

Tratamiento actual de la artritis reumatoide. Perspectivas para el desarrollo de las terapias antígeno-específicas

✉ Ariana Barberá, Noraylis Lorenzo, María del Carmen Domínguez

División de Química Física, Dirección de Investigaciones Biomédicas
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, Habana 16, CP 11600, La Habana, Cuba
E-mail: ariana.barbera@cigb.edu.cu

REVISIÓN

RESUMEN

La artritis reumatoide es una enfermedad degenerativa caracterizada por la inflamación crónica de las articulaciones periféricas. La primera línea de tratamiento de esta enfermedad implica el uso de potentes antiinflamatorios y drogas que provocan una supresión global del sistema inmune. Sin embargo, estos fármacos no inducen una remisión sostenida, y su uso puede causar una inmunosupresión importante que puede conducir a complicaciones. Por ello es necesario el desarrollo de nuevas modalidades terapéuticas para esta enfermedad. Las terapias antígeno-específicas suprimen las células patogénicas, sin afectar la propiedad del sistema inmune de responder ante las infecciones. Las proteínas de estrés térmico son candidatas promisorias en esta modalidad de tratamiento. Aunque se ha avanzado en el desarrollo de terapias antígeno-específicas eficientes en modelos animales con excelentes resultados, ha sido difícil trasladarlas a los seres humanos. El uso combinado de las terapias antígeno-específicas con los fármacos actuales puede ser una estrategia muy atractiva en el futuro cercano para lograr la remisión completa de la enfermedad. Algunas de estas combinaciones de tratamiento ya han comenzado a evaluarse en modelos animales y en pacientes con artritis reumatoide.

Palabras clave: artritis reumatoide, células T reguladoras, terapia biológica, citocina proinflamatoria, terapia combinada

Biotecnología Aplicada 2012;29:137-145

ABSTRACT

Current treatment of Rheumatoid Arthritis. Perspectives for the development of antigen-specific therapies. Rheumatoid arthritis is a degenerative disease characterized by chronic inflammation of peripheral joints. The first line of treatment involves the use of potent anti-inflammatory and immunosuppressive drugs, leading to an overall suppression of the immune system. However, these drugs do not induce sustained remission and their use can cause immunosuppression that leads to severe complications. Thus, there is a need for developing new therapeutic alternatives for the treatment of this disease. Antigen-specific therapies allow the elimination of pathogenic cells without affecting the immune system's ability to respond to infections. Within this approach heat stress proteins are promising candidates. Although progress has been made in the development of efficient antigen-specific therapies, the excellent results obtained in animal models have been difficult to translate to humans. The combined use of antigen-specific therapy with current drugs can be an attractive strategy in the near future to achieve the complete remission of the disease. Some of these combinations have already begun to be evaluated in animal models and in rheumatoid arthritis patients.

Keywords: rheumatoid arthritis, regulatory T cells, biological therapy, pro-inflammatory cytokine, combination therapy

Introducción

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune sistémica que afecta al 1% de la población mundial con un pico de incidencia entre la cuarta y quinta décadas de la vida. Su manifestación clínica primaria es la inflamación de las articulaciones periféricas, daño que suele ocurrir de forma simétrica, con una evolución crónica y progresiva, y se caracteriza por periodos de actividad y remisiones [1]. Por su carácter crónico y su propensión a causar daños irreversibles en las estructuras cartilaginosa y ósea de las articulaciones, esta enfermedad tiene un gran impacto en la calidad de vida del paciente.

En la actualidad, la mayoría de las terapias para la AR aprobadas por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) se focalizan en la inhibición global de la actividad inflamatoria. Para un mejor pronóstico de la enfermedad, ha sido muy importante el reconocimiento de la necesidad de iniciar tempranamente el tratamiento con los fármacos antirreumáticos modifi-

cadore de la enfermedad (FARME) [2, 3]. Estos no calman el dolor ni moderan la inflamación; pero, a largo plazo, disminuyen la actividad y severidad de la enfermedad. Entre estos medicamentos están el metotrexato (MTX), la leflunomida, los antimaláricos como la cloroquina y la hidroxicloroquina, las sales de oro, la D-penicilamina, la sulfasalazina y la ciclosporina A.

Durante la década de los noventa, el MTX se convirtió en el fármaco de primera línea para el tratamiento de la enfermedad, pues su combinación con otros medicamentos es generalmente exitosa y su toxicidad es adecuada [4, 5]. Sin embargo, la eficacia de este FARME es parcial: solo se logra la remisión en una minoría de pacientes con AR [6].

Al propio tiempo, la supresión generalizada del sistema inmune incrementa el riesgo de infecciones y cáncer.

Recientemente, la terapia biológica ha sido incorporada en el tratamiento de los pacientes que no

1. Pratt AG, Isaacs JD, Mathey DL. Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2009;23(1):37-48.

2. Anderson JJ, Wells G, Verhoeven AC, Felson DT. Factors predicting response to treatment in rheumatoid arthritis: the importance of disease duration. *Arthritis Rheum.* 2000;43(1):22-9.

3. Nell VP, Machold KP, Eberl G, Stamm TA, Uffmann M, Smolen JS. Benefit of very early referral and very early therapy with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2004; 43(7):906-14.

4. Kinder AJ, Hassell AB, Brand J, Brownfield A, Grove M, Shadforth MF. The treatment of inflammatory arthritis with methotrexate in clinical practice: treatment duration and incidence of adverse drug reactions. *Rheumatology (Oxford).* 2005;44(1):61-6.

responden al MTX o a otros FARME, con el propósito de bloquear más específicamente aquellos componentes que tienen un papel importante en la patogénesis de la enfermedad [7, 8].

Modulación de la respuesta inmune mediante el bloqueo de moléculas implicadas en la patogénesis de la AR

La inflamación crónica de las articulaciones es inducida por células T activadas que infiltran la membrana sinovial. En los últimos años se ha intensificado el estudio de los mecanismos implicados en la patogénesis de la enfermedad. Hasta el momento, la hipótesis más aceptada propone que el daño se origina mediante el reconocimiento de un antígeno proveniente de virus, bacterias o presente en el propio organismo humano (autoantígeno). El reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos T CD4⁺, de conjunto con la estimulación de diferentes citocinas [9], induce la diferenciación de estas células en los fenotipos Th1 y Th17, respectivamente [10, 11]. Estas células producen citocinas proinflamatorias que ejercen efectos positivos sobre la activación de linfocitos T y B, macrófagos y células sinoviales, que a su vez generan una mayor producción de citocinas, la expresión de moléculas de adhesión y la migración hacia la articulación de otras células inflamatorias. Al activarse las células sinoviales y los macrófagos, como respuesta a este ambiente inflamatorio, aumenta considerablemente la secreción de la interleucina 1 (IL-1) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que son los principales promotores de los efectos nocivos para la articulación. Estas citocinas pueden inhibir la regeneración ósea por los osteoblastos e inducir mayor reabsorción por los osteoclastos, lo que contribuye a la destrucción del hueso [9]. Los fibroblastos presentes en la membrana sinovial como respuesta al TNF- α y a la IL-1, secretan moléculas como las metaloproteasas, las prostaglandinas, la IL-6 y la IL-8, que potencian la afectación de la articulación. Las metaloproteasas median la erosión de la matriz ósea, las prostaglandinas promueven los procesos inflamatorios, mientras que la IL-8 facilita la quimiotaxis de los neutrófilos y la angiogénesis. Este último proceso es de gran relevancia por el estado de hipoxia y el aumento de las células en el espacio articular. Los fibroblastos sinoviales activados producen además, las quimiocinas proinflamatorias CCL5 y el CXCL1, que reclutan activamente linfocitos T, B y neutrófilos al tejido sinovial. De igual forma, mediante la síntesis de la IL-6 estimulan la producción de reactantes de la fase aguda, los cuales potencian esta respuesta inflamatoria. Como resultado del proceso inflamatorio crónico, ocurre la proliferación del tejido sinovial, y se forma un tejido granular denominado *pannus*, que presenta las características de un tumor multicéntrico local, que provoca la erosión del cartílago y el hueso [12].

El término agentes biológicos o terapia biológica se refiere a complejas moléculas proteicas que eliminan componentes claves de la patogénesis de la AR. Estas pueden ser moléculas de la superficie celular, citocinas o sus receptores, así como moléculas de adhesión y coestimuladoras, implicadas en las vías de activación o efectoras del sistema inmune.

La figura representa la patogénesis de la AR y los blancos principales de la terapia biológica.

La FDA ha aprobado numerosos agentes biológicos que bloquean las citocinas proinflamatorias más importantes en la patogénesis de la AR.

Inhibidores del TNF- α

El TNF- α es una citocina crucial en la patogénesis de la AR: se ha encontrado en altas concentraciones en la membrana sinovial de los pacientes. Una vez liberado, se une a receptores específicos situados en la superficie de la mayoría de las células del organismo humano. Inicialmente se describió que el bloqueo del TNF- α en cultivos de tejido sinovial de articulaciones inflamadas, reduce la producción de muchos mediadores proinflamatorios como la IL-1, la IL-6, la IL-8 y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos [13]. Esa reducción de mediadores inflamatorios es esencial para la eficacia de los fármacos anti-TNF- α ; pero incrementa los efectos adversos severos asociados con su uso, puesto que estas citocinas proinflamatorias son esenciales para una respuesta inmune efectiva frente a los microorganismos.

En la actualidad, se dispone de cinco medicamentos bloqueadores de la actividad del TNF- α para el tratamiento de la AR: el Etanercept® (proteína de fusión del receptor soluble del TNF- α), el Infliximab® (anticuerpo quimérico anti-TNF- α), el Adalimumab® (anticuerpo recombinante humano anti-TNF- α), el Golimumab (anticuerpo monoclonal anti-TNF- α humanizado) y el Certolizumab (fragmento Fab pegilado derivado de un anticuerpo monoclonal humanizado).

La terapia anti-TNF- α constituye la alternativa de mayor éxito para el tratamiento de la AR en estos momentos. Sin embargo, la supresión sistémica del TNF- α en los pacientes, se ha asociado con un aumento de su susceptibilidad a contraer infecciones, en

5. Klareskog L, van der Heijde D, de Jager JP, Gough A, Kalden J, Malaise M, et al. Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet*. 2004;363(9410):675-81.

6. van Vollenhoven RF. Treatment of rheumatoid arthritis: state of the art 2009. *Nat Rev Rheumatol*. 2009;5(10):531-41.

7. Goldblatt F, Isenberg DA. New therapies for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2005;140(2):195-204.

8. Castro-Rueda H, Kavanaugh A. Biologic therapy for early rheumatoid arthritis: the latest evidence. *Curr Opin Rheumatol*. 2008;20(3):314-9.

9. Hoffmann M, Hayer S, Steiner G. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis; induction of arthritogenic autoimmune responses by proinflammatory stimuli. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1173:391-400.

10. Boissier MC, Assier E, Falgarone G, Bessis N. Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/Treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm. *Joint Bone Spine*. 2008;75(4):373-5.

11. Gaffen SL. The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2009;11(5):365-70.

12. Juarez M, Filer A, Buckley C. Fibroblasts as therapeutic targets in rheumatoid arthritis and cancer. *Swiss Med Wkly*. 2012;142:50.

13. Feldmann M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(5):364-71.

14. Caspi RR. Immunotherapy of autoimmunity and cancer: the penalty for success. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):970-6.

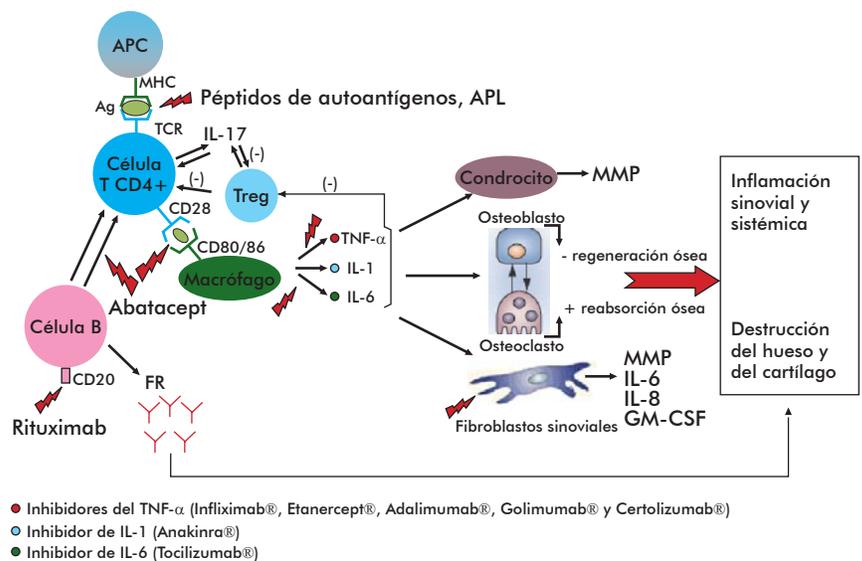


Figura. Patogénesis de la AR y principales blancos de la terapia biológica. Ag: antígenos; APC: célula presentadora de antígeno; APL: ligandos peptídicos modificados; FR: factor reumatoide; GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos; MHC: complejo principal de histocompatibilidad; MMP: metaloproteasas; TCR: receptor de células T; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa; Treg: células T reguladoras. El signo (-) indica los efectos negativos o supresores de citocinas proinflamatorias o de ciertos grupos celulares sobre otros grupos de células. : blanco terapéutico.

particular, la reactivación de infecciones latentes, como la tuberculosis [14, 15] y un incremento en el desarrollo de linfomas, sobre todo cuando se administra en combinación con el MTX o con corticosteroides [15, 16]. Paradójicamente, a pesar de que disminuyen los signos y síntomas de la artritis, el bloqueo del TNF- α por periodos prolongados, puede incrementar el inicio de otros desórdenes autoinmunes como la esclerosis múltiple y el lupus eritematoso sistémico [17, 18]. Por otra parte, esta terapia es ineficaz en el 50% de los pacientes con AR [19].

Inhibidor de la IL-1

El único inhibidor de la IL-1 aprobado por la FDA para el tratamiento de la AR es el Anakinra®: un antagonista del receptor de la IL-1, que se indica en pacientes cuya administración de los agentes anti-TNF- α ha sido infructuosa.

Los resultados de los ensayos clínicos iniciales con este fármaco, no fueron tan eficaces como los obtenidos con los bloqueadores del TNF- α . Además, debe administrarse a los pacientes diariamente. Por estas dos razones, el medicamento es menos usado que los inhibidores del TNF- α para tratar la AR [20].

Inhibidor de la IL-6

El Tocilizumab® es un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor de la IL-6, que reduce los niveles séricos del factor de crecimiento del endotelio vascular y de la proteína C en pacientes con AR, lo cual favorece la disminución de los signos y síntomas de la enfermedad [21, 22]. La eficacia clínica y los eventos adversos asociados con el uso de este inhibidor, son comparables con los de los fármacos anti-TNF- α .

Numerosos ensayos clínicos en pacientes con AR y otras enfermedades autoinmunes han evidenciado la eficacia de los agentes biológicos que bloquean las citocinas proinflamatorias en la práctica médica [7, 8]. Desafortunadamente, ninguno de estos tratamientos lleva a una remisión completa o cura de la enfermedad. Esta solo se lograría con tratamientos durante periodos prolongados, insostenibles por la gravedad de los efectos adversos.

Otras estrategias terapéuticas se han focalizado en modular diferentes elementos de la respuesta inmune adaptativa, desde anticuerpos que bloquean moléculas de adhesión para inhibir el tráfico de los leucocitos hacia las articulaciones, hasta la depleción de las células T o B. Específicamente, se ha tratado de eliminar solo las células T patogénicas (células que expresan OX-40) [23], o los antígenos implicados en la señalización de las células T, como las moléculas coestimuladoras CD28, CD80 y CTLA-4 [24]. Algunas de estas estrategias han tenido resultados efectivos en ensayos clínicos, y como consecuencia, han sido aprobados por la FDA para su uso en el tratamiento de la AR.

Inhibición de la coestimulación

El Abatacept® es una proteína de fusión, formada por la molécula CTLA-4 unida a la cadena pesada de la región constante de la IgG1 humana. Es la primera de una clase de agentes terapéuticos conocidos como moduladores selectivos de la coestimulación. Interactúa con las moléculas CD80 y CD86 de las células

presentadoras de antígenos (APC), y bloquea sus señales coestimuladoras a través del CD28, lo que impide la activación de los linfocitos T. En varios ensayos clínicos se demostró la efectividad del tratamiento de la AR en pacientes que recibieron tratamiento con MTX y fue inefectivo [25, 26].

Disminución de los linfocitos B

Esta terapia se ha utilizado en un amplio número de desórdenes autoinmunes, con el objetivo de reducir la fuente celular de autoanticuerpos patogénicos. En la AR se usa el Rituximab®, que es un anticuerpo monoclonal quimérico anti-CD20. El CD20 es un antígeno pan-B, por lo que su expresión está restringida a células pre-B y B maduras. No se encuentra en células madre pluripotenciales, y su expresión se pierde una vez diferenciados los linfocitos B en células plasmáticas [27]. Varios ensayos clínicos han mostrado la eficacia del Rituximab® en el tratamiento de la AR [28-30].

En general, la inmunoterapia contra este grupo de moléculas es un paso conceptual superior, debido a que su propósito es modular los elementos de la inmunidad adaptativa más que suprimir una vía individual (por ejemplo, una citocina). Sin embargo, esta terapia tampoco logra la remisión completa de la enfermedad.

Modulación de la actividad de los fibroblastos sinoviales

Numerosos estudios han evidenciado la importante función de los fibroblastos sinoviales en el mantenimiento y persistencia de la inflamación en el microambiente articular [12]. En los últimos años se han desarrollado estrategias, cuyo blanco terapéutico son estas células. También hay terapias que tienen un impacto sobre la activación de los fibroblastos, como la terapia anti-TNF- α ; y otras que bloquean sus principales productos, como la terapia contra el receptor de la IL-6. Otras se han dirigido contra las vías de señalización celular, que llevan a la activación de estas células. El Imatinib es un inhibidor de una pequeña familia de tirosinas quinasas, capaz de modular la proliferación de los fibroblastos sinoviales en modelos animales de AR [12]. Esta droga, aprobada por la FDA para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica y de tumores gastrointestinales, inhibe varias de las quinasas implicadas en la patogénesis de la AR. Por ejemplo, inhibe el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, que media la proliferación de los fibroblastos. Además inhibe al protooncogén *c-fms* que provoca la activación y producción por los macrófagos del TNF- α y de *c-kit* que media la secreción del TNF- α y de la IL-6. Este fármaco tuvo efectividad en un estudio abierto en tres pacientes con AR severa, cuyos tratamientos anteriores fueron infructuosos [31]. El Imatinib se está evaluando para tratar otras enfermedades autoinmunes e inflamatorias crónicas [32]. A su vez, se trabaja intensamente en el desarrollo de terapias específicamente contra marcadores fenotípicos de esta población o para modular los cambios epigenéticos que sufren estas células en el sinovio reumatoide [12].

La combinación de FARME y drogas biológicas ha sido muy explorada, pues generalmente rebasa la eficacia clínica de la monoterapia. La combinación más

15. Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA*. 2006; 295(19):2275-85.

16. Feldmann M, Steinman L. Design of effective immunotherapy for human autoimmunity. *Nature*. 2005;435(7042):612-9.

17. De Bandt M. Lessons for lupus from tumour necrosis factor blockade. *Lupus*. 2006;15(11):762-7.

18. Lin J, Ziring D, Desai S, Kim S, Wong M, Korin Y, et al. TNFalpha blockade in human diseases: an overview of efficacy and safety. *Clin Immunol*. 2008;126(1):13-30.

19. Welsing PM, Severens JL, Hartman M, van Riel PL, Laan RF. Modeling the 5-year cost effectiveness of treatment strategies including tumor necrosis factor-blocking agents and leflunomide for treating rheumatoid arthritis in the Netherlands. *Arthritis Rheum*. 2004;51(6):964-73.

20. Jiang Y, Genant HK, Watt I, Cobby M, Bresnihan B, Aitchison R, et al. A multicenter, double-blind, dose-ranging, randomized, placebo-controlled study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis: radiologic progression and correlation of Genant and Larsen scores. *Arthritis Rheum*. 2000;43(5):1001-9.

21. Emery P, Keystone E, Tony HP, Cantagrel A, van Vollenhoven R, Sanchez A, et al. IL-6 receptor inhibition with tocilizumab improves treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis refractory to antitumor necrosis factor biologicals: results from a 24-week multicentre randomised placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(11):1516-23.

22. Maini RN, Taylor PC, Szechinski J, Pavelka K, Broll J, Balint G, et al. Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, tocilizumab, in European patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate. *Arthritis Rheum*. 2006;54(9):2817-29.

23. Sugamura K, Ishii N, Weinberg AD. Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(6):420-31.

24. Buch MH, Vital EM, Emery P. Abatacept in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2008;10 Suppl 1:S5.

25. Genovese MC, Becker JC, Schiff M, Luggen M, Sherrer Y, Kremer J, et al. Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition. *N Engl J Med*. 2005;353(11):1114-23.

26. Schiff M, Keiserman M, Coddling C, Songcharoen S, Berman A, Nayiager S, et al. Efficacy and safety of abatacept or infliximab vs placebo in ATTEST: a phase III, multi-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled study in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(8):1096-103.

27. Edwards JC, Leandro MJ, Cambridge G. B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders. *Biochem Soc Trans*. 2002; 30(4):824-8.

empleada y exitosa es la del MTX y los anti-TNF- α , pues los pacientes recuperan más rápidamente su capacidad funcional y tienen una menor progresión radiológica [33-35].

Sin embargo, el desafío principal de las terapias para estas enfermedades está en lograr que el sistema inmune mantenga la homeostasis sin necesidad de tratamiento continuo. Como los FARME y las drogas biológicas permiten el control clínico inicial en la mayoría de los pacientes, en la actualidad la atención se ha desplazado más a lograr el mantenimiento de este estado de remisión. Las herramientas terapéuticas para mantener la remisión a largo plazo todavía no existen, pero se pudieran encontrar en la capacidad de establecer la tolerancia inmunológica mediante la inducción de células T reguladoras (Treg) antígeno-específicas [36].

Características fenotípicas y funcionales de las células Treg

El término reguladoras se utiliza para describir diferentes poblaciones de células T que exhiben una acción inmunosupresora, tanto *in vitro* como *in vivo*, sobre otras células del sistema inmune. Ejercen una función importante en el mantenimiento de la tolerancia periférica, en el control de las respuestas inflamatorias contra diferentes gérmenes, en el control de la homeostasis intestinal y en la supresión de la respuesta inmune antitumoral [37, 38].

Estas células se pueden clasificar en dos poblaciones, en dependencia de su origen: las Treg naturales y las Treg adaptativas [39].

Las Treg naturales se generan en el timo, como respuesta a interacciones de alta afinidad entre su receptor de células T (TCR) y el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) presentado por las células del estroma tímico. El repertorio de los TCR de las Treg es tan diverso como el de las células T convencionales [40]. Estas células salen a la periferia con un fenotipo supresor estable y completamente funcional [41], y constituyen alrededor del 5% de las células T CD4+ [39]. Ellas expresan constitutivamente la cadena α del receptor de la IL-2 (CD25), pero apenas producen esta citocina, por lo que su supervivencia es dependiente de la IL-2 exógena [42]. Otros marcadores fenotípicos expresados por estas células son el CTLA-4 y el receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoide. Sin embargo, en la actualidad su marcador distintivo es el factor de transcripción Foxp3, que ejerce una función importante en el desarrollo de este grupo celular. Actúa como el controlador maestro de la ontogenia y el mantenimiento de las células Treg. Recientemente se ha descrito que su expresión no es exclusiva de las células Treg humanas, pues además se sobreexpresa transitoriamente en las células T efectoras activadas. No obstante, todavía se considera un marcador exclusivo de las células Treg en el ratón [43].

Estas células pueden ejercer su efecto supresor mediante diversos mecanismos; algunas suelen ser dependientes del contacto celular mediado por las granzimas A y B o por la vía de las perforinas, mediante las cuales pueden inducir apoptosis de las células T efectoras y de otras como monocitos y linfocitos B [44, 45]. Las células Treg también pueden ejercer su

acción supresora mediante el contacto celular con las células dendríticas, y afectar la maduración y funciones de estas [46, 47].

Otros mecanismos inmunosupresores de las Treg se basan en la secreción de determinados factores solubles, como las citocinas TGF- β [48], la IL-10 [49] y la IL-35 [50]. Recientemente se han descrito otras moléculas de acción inmunosupresora secretadas por las Treg, como el monóxido de carbono y la galectina [51, 52].

Asociado con la dependencia del consumo de IL-2 exógena por las Treg en la periferia, se refirió un mecanismo mediante el cual pueden inducir apoptosis en los linfocitos T efectoras, al privarlos de esta citocina [53].

Las Treg adaptativas se generan en la periferia, a partir de poblaciones maduras de células T, bajo ciertas condiciones de estimulación antigénica. Al igual que las Treg naturales, las adaptativas poseen propiedades inmunosupresoras y ejercen su función mediante la secreción de citocinas y del contacto celular [54]. Entre estas se han identificado subpoblaciones diferentes según sus propiedades genotípicas y funcionales, las células Treg tipo 1, que secretan IL-10, y las Th3, que producen TGF- β . Estas células son cruciales para la homeostasis en el tracto gastrointestinal [55, 56].

Células Treg en la AR

Las células Treg realizan una función fundamental en la prevención del desarrollo de las enfermedades autoinmunes [57, 58]. En este sentido, varios estudios se han focalizado en demostrar alguna alteración en el número o la actividad de las Treg que pudieran contribuir al desarrollo de las enfermedades autoinmunes como la AR. En relación con esta enfermedad, algunos autores encontraron un incremento en la frecuencia de células T con fenotipo regulador en el fluido sinovial [59-61]. Otros estudios han demostrado que la frecuencia de Treg en el líquido sinovial de pacientes con AR es más elevada que en la periferia y, a su vez, el número de Treg CD4+CD25+ periféricas de pacientes con AR es menor que en voluntarios sanos [62]. El incremento de las células Treg en la articulación inflamada parece no estar asociado con la severidad de la enfermedad o la efectividad del tratamiento [63]. Sin embargo, la AR se desarrolla a pesar de un incremento de la frecuencia de las Treg en el sinovial [64]. En este sentido, se ha confirmado que las células Treg de pacientes con AR presentan un deterioro en sus funciones pues, a pesar de suprimir la proliferación de células T CD4+ CD25- autólogas, no inhiben la secreción de citocinas proinflamatorias, como el interferón gamma y el TNF- α [65, 66]. Esta función defectuosa de las Treg podría estar dada por el efecto inhibitorio que ejercen algunos componentes del ambiente del sinovial inflamado, como las citocinas TNF- α , IL-7, IL-15 e IL-6, aumentadas en los pacientes con AR [67, 68].

Inducción de las células Treg antígeno-específicas por tolerización mucosal con antígenos polipos

Las terapias antígeno-específicas tienen como propósito eliminar de forma puntual los clones de células T que escapan a los mecanismos de control de la

28. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Furie RA, Genovese MC, et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum.* 2006;54(9):2793-806.

29. Emery P, Fleischmann R, Filipowicz-Sosnowska A, Schechtman J, Szczepanski L, Kavanaugh A, et al. The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase IIB randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *Arthritis Rheum.* 2006; 54(5):1390-400.

30. Keystone E, Fleischmann R, Emery P, Furst DE, van Vollenhoven R, Bathon J, et al. Safety and efficacy of additional courses of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis: an open-label extension analysis. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(12):3896-908.

31. Eklund KK, Joensuu H. Treatment of rheumatoid arthritis with imatinib mesylate: clinical improvement in three refractory cases. *Ann Med.* 2003;35(5):362-7.

32. Paniagua RT, Robinson WH. Imatinib for the treatment of rheumatic diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007;3(4): 190-1.

33. Breedveld FC, Weisman MH, Kavanaugh AF, Cohen SB, Pavelka K, van Vollenhoven R, et al. The PREMIER study: A multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis Rheum.* 2006;54(1):26-37.

34. St Clair EW, van der Heijde DM, Smolen JS, Maini RN, Bathon JM, Emery P, et al. Combination of infliximab and methotrexate therapy for early rheumatoid arthritis: a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2004;50(11):3432-43.

35. van der Heijde D, Klareskog L, Rodriguez-Valverde V, Codreanu C, Bolosiu H, Melo-Gomes J, et al. Comparison of etanercept and methotrexate, alone and combined, in the treatment of rheumatoid arthritis: two-year clinical and radiographic results from the TEMPO study, a double-blind, randomized trial. *Arthritis Rheum.* 2006;54(4):1063-74.

36. van de Ven A, Prakken B, Albani S. Immunological tolerance in the therapy of rheumatoid arthritis. *Discov Med.* 2007; 7(37):46-50.

37. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008;133(5):775-87.

38. Wraith DC, Nicolson KS, Whitley NT. Regulatory CD4+ T cells and the control of autoimmune disease. *Curr Opin Immunol.* 2004;16(6):695-701.

39. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):490-500.

40. Pacholczyk R, Ignatowicz H, Kraj P, Ignatowicz L. Origin and T cell receptor diversity of Foxp3+CD4+CD25+ T cells. *Immunity.* 2006;25(2):249-59.

tolerancia periférica y que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad [69]. En teoría, este enfoque es el modo ideal para modular la respuesta inmune, puesto que no afecta el resto de las poblaciones celulares. Por ello, este tipo de tratamiento no debe tener los efectos adversos asociados a una inmunosupresión generalizada [70].

La tolerancia antígeno-específica se puede inducir mediante la administración de un antígeno relevante presente en el sitio de la inflamación, por vía mucosal [71]. En numerosos modelos autoinmunes experimentales, la administración nasal u oral de un autoantígeno patógeno lleva a la supresión considerable de la actividad de la enfermedad [72-75]. Los mecanismos que median este proceso no solo están asociados con la neutralización de las células T antígeno-específicas, sino además con la inducción de las células Treg, que suprimen las funciones efectoras de las células T autorreactivas. La activación de las células Treg por vía mucosal se relaciona con la presencia de las APC especializadas con propiedades tolerogénicas en el tracto gastrointestinal [76]. Específicamente, la presentación de antígenos en el intestino ocurre en ausencia de señales coestimuladoras o con la expresión de señales coinhibitorias en estas APC [77, 78]. Por ejemplo, en varios ensayos se ha demostrado la inducción de células Th3 secretoras de TGF- β , después de la ingestión de un antígeno. Otros autores han demostrado la inducción de tolerancia oral mediada por células Treg (CD4+ CD25+) que secretan IL-10 [79-81].

Existen evidencias que argumentan que una vez activadas las células Treg ejercen su función supresora de una forma antígeno no específica, porque suprimen no solo las células T estimuladas con el mismo antígeno, sino también las células T CD4+ y las CD8+ activadas con otros antígenos de la misma vecindad [82]. Ello se puede lograr mediante la producción de citocinas inhibitorias, como la IL-10 y el TGF- β . Por ello, la tolerización antígeno-específica mediada por las células Treg no está restringida a una sola especificidad antigénica, lo que constituye una perspectiva de que esta estrategia pueda ser clínicamente relevante [36].

Sin embargo, a pesar de los buenos resultados en los modelos animales, el uso de esta estrategia en humanos no ha sido exitosa. Los ensayos clínicos han demostrado que la administración oral de antígenos es segura [83-87]; pero en muchos casos la eficacia clínica es pobre [83, 84] o solo es efectiva en un pequeño grupo de pacientes [86]. En tales resultados han influido la dosis, la frecuencia de administración y el antígeno empleado. Numerosos estudios preclínicos y clínicos han demostrado que las administraciones muy frecuentes de antígeno, así como las dosis elevadas, no consiguen una regulación óptima de la respuesta inmune [88]. No obstante, es imposible trasladar exactamente los regímenes de dosis empleados en modelos animales, a los humanos, pues no existe una fórmula completamente validada que lo permita.

Es importante considerar que los antígenos desencadenantes de la AR no están tan definidos en los seres humanos como en los modelos animales. Se han propuesto varios factores exógenos y propios desencadenantes de la enfermedad. Tampoco se conocen cuáles de estos antígenos puedan ser patógenos en

un individuo determinado. Incluso, cuando el proceso autoinmune es clínicamente evidente, la respuesta inmune se ha expandido a otros antígenos propios. Este fenómeno de amplificación de la respuesta inmune se conoce como propagación de epitopo [89]. Debido a este mecanismo, el proceso puede continuar en un ciclo que se perpetúa y los factores desencadenantes iniciales pueden ser de poca relevancia para el proceso. Por ejemplo, los resultados tras emplear el colágeno tipo II de pollo y el de bovino, así como la glicoproteína del cartilago humano de 39 kDa (HCgp39) son los constituyentes mayoritarios del cartilago articular, no han sido convincentes [90-92]. Para tener éxito en la interrupción de este ciclo, la terapia debe centrarse en los antígenos que participan en el proceso de amplificación. Este antígeno debe ser sobreexpresado en el sitio de la inflamación y ser reconocido por el sistema inmunológico. Otro aspecto significativo es que debido al fenómeno de propagación molecular mencionado, este antígeno debe activar células T que regulan la respuesta patogénica a otros antígenos relevantes en el sitio de la inflamación.

Las proteínas de estrés térmico (HSP) están entre los candidatos que realizan esta función. Filogenéticamente son muy conservadas, altamente inmunogénicas y su expresión aumenta ante determinadas condiciones de estrés celular, como por ejemplo, la inflamación [93]. Como resultado, se expresan abundantemente en el sitio de la inflamación en la AR [94, 95]. Las HSP y los péptidos derivados de ellas son reconocidos como señales de 'peligro', capaces de estimular una fuerte respuesta proinflamatoria [94, 96, 97]. Esta respuesta contribuye a eliminar al posible agente patógeno; pero debido al estrés celular, también se incrementa la presencia de péptidos derivados de las HSP endógenas. Estos péptidos constituyen un nuevo blanco para el sistema inmune e inducen un ciclo perpetuo de inflamación. De esta forma, las HSP contribuyen a la amplificación del proceso autoinmune. Sin embargo, una propiedad importante de estas proteínas es que determinados péptidos propios pueden inducir células T reguladoras [98]. La inducción de una respuesta reguladora puede estar condicionada por contactos previos con las HSP, lo cual ocurre a lo largo de la vida, durante las inmunizaciones y en la alimentación [99].

Por tanto, las HSP son candidatos para inducir tolerancia en enfermedades autoinmunes, pues estimulan una respuesta reguladora de células T y están abundantemente en el sitio de la inflamación. Además, estudios con células de pacientes con artritis idiopática juvenil, sugieren que las HSP pueden tener una función natural en el control de la inflamación, por la inducción de una respuesta reguladora [100-103].

Inmunomodulación antígeno-específica por péptidos de las HSP

Numerosos miembros de la familia de las HSP han mostrado ejercer una función protectora en la artritis experimental [74, 104]. Algunos de ellos se han evaluado en ensayos clínicos. Los estudios con OM-89, un extracto de *Escherichia coli*, brindaron las primeras evidencias de que la HSP de 60 kDa (HSP60) podía ser efectiva en el tratamiento de la artritis humana. Ensayos multicéntricos controlados con placebo emplean-

41. Picca CC, Larkin J, 3rd, Boesteanu A, Lerman MA, Rankin AL, Caton AJ. Role of TCR specificity in CD4+ CD25+ regulatory T-cell selection. *Immunol Rev*. 2006;212:74-85.

42. Malek TR, Bayer AL. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(9):665-74.

43. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol*. 2007;19(4):345-54.

44. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LJ, Piwnicka-Worms DR, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*. 2007;27(4):635-46.

45. Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+ CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol*. 2005;174(4):1783-6.

46. Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*. 2006;118(2):240-9.

47. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol*. 2005;6(4):338-44.

48. Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med*. 2005;201(7):1061-7.

49. Suri-Payer E, Cantor H. Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4(+)CD25(+) T cells. *J Autoimmun*. 2001;16(2):115-23.

50. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007;450(7169):566-9.

51. Garin MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, Lechler RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood*. 2007;109(5):2058-65.

52. Lee SS, Gao W, Mazzola S, Thomas MN, Ciszmadia E, Otterbein LE, et al. Heme oxygenase-1, carbon monoxide, and bilirubin induce tolerance in recipients toward islet allografts by modulating T regulatory cells. *FASEB J*. 2007;21(13):3450-7.

53. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*. 2007;8(12):1353-62.

54. Verbsky JW. Therapeutic use of T regulatory cells. *Curr Opin Rheumatol*. 2007;19(3):252-8.

55. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*. 2009;30(5):626-35.

do OM-89 evidenciaron que el extracto disminuye los signos de la enfermedad con pocos eventos adversos [105, 106]. Más tarde, el análisis del contenido de este extracto reveló que contenía HSP [107] y que la administración oral en modelos animales indujo una respuesta de células T específicas dirigidas contra esta molécula [108]. Por lo tanto, se considera que las HSP son responsables del efecto terapéutico de OM-89 en la artritis. El ensayo más exitoso hasta el momento es el del grupo de Prakken y cols., quienes indujeron la tolerancia en pacientes con AR, mediante la administración del péptido dnaJP1 de la HSP40 de *E. coli* por vía oral [109]. Dicho péptido posee características homólogas con su equivalente en el ser humano [94]. Además contiene cinco aminoácidos de secuencia QKRAA asociada con la AR. En un estudio piloto fase I, se trataron 15 pacientes con AR durante 6 meses. El análisis inmunológico indicó que el péptido desvió el fenotipo proinflamatorio de las células T específicas para ese péptido hacia un fenotipo con función reguladora. La producción de citocinas antiinflamatorias como la IL-4 y la IL-10 se incrementó, mientras que disminuyeron los niveles de TNF- α e interferón gamma (INF- γ). Posteriormente, se estudió la eficacia clínica de este péptido, mediante un ensayo fase II controlado con placebo en 160 pacientes con AR activa. El tratamiento fue seguro, tolerado y redujo la respuesta de TNF- α hacia el péptido dnaJP1. Además, hubo una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo que recibió tratamiento y el grupo placebo, en cuanto al por ciento de pacientes que alcanzó un criterio de mejoría clínica de 20 y 50% (ACR20 y ACR50, respectivamente, según el Colegio Americano de Reumatología), lo que sugiere la eficacia clínica [110].

En un ensayo clínico fase II en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 de comienzo reciente, se demostró la eficacia inmunológica de otro péptido, derivado de la HSP60, denominado DiaPep277TM. El tratamiento fue tolerado, logró preservar la función de las células β del páncreas y disminuyó la necesidad de insulina exógena, en comparación con el grupo que recibió placebo [111]. Posteriormente se demostró que el péptido activa células Treg CD4⁺ CD25⁺ humanas [98].

En resumen, los resultados de los estudios en pacientes con AR y con diabetes mellitus tipo 1 evidencian que los péptidos derivados de las HSP pueden desviar el fenotipo proinflamatorio de las células patógenas a uno más tolerogénico, lo que significa un beneficio para el paciente, y no provoca inmunosupresión generalizada.

Además de péptidos que contienen epitopos de antígenos propios como inductores de tolerancia periférica, este concepto terapéutico se ha considerado en modelos experimentales de numerosas enfermedades autoinmunes con ligandos peptídicos modificados (APL).

Inmunomodulación antígeno-específica por ligandos peptídicos modificados

Los APL son análogos de los péptidos inmunogénicos de los cuales se derivan. Generalmente presentan una o varias sustituciones en las posiciones esenciales de contacto con el TCR o con las moléculas MHC, que interfieren o modifican la cascada de eventos intracelulares para la activación de las células T [112].

Conceptualmente pueden diseñarse APL con propiedades similares al péptido inmunogénico (agonistas), entre cuyos efectos está incrementar la respuesta de las células T hacia antígenos específicos. Este efecto es ventajoso en condiciones patológicas como enfermedades neoplásicas e infecciosas. También se pueden diseñar péptidos con propiedades antagonistas (antagonistas o agonistas parciales) al péptido inmunogénico, lo cual podría ser beneficioso para el control de enfermedades autoinmunes. Los APL clasificados como nulos, son aquellos que pueden ser presentados por las APC, pero no causan efecto en los linfocitos T [112].

Se ha tratado de explicar el mecanismo de acción de los APL sobre la base de los componentes bioquímicos involucrados en la activación de las células T. La unión de un ligando agonista al TCR lleva al reclutamiento de las quinasas y a la fosforilación completa de los ITAM (motivos de activación de inmutoreceptores basados en tirosina) de todas las cadenas del CD3, lo que provoca la activación de las funciones efectoras de las células T. Sin embargo, la unión del complejo MHC-APL al TCR puede ocasionar alteraciones en el patrón de fosforilación, lo que resulta en una modulación de la actividad tirosina quinasa, y por tanto, generar cambios en la respuesta de estas células [113].

Se ha descrito ampliamente la modulación de la respuesta inmune mediada por APL en algunos modelos experimentales de enfermedades autoinmunes. Se ha demostrado que estos péptidos inducen la anergia o la muerte mediada por apoptosis de linfocitos T activados, debido a la expresión de FasL y TNF- α [114, 115]. A su vez, se ha propuesto que los APL pueden mediar *in vivo* una supresión activa mediante la inducción de células Treg que secretan citocinas supresoras [116, 117]. Además, algunos ejemplos evidencian que los APL pueden tener efectos beneficiosos por una combinación de mecanismos tolerogénicos [118].

Por ejemplo, desde la década pasada, para el tratamiento de la esclerosis múltiple se utiliza con éxito el Copaxone[®], clasificado como un APL por su mecanismo de acción. Es un polímero sintetizado al azar, compuesto por los aminoácidos L-Ala, L-Tyr, L-Lys y L-Glu, que puede ser presentado por numerosas moléculas del MHC clase II y actúa como un antagonista del epitopo inmunodominante de la proteína básica de la mielina. La unión de este compuesto con el TCR de las células T autorreactivas específicas para este epitopo inmunodominante, induce efectos tolerogénicos en ellas [119]. Además se ha comprobado que este fármaco induce un cambio en el perfil de las citocinas proinflamatorias a reguladoras, que median el mecanismo de supresión activa mediada por Treg, lo que explica su eficacia terapéutica [120, 121].

Como se ha señalado, las HSP son candidatas para inducir tolerancia antígeno-específica en las enfermedades autoinmunes. Algunos grupos de investigación han diseñado APL a partir de diferentes epitopos de la HSP60, con el propósito de expandir células Treg que medien el mecanismo de supresión activa. Estos APL se encuentran en una fase preclínica de investigación.

A partir de la HSP60 humana, un grupo de investigadores diseñó un APL derivado del epitopo immuno-

56. Levings MK, Roncarolo MG. Phenotypic and functional differences between human CD4⁺CD25⁺ and type 1 regulatory T cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;293:303-26.

57. Oh S, Rankin AL, Caton AJ. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in autoimmune arthritis. *Immunol Rev*. 2010; 233(1):97-111.

58. Roncarolo MG, Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(8):585-98.

59. Cao D, Borjesson O, Larsson P, Rudin A, Gunnarsson I, Klareskog L, et al. FOXP3 identifies regulatory CD25^{bright} CD4⁺ T cells in rheumatic joints. *Scand J Immunol*. 2006;63(6):444-52.

60. Mottonen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomaki P, Luukkainen R, Lassila O. CD4⁺CD25⁺ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2005;140(2):360-7.

61. Ruprecht CR, Gattorno M, Ferlito F, Gregorio A, Martini A, Lanzavecchia A, et al. Coexpression of CD25 and CD27 identifies FoxP3⁺ regulatory T cells in inflamed synovia. *J Exp Med*. 2005;201(11): 1793-803.

62. van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP, Taams LS. CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum*. 2004;50(9):2775-85.

63. Cao D, van Vollenhoven R, Klareskog L, Trollmo C, Malmstrom V. CD25^{bright} CD4⁺ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res Ther*. 2004; 6(4):R335-46.

64. Nanki T, Hayashida K, El-Gabalawy HS, Suson S, Shi K, Girschick HJ, et al. Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4⁺ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol*. 2000;165(11):6590-8.

65. Cao D, Malmstrom V, Baecher-Allan C, Hafler D, Klareskog L, Trollmo C. Isolation and functional characterization of regulatory CD25^{bright}CD4⁺ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 2003; 33(1):215-23.

66. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α therapy. *J Exp Med*. 2004; 200(3):277-85.

67. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*. 2003;299(5609):1033-6.

68. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. TNF downmodulates the function of human CD4⁺CD25^{hi} T-regulatory cells. *Blood*. 2006;108(1):253-61.

69. Chatenoud L. Immune therapies of autoimmune diseases: are we approaching a real cure? *Curr Opin Immunol*. 2006; 18(6):710-7.

dominante de este antígeno propio (180-188). Este APL administrado por vía intranasal ejerció un efecto profiláctico y terapéutico muy superior al péptido nativo en el modelo de artritis inducida por adyuvante. Se une con mayor afinidad al MHC de ratas (RT1B1) e induce células Treg secretoras de IL-10 que controlan el curso de la enfermedad [73].

Domínguez y cols. predijeron una nueva región que contiene varios epitopos de células T en la secuencia de la HSP60, mediante herramientas bioinformáticas [122]. El péptido correspondiente se modificó en uno de los probables sitios de contacto con la molécula de HLA clase II. El cambio permitió que este péptido se pudiera presentar por varias de las moléculas de HLA clase II relacionadas con la AR que se incluyeron en el estudio. A diferencia del péptido nativo, este APL expande células T CD4+ con fenotipo regulador *in vivo* en ratones Balb/C y en ensayos *ex vivo* con células mononucleares aisladas de pacientes con AR. Además se demostró que este péptido tuvo un efecto clínico e histopatológico potente en dos modelos animales de AR, asociado con una disminución de los niveles del TNF- α [123].

Este APL induce la muerte por apoptosis de linfocitos con fenotipo de memoria presentes en la sangre periférica de pacientes con AR (observaciones inéditas). Es preciso destacar que se ha publicado abundantemente que los linfocitos periféricos que presentan este fenotipo, en parte son responsables de perpetuar el proceso inflamatorio autoinmune [124]. Por tanto, el efecto biológico de este APL puede deberse a una combinación de mecanismos tolerogénicos, que pudieran ser beneficiosos en el tratamiento de la AR de comienzo reciente.

De manera general, en estudios con modelos animales se ha demostrado que los APL tienen un efecto terapéutico superior a los péptidos nativos de los que se derivan. Sin embargo, los resultados iniciales de ensayos clínicos con péptidos tipo APL no fueron satisfactorios. En el año 2000 se efectuaron dos ensayos en pacientes con esclerosis múltiple, que recibieron dos APL derivados de un epitopo de células T de la proteína básica de la mielina (epitopo 83-99). Estos APL contenían modificaciones en las posiciones esenciales de contacto con el TCR. Ambos estudios se interrumpieron por exacerbaciones de la enfermedad en tres pacientes y reacciones de hipersensibilidad sistémica [125, 126]. Tales efectos se correlacionaron con la expansión de las células Th1 antígeno-específicas durante el tratamiento. Los investigadores a cargo concluyeron que esos efectos se debieron al protocolo de inmunización empleado, en el que se administró una dosis elevada de los dos APL (50 mg) por vía subcutánea, que favoreció la expansión de clones de células T con un fenotipo Th1. Sin embargo, los individuos que recibieron la dosis más baja de APL (5 mg) toleraron mejor la terapia, en ambos estudios. De hecho se evidenció una reducción del número y volumen de las lesiones después de 4 meses de tratamiento.

Los resultados de estos dos ensayos han llevado a que los investigadores profundicen en los mecanismos moleculares mediante los cuales se puede inducir tolerancia antigénica empleando estas moléculas. En este sentido, las modificaciones en el diseño de los APL, en la dosificación y la ruta de administración deben

proporcionar protocolos de inmunización que minimicen el riesgo potencial de activar poblaciones de células T patogénicas. De esta forma, los APL se deben administrar en la menor dosis posible a la que induzcan un efecto biológico. Ello facilita la expansión de células T APL-específicas con un fenotipo regulador y minimiza la posibilidad de activar cruzadamente poblaciones de células T patogénicas [112]. Otro aspecto a considerar es que las terapias antígeno-específicas deben ser aplicadas a pacientes con enfermedades autoinmunes de reciente comienzo, debido a que el proceso inflamatorio aun no se ha perpetuado y por tanto la autorreactividad a antígenos propios es limitada.

En el año 2006 se publicaron los resultados de un ensayo clínico en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 de reciente comienzo, en el que se evaluó un APL derivado de la insulina humana. Las dosis suministradas por vía subcutánea fueron de 0.1, 1 y 5 mg. Se demostró que el tratamiento era seguro, tolerado y consiguió desviar la respuesta Th1 patogénica de la enfermedad a un fenotipo regulador [127].

Sin embargo, en la actualidad es cuestionable que un solo APL se pueda emplear en la inmunoterapia a todos los individuos. El APL debe ser capaz de unirse a alguna de las moléculas HLA que exprese el paciente; de lo contrario, el péptido no podrá ser presentado por las APC, y por tanto, no podrá modular la actividad de estas células. Algunos investigadores han diseñado APL derivados de la HCgp39 y del péptido (256-276) del colágeno tipo II, que tienen una alta afinidad por la molécula HLA-DR4 (DRB1*0401), que está relacionada con la AR [128, 129]. No obstante, un grupo de pacientes no presentará esta molécula HLA clase II, lo cual limitará el alcance de este tipo de péptido en la inmunoterapia. Otro aspecto importante es que dada la heterogeneidad en el reconocimiento TCR/MHC/péptido, no es obvio que un solo APL sea capaz de silenciar todas las células T específicas para el autoantígeno del cual se deriva el APL. Por ello es importante que los APL induzcan células Treg capaces de suprimir la respuesta al autoantígeno del cual se deriva, y a otros autoantígenos relevantes presentes en el sitio de la inflamación. En particular, en enfermedades autoinmunes como la AR, de la que se desconoce cuáles antígenos pueden ser patogénicos, es fundamental la inducción de células Treg. La selección de péptidos derivados de las HSP que participan en el proceso patogénico de la AR pero que, a diferencia del colágeno tipo II o de la HCgp39, son proteínas reguladoras naturales de la respuesta inmune, puede ser importante para inducir el mecanismo de supresión activa mediada por Treg [130].

Sin embargo, la AR es una enfermedad autoinmune de etiopatogenia compleja, y para lograr su remisión habrá que recurrir inevitablemente a la combinación de estrategias. El uso previo o concomitante de terapias antígeno-específicas con los fármacos aprobados para esta enfermedad se está explorando, con resultados muy promisorios.

Tolerización antígeno-específica como complemento para la terapia combinada

Como se ha discutido, en la AR activa predomina el ambiente proinflamatorio. En este sentido, la mayoría

70. Wehrens EJ, van Wijk F, Roord ST, Albani S, Prakken BJ. Treating arthritis by immunomodulation: is there a role for regulatory T cells? *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49(9):1632-44.

71. Wauben MH. Immunological mechanisms involved in experimental peptide immunotherapy of T-cell-mediated diseases. *Crit Rev Immunol*. 2000;20(6):451-69.

72. García G, Komagata Y, Slavín AJ, Maron R, Weiner HL. Suppression of collagen-induced arthritis by oral or nasal administration of type II collagen. *J Autoimmun*. 1999;13(3):315-24.

73. Prakken BJ, Roord S, van Kooten PJ, Wagenaar JP, van Eden W, Albani S, et al. Inhibition of adjuvant-induced arthritis by interleukin-10-driven regulatory cells induced via nasal administration of a peptide analog of an arthritis-related heat-shock protein 60 T cell epitope. *Arthritis Rheum*. 2002;46(7):1937-46.

74. Zonneveld-Huijssoon E, Roord ST, de Jager W, Klein M, Albani S, Anderton SM, et al. Bystander suppression of experimental arthritis by nasal administration of a heat shock protein peptide. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(12):2199-206.

75. Pop SM, Wang CP, He Q, Wang Y, Wallet MA, Goudy KS, et al. The type and frequency of immunoregulatory CD4+ T-cells govern the efficacy of antigen-specific immunotherapy in nonobese diabetic mice. *Diabetes*. 2007;56(5):1395-402.

76. Min SY, Park KS, Cho ML, Kang JW, Cho YG, Hwang SY, et al. Antigen-induced, tolerogenic CD11c+, CD11b+ dendritic cells are abundant in Peyer's patches during the induction of oral tolerance to type II collagen and suppress experimental collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(3):887-98.

77. Mason KL, Huffnagle GB, Noverr MC, Kao JY. Overview of gut immunology. *Adv Exp Med Biol*. 2008;635:1-14.

78. Zhang Y, Chung Y, Bishop C, Daugherty B, Chute H, Holst P, et al. Regulation of T cell activation and tolerance by PDL2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(31):11695-700.

79. Hultkrantz S, Ostman S, Telemo E. Induction of antigen-specific regulatory T cells in the liver-draining celiac lymph node following oral antigen administration. *Immunology*. 2005;116(3):362-72.

80. Mizrahi M, Ilan Y. The gut mucosa as a site for induction of regulatory T-cells. *Curr Pharm Des*. 2009;15(11):1191-202.

81. Battaglia M, Gianfrani C, Gregori S, Roncarolo MG. IL-10-producing T regulatory type 1 cells and oral tolerance. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1029:142-53.

82. Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect*. 2001;3(11):947-54.

83. Barnett ML, Kremer JM, St Clair EW, Clegg DO, Furst D, Weisman M, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with oral type II collagen. Results of a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*. 1998;41(2):290-7.

84. Choy EH, Scott DL, Kingsley GH, Thomas S, Murphy AG, Staines N, et al. Control of rheumatoid arthritis by oral tolerance. *Arthritis Rheum*. 2001;44(9):1993-7.

de los estudios indican que las células Treg no son deficientes en los pacientes con AR, sino que su funcionalidad está comprometida por ese ambiente [131]. Por ello, la eficacia de la tolerización antígeno-específica se puede incrementar al inhibir la inflamación en estos pacientes. Esta terapia inicial ayuda a neutralizar las citocinas y/o las células T proinflamatorias presentes en el sitio de la inflamación, antes de inducir la tolerización antigénica. Trabajos previos han evidenciado que la inhibición del TNF- α puede ser particularmente interesante para tal propósito: puede restaurar el número y la función de las Treg en pacientes con AR [132]. Además, puede inducir un cambio a un perfil de citocinas regulador en monocitos y en células T de pacientes con AR [133].

Ello se demostró en un estudio que combinó la inducción de Treg antígeno-específica con la terapia anti-TNF- α en la artritis inducida por adyuvante en ratas. La administración en grupos separados de un péptido artritogénico (p180-188) de la HSP60 por vía nasal, y el tratamiento con una dosis única de Etanercept® no llevaron a una reducción significativa de los signos clínicos de la artritis. Sin embargo, la administración combinada de una sola dosis del Etanercept® antes de la inducción de la tolerancia mucosal con el péptido de la HSP60 (p180-188), proporcionó una mejoría clínica e histopatológica significativas y condujo a la desviación del patrón de citocinas hacia un fenotipo regulador [134]. Es preciso destacar que con la combinación terapéutica se lograron resultados similares al tratamiento completo con las tres dosis del Etanercept®.

Ello es muy importante, pues permitió reducir el número de dosis en la terapia anticitocinas, y también los efectos adversos asociados con la terapia.

Existe evidencia de una mayor efectividad clínica en humanos cuando se combina la inducción de Treg con un tratamiento antiinflamatorio. En el ensayo antes descrito, en el que se empleó el péptido dnaJP1 en pacientes con AR, el efecto clínico fue superior en el grupo de pacientes que recibió la hidroxiclороquina [110]. Ello puede deberse, en parte, a que esta droga disminuye los niveles del TNF- α y de la IL-6. A su vez, se conoce que el efecto principal de la hidroxiclороquina es el bloqueo del procesamiento de las proteínas por las APC [135, 136]. Esta droga crea un ambiente de baja presentación de proteínas, que favorece el impacto que puede tener el péptido dnaJP1, que no necesita ser procesado por estas células en la regulación

del sistema inmune. Estos datos en conjunto evidencian que la combinación de la inducción de Treg con un tratamiento antiinflamatorio puede incrementar el beneficio clínico de la terapia para pacientes con AR.

Conclusiones

La AR es una enfermedad severa que afecta considerablemente la calidad de vida de los pacientes y acelera su muerte. La terapia actual es insatisfactoria, pues se centra en aliviar el dolor, reducir la inflamación y retrasar los daños en las articulaciones de los pacientes. El reconocimiento de la AR de reciente comienzo como una urgencia médica, ha permitido comenzar a tratarla, en estadios tempranos, más agresivamente con los fármacos modificadores de la enfermedad y con la terapia biológica. A pesar de los excelentes resultados con el grupo de pacientes que se favorecen con el tratamiento, estos fármacos causan una inmunosupresión generalizada que provocan efectos adversos severos y no inducen una remisión sostenida, por lo que el tratamiento debe ser continuo. Una modulación más específica de la respuesta inmune puede teóricamente revertir estos inconvenientes. Las HSP son candidatos promisorios en esta modalidad de tratamiento. Estas proteínas inducen células Treg que reconocen específicamente antígenos en el sitio de la inflamación, lo cual evita las reacciones adversas asociadas con una inmunosupresión generalizada. Los ensayos clínicos han evidenciado que el tratamiento con las HSP es seguro y consigue la mejoría clínica en los pacientes. Como la mayoría de los estudios indican que las células Treg no son deficientes en los pacientes con artritis, sino que están funcionalmente comprometidas por el ambiente proinflamatorio, la eficacia de esta estrategia se puede optimizar inhibiendo la inflamación con el uso de las terapias actuales. Es importante señalar la posibilidad de reducir la dosis de los fármacos antiinflamatorios. Todo ello puede tener un gran impacto en la calidad de vida del paciente, puesto que permitiría aminorar los efectos adversos asociados con la administración de estos fármacos y reducir el costo de la terapia. En el mejor escenario, la terapia antígeno-específica pudiera ser el único tratamiento que requiera el paciente a largo plazo para mantener el control de la enfermedad. La inducción de células Treg antígeno-específicas pudiera ayudar significativamente a incrementar la seguridad y eficacia de las terapias actuales a pacientes con AR.

85. Myers LK, Higgins GC, Finkel TH, Reed AM, Thompson JW, Walton RC, et al. Juvenile arthritis and autoimmunity to type II collagen. *Arthritis Rheum.* 2001;44(8):1775-81.

86. Sieper J, Kary S, Sorensen H, Alten R, Eggens U, Hüge W, et al. Oral type II collagen treatment in early rheumatoid arthritis. A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Arthritis Rheum.* 1996;39(1):41-51.

87. Trentham DE, Dynesius-Trentham RA, Orav EJ, Combitchi D, Lorenzo C, Sewell KL, et al. Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis. *Science.* 1993;261(5129):1727-30.

88. Peakman M, von Herrath M. Antigen-specific immunotherapy for type 1 diabetes: maximizing the potential. *Diabetes.* 2010; 59(9):2087-93.

89. Vanderlugt CL, Miller SD. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(2):85-95.

90. Keystone EC. Abandoned therapies and unpublished trials in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2003;15(3):253-8.

91. Landewe RB, Houbiers JG, Van den Bosch F, in't Hout J, Verschueren PC, Meijerink JH, et al. Intranasal administration of recombinant human cartilage glycoprotein-39 as a treatment for rheumatoid arthritis: a phase II, multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled, parallel-group, dose-finding trial. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(9):1655-9.

92. McKown KM, Carbone LD, Kaplan SB, Aelion JA, Lohr KM, Cremer MA, et al. Lack of efficacy of oral bovine type II collagen added

to existing therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999;42(6):1204-8.

93. van Eden W, van der Zee R, Prakken B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(4):318-30.

94. Albani S, Keystone EC, Nelson JL, Ollier WE, La Cava A, Montemayor AC, et al. Positive selection in autoimmunity: abnormal immune responses to a bacterial dnaI antigenic determinant in patients with early rheumatoid arthritis. *Nat Med.* 1995;1(5):448-52.

95. Boog CJ, de Graeff-Meeder ER, Lucassen MA, van der Zee R, Voorhorst-Ogink MM, van Kooten PJ, et al. Two monoclonal antibodies generated against human hsp60 show reactivity with synovial membranes of patients with juvenile chronic arthritis. *J Exp Med.* 1992;175(6):1805-10.

96. Albani S. Infection and molecular mimicry in autoimmune diseases of childhood. *Clin Exp Rheumatol*. 1994;12 Suppl 10:335-41.
97. Albani S, Ravelli A, Massa M, De Benedetti F, Andree G, Roudier J, et al. Immune responses to the Escherichia coli dnaJ heat shock protein in juvenile rheumatoid arthritis and their correlation with disease activity. *J Pediatr*. 1994;124(4):561-5.
98. Zanin-Zhorov A, Cahalon L, Tal G, Margalit R, Lider O, Cohen IR. Heat shock protein 60 enhances CD4+ CD25+ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J Clin Invest*. 2006;116(7):2022-32.
99. van Eden W, van der Zee R, Paul AG, Prakken BJ, Wendling U, Anderton SM, et al. Do heat shock proteins control the balance of T-cell regulation in inflammatory diseases? *Immunol Today*. 1998;19:303-7.
100. de Kleer IM, Kamphuis SM, Rijkers GT, Scholtens L, Gordon G, De Jager W, et al. The spontaneous remission of juvenile idiopathic arthritis is characterized by CD30+ T cells directed to human heat-shock protein 60 capable of producing the regulatory cytokine interleukin-10. *Arthritis Rheum*. 2003;48(7):2001-10.
101. Kamphuis S, Kuis W, de Jager W, Teklenburg G, Massa M, Gordon G, et al. Tolerogenic immune responses to novel T-cell epitopes from heat-shock protein 60 in juvenile idiopathic arthritis. *Lancet*. 2005;366(9479):50-6.
102. Massa M, Passalia M, Manzoni SM, Campanelli R, Ciardelli L, Yung GP, et al. Differential recognition of heat-shock protein dnaJ-derived epitopes by effector and Treg cells leads to modulation of inflammation in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56(5):1648-57.
103. de Graeff-Meeder ER, van Eden W, Rijkers GT, Prakken BJ, Kuis W, Voorhorst-Ogink MM, et al. Juvenile chronic arthritis: T cell reactivity to human HSP60 in patients with a favorable course of arthritis. *J Clin Invest*. 1995;95(3):934-40.
104. Cobelens PM, Heijnen CJ, Nieuwenhuis EE, Kramer PP, van der Zee R, van Eden W, et al. Treatment of adjuvant-induced arthritis by oral administration of mycobacterial Hsp65 during disease. *Arthritis Rheum*. 2000;43(12):2694-702.
105. Rosenthal M, Bahous I, Ambrosini G. Longterm treatment of rheumatoid arthritis with OM-8980. A retrospective study. *J Rheumatol*. 1991;18(12):1790-3.
106. Vischer TL. Follow-up with OM-8980 after a double-blind study of OM-8980 and auranoftin in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 1990;9(3):356-61.
107. Polla BS, Baladi S, Fuller K, Rook G. Presence of hsp65 in bacterial extracts (OM-89): a possible mediator of orally-induced tolerance? *Experientia*. 1995;51(8):775-9.
108. Bloemendal A, Van der Zee R, Rutten VP, van Kooten PJ, Farine JC, van Eden W. Experimental immunization with anti-rheumatic bacterial extract OM-89 induces T cell responses to heat shock protein (hsp)60 and hsp70; modulation of peripheral immunological tolerance as its possible mode of action in the treatment of rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol*. 1997;110(1):72-8.
109. Prakken BJ, Samodal R, Le TD, Giannoni F, Yung GP, Scavulli J, et al. Epitope-specific immunotherapy induces immune deviation of proinflammatory T cells in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(12):4228-33.
110. Koffeman EC, Genovese M, Amox D, Keogh E, Santana E, Matteson EL, et al. Epitope-specific immunotherapy of rheumatoid arthritis: clinical responsiveness occurs with immune deviation and relies on the expression of a cluster of molecules associated with T cell tolerance in a double-blind, placebo-controlled, pilot phase II trial. *Arthritis Rheum*. 2009;60(11):3207-16.
111. Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, Metzger M, Cohen IR. Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet*. 2001;358(9295):1749-53.
112. Bielekova B, Martin R. Antigen-specific immunomodulation via altered peptide ligands. *J Mol Med (Berl)*. 2001;79(10):552-65.
113. Madrenas J, Wange RL, Wang JL, Isakov N, Samelson LE, Germain RN. Zeta phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. *Science*. 1995;267(5197):515-8.
114. Ben-David H, Sela M, Mozes E. Down-regulation of myasthenogenic T cell responses by a dual altered peptide ligand via CD4+CD25+ regulated events leading to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(6):2028-33.
115. Katsara M, Deraos G, Tselios T, Matsoukas J, Apostolopoulos V. Design of novel cyclic altered peptide ligands of myelin basic protein MBP83-99 that modulate immune responses in SJL/J mice. *J Med Chem*. 2008;51(13):3971-8.
116. Ben-David H, Venkata Aruna B, Sela M, Mozes E. A dual altered peptide ligand inhibits myasthenia gravis associated responses by inducing phosphorylated extracellular-regulated kinase 1,2 that upregulates CD4+CD25+Foxp3+ cells. *Scand J Immunol*. 2007;65(6):567-76.
117. Zhao J, Li R, He J, Shi J, Long L, Li Z. Mucosal administration of an altered CII263-272 peptide inhibits collagen-induced arthritis by suppression of Th1/Th17 cells and expansion of regulatory T cells. *Rheumatol Int*. 2008;29(1):9-16.
118. Anderton SM. Peptide-based immunotherapy of autoimmunity: a path of puzzles, paradoxes and possibilities. *Immunology*. 2001;104(4):367-76.
119. Aharoni R, Teitelbaum D, Arnon R, Sela M. Copolymer 1 acts against the immunodominant epitope 82-100 of myelin basic protein by T cell receptor antagonism in addition to major histocompatibility complex blocking. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(2):634-9.
120. Duda PW, Schmied MC, Cook SL, Krieger JI, Hafler DA. Glatiramer acetate (Copaxone) induces degenerate, Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2000;105(7):967-76.
121. Neuhaus O, Farina C, Yassouridis A, Wiendl H, Then Bergh F, Dose T, et al. Multiple sclerosis: comparison of copolymer-1-reactive T cell lines from treated and untreated subjects reveals cytokine shift from T helper 1 to T helper 2 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(13):7452-7.
122. Singh H, Raghava GP. ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics*. 2001;17(12):1236-7.
123. Dominguez M del C, Lorenzo N, Barbera A, Darrasse-Jeze G, Hernandez MV, Torres A, et al. An altered peptide ligand corresponding to a novel epitope from heat-shock protein 60 induces regulatory T cells and suppresses pathogenic response in an animal model of adjuvant-induced arthritis. *Autoimmunity*. 2011;44(6):471-82.
124. Szodoray P, Jellestad S, Nakken B, Brun JG, Jonsson R. Programmed cell death in rheumatoid arthritis peripheral blood T-cell subpopulations determined by laser scanning cytometry. *Lab Invest*. 2003;83(12):1839-48.
125. Bielekova B, Goodwin B, Richert N, Cortese I, Kondo T, Afshar G, et al. Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nat Med*. 2000;6(10):1167-75.
126. Kappos L, Comi G, Panitch H, Oger J, Antel J, Conlon P, et al. Induction of a non-encephalitogenic type 2 T helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide ligand in a placebo-controlled, randomized phase II trial. The Altered Peptide Ligand in Relapsing MS Study Group. *Nat Med*. 2000;6(10):1176-82.
127. Alleva DG, Maki RA, Putnam AL, Robinson JM, Kipnes MS, Dandona P, et al. Immunomodulation in type 1 diabetes by NBI-6024, an altered peptide ligand of the insulin B epitope. *Scand J Immunol*. 2006;63(1):59-69.
128. Boots AM, Hubers H, Kouwijzer M, den Hoed-van Zandbrink L, Westrek-Esselink BM, van Doorn C, et al. Identification of an altered peptide ligand based on the endogenously presented, rheumatoid arthritis-associated, human cartilage glycoprotein-39(263-275) epitope: an MHC anchor variant peptide for immune modulation. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(4):R71.
129. Sakurai Y, Brand DD, Tang B, Rosloniec EF, Stuart JM, Kang AH, et al. Analog peptides of type II collagen can suppress arthritis in HLA-DR4 (DRB1*0401) transgenic mice. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(5):R150.
130. Quintana FJ, Cohen IR. The HSP60 immune system network. *Trends Immunol*. 2011;32(2):89-95.
131. Flores-Borja F, Jury EC, Mauri C, Ehrenstein MR. Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(49):19396-401.
132. Toubi E, Kessel A, Mahmudov Z, Hallas K, Rozenbaum M, Rosner I. Increased spontaneous apoptosis of CD4+CD25+ T cells in patients with active rheumatoid arthritis is reduced by infliximab. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1051:506-14.
133. Schuerwegh AJ, Van Offel JF, Stevens WJ, Bridts CH, De Clerck LS. Influence of therapy with chimeric monoclonal tumour necrosis factor-alpha antibodies on intracellular cytokine profiles of T lymphocytes and monocytes in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2003;42(4):541-8.
134. Roord ST, Zonneveld-Huijssoon E, Le T, Yung GP, Koffeman E, Ronaghy A, et al. Modulation of T cell function by combination of epitope specific and low dose anticytokine therapy controls autoimmune arthritis. *PLoS One*. 2006;1:e87.
135. Savarino A, Boelaert JR, Cassone A, Majori G, Cauda R. Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases? *Lancet Infect Dis*. 2003;3(11):722-7.
136. van den Borne BE, Dijkmans BA, de Rooij HH, le Cessie S, Verweij CL. Chloroquine and hydroxychloroquine equally affect tumor necrosis factor-alpha, interleukin 6, and interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells. *J Rheumatol*. 1997;24(1):55-60.