

DM1. ELS GRANS REPTES DE LA TERÀPIA IMMUNOLÒGICA.

Conchi Mora, PhD

Investigadora Unitat Immunologia

Dept. Medicina Experimental

Univ. Lleida

C/. Montserrat Roig nº 2

25008 Lleida

tel. 973-702415

e-mail:conchi.mora@mex.udl.cat

La diabetis mellitus autoimmune o de tipus 1 (DM1) es caracteritza per la destrucció selectiva exercida pel sistema immunitari de les cèl·lules beta pancreàtiques pròpies. Es tracta d'una malaltia poligènica amb un nivell de concordància entre bessons monozigòtics variable entre el 30 i el 70% (1) dependent de l'estudi, la qual cosa indica la importància del component ambiental a l'etiologia de la DM TIPUS 1.

Els limfòcits T tenen una funció crucial durant la progressió de l'atac autoimmunitari. Tant en humans com al model murí de DM1 NOD (Non Obese Diabetic), hi ha una clara deficiència de la inducció de tolerància tant a nivell tímic com perifèric, deficiència causalment associada als haplotips de risc del MHC de classe II (DQ8 i DQ2 en humans, i IA^g en el model murí NOD) (2).

Si bé la causa inicial que desencadena la infiltració selectiva dels illots pancreàtics pels leucòcits, se situa al terreny del debat, existeixen nombroses evidències experimentals que apunten a un insult vers les cèl·lules beta provocat bé sigui per una infecció vírica (3), o bé per la deficiència en l'acció fagocítica responsable de retirar les restes cel·lulars resultants d'un pic d'apoptosi de les cèl·lules beta post-natal espontani (4). En qualsevol cas, l'evidència experimental actual apunta al fet que la causa principal de la mort de les cèl·lules beta en la DM1 és l'apoptosi (5,6). S'han descrit tres mecanismes efectors principals de la mort de les cèl·lules beta pancreàtiques productores d'insulina a la DM1: la via pro-apoptòtica senyalitzada pel receptor Fas (CD95) quan interacciona amb el seu lligand FasL (CD95L) (7); la via pro-apoptòtica iniciada pels grànuls citolítics alliberats a les cèl·lules □ a través dels porus formats per la perforina produïda pels limfòcits CD8 (8); i la inducció de mort cel·lular induïda per la producció d'òxid nítric a partir de l'enzim iNOS (inducible Nitric Oxid Synthase) (9).

D'aquest tres mecanismes, un dels més extensivament estudiat ha estat el protagonitzat per la interacció entre Fas i FasL. Fas pertany a la família de receptors de la família del TNFR (receptors de TNF), i trimeritza un cop interacciona amb el seu lligand, també trimèric. La trimerització d'aquest receptor promou la cascada pro-apoptòtica senyalitzada per Fas. L'acció conjunta de IL-1 β i IFN γ es requereix per a la inducció de Fas a la superfície cel·lular de les cèl·lules beta de ratolí (10-12), mentre que en les anàlogues humanes, IL-1 β és suficient. Aquesta citocina, cobra una especial significació en malalties cròniques inflamatòries com ara la DM1, ja que a part de induir l'expressió de Fas en les cèl·lules diana, la qual cosa converteix aquestes en blancs fàcils de destrucció pels limfòcits T activats, abundants en expressió de FasL a la seva superfície, a més a més, té la capacitat de promoure la síntesi de iNOS, a través del factor de transcripció NF κ B (13, 14). No obstant, recents observacions apunten vers l'existència de certa redundància a nivell de citocines, ja que el bloqueig parcial de la senyalització mediada pel receptor de IL-1, o bé de la síntesi de la citocina activa, no evita significativament l'aparició de DM1 en els ratolins NOD (15, 16).

Per una altra banda l'evolució de la malaltia no sembla seguir una cinètica linial, sinó la corresponent a un curs de recaiguda-remissió, amb un perfil cíclic fins la instauració definitiva de la mateixa, segons el que han proposat von Herrath et al. (17). Les cèl·lules beta dels illots no romandrien passives vers l'atac immunitari, sinó davant de l'augment de la glucèmia poden incrementar la velocitat de replicació, la qual cosa, a la seva vegada, pot augmentar la seva susceptibilitat a patir apoptosi (18-20) induïda per citocines. Les cèl·lules T efectores i reguladores mesuren les seves forces fins que el nombre de efectores no pot ser contingut per les reguladores. És a la fase de "lluna de mel" de la DM1 quan ens trobaríem amb una elevada proliferació de les cèl·lules beta, un control molt balancejat entre cèl·lules T reguladores i cèl·lules T efectores, i un discret increment de la massa de cèl·lules beta, després d'una evolució de pèrdua de massa de cèl·lules beta progressiva. (21). Normalment la fase de lluna de mel comença al cap de setmanes després de la diagnosi de la DM1 i de l'aplicació del tractament amb insulina exògena per tal de corregir la hiperglucèmia. Aquesta fase es caracteritza per una disminució dels requeriments en l'administració d'insulina exògena i un millor control de la glucèmia pel pacient diabètic. La "lluna de mel" diabètica pot durar fins a 24 mesos després de la diagnosi (22-24) i, almenys en el model NOD, pot explicar-se per la recuperació parcial de massa de cèl·lules beta perduda a partir de cèl·lules existents però descompensades metabòlicament (21) i, per la replicació de les cèl·lules

preexistents en resposta a la insulinitis (25). Tots aquests factors comporten una evolució en el ventall de determinants antigènics exposats, ja que durant la progressió de la inflamació, apareixen nous autoantigens, degut al processament diferencial de les proteïnes com a conseqüència del atac vers la cèl·lula beta i l'alliberament de proteases com ara són Granzim B i Granzim A, etc ver les cèl·lules diana. Aquestes proteases i d'altres associades als processos inflamatoris tenen punts de tall novells, de manera que es generen nous pèptids contra els quals no s'havia induït tolerància prèviament (26); també la captació del contingut cel·lular de les cèl·lules beta apoptòtiques, posa a disposició de les cèl·lules presentadores d'antigen nous determinants antigènics per presentar a les cèl·lules T autorreactives. Aquest fenomen d'increment progressiu del número de determinants autoantigènics o repertori d'autoantigens al llarg de l'evolució de la DM1 s'anomena *escampament epitòpic* o "*epitope spreading*" i s'ha descrit en varietat de malalties cròniques inflamatòries com són l'esclerosi múltiple i el lupus sistèmic eritematós (17).

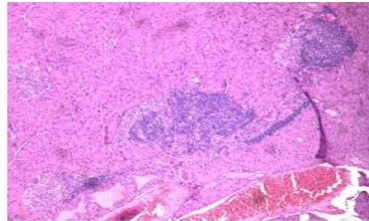
La detecció entre els parents de primer grau dels pacients de DM1, d'autoanticossos té un important valor de prognosi, ja que el risc de patir DM1 incrementa proporcionalment amb el número de autoantigens contra els quals es desenvolupen autoanticossos (20, 27). No obstant, malgrat que els autoantigens majoritaris a la DM1 pertanyen a proteïnes vinculades a la cèl·lula beta (insulina, Glutàmic Acid Descarboxilasa (GAD65), Islet cell antigen 2 (IA2), Islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic-subunit-related protein (IGRP)), s'han descrit d'altres no relacionats amb la cèl·lula beta, com la Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) i la periferina (28).

Davant d'aquest escenari, on ens trobem redundància a nivell de citocines que poden suplir amb més o menys eficiència la inducció de mort de les cèl·lules β , i l'existència de multiplicitat de mecanismes, amb diferent pes específic a l'hora de generar la malaltia, el disseny d'una teràpia efectiva ha de tenir en compte tots aquests factors, sense caure en la simplificació extrema del problema. La DM1, no oblidem és un desordre metabòlic causat per múltiples factors, des de l'augment anòmal a nivell perifèric de la freqüència de limfòcits autorreactius (primera barrera de control del procés autoimmunitari fallida), l'escalada d'activació d'aquests limfòcits a la perifèria sense un control adient (segona barrera saltada), fins l'apostament selectiu dels limfòcits autorreactius al microambient de l'illot pancreàtic (factor teixit-específic). Tot agreujat pel fenomen d'escampament epitòpic.

La tolerància immunològica pot assolir-se mitjançant diferents mecanismes: deleció clonal, inducció d'anèrgia, ignorància o immunosupressió. Tots aquests punts de control semblen estar alterats en major o menor grau a la DM1, de forma que, l'espiral autorreactiva troba el seu camí i l'amenaça resta a la memòria immunològica fins i tot després del trasplantament d'illots pancreàtics al·logènics, per la qual cosa s'ha d'administrar un tractament immunosupressor per tal d'evitar el rebuig i la recidiva diabètica després del trasplantament. La immunosupressió indiscriminada, no antigen-específica, comporta una major susceptibilitat a infeccions i processos tumorigènics, de forma que no deixa de ser una alternativa poc atractiva davant del tractament amb insulina, i només s'aplica a casos de trasplantament múltiple d'òrgans o casos de control làbil de la glucèmia. Actualment molts esforços s'estan efectuant en aconseguir, per una banda, una font fàcilment accessible de massa beta funcional trasplantable, i per una altra, teràpia cel·lular immunològica que mantingui la tolerància antigen-específica vers els autoantigens de l'empelt a llarg termini. Aquesta aproximació apunta a l'ús de cèl·lules T reguladores autòlogues antigen-específiques. Dins de tot el panorama de possibles fonts d'immunosupressió cel·lular es distingeixen dos grans fenotips: les cèl·lules comunament anomenades **T regs**, caracteritzades pels seus marcadors específics ($CD4^+CD25^{hi}$, FoxP3+), la dotació de les quals ve ja donada per la freqüència existent en el timus, no podent-se induir, la seva acció depèn del contacte cèl·lula a cèl·lula i de l'acció directa o indirecta del TGF- β ; i, les cèl·lules **Tr1**, ($CD4^+CD25^-FoxP3^-,IL-4^-IL-5^+IL-10^+TGF\beta^+$), que poden induir-se in vitro mitjançant el tractament amb IL-10, IFN α i APCs en humans, el seu mecanisme d'acció no requereix contacte cel·lular i és mediat per l'acció de la IL-10 i el TGF- β (29). Ambdós tipus T regs i Tr1 mostren anèrgia in vitro. Notables esforços s'estan duent a terme amb l'objectiu de generar una font autòloga de cèl·lules T immunosupressores que tinguin una acció localitzada al nínxol de l'illot pancreàtic empeltat, de forma que s'evitin els efectes nocius derivats de la teràpia immunosupressora convencional.

Caldria considerar si, un cop assolit aquest en pacients empeltats, seria viable l'aplicació d'aquesta teràpia a pacients de DM1 en fase de "lluna de mel", de forma que es potenciï la recuperació de la massa beta i es neutralitzi l'espiral autoagressiva. De cara a aplicacions més llunyanes de l'esmentada teràpia cel·lular, hom pot plantejar-se la teràpia preventiva aplicada als parents de primer grau amb alt risc de desenvolupar la DM1 (alta diversitat d'autoanticossos).

Per tot l'anteriorment esmentat, els investigadors i terapeutes de laDM1 tenim davant dos grans reptes: la recuperació de la massa β cel·lular funcional perduda durant el curs de la DM1, per una banda, i el manteniment d'aquesta massa, un cop recuperada, fora de l'abast de l'atac autoimmunitari.



Imatge de microscòpia òptica (200x), d'una secció de pàncrees de ratolí NOD, on apareix l'infiltrat mononuclear dels illots pancreàtics.

REFERÈNCIES

1. Olmos P, A'Hern R, Heaton DA, Millward BA, Risley D, Pyke DA, Leslie RD. *The significance of concordance rate of type I (insulin-dependent) diabetes mellitus in identical twins. Diabetologia 31: 747-750. 1988.*
2. Lee KH, Wucherpfennig KW, Wiley DC. *Structure of a human insulin peptide-HLA-DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes. Nature Immunology 2: 501-507. 2001.*
3. Dotta F, Censini S, van Alteren AG, Marselli L, Masini M, Dionisi S, Mosca F, Boggi U, Muda AO, Prato SD, Elliott JF, Covacci A, Rapuoli R, Roep BO, Marchetti P. *Cocksakie B4 virus infection of β cells and natural killer cell insulinitis in recent type 1 diabetic patients. Proc. Natl.Acad. Sci. USA 104: 5115-5120. 2007.*
4. O'Brien BA, Geng X, Orteu CH, Huang Y, Ghoreishi M, Zhang Y, Bush JA, Li G, Finegood DT, Dutz JP: *A deficiency in the in vivo clearance of apoptotic cells is a feature of the NOD mouse. J. Autoimmun. 26: 104-115, 2006.*
5. Suarez-Pinzón W, Sorensen O, Bleackley RC, Elliot JF, Rajotte RV, Rabinovitch A: *Beta.cell destruction in NOD mice correlates with Fas (CD95) expression on beta cells and pro-inflammatory cytokine expression in islets. Diabetes 48: 21-28, 1999.*

6. Kurrer MO, Pakala SV, Hanson HL, Katz JD: □ *Cell Apoptosis in T-cell-mediated Autoimmune Diabetes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94:213-218, 1997.*
7. Itoh N, Imagawa A, Hanafusa T, Waguri M, Yamamoto K, Iwasahi H, Moriwaki M, Nakajima H, Miyagawa J, Namba M, Makino S, Nagata S, Kono N, Matsuzawa Y: *Requirement of Fas for the Development of Autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. J. Exp. Med. 186: 613-618, 1997.*
8. Kagi D, Odermatt B, Seiler P, Zinkernagel RM, Mak TW, Hengartner H: *Reduced incidence and delayed onset of diabetes in perforin-deficient nonobese diabetic mice. J. Exp. Med. 186: 989-997, 1997.*
9. Heitmeier MR, Scarin AL, Corbett JA: *Interferon-g increases the sensitivity of islets of Langerhans for inducible nitric-oxide synthase expression induced by interleukin 1. J. Biol. Chem. 272: 13697-13704, 1997.*
10. Yamada K, Takane-Gyotoku X, Yuan X, Ichikawa F, Inada C, Nonaka K: *Mouse islet cell lysis mediated by interleukin-1-induced Fas. Diabetologia 39: 1306-1312, 1996.*
11. Augstein P, Bahr J, Wachlin G, Heinke P, Berg S, Salzsieder E, Harrison LC: *Cytokines activate caspase-3 in insulinoma cells of diabetes-prone NOD mice directly and via upregulation of Fas. J. Autoimm. 23: 301-309, 2004.*
12. Amrani A, Verdaguer J, Thiessen S, Bou S, Santamaria P: *IL-1 alpha, IL-1 beta, and IFN-gamma mark beta cells for Fas-dependent destruction by diabetogenic CD4(+) T lymphocytes. J. Clin. Invest. 105: 459-468, 2000.*
13. Darville MI, Eizirik DL: *Cytokine induction of Fas gene expression in insulin-producing cells requires the transcription factors NF-kappaB and C/EBP. Diabetes 50:1741-1748, 2001.*
14. Zumsteg U, Frigerio S, Hollander GA: *Nitric oxide production and Fas surface expression mediate two independent pathways of cytokine-induced murine beta-cell damage. Diabetes 49: 39-47, 2000.*

15. . Schott WH, Haskell BD, Tse HM, Milton MJ, Piganelli JD, Choisy-Rossy CM, Reifsnnyder PC, Chervonsky AV, Leiter EH: *Caspase-1 is not required for type 1 diabetes in the NOD mouse. Diabetes 53: 99-104, 2004.*

16. Signore A, Annovazzi A, Procaccini E, Beales PE, Spencer J, Testi R, Ruberti G: *CD95 and CD95-ligand expression in endocrine pancreas of NOD, NOR and Balb/c mice. Diabetologia 40: 1476-1479, 1997.*

17. von Herrath M, Sanda S, Herold K: *Type 1 diabetes as a relapsing-remitting disease? Nature Reviews. Immunol 7: 988-993, 2007.*

18. Boissonnas, A., Combadiere B. *Interplay between cell division and cell death during TCR triggering. Eur. J. Immunol. 34 : 2430-2438. 2004.*

19. Karas, M., T.Z. Zaks, J.L. Liu, and D. LeRoith. *T cell receptor-induced activation and apoptosis in cycling human T cells occur throughout the cell cycle. Mol. Biol. Cell 10: 4441-4450. 1999.*

20. Ritzel, R.A., Butler P.C. *Replication increases beta-cell vulnerability to human islet amyloid polypeptide-induced apoptosis. Diabetes 52: 1701-1708. 2003.*

21. Sherry NA, Kushner JA, Glandt M, Kitamura T, Brillantes AM, Herols KC. *Effects of autoimmunity and immune therapy on b-cell turnover in type 1 diabetes. Diabetes 55: 3238-3245, 2006.*

22. Muhammad BJ, Swift PG, Raymond NT, Botha JL. *Partial remission phase of diabetes in children younger than age 10 years. Arch.Dis.Child. 80: 367-369. 1999.*

23. Bober E, Dundar B, Buyukgebiz A. *Partial remission phase and metabolic control in type 1 diabetes mellitus in children and adoslescents. J. Pediatr. Endocrinol. Metab. 14: 435-441. 2001.*

24. Robles DT, Eisenbarth GS, Wang T, Erlich HA, Bugawan TL, Babu SR, Barriga K, Norris JM, Hoffman M, Klingensmith G, Yu L, Rewers M. *Diabetes Study in the Young. Millenium award recipient contribution. Identification of children with early onset and high incidence of anti-islet autoantibodies. Clin. Immunol. 102: 217-224. 2002.*

25. Sreenan S, Pick AJ, Levisetti M, Baldwin AC, Pugh W, Polonsky KS. Increased β cell proliferation and reduced mass before diabetes onset in the nonobese diabetic mouse. *Diabetes* 48: 989-996. 1999.
26. Casciola-Rosen L, Andrade F, Ulanet D, Wong WB, Rosen A. Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity. *J Exp Med.* 190:815-26. 1999.
27. Skyler JS, Krischer JP, Wolfsdorf J, Cowie C, Palmer JP, Greenbaum C, Cuthbertson D, Rafkin-Mervis LE, Chase HP, Leschek E. Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial--Type 1. *Diabetes Care* 28: 1068-1076. 2005.
28. Puertas MC, Carrillo J, Pastor X, Ampudia RM, Planas R, Alba A, Bruno R, Pujol-Borrell R, Estanyol JM, Vives-Pi M, Verdaguer J. Peripherin is a relevant neuroendocrine autoantigen recognized by islet-infiltrating B lymphocytes. *J. Immunol.* 178: 6533-6539. 2007.
29. Roncarolo MG, Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nature Reviews. Immunology.* 7: 585-598. 2007.