clinical prospects. Diabetologia* 1992; 35:1101.
37. Nakayama M, Abiru N, Moriyama H, et al. Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature* 2005; 435:220.
38. Krishnamurthy B, Dudek NL, McKenzie MD, et al. Responses against islet antigens in NOD mice are prevented by tolerance to proinsulin but not IGRP. *J Clin Invest* 2006; 116:3258.
39. Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, et al. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 1990; 347:151.
40. Pietropaolo M, Hutton JC, Eisenbarth GS. Protein tyrosine phosphatase-like proteins: link with IDDM. *Diabetes Care* 1997; 20:208.
41. Hawa M, Rowe R, Lan MS, et al. Value of antibodies to islet protein tyrosine phosphatase-like molecule in predicting type 1 diabetes. *Diabetes* 1997; 46:1270.
42. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:17040.
43. Ziegler AG, Hillebrand B, Rabl W, et al. On the appearance of islet associated autoimmunity in offspring of diabetic mothers: a prospective study from birth. *Diabetologia* 1993; 36:402.
44. Achenbach P, Koczwara K, Knopff A, et al. Mature high-affinity immune responses to (pro)insulin anticipate the autoimmune cascade that leads to type 1 diabetes. *J Clin Invest* 2004; 114:589.
45. Wong FS, Karttunen J, Dumont C, et al. Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library. *Nat Med* 1999; 5:1026.
46. Alleva DG, Crowe PD, Jin L, et al. A disease-associated cellular immune response in type 1 diabetics to an immunodominant epitope of insulin. *J Clin Invest* 2001; 107:173.
47. Moriyama H, Abiru N, Paronen J, et al. Evidence for a primary islet autoantigen (preproinsulin 1) for insulinitis and diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:10376.
48. Bonifacio E, Atkinson M, Eisenbarth G, et al. International Workshop on Lessons From Animal Models for Human Type 1 Diabetes: identification of

- insulin but not glutamic acid decarboxylase or IA-2 as specific autoantigens of humoral autoimmunity in nonobese diabetic mice. Diabetes* 2001; 50:2451.
49. Mziaut H, Trajkovski M, Kersting S, et al. Synergy of glucose and growth hormone signalling in islet cells through ICA512 and STAT5. *Nat Cell Biol* 2006; 8:435.
  50. Ellis TM, Schatz DA, Ottendorfer EW, et al. The relationship between humoral and cellular immunity to IA-2 in IDDM. *Diabetes* 1998; 47:566.
  51. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, et al. Prediction of type 1 diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 1996; 45:926.
  52. Wenzlau JM, Walter M, Gardner TJ, et al. Kinetics of the post-onset decline in zinc transporter 8 autoantibodies in type 1 diabetic human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:4712.
  53. Winer S, Tsui H, Lau A, et al. Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive. *Nat Med* 2003; 9:198.
  54. Martin S, Wolf-Eichbaum D, Duinkerken G, et al. Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-lymphocyte deficiency. *N Engl J Med* 2001; 345:1036.
  55. Walker LS, Abbas AK. 2002. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 11-19.
  56. Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, et al. 2009. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* 155: 173-81.
  57. 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.
  58. Knip M, Siljander H. 2008. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmun. Rev.* 7: 550-7.
  59. 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.
  60. Kishiyama CM, Chase HP, Barker JM. 2006. Prevention strategies for type 1 diabetes. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 7: 215-24.
  61. 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.
  62. 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.
  63. 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.
  64. Roep BO. 2003. The role of T-cells in the pathogenesis of type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia* 46: 305-21.

65. 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.
66. Kikutani H, Makino S. 1992. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv. Immunol.* 51: 285-322.
67. 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.
68. Lampeter EF, McCann SR, Kolb H. 1998. Transfer of diabetes type 1 by bone-marrow transplantation. *Lancet.* 351: 568-569.
69. 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.
70. 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.
71. Rabinovitch A. 1994. Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes* 43: 613-21.
72. Anderson MS, Bluestone JA. 2005. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu. Rev Immunol.* 23: 447-85.
73. 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.
74. 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.
75. Herold KC. 2004. Achieving antigen-specific immune regulation. *J. Clin. Invest.* 113: 346-49.
76. 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.
77. Skyler JS. 2007. Prediction and prevention of type 1 diabetes: progress, problems, and prospects. *Clin. Pharmacol. Ther.* 81: 768-71.
78. Steinman RM, Hawinger D, Nussenzweig M. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 685-711.
79. Moser M. 2003. Dendritic cells in immunity and tolerance- do they display opposite functions? *Immunity* 19: 5-8.
80. Zammit DJ, Cauley LS, Pham QM, et al. 2005. Dendritic cells maximize the memory CD8 T cell response to infection. *Immunity* 22: 561-70.
81. Lipscomb MF, Masten BJ. 2002. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol. Rev.* 82: 97-130.
82. Shortman K, Liu YJ. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Rev. Immunol.* 2: 151-161.
83. Mellman I, Steinman RM. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell.* 106: 255-258.



84. Morelli AE, Thomson AW. 2007. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 610-621.
85. 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.
86. Steinbrink K, Graulich E, Kubisch 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.
87. 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.
88. 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.
89. 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.
90. 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.
91. 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.
92. 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.
93. Giannoukakis N, Phillips B, Finegold D, Harnaha J, Trucco M. 2011. Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 34:2026-2032.
94. Torres-Aguilar H, Sanchez-Torres C, Blank M, Shoenfeld Y. 2010. IL-10/TGF- $\beta$ -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.* 30:659-668.

#### 1.4. Objetivo general

Determinar la influencia de las células dendríticas tolerogénicas sobre la función de los linfocitos T autorreactivos de pacientes con DM1.

#### 1.5. Justificación

Las células dendríticas tolerogénicas (tDC) se están investigando como terapia para tratar diversas enfermedades autoinmunes, ya que son capaces de inactivar linfocitos T autorreactivos mediante diversos mecanismos moleculares. En la actualidad se desconoce si la aplicación *in vivo* de DC autólogas tolerogénicas a pacientes con enfermedades autoinmunes o con un alto riesgo genético de contraerlas puede ayudar a la prevención y/o tratamiento de las mismas. En el caso de la DM1 (DM1), el uso de las DC se ha estudiado en modelos de ratones diabéticos no obesos (NOD), y se ha conseguido prevenir la aparición de la enfermedad e incluso revertirla una vez presentados los síntomas clínicos. Estos antecedentes permiten pensar que las DC tolerogénicas pueden ser útiles para el tratamiento de la DM1 en humanos, pero es necesario determinar si estas DC pueden tener un impacto en la inducción de tolerancia frente a auto-antígenos diabetogénicos. En nuestro grupo de trabajo se ha realizado un estudio preliminar donde se generaron DC control y tolerogénicas a partir de monocitos de pacientes con DM1. En este proyecto nos proponemos analizar el efecto de estas DC sobre la proliferación y secreción de citocinas de los linfocitos T CD4+ que reconocen insulina o GAD65. El desarrollo de un proyecto de DC tolerogénicas *in vitro* con potentes capacidades reguladoras sobre los linfocitos T autorreactivos permitiría valorar su uso en la prevención y el tratamiento de las enfermedades auto-inmunes.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Objetivos específicos

1. Seleccionar 25 pacientes con el diagnóstico de DM1.
2. Purificar linfocitos T CD4+ con fenotipo efector/memoria (CD45RA-) y monocitos de sangre periférica de los pacientes.
3. Generar células dendríticas (DC) control y tolerogénicas a partir de los monocitos de cada individuo.
4. Realizar co-cultivos de linfocitos de memoria con DC inmunogénicas o tolerogénicas pulsadas con insulina, GAD65, o en ausencia de antígeno.
5. Analizar la producción de las citocinas IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-10 en los sobrenadantes de los co-cultivos y la proliferación de los linfocitos por dilución de CFSE mediante citometría de flujo al segundo y al quinto día de realizar los co-cultivos.

### 2.2. Diseño

Se realizó el reclutamiento de pacientes de las áreas que acepten firmar el consentimiento informado. A los pacientes con DM1 que deseen participar, se les realizará una historia clínica. Posteriormente tomó una muestra de sangre entre 30-40 ml, de la cual, a partir del concentrado leucocitario, se purificaron los LT CD4+CD45RA- y los monocitos. Los monocitos sirvieron como precursores de DC tolerogénicas. Se realizaron co-cultivos de los linfocitos y las DC pulsadas con los antígenos diabetogénicos, y se evaluó la capacidad de proliferación y de secreción de citocinas de los linfocitos T.

### 2.2.1. Tipo de investigación:

Coloque una x en frente de la opción correspondiente

Observacional Es aquella en la que se presencia un fenómeno sin modificar intencionalmente sus variables.		Experimental ó propositiva Es aquella en la que se modifican intencionalmente las variables del fenómeno.	X
Longitudinal Es aquella en la que se lleva a cabo el seguimiento de un fenómeno durante su desarrollo.		Transversal Es aquella en la que se examinan las características de un grupo en un momento dado ó durante un tiempo limitado.	X
Prospectiva Es aquella que se planea a futuro y en la que previamente se definen con precisión las condiciones de estudio.	X	Retrospectiva Es aquella que se basa en la revisión de expedientes, cédulas, sin que se hayan precisado las condiciones de estudio.	
Exploratoria ó descriptiva Estudio cuyo nivel de aprehensión de la realidad es descriptivo y sirve de orientación para formular hipótesis. Es aquella en la que un fenómeno es estudiado sin establecer comparaciones.	X	Comparativa Es aquella en la que se establece la comparación entre dos ó más grupos ó variables, establece relaciones de causa-efecto entre distintos fenómenos; es decir formula hipótesis de tipo casual.	
Abierta Cuando el investigador conoce las condiciones que pueden modificar las variables en estudio.	X	A ciegas Cuando el investigador desconoce las condiciones principales que pueden modificar las variables en estudio.	
Basica Trabajo experimental ó teórico efectuado primariamente con el objeto de generar nuevos conocimientos	X	Aplicada Investigación original realizada para la generación de nuevos conocimientos pero encaminada hacia una finalidad u objetivo práctico determinado.	

sobre los fundamentos y hechos observables	
<p>Tecnologica</p> <p>Trabajo sistemático en el que se utilizan los conocimientos obtenidos de la investigación científica y/o de la experiencia práctica, encaminado a desarrollar nuevos materiales, productos y dispositivos, establecer nuevos procesos, sistemas y servicios ó mejorar los ya existentes, incluyendo el desarrollo de prototipos, instalaciones experimentales y servicios piloto.</p>	<p>Biomedica X</p> <p>Actividad encaminada a generar nuevos conocimientos sobre los procesos biológicos del ser humano en sus diferentes sistemas de organización, que van desde niveles subcelulares hasta el organismo integral. Estos conocimientos pueden ser de otros sistemas biológicos diferentes al humano cuando, por la naturaleza del diseño requerido, no sea factible de llevarse a cabo en éste.</p>
<p>Clinica X</p> <p>Actividad encaminada a generar nuevos conocimientos sobre los procesos patológicos que afectan al ser humano como individuo y que se relacionan con los procesos de desarrollo, etiopatogenia, fisiopatogenia diagnóstico, pronóstico, tratamiento y complicaciones, tomando como referencia la historia natural de la enfermedad.</p>	<p>Salud publica</p> <p>Actividad encaminada a generar nuevos conocimientos sobre las condiciones de la salud de la población y la respuesta social organizada a dichas condiciones. Este tipo de investigación tiene los mismos objetos de análisis que la investigación biomédica y clínica, pero los estudia a nivel poblacional, basándose primordialmente en las ciencias sociales.</p>

### 2.3. Grupos de estudio

25 pacientes con DM1

#### 2.3.1. Grupo problema

25 pacientes con DM1

#### 2.3.2. Grupo testigo

En este proyecto no existe grupo testigo ya que se van a comparar variables dentro del grupo de pacientes (células dendríticas control frente a células dendríticas tolerogénicas).

### 2.4. Tamaño de la muestra

Por tratarse de un proyecto experimental original los estudios celulares se realizarán en forma inicial 25 pacientes con DM1

#### 2.4.1. Criterios de inclusión

Hombres o mujeres mayores de 12 años de edad con DM1, y familiares de primer grado (hermanos) que no han desarrollado la enfermedad, con consentimiento informado por escrito. Como controles se incluirán individuos sanos sin antecedentes de DM1 en el mismo rango de edades.

#### 2.4.2. Criterios de exclusión

Hombres o mujeres a partir de 12 años de edad con DM1, con consentimiento informado por escrito.

#### 2.4.3. Criterios de eliminación

Pacientes con morbilidades como infección activa o crónica, presencia o sospecha de neoplasia, etc.

## 2.5. Cédula de recolección de datos

Se anexa el formato donde se recogen las variables que se investigan en nuestro estudio.

## 2.6. Descripción general del estudio

Este estudio se enmarca dentro del protocolo que fue aprobado por el Comité de Ética de nuestra institución con referencia 244.2012. Se iniciará el reclutamiento de pacientes de las áreas que acepten firmar el consentimiento informado. A los pacientes con DM1 1 que deseen participar, se les realizará una historia clínica y se tomarán medidas antropométricas a cada paciente, así como sus cifras de presión arterial. Posteriormente se tomará una muestra de sangre entre 30-40 ml de la cual se aislarán los linfocitos T CD4+CD45RA-y los monocitos, con los cuales se realizarán los estudios celulares.

### 3. ORGANIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

#### 3.1. Programa de trabajo

Dentro del curso de tres años se realizó la recolección de datos, muestras sanguíneas, así como la generación de DC tolerogénicas y el análisis in vitro de la respuesta de los linfocitos T de memoria específicos para insulina y GAD65. Una vez concluida la parte experimental, se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos.

#### 3.2. Análisis de datos

El estudio descriptivo incluye medidas de tendencia central. El análisis bi-variado incluye diferencias en entre medias mediante prueba de t de Student y la prueba de Chi cuadrada para las diferencias entre proporciones, siempre y cuando se cumplan con los requisitos de aplicación. Se utilizara el programa de SPSS.

---

#### **MÉTODOS MATEMÁTICOS PARA EL ANÁLISIS DE LOS DATOS (CONSULTAR ASESOR).**

Seleccionar los métodos de análisis estadísticos de los datos derivados de la investigación.

Chi cuadrada ( $\chi^2$ ). Para comparar proporciones entre dos ó más grupos

“t” de Student. Para comparar promedios entre dos grupos X

Análisis de varianza. Para comparar promedios entre más de dos

Prueba de Mann-Whitney X

Correlación de Pearson X

---



## **4. RECURSOS**

### **4.1. Humanos**

El investigador responsable y los asociados.

### **4.2. Físicos**

Formatos de cuestionario, equipo para venopunción y extracción sanguínea (jeringa, torunda, ligadura, bolsa de recolección y fraccionamiento de sangre), centrífuga, incubadora, refrigerador, tubos de distintas medidas para manipulación de muestras, cámaras de Neubauer, gradillas, cajas para cultivo celular, pipetas estériles desechables de diferentes medidas, reactivos de laboratorio como: ficoll, DPBS, medio de cultivo RPMI, citocinas y factores de crecimiento y/o maduración (GM-CSF, IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ), etanol al 70%.

## **5. FINANCIAMIENTO**

### **5.1. Costo de la investigación**

Por parte de los investigadores con apoyo del CINVESTAV y CONACYT

## **6. ASPECTOS ÉTICOS**

En esta sección se explicarán con detalle los riesgos y peligros de la investigación, así como las medidas que deben tomarse para evitar procedimientos inadecuados. El paciente ó sus familiares deberán ser informados de su participación en la investigación y deberá ser recabada su conformidad por escrito, en los casos que se considere necesario (anexar carta de consentimiento informado). En esta sección de explicaran mediante consentimiento informado al paciente de los riesgos y complicaciones del procedimiento quirúrgico, los cuales deberán aprobar o rechazar el procedimiento y mostrar su conformidad mediante consentimiento informado firmado. Se informará a los pacientes y en caso necesario a sus familiares,

además se obtendrá un consentimiento informado por escrito a los participantes mayores de 18 años y asentimiento a los menores de edad con el consentimiento firmado de su padre, madre o tutor.

## **7. RESULTADOS**

Se obtuvieron muestras de sangre (30-40 ml) de 25 pacientes diagnosticados con DM1 (Tabla 2). Ninguno de ellos tenía infección activa, neoplasia, o complicaciones crónicas tales como albuminuria, retinopatía, neuropatía o. Nueve pacientes fueron reclutado alrededor del momento del diagnóstico. El 75% de ellos tenían niveles de glucosa en sangre por encima de 200 mg/dl, y 37,5% presentaron cetoacidosis. En contraste, sólo el 21% de los 16 pacientes con enfermedad de larga duración evaluados tenían niveles de glucosa en sangre  $\geq 200$  mg/dl y ninguno tenía cetoacidosis en el momento de la toma de muestra.

Tabla 2. Características de los pacientes con DM1 evaluados en el estudio.

Pacientes	No.	F: M	Edad <sup>b)</sup> (media ± SD)	Rango edad <sup>b)</sup>	Tiempo desde el diagnóstico <sup>b)</sup> (media ± SD)	HbA1c (media ± SD)	Colesterol en mg/dl (media ± SD)
Debutantes	9	1: 1	12.6 ± 1.3	10-14	0	10.6 ± 3 <sup>c)</sup> (92.8 ± 32.8) <sup>d)</sup>	263 ± 57
Diagnóstico o no reciente	16	2: 2: 1	23 ± 11.2	12-58	8.1 ± 6.7	7.85 ± 1.5 (62.3 ± 17.3)	205 ± 57

a) Femenino:Masculino

b) Años.

c) Valores de HbA1c en unidades de porcentaje.

d) Valores de HbA1c en mmol HbA1c/mol Hb.

Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% suero heterólogo o suero de ternera fetal (FCS) inactivado por calor, 2 mM L-glutamina (Hyclone Laboratories, Logan, UT), 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina (Gibco, Grand Island, NY). Se utilizaron los siguientes reactivos: factor estimulante de las colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF, 1000 U/ml); IL-4 (15 ng/ml), IL-10 (20 ng/ml), TGF- $\beta$ 1 (40 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN); IL-2 (80 U/ml, Biovision, Mountain View, CA); diacetato de carboxi-fluoresceína succinimidil éster (CFSE, 10  $\mu$ M, Molecular Probes, Eugene, OR); insulina (0,1 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); GAD65 (0,2 mg/ml, Novus Productos Biológicos, Littleton, CO); candidina (0,1 mg/ml), lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* 0111: B4 (0,1  $\mu$ g/ml, Sigma-Aldrich).

Las células mononucleares de sangre periférica se purificaron a partir de sangre. Los monocitos CD14+ se separaron por clasificación celular magnética. Los linfocitos T CD4+ se aislaron, seguido de incubación con Ab anti-MACS CD45RA (Ab) para obtener células CD45RA- efectoras/memoria. Los monocitos se cultivaron en medio suplementado con FCS y tratados con solamente con GM-CSF e IL-4 para obtener cDC, o simultáneamente con IL-10 y TGF- $\beta$ 1 para generar tDC.

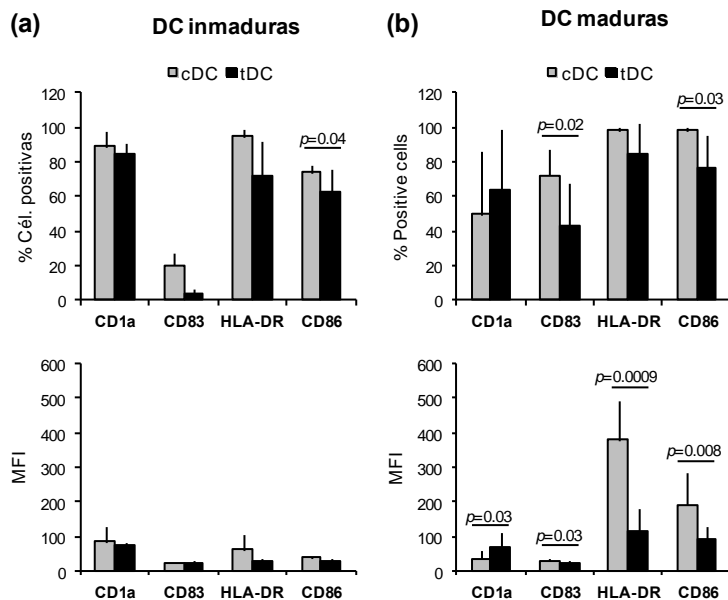


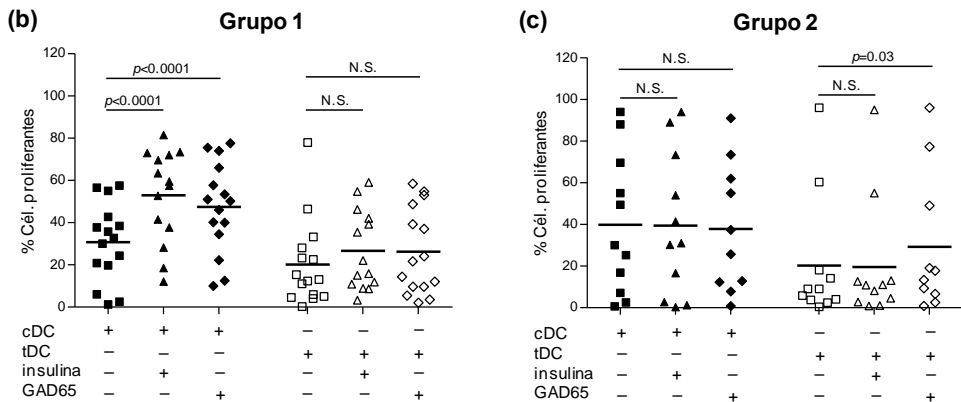
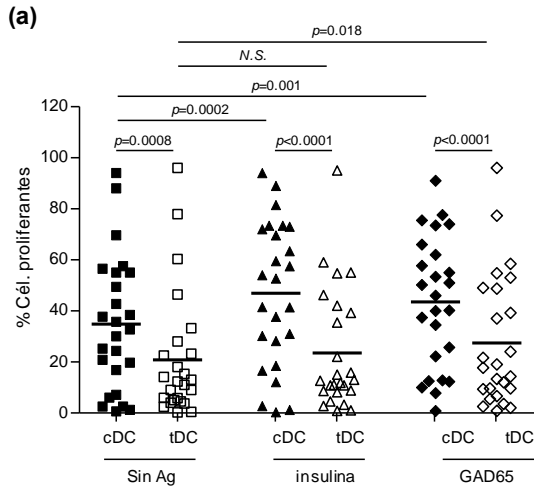
Figura 3. Fenotipo de inmaduros y maduros cDC y tDC. cDC y tDC generadas a partir de monocitos CD14+ aislados de pacientes con DM1 fueron analizadas antes (inmaduras, a) y después (maduras, b) de su maduración con LPS. La expresión de los marcadores indicados fue evaluada por citometría de flujo. El porcentaje de células positivas y la intensidad media de fluorescencia (MFI) para cada marcador se representada como la media  $\pm$  desviación estándar de 7 pacientes. Las estadísticas se realizaron mediante la prueba *t* pareada, y se muestran las diferencias significativas.

Analizamos el fenotipo y la función de DC generadas a partir de donantes sanos con IL-10 y TGF- $\beta$ 1, y demostró su capacidad para suprimir la respuesta de linfocitos T. Hemos generado CDC y TDC en ausencia o presencia de IL-10/TGF- $\beta$ 1, respectivamente, a partir de monocitos de sangre de 25 pacientes con DM1. Las células dendríticas fueron maduras con LPS, y la expresión de marcadores de superficie relacionados con la maduración de DC se evaluó en 7 pacientes. Similar a lo que se ha informado en un estudio previo con pacientes DM1, la expresión de HLA-DR, CD83 y CD86, tres moléculas que están regulando durante la maduración DC (Figs. 3a y b), fue disminuido significativamente en tDC (Fig. 3b). En contraste, la

expresión de CD1a, que es las regulada en la maduración de DC (Figs. 3a y b), siendo significativamente mayor en PMS (Fig. 3b). Estos resultados fueron equivalentes en pacientes recientemente y no recién diagnosticados. Por lo tanto, a pesar de tanto DC se activaron con LPS, la maduración de tDC fue afectada en cierta medida y exhibieron un fenotipo comparable a la de inmaduros DC.

Células T efectoras/memoria de las células CD4+ CD45RA- de pacientes con DM1 fueron estimuladas con cualquiera autólogo CDC o tDC pulsado con insulina, GAD65, o hacia la izquierda no pulsada. En comparación con los CDC, tDC exhibió una significativa disminución de la capacidad para estimular las células T proliferación, observada en Ag-cargado y descargado DC. El porcentaje de la proliferación de células T con CDC vs tDC fue:  $34,8 \pm 25,7\%$  vs  $20,8 \pm 24,2\%$  con descargadas DC ( $p = 0,0008$ ),  $47 \pm 27,7\%$  vs  $23,5 \pm 23,2\%$  con la insulina cargada DC (pb 0,0001), y  $43,6 \pm 25\%$  vs  $27,4 \pm 25,2\%$  con GAD65-cargado DC (pb 0,0001) (Fig. 4a).

*Figura 4. Capacidad de DC para inducir la insulina / proliferación de GAD65 específica en las células T efectoras / de memoria. (a) las células CD4 + CD45-T eran co-cultivadas con autólogo CDC o PMS. DC se pulsaron con insulina, GAD65, o hacia la izquierda no pulsada. Después de 5 días, los linfocitos eran cultivados y el porcentaje de células en proliferación se determinó por citometría de flujo. Cada símbolo representa un paciente individual. (b) Porcentaje de Foxp3-expresión de los linfocitos T dentro de los proliferantes y células no proliferativas poblaciones. cada célula población se consideró como 100% para la normalización de datos. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  desviación estándar de tres pacientes distintos. (c, d) El los datos de los pacientes de (a) se representan de acuerdo con el específico (c, grupo 1) o no específico (d, grupo 2) respuesta a la insulina y GAD65 con los CDC. Las barras horizontales corresponden a la media del grupo de datos. Las estadísticas se realizaron mediante la prueba t pareada, y P-valores se representan. N.S., no hay diferencia significativa.*



En estos cultivos primarios, hemos detectado que los linfocitos de un grupo de pacientes proliferaron específicamente en contra de la insulina o GAD65 con los CDC, es decir, la proliferación de los CDC cargado-Ag fue superior que con la CDC no pulsada (grupo 1, 14 pacientes para insulina y 15 para GAD65) (Fig. 4b), mientras que los linfocitos de otros pacientes no lo hicieron (grupo 2) (Fig. 4c). En ambos grupos, la respuesta a la descargada tDC era comparable a la de Ag-cargado PMS. En particular, el 70% de los pacientes del grupo 2 tuvo cetoacidosis y/o glucosa en la sangre los niveles en el

momento del muestra de sangre fue tomada. Seis de cada 9 pacientes reciente aparición evaluado pertenecen al grupo 2. En contraste, sólo el 20% de la los pacientes del grupo 1 tenían niveles de glucosa en sangre  $\geq 200$  mg/dl, y ninguno de ellos tenía cetoacidosis cuando la muestra de sangre fue obtenido.

A la luz de los patrones divergentes de una respuesta específica contra diabetogénico Ag, el próximo investigó si tales perfiles podrían estar asociados con otros parámetros de la pacientes. De esta manera se realizó un amplio análisis de las correlaciones entre las respuestas de células T y la edad del paciente, la edad de la enfermedad de inicio, duración de la enfermedad, el porcentaje de hemoglobina glicosilada (Hb) A1c y los niveles de colesterol. En primer lugar, correlación realizado análisis con las respuestas de células T específicas a la insulina o GAD65-cargado CDC (Fig. 5a). Encontramos un correlación negativa moderada sólo con los niveles de colesterol (insulina:  $r = -0,3775$ ,  $p = 0,1$ ; GAD65:  $r = -0,4641$ ,  $p = 0,045$ ). Además, llevamos a cabo las pruebas de correlación con la Respuestas de células T a los CDC descargado (Fig. 5b). En este caso, detectado una fuerte correlación positiva con tanto el nivel de colesterol y el porcentaje de HbA1c (colesterol:  $r = 0,6495$ ,  $p = 0,0019$ ; HbA1c:  $r = 0,5611$ ,  $p = 0,008$ ). Tomado En conjunto, estos resultados sugieren que la especificidad antigénica de las respuestas de células T in vitro se correlacionan negativamente con metabólica parámetros de los pacientes asociados con un mal control de la enfermedad.



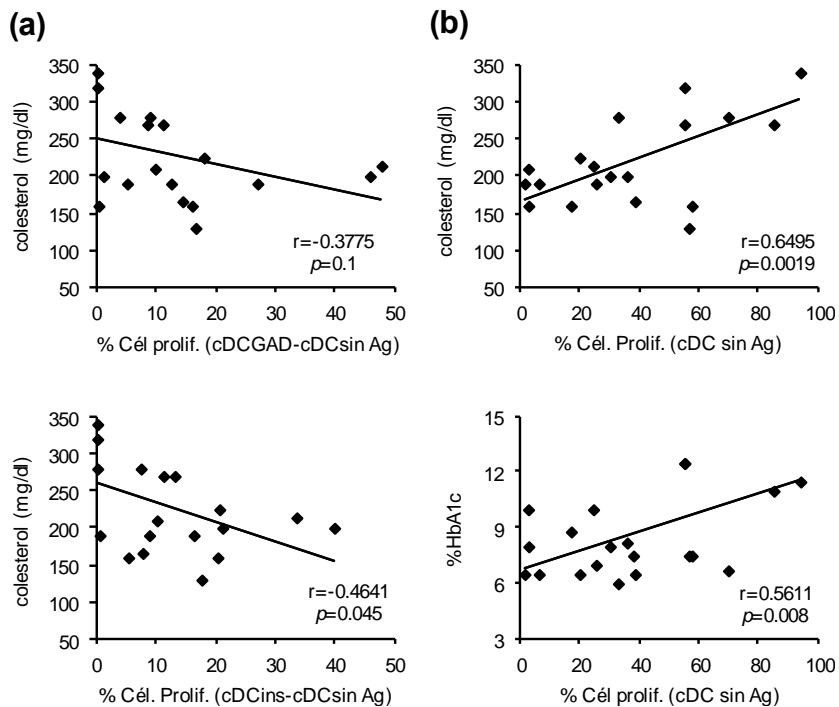


Figura 5. Correlación de las respuestas de los linfocitos T y los parámetros clínicos de pacientes DM1. (a) de dispersión de puntos de la específica respuesta a la insulina (panel superior) y GAD65 (panel inferior), mide como (% de células de ciclismo con los CDC cargadas con Ag - células% de ciclismo con no pulsada CDC) y los niveles de colesterol de los pacientes. (b) puntos de dispersión de las respuestas de las células T con niveles de colesterol no pulsadas CDC y los pacientes (superior panel) o porcentaje de HbA1c (panel inferior). Índices de correlación  $r$  de acuerdo con el análisis y los valores de  $p$  de Pearson se muestran.

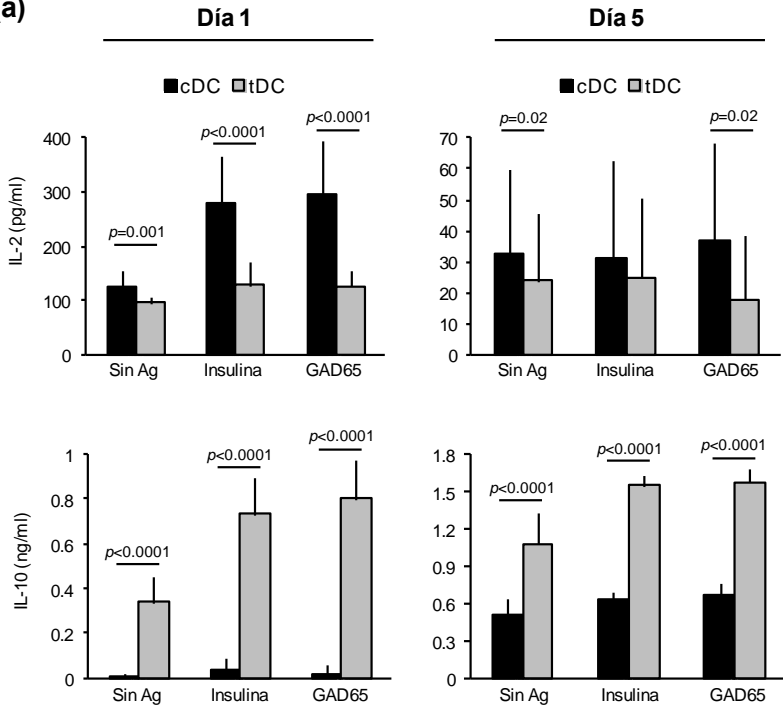
Los sobrenadantes de 5 días a partir de los co-cultivos primarios se analizaron para la presencia de IL-2, IL-10 e IFN- $\gamma$ . IL-2 e IL-10, dos citocinas con proliferativa potente y los efectos antiproliferativos, respectivamente, fueron también evaluados en sobrenadantes de 1-día. IL-2 se secretó temprana después de la activación de los linfocitos T, y sus niveles fueron bajos en el final de los co-cultivos. En presencia de tDC, la sobrenadantes contenían importantes cantidades reducidas de IL-2 en comparación con los de los CDC,

especialmente evidenciado en principios tiempos de los co-cultivos (Fig. 6a). En ese momento, la producción de IL-2 con carga-Ag CDC fue superior en comparación con los no pulsada CDC. En contraste, no hubo diferencias limitados sobre la producción de IL-2 entre los cultivos establecidas con Ag-pulsada o no pulsada tDC. Se detectaron grandes cantidades de IL-10 en los sobrenadantes de 1-día sólo en las culturas con el TDC, pero su producción aumentó con tanto CDC y TDC lo largo de la cultura. Sin embargo, los sobrenadantes de los co-cultivos TDC contenían cantidades superiores de IL-10 en cualquier momento evaluado (Fig. 6a). Por el contrario a IL-2, IL-10 la producción fue mayor con pulsadas-Ag tDC que con no pulsada tDC, mientras que CDC indujo cantidades similares de IL-10 con independencia de si se cargaron con Ag o no.

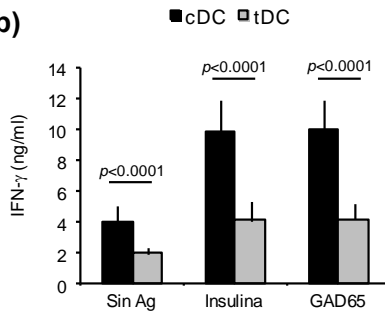
Las DC Tolerogénicas fueron significativamente menos eficaz en la inducción la secreción de IFN- $\gamma$  por las células T que CDC (Fig 6b), Pero las citocinas de producción de DC cargadas con Ag era superior en comparación con las DC no pulsada tanto CDC y TDC. Los resultados fueron similares en los de reciente aparición y establecieron los pacientes de todas las citocinas evaluado.

*Figura 6. medición de citocinas en co-cultivos de linfocitos con DC. IL-2, IL-10 (a) y IFN- $\gamma$  (b) se cuantificaron por ELISA en 1-día (IL-2, IL-10) y 5-día (IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$ ) sobrenadantes de co-cultivos de linfocitos y CDC o el TDC, estableció como en la Fig. 2. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de 10 (IL-10 e IFN- $\gamma$ , quinto día), 13 (IL-2 e IL-10, día primero) o 18 (días quinto IL-2) pacientes. Estadísticas se llevaron a cabo por la prueba t pareada, y las diferencias significativas se representan.*

(a)

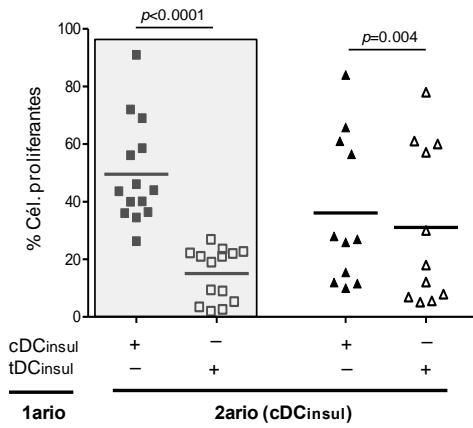


(b)

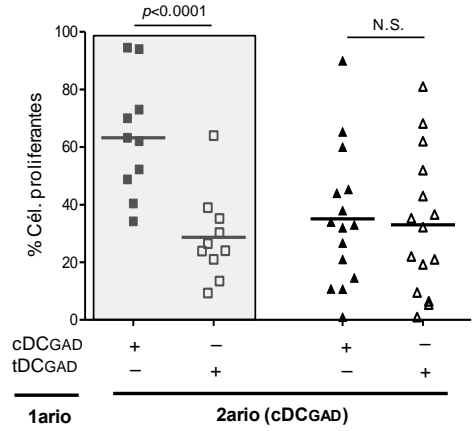


Hasta este punto, hemos demostrado que tDC de pacientes DM1 eran pobres para generar un entorno enriquecido de IL-10 tras la interacción con células T. A continuación, se evaluó si estas células T fueron tolerantes. Por lo tanto, las células T se recuperaron de los cocultivos primarios con CDC cargado-Ag (CTL) o PMS (TTL) se volvieron a estimular con insulina autólogo o GAD65-pulsada CDC. En ausencia de CDC, no se observó la proliferación cuando las células T se cultivaron sólo con el Ag. Establecimos un punto de corte arbitrario punto  $\geq 15\%$  ( $\Delta$ cTL / TTL:% ciclismo CTL -% ciclismo TTL) para categorizar el TTL como tolerantes fácilmente. Catorce pacientes para la insulina (reducción de  $34,5 \pm 16,6\%$  en ciclismo TTL en comparación con CTL, pb 0,0001) y 10 pacientes para GAD65 (reducción de  $34,6 \pm 13\%$ , pb 0,0001) cayó en esta categoría (Fig. 7a y b, resaltado con rectángulos grises). La linfocitos de 8 pacientes fueron tolerantes tanto a la insulina y GAD65. En el resto de los pacientes, TTL y CTL respondieron de manera similar después de recambio cargado CDC-Ag (Fig. 7a y b). En particular, el 71% y el 78% de los individuos cuyos linfocitos fueron tolerantes contra la insulina y GAD65, respectivamente, pertenecen a la grupo 1 de pacientes. Tomado en cuenta el número total de pacientes, TTL de 33% (insulina) y 11% (GAD65) del recién diagnosticados fueron tolerantes en comparación con 62,5% (insulina) y 56% (GAD65) de los pacientes establecidos. Hubo un negativo correlación entre  $\Delta$ cTL/TTL y el porcentaje de HbA1c (insulina:  $r = -0.4966$ ,  $p = 0,03$ ; GAD65:  $r = -0.4992$ ,  $p = 0,029$ ; Fig. 7c y d). En general, se concluye que tDC de un grupo de DM1 pacientes, predominantemente compuestas por no recién diagnosticados individuos, son capaces de inducir una respuesta menor estable de las células T y la insulino-GAD65 específico.

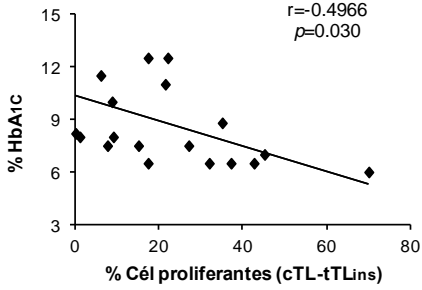
(a)



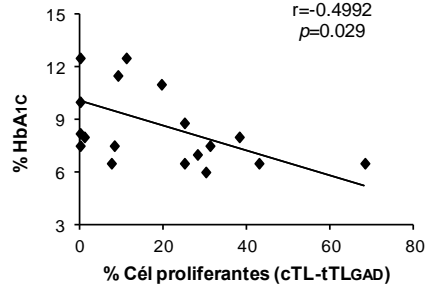
(b)



(c)



(d)



*Figura 7. las DC tolerogénicos induce hiporreactividad en contra insulina / células T-GAD65 reactiva a partir de un grupo de pacientes DM1. Los linfocitos estimulados previamente con insulina (a) o GAD65-cargado (b) CDC o tDC fueron puestos a prueba nuevamente con los CDC se pulsaron con el mismo antígeno diabetogénico. El porcentaje de células en ciclo se analizó 5 días más tarde. Las barras horizontales corresponden a la media del grupo de datos. Puso de relieve con rectángulos grises son los grupos de pacientes cuyos linfocitos fueron tolerantes. Las estadísticas se realizaron por el emparejado t-test. (c, d) Los análisis de correlación de linfocitos T respuestas secundarias y porcentaje de HbA1c. Se muestra son los puntos de dispersión que representa la respuesta a la insulina (c) y GAD65 (d), medida como (% de ciclismo CTL -% ciclismo TTL). Índices de correlación r según Se muestran de análisis y valores de p de Pearson*

Una característica esencial de una terapia exitosa es que tDC no debe causar inmunosupresión generalizada. para evaluar si TTL todavía podía responder a sin relación Ag, probamos sus respuestas a candida en 8 pacientes. Utilizamos CTL para la comparación como un control positivo. El porcentaje de células proliferantes que respondieron a candida pulsadas CDC estaba similar en TTL y CTL, independientemente de que se estimularon con insulina o GAD65 en el co-cultivo primario (Fig. 8a y b). Por otra parte, el porcentaje de TTL que proliferaron en contra candida fue mayor que el porcentaje de TTL que respondió al antígeno diabetogénico (insulina inicial  $p = 0,001$ , GAD65  $p = 0,003$ ). Se obtuvieron resultados equivalentes cuando TTL eran intercambiados con el antígeno diabetógeno, es decir, TTL tolerante a la insulina todavía respondió a GAD65 pulsadas CDC ( $p = 0,003$ ), y TTL tolerante a GAD65 respondieron a insulina-pulsado CDC ( $p = 0,005$ ) (Fig. a y b). Por lo tanto, estos Los resultados sugieren que la Ag-cargado tDC induce una respuesta menor exclusivamente en los linfocitos reactivos a este Ag, pero no ponen en peligro la capacidad de otras células T para responder a sus afines antígenos.

(a)

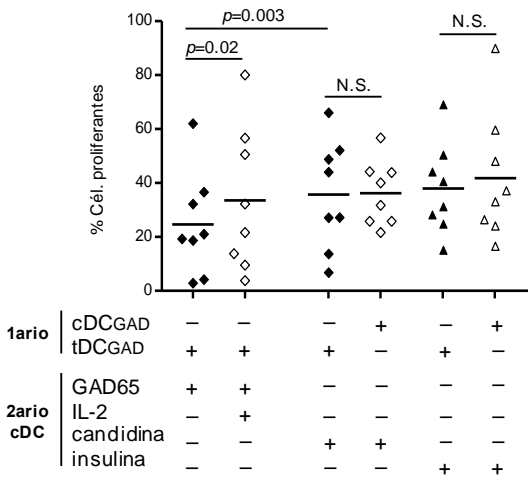
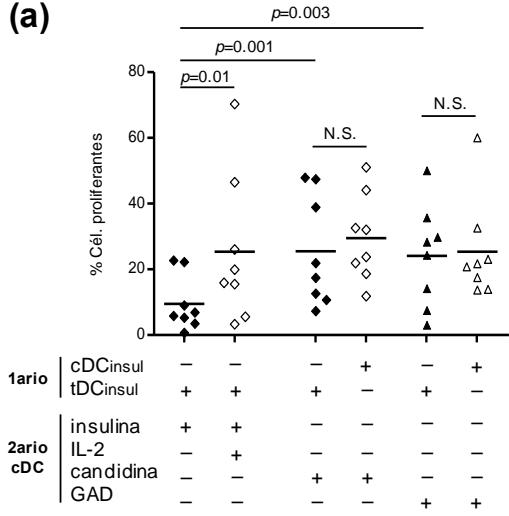
p=0.003

Figura 8. Las DC tolerogénicas inducida contra insulina o hiporreactividad GAD65 específica en las células T efectoras / de memoria. T<sub>H</sub>1 y CTL generada a partir de cultivos primarios con insulina (a) o GAD65- (b) cargado DC fueron etiquetados con CFSE y reexponerse CDC pulsado con insulina (a) (TTL) y GAD65 (b) (TTL), tanto en la presencia o ausencia de IL-2, candia (a, b) (TTL y CTL) o con el antígeno diabetogénico GAD65 (a) o insulina (b) (TTL y CTL). El porcentaje de células en ciclo se analizó 5 días más tarde por el flujo de citometría. Cada punto representa el valor de un individuo paciente. Las barras horizontales corresponden a la media del grupo de datos. El p-valores obtenidos con el análisis de la prueba t pareada son se muestra. N.S., no hay diferencia significativa.

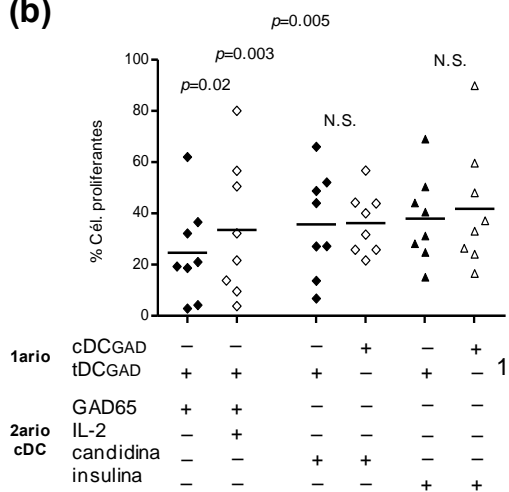
1ario	IL-2	-	+	-	-	-	-
cDC	candina	-	-	+	+	-	-
	GAD	-	-	-	-	+	+

(b)

(a)



(b)



## **8. CONCLUSIÓN**

Restablecer la tolerancia a los antígenos libres es un tema importante para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Diferentes terapias con células dendríticas tolerigénicas autólogas (atDC), están actualmente bajo investigación para inactivar linfocitos T autoreactivos. En el presente estudio se evaluó la capacidad de atDC para generar IL-10 y TGF- $\beta$ 1 en pacientes con DM1 recién y no reciente diagnóstico, para suprimir la actividad de los linfocitos T CD4 + e insulino-GAD65 específico.

Los resultados indican que las atDC indujeron una menor respuesta Ag-específica en los linfocitos de un grupo de pacientes, en su mayoría compuesto por individuos con la enfermedad controlada, y podría ser un tratamiento potencial para estos pacientes.