

Ingrés d'Acadèmics Corresponents

REPTES CIENTÍFICS I ORGANITZATIUS EN LA RECERCA SOBRE LES ENDOCRINOPATIES AUTOIMMUNITÀRIES ALS HOSPITALS ACADÈMICS I ELS INSTITUTS DE RECERCA SANITÀRIA VINCULATS

Ricard PUJOL i BORRELL

Catedràtic i Cap de Servei. Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Facultat de Medicina. UAB. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona

En 1987 creïem que en menys de deu anys disposaríem d'una teràpia curativa immunològica eficaç per a la diabetis tipus 1 (DM-1). Però no ha estat així, tot el contrari, àdhuc som bastant pessimistes sobre la disponibilitat a curt termini d'una teràpia immunològica curativa de la diabetis amb restitució de la capacitat total de secreció d'insulina. En aquest article tractaré d'explicar perquè van fallar les nostres prediccions.

BARRERES CIENTÍFIQUES

1. L'existència d'una teràpia efectiva, la insulina.

La disponibilitat de la teràpia amb insulina posa el llistó a l'entrada en assajos clínics per a les teràpies en diabetis més alt que en, per exemple en l'artritis reumatoide, on els anticossos monoclonals amb anti-TNF, anti-CTLA i anti-CD20 han suposat una revolució, encara que no siguin curatius. En la DM-1 la insulina compleix amb escreix la funció pal·liativa. De fet, en la diabetis s'han aconseguit alguns resultats mitjançant terapèutiques immunològiques como ciclosporina (1) o anti-CD3 humanitzat (2). Aquests dos immunosupressors allarguen l'anomenat període "honey-moon" durant el qual disminueixen les necessitats d'insulina, però no s'ha aconseguit revertir la diabetis i el tractament no millora el control glicèmic a llarg termini.

2. La complexitat del control de la resposta immune

De la resposta immune coneixem com es desencadena i els efectors que genera el sistema immune per controlar el patogen. Però els processos que regulen la producció d'aquests efectors són només parcialment coneguts. Els principals èxits en la inducció de tolerància en el trasplantament d'òrgans són facilitats perquè el tractament precedeix a la trobada amb l'antigen (3). Una peculiaritat en aquest camp és la disponibilitat d'un model animal "ideal" el ratolí NOD. Aquesta disponibilitat ha propiciat una concentració de la recerca en aquest model però

gairebé totes les teràpies que han tingut èxit en ell han fracassat en els pacients (4). Alguns desenvolupaments recents mantenen l'esperança que aquests abordatges condueixin finalment a la curació de la diabetis (5), però en general, s'ha desatès la recerca en el subjecte real, el pacient diabètic. Però la major dificultat ha estat la complexitat de la resposta immune i de la seva regulació. A les subpoblacions de limfòcits que van començar a reconèixer-se fa 35 anys amb les primeres aplicacions dels anticossos monoclonals, s'han anat afegit més subpoblacions i subtipus funcionals.

S'ha anat reconeixent l'efecte modulador dels mecanismes de la immunitat natural com a complement i polimorfo nuclears (llargament oblidats) en la resposta específica adaptativa (6). A més de centenars de mediadors solubles, citocines, quimiocines, mediadors lípidics, etc. I àdhuc cal afegir el reconeixement recent del paper clau dels micro RNAs (7) i de l'epigenètica en general en la regulació de la resposta immune (8). Quinze anys després de la resurrecció del concepte de cèl·lules T supressores en forma de T reguladores seguim sense conèixer els mecanismes a través dels quals exerceixen el seu efecte, encara que si sabem que la seva manca té efectes nefastos per a la tolerància immunològica dels nounats que presenten múltiples malalties autoimmunes i hipersensibilitat. Durant un temps vivim amb l'esperança que, quan identifiquéssim els acte antigens podríem detenir la resposta autoimmune. Però no ha estat així. Hem anat identificant els enzims GAD i I-A2 i la pròpia insulina com els autoantígens de la diabetis, però no s'ha obtingut cap èxit en l'ús de lligands tolerogènics com a teràpia. Tot això sobre el fons d'un sistema en bona part controlat pels gens HLA, el més polimòrfic del genoma humà. Cada ésser humà és diferent, però si en alguna cosa és diferent, és en quant al seu sistema immune. El que sota el fracàs del control terapèutic de la autoimmunitat és el nostre desconeixement dels

mecanismes de tolerància. Només en els últims anys, hem començat a comprendre com es complementen i se solapen els controls a nivell central, (generació dels repertoris de limfòcits), amb els controls que actuen durant la resposta immune a nivell dels ganglis limfàtics i a nivell dels teixits perifèrics. La plasticitat del sistema immune li permet recuperar la resposta després de teràpies immunosupressores agressives.

Només procediments molt dràstics com el trasplantament de progenitors hematopoètics pot, i no sempre, detenir les malalties autoimmunes. S'empra només en alguns casos extremadament greus de EM9, LED (10) i malaltia de Crohn (10). Hem de fer nostre el concepte que el sistema immune és per disseny, altament redundat i haurem de començar a pensar en teràpies combinades que controlin resposta local i sistèmica, innata i adaptativa simultàniament perquè els enfocaments reduccionistes que s'estan aplicant fins ara aparentment fracassen però això no indica que no estiguin tenint cap efecte. I hem d'aprendre a valorar millor els resultats dels assajos clínics quan tractem de modificar la resposta immune, mesurant múltiples paràmetres i no només la millorança clínica o la curació, per molt que aquesta sigui la finalitat última.

BARRERES ORGANITZATIVES

Una pregunta que sorgeix repetidament, quan s'analitza l'entorn investigador tant local com internacional, és sí el nostre sistema de ciència és adequat per a desenvolupar, en el menor temps possible, millors processos preventius, diagnòstics, terapèutics, o almenys pal·liatius per els nostres malalts. No hi ha dubte que els grans descobriments científics i/o tecnològics s'acaben aplicant a la medicina. Però algunes aplicacions han estat molt lentes per exemple la producció d'anticossos monoclonals a demanda inventada en 1975 per Milstein i Kohler, reconeguts amb el Nobel el 1984, no s'han aplicat de forma general fins entrat el nostre segle. Un obstacle és la complexitat de la regulació que s'ha imposat per salvaguardar la seguretat dels pacients en quant a les tècniques diagnòstiques: la validació exhaustiva, contínues auditories de qualitat, d'acreditació de centres, d'estandardització, està reduint la possibilitat d'aplicar en el laboratori diagnòstic tècniques pròpies abocant-los a usar només "kits" diagnòstics que han passat tots els controls però disponibles molts anys després que la tecnologia s'hagi descobert i fins i tot

perfeccionat. Això desanima a investigar o innovar en els nostres laboratoris diagnòstics. Pel que fa als fàrmacs: assajos clínics d'enorme cost, acotació de l'aplicació de noves teràpies com les teràpies cel·lulars i teràpia gènica etc., exclouen a tots excepte els grans conglomerats. Les normatives de vegades semblen dissenyades més per mantenir vedats tancat i alimentar burocràcies que per salvaguardar al pacient. Retarden la innovació i afavoreixen a les grans corporacions que són les úniques que poden fer front el cost d'aquestes regulacions. Paradoxalment, generen errors i problemes de seguretat per la seva pròpia complexitat i l'allunyament entre la presa de decisions i l'assistència sanitària directa.

Però més important és l'existència d'espais separats, aïllats, entre la recerca clínica i de laboratori. La situació idònia en l'entorn sanitari és aquella en la qual un professional clínic identifica un problema, formula les preguntes adequades i intueix abordatges, siguin observacionals, epidemiològics, experimentals, per simulació "in sillico"... o combinats, però només fa falta que els intueixi... si té el col·laborador bàsic adequat. O viceversa, des de l'entorn de les ciències biomèdiques, un científic biomèdic davant un nou concepte o una nova tecnologia, intueix la seva possible aplicació a la medicina a qualsevol dels seus nivells: resolució d'un problema etiològic, diagnòstic, terapèutic etc. De nou n'hi ha prou que ho intueixi si té el col·laborador clínic adequat per formular el projecte.

Perquè això sigui possible:

El científic clínic ha de tenir uns coneixements raonables de ciències bàsiques de la vida per a poder identificar problemes concrets que es puguin descompondre en preguntes abordables científicament encara que ell, per si mateix, no pugui dissenyar el projecte. El científic biomèdic ha de conèixer prou de l'organisme humà normal, dels seus principals processos patològics i de com funcionen els sistemes de salut per identificar l'aplicació d'un nou concepte o tecnologia que ha sorgit o que ell mateix ha generat i a més tots dos han de tenir un estatus científic i professional equiparable no estar uns sotmesos als altres.

Això és necessari per tenir als millors investigadors de tots dos camps i perquè hi hagi una autèntica llibertat intel·lectual que afavoreixi la gènesi d'hipòtesis destrossadores. Això no ocorre, en aquest moment perquè en els Instituts d'Investigació Sanitària lligats als hospitals (IIS), la balança està desequilibrada,

en general a favor dels clínics que són els sènior que típicament interaccionen amb investigadors no clínics predoctorals o postdoctorals encara que alguns d'ells tinguin una trajectòria mantinguda. Això genera un desequilibri i dificulta que sigui difícil atreure als millors investigadors de ciències bàsiques de la biomedicina als instituts de recerca sanitaris. Viceversa, en els instituts no lligats a hospitals els problemes que s'aborden segueixen en gran manera les modes internacionals però no els problemes sanitaris.

Aquests instituts intimiden als clínics i els seus científics no clínics estan tan ocupats a defensar el seu estatus internacional que no estan fàcilment disposats a sacrificar el seu temps en un problema clínic. O si estudien un problema clínic ho fan des de la comoditat d'un model animal com el citat del ratolí NOD i no donen el salt a la cerca de l'aplicació clínic, que sempre es deixa per al proper projecte. I quan es produeix una interacció, es limita a la cessió de mostres per sortir en publicacions però sense grans interaccions científiques. Es perden enormes oportunitats per ambdues parts que es mantenen en les seues propis espais tancats.

Quins objectius i accions hauríem de plantejar-nos per trencar aquesta dinàmica? Objectiu prioritari: alinear objectius i interessos dels investigadors clínics i de laboratori. És difícil, totes les organitzacions ho intenten però les forces que mantenen els "Espais Tancats" són molt potents. Ningú vol perdre productivitat en la transició de model. Algunes mesures factibles serien les següents.

1. Millorar la formació en ciències bàsiques de la vida dels graduats en medicina. Possibles mesures concretes:

1.1 Incloure una examen-revàlida al final del període preclínic, una avaluació dissenyada conjuntament per docents de preclíniques, clíniques i investigadors. 1.2 Augmentar el pes de les assignatures preclíniques en la nota que computa per a l'examen MIR. 1.3 Analitzar els programes de les assignatures harmonitzant continguts de preclíniques i de clíniques per a millorar la comprensió fisiopatològica dels processos de malaltia

2. Prevaler l'entrada dels graduats en ciències biomèdiques en aquests instituts de recerca sanitària i participar en la seva formació.

3. Introduir la modalitat de tesi dins del grau de medicina, mitjançant un parell d'anys entre tercer i quart en els quals es pararia el rellotge acadèmic i amb

una beca adequada, es realitzaria un projecte de tesi en un institut de recerca sanitària. El fet de comptar amb aquesta tesi hauria de facilitar la superació de l'examen MIR.

4. Millorar la situació dels investigadors dels IIS. Els programes Miquel Servet i similars, han estat un avanç, però àdhuc gaudeixen d'una situació en part subordinada i inestable, per millorar-la caldria:

4.1 Augmentar les seves responsabilitats docents retribuïdes i obrir-los la carrera docent universitària; augmentar el caràcter universitari dels IIS.

4.2 Ampliar la durada dels projectes a 4-5 anys, ara són de 3.

4.3 Dotar aquests projectes d'una major aportació als IIS, atès que pel seu caràcter experimental generen més despesa, i d'aquesta forma fer atractius aquests investigadors als IIS.

5. Reforçar el caràcter universitari dels IIS; augmentar la implicació en docència; augmentar la implicació de les grans institucions de recerca: CERCA, ISCIII, CSIC en aquests instituts.

6. Respecte a les agències: Incloure els costos de personal dins dels projectes (3+1, és a dir tres anys de costos de projecte i un any addicional de personal, o millor 5+1); tant per uns com para uns altres; en un cas aquests recursos anirien a la institució sanitària per alliberar temps a l'investigador clínic, en l'altre alliberarien del cost als IIS, augmentat la seguretat dels investigadors que no dependrien de les fluctuacions econòmiques dels instituts.

PRIMÍCIA DE RECERCA

Com no vull que tota la presentació sigui teòrica els vull presentar un dels últims resultats del nostre laboratori. Com saben l'anomenada malaltia de Graves-Basedow és produïda per auto-anticossos contra el receptor de la tirotròpina (Pujol-Borrell et al, en premsa). La producció d'autoanticossos és una de les característiques de les malalties autoimmunes en general. El que és sorprenent -i es coneix des de 1956- és que en aquest cas l'autoanticós és estimulant, és a dir simula l'efecte del lligant fisiològic. I això és excepcional en autoimmunitat, no hi ha models animals realment equivalents i quan generem anticossos anti-receptor de la tirotròpina injectant aquesta proteïna als animals d'experimentació és difícilíssim generar anti-cossos anti-receptor que siguin estimulants, sent

fàcil, en canvi, generar anticossos bloquejants o que simplement s'uneixin al receptor. La indústria dedicada a la producció de kits diagnòstics per a la patologia tiroidea va fracassar durant anys en els seus intents de generar anticossos anti-TSHR estimulants. Els pocs anticossos anti-receptor de la tirotropina estimulants disponibles, s'han obtingut mitjançant la generació d'híbridomes humans a partir de limfòcits de pacients.

Els últims anys ens hem dedicat, amb la col·laboració dels endocrinòlegs de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol i de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, per tractar d'entendre perquè es perd la tolerància al TSHR. I hem constatat que aquest s'expressa en el tim -com a tants autoantígens- i que aquesta expressió s'hagi influïda per un polimorfisme del gen del receptor. Aquest polimorfisme determinen el nivell d'expressió de TSHR en el tim: l'al·lel que determina una major expressió protegeix de la malaltia i viceversa (11). En si, aquests resultats constitueixen un avanç en la genètica de la malaltia del Graves-Basedow, més enllà dels polimorfismes de HLA i altres gens reguladors del la resposta com CTLA-4 i PTPN22, perquè aporten un mecanisme tiroide específic per a comprendre la pèrdua de tolerància al TSHR, que tindria, per tant, un component de fallada de tolerància tímica (Pujol-Borrell et al. en premsa). L'inesperat va ser que el receptor de la TSH s'expressés no només en les cèl·lules epitelials del tim, que són les que imparteixen tolerància, sinó també i a un nivell més elevat, en els timòcits, on responen tant a TSH com als anticossos anti-TSHR dels pacients (12). Aquesta dada ens porta a formular dues propostes. La primera és que aquesta expressió de TSHR pels timòcits explicaria la hipertròfia del tim, que és una troballa freqüent i inexplicada en la malaltia de Graves-Basedow. La segona proposta, més especulativa, és que existeixen mecanismes d'estimulació recíproca entre els centres germinals on maduren els limfòcits B que produeixen els anticossos anti-receptor de la TSH i els timòcits que expressen TSHR. En aquest moment són propostes basades en una sèrie d'observacions, però esperem en el futur poder generar evidència directa i començar així a solucionar l'enigma de la generació dels anticossos estimulants del receptor de la TSH en al malaltia de Graves-Basedow (Pujol-Borrell et al. en premsa).

Agraïments. A més de l'especial agraïment als acadèmics Prof M Foz-Sala i C Rei-Joly al llarg de la meua vida professional haig d'agrair l'ajuda i ensenyaments de moltes persones, la següent llista és incompleta, però tracta de destacar a

aquelles, l'ajuda de les quals ha tingut major impacte en la meua forma de fer recerca: Prof J Guàrdia, Prof M Foz, Prof GF Bottazzo, Prof D Doniach, Prof Sir Marc Feldmann, Prof. JJ Navas, Dra Anna Sanmartí-Sala, Dra Anna Lucas-Martín, Prof. Dolores Jaraquemada, Dr. Manel Juan, Dr. Eva Martínez-Càceres, Sr Marco Fernandez Sanmartin, Dra Marta Vives-Pi, Dr I. Argelagues, Dr. Lluís Puig, Dr R Colobran, Dra Mireia Gimenez-Barcons, Dr M Hernandez, Dr P Soler Palacin, Dra Mònica Martínez Gall i les facultatius especialistes Ana Marin Sánchez i Paz Bermejo.

Bibliografia

1. Sillar C, Dupré J, Gent M, et al. Effects of cyclosporine immunosuppression in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. *Science* 1984; 223:1362-7.
2. Hagopian W, Ferry RJ, Sherry N, et al. Teplizumab preserves C-peptide in recent-onset type 1 diabetes: two-year results from the randomized, placebo-controlled Protégé trial. *Diabetes* 2013; 62:3901-8.
3. Nepom GT, St Clair EW, Turka LA. Challenges in the pursuit of immune tolerance. *Immunol Rev* 2011; 241:49-62.
4. Atkinson MA, Leiter EH. The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? *Nat Med* 1999; 5 :601-4.
5. Pujol-Autonell I, Serracant-Prat A, Cano-Sarabia M, et al. Use of autoantigen-loaded phosphatidylserine-liposomes to arrest autoimmunity in type 1 diabetes. *PLoS ONE* 2015;10(6):e0127057.
6. Magri G, Miyajima M, Bascones S, et al. Innate lymphoid cells integrate stromal and immunological signals to enhance antibody production by splenic marginal zone B cells. *Nat Immunol* 2014; 15:354-64.
7. Ansel KM. RNA regulation of the immune system. *Immunol Rev* 2013; 253:5-11.
8. Kanno Y, Vahedi G, Hirahara K, et al. Transcriptional and Epigenetic Control of T Cell Lineage Specification: Molecular Mechanisms Underlying Commitment and Plasticity. *2012*;30: 707-731.
9. Muraro PA, Robins H, Malhotra S, et al. T cell repertoire following autologous stem cell transplantation for multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2014; 124:1168-72.
10. Su G, Luan Z, Wu F, et al. Long-term follow-up of autologous stem cell transplantation for severe paediatric systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2013; 32 :1727-34.
11. Colobran Oriol R, Armengol MDP, Faner R, et al. Association of an SNP with intrathymic transcription of TSHR and Graves' disease: a role for defective thymic tolerance. *Human Molecular Genetics* 2011; 20:3415-23.
12. Giménez-Barcons M, Colobran Oriol R, Gómez-Pau A, Marín-Sánchez A, Casteràs A, Obiols G, et al. Graves' disease TSHR-stimulating antibodies (TSAbs) induce the activation of immature thymocytes: a clue to the riddle of TSAbs generation? *The Journal of Immunology*. 2015; 194:4199-206.

Agraïment de la Revista RAMC a José Ramon Alonso Carnero, per la seva ajuda en l'adaptació del text.