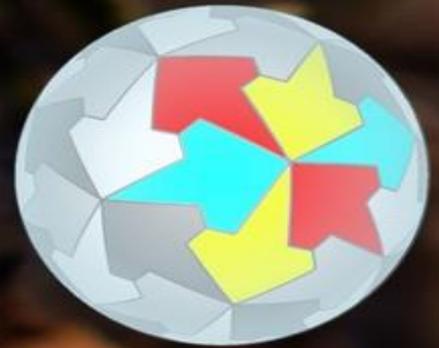


SECUAH 2021

29 marzo – 30 abril

de VI Congreso de Señalización Celular



Restauración de la respuesta CD8 VHB-específica mediante bloqueo PD-L1 más IL-15 en la hepatitis crónica B eAg(-) con tratamiento corto con análogos de nucleos(t)idos.

Congreso SECUAH 2021
Alcalá de Henares
Marzo 2021

Julia Peña Asensio
julia.pena@edu.uah.es

Hospital universitario de Guadalajara.
Programa de doctorado en señalización celular. UAH

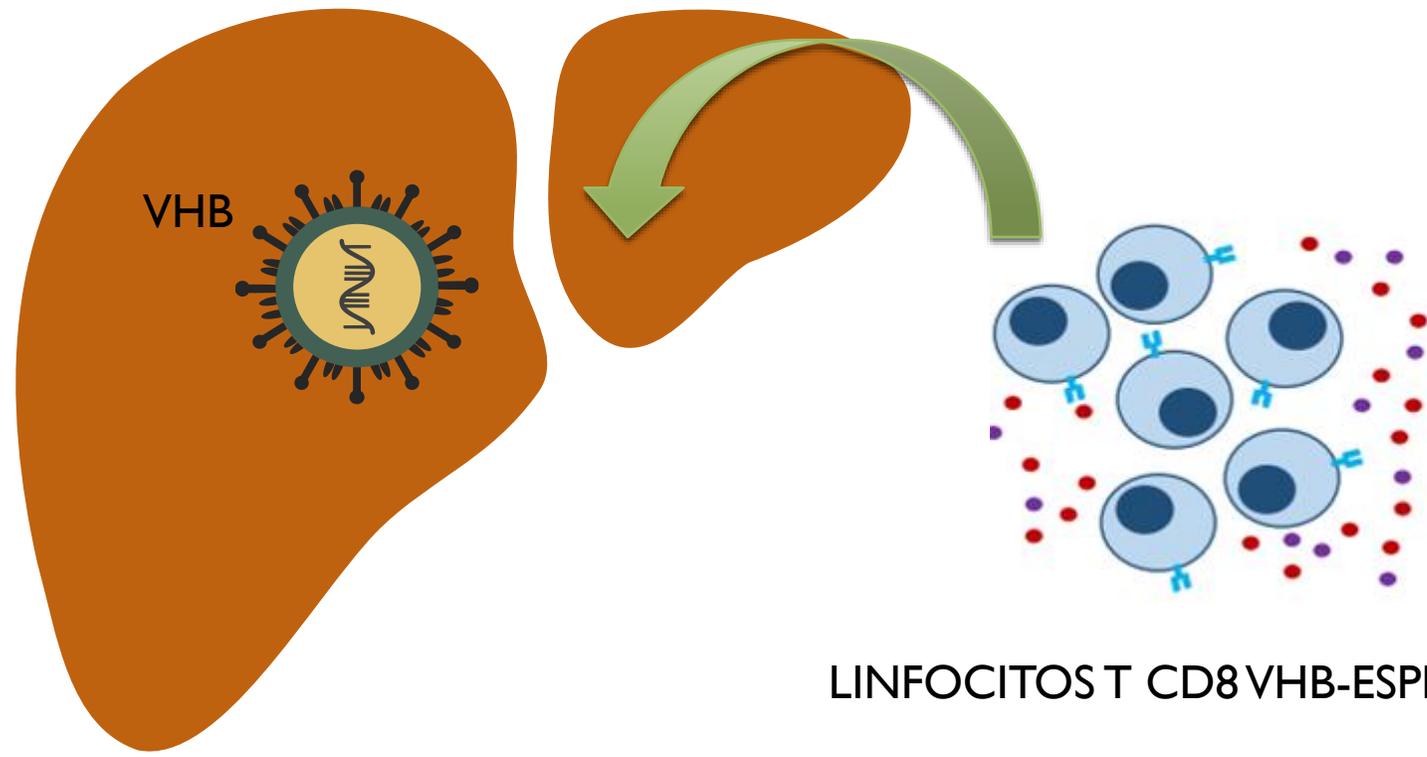


Universidad
de Alcalá



Hospital Universitario
Guadalajara

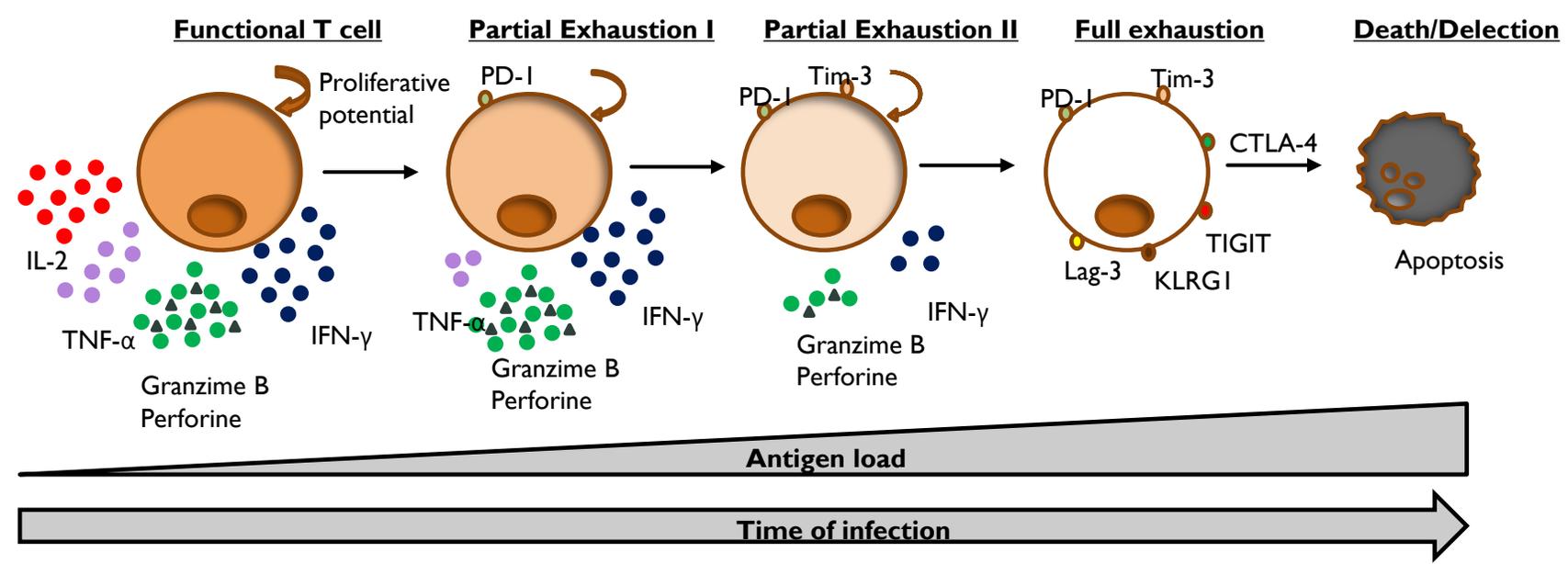
INTRODUCCION: IMPORTANCIA DE LA RESPUESTA CELULAR T CD8 CONTRA EL VIRUS DE LA HEPATITIS B



LINFOCITOS T CD8 VHB-ESPECÍFICOS

- El virus de la hepatitis B es un virus hepatotropo y no citopático
- Las células T CD8 controlan la infección del VHB en los pacientes que resuelven la infección aguda, sin embargo la enfermedad puede hacerse crónica si la respuesta es insuficiente.
- La hepatitis crónica acaba degenerando en cirrosis hepática y hepatocarcinoma.

INTRODUCCION: AGOTAMIENTO CELULAR

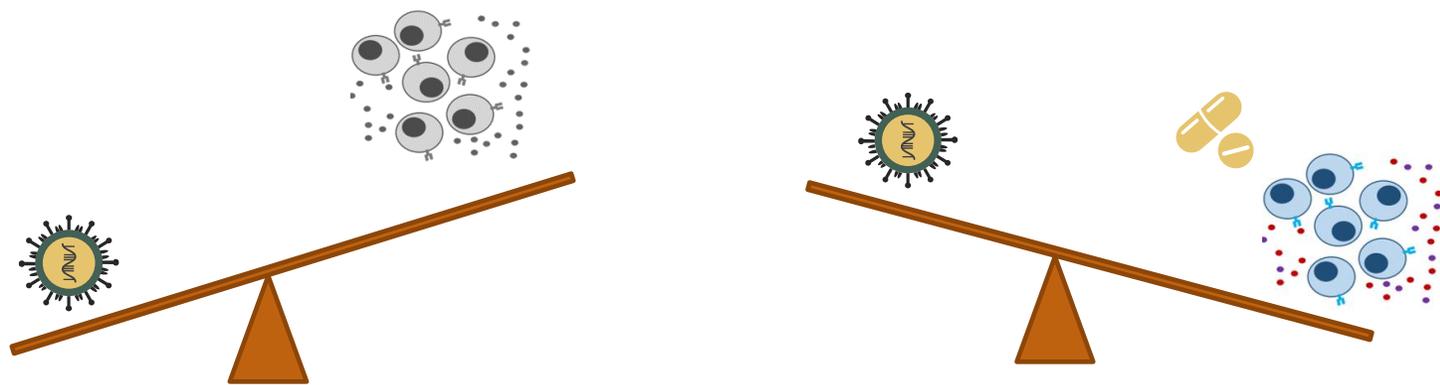


Durante la infección crónica por el VHB, la persistente antigenemia afecta a la capacidad efectora y de proliferación de los linfocitos T CD8-VHB específicos, que sufren un proceso de agotamiento progresivo. Con el tiempo, la cantidad de moléculas co-estimuladoras negativas que expresan va aumentando, y se producen cambios epigenéticos que impiden la recuperación de éstas células en sus estadios finales. Finalmente son deleccionadas y acaban muriendo por apoptosis.

INTRODUCCION: AGOTAMIENTO CELULAR Y TRATAMIENTOS

Podemos revertir el agotamiento celular en algunos pacientes crónicos gracias al tratamiento antiviral, que consigue evitar la presión de antígenos como el antígeno HBs (AgHBs) sobre el sistema inmune al parar la replicación viral.

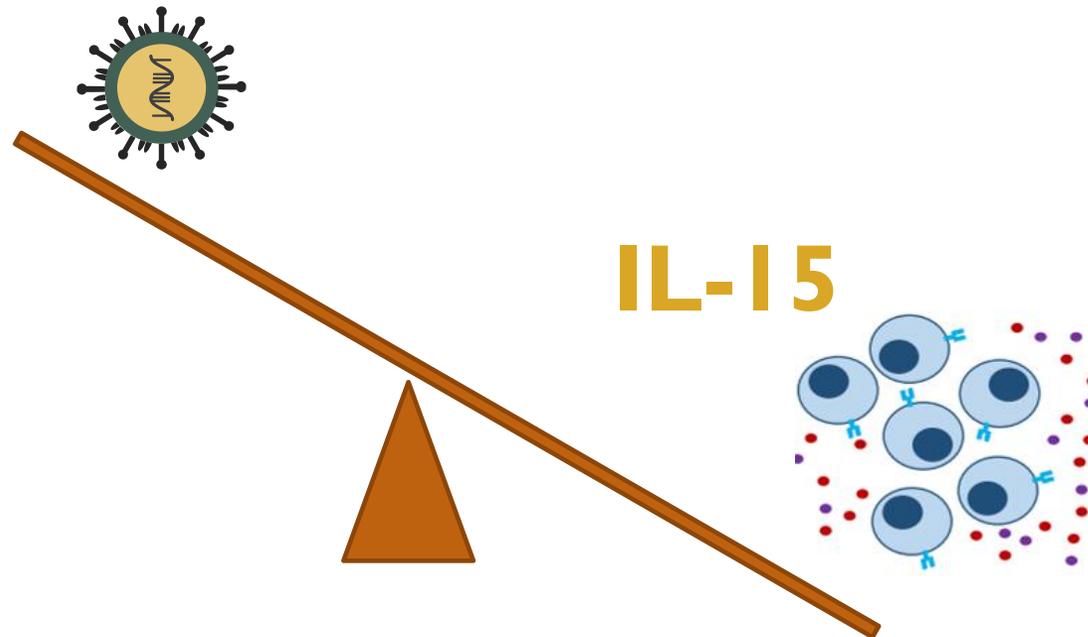
Esto no es suficiente en todos los pacientes y por eso es necesario el estudio de otros tratamientos que bloqueen vías de coestimulación negativa como la vía PD-1 o la estimulación de vías positivas con agonistas como 4-1BBL o citoquinas.



- TRATAMIENTO ANTIVIRAL
- TRATAMIENTOS INMUNOMODULADORES:
 - (-)BLOQUEO PD-1
 - (+)CITOQUINAS

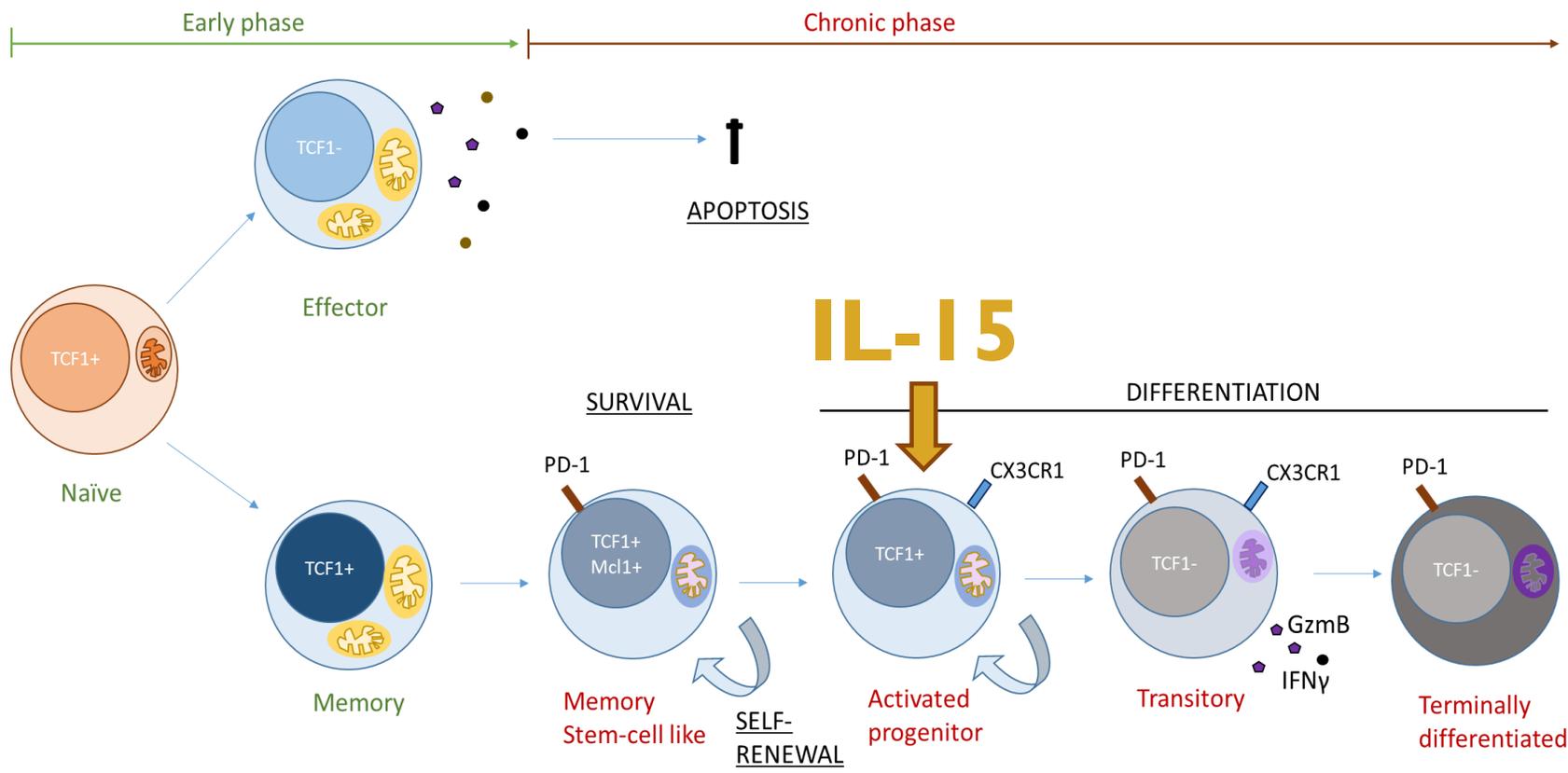
HIPOTESIS: ¿PUEDE LA IL-15 SER UN BUEN TRATAMIENTO INMUNOMODULADOR?

Entre los posibles tratamientos para revigorizar a los linfocitos T CD8, pensamos que la IL-15 podría ser un buen candidato ya que permite activar vías de supervivencia como Bcl-2, evitando su apoptosis. Además de ser una citoquina que promueve la memoria inmunológica y que podría tener un papel importante en el metabolismo mitocondrial.



- TRATAMIENTO ANTIVIRAL
- TRATAMIENTOS INMUNOMODULADORES:
 - BLOQUEO PD-1
 - CITOQUINAS: **IL-15**

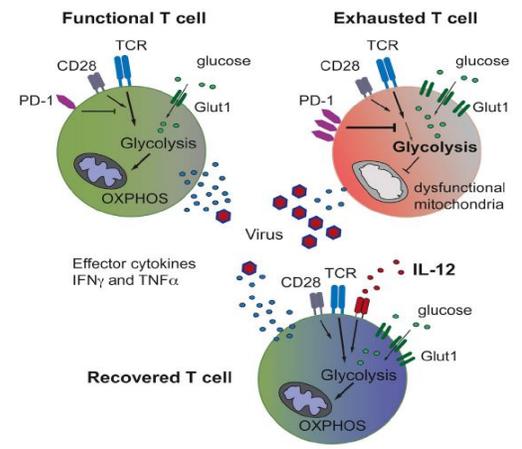
HIPÓTESIS: POSIBLE EFECTO DE LA IL-15 EN LA DIFERENCIACIÓN A CÉLULAS PROGENITORAS



Las células progenitoras activadas antígeno (Ag)-específicas se definen por la expresión del factor de transcripción TCF1+ y son las encargadas de generar la progenie (P) efectora (TCF1-).

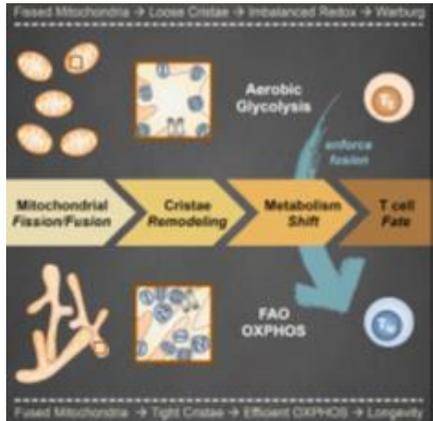
La IL-15 podría tener un papel en la diferenciación, estimulando la proliferación de células de memoria progenitoras, con capacidad de autorenovarse y a su vez dar una progenie efectora.

HIPÓTESIS: POSIBLE EFECTO DE LA IL-15 EN LA REPROGRAMACIÓN MITOCONDRIAL

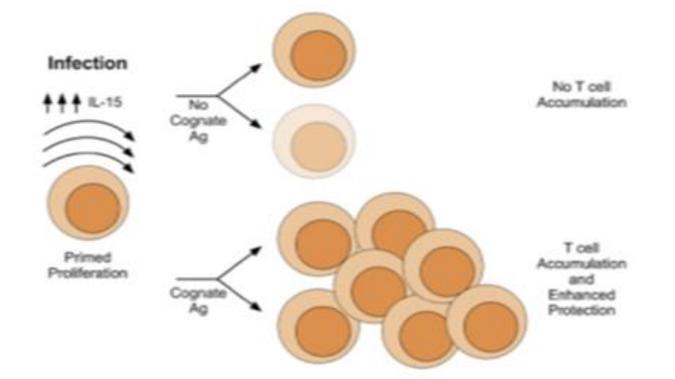


Schurich et al. Cell Reports 2016; 16, 1243-1252

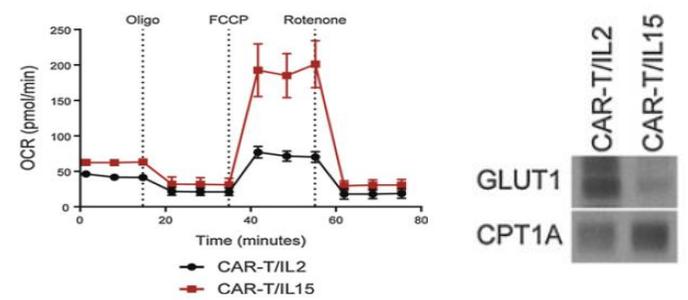
La reprogramación mitocondrial hacia un metabolismo menos glicolítico y en el que haya mayor oxidación de ácidos grasos (FAO) y mayor fosforilación oxidativa (OXPHOS) podría mejorar las capacidades efectoras de las células agotadas.



Buck et al. Cell 2016;166: 63-76



Buck et al. Cell 2016;166: 63-76



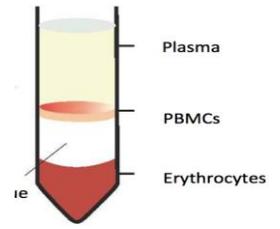
Alizadeh D, et al. Cancer Immunol Res 2019;7:759-72

IL-15 promueve la activación de células T de memoria durante la infección, promoviendo su proliferación. Además, ésta proliferación de células de memoria se relacionó con un metabolismo más catabólico y mejor respiración celular.

MATERIAL Y MÉTODOS

A. Ex vivo

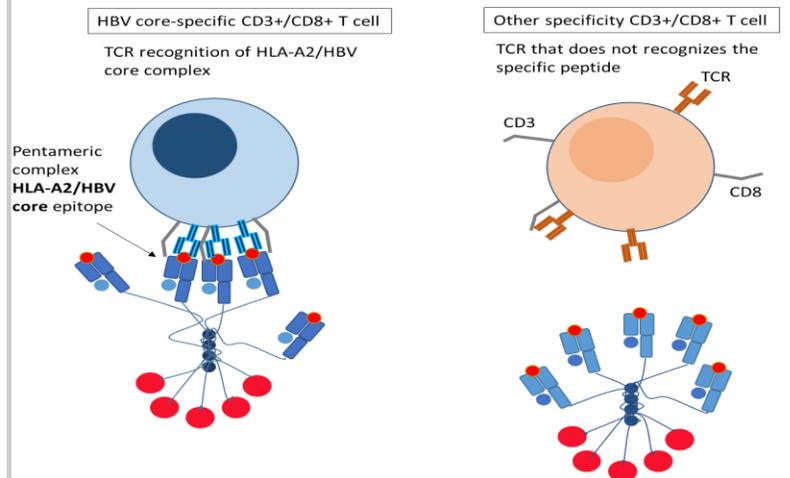
1. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica



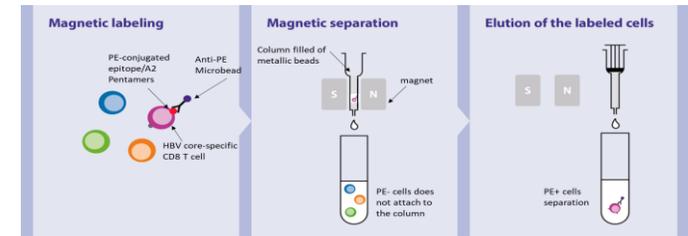
2. Selección de 6 pacientes HLA A2+



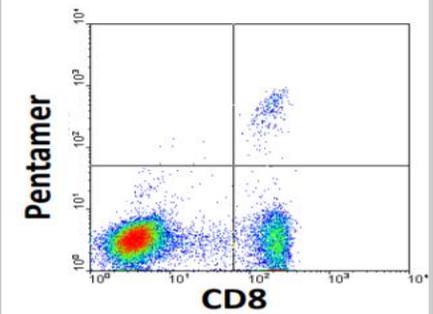
3. Marcaje de células específicas con pentámeros



4. Concentración mediante bolas magnéticas

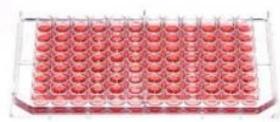


5. Visualización mediante Citometría de flujo



B. Estimulación in-vitro antígeno específica durante 20 días

1. Tratamientos con IL-2 o IL-15

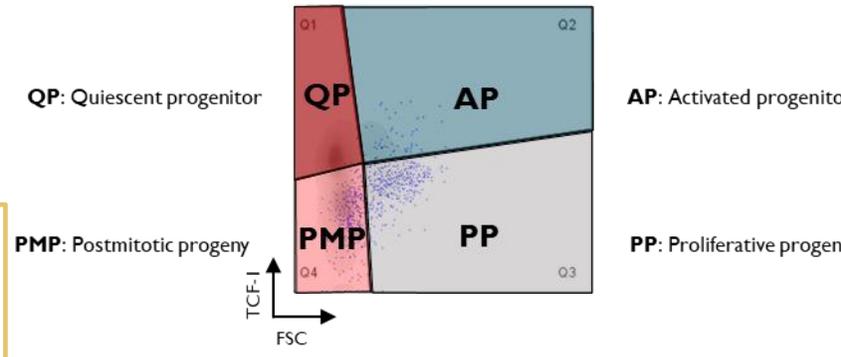
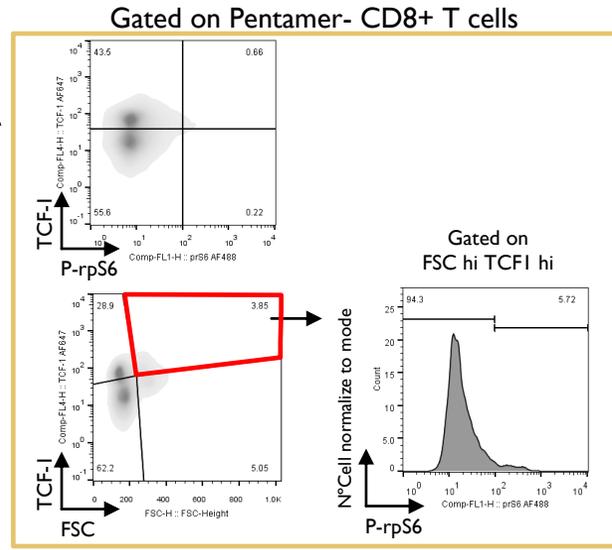
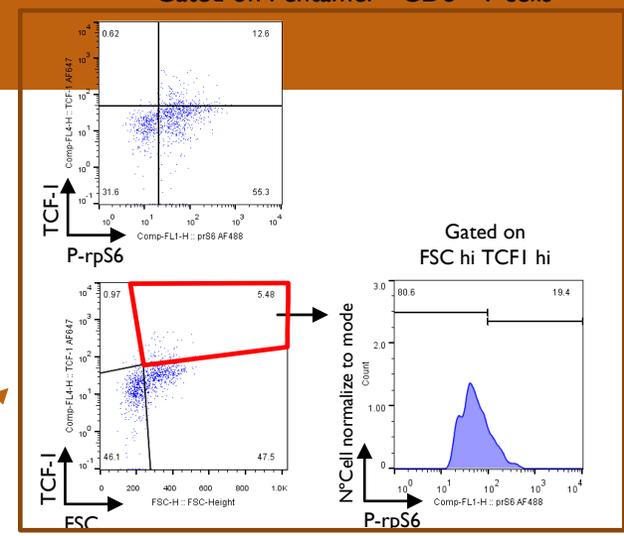
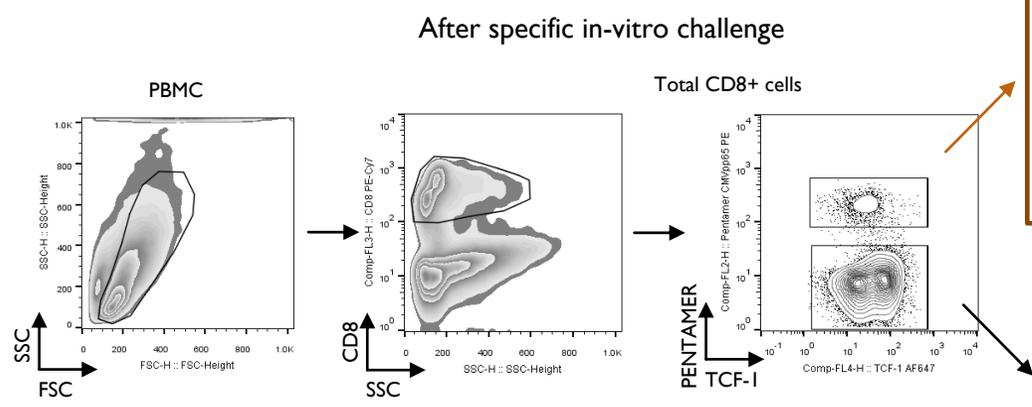


2. Marcaje de células específicas, anticuerpos de **membrana**, tinción intracelular de **citoquinas**, tinción intranuclear de **factores de transcripción**, marcaje citoplasmático de proteínas relacionadas con el **metabolismo mitocondrial**

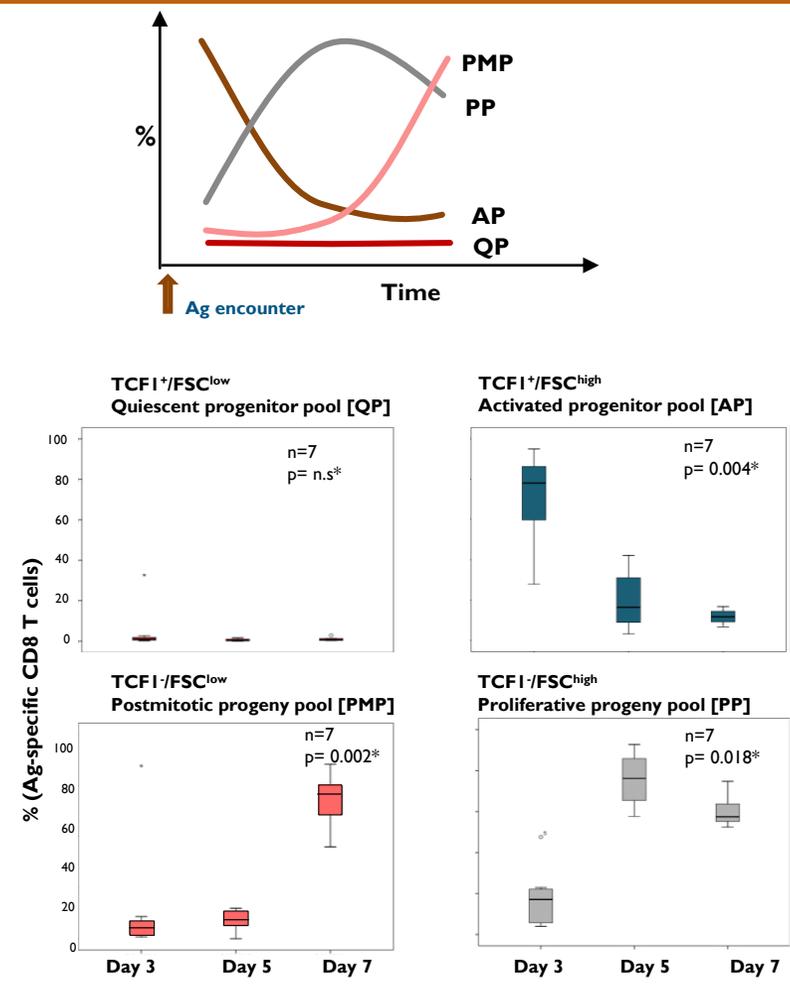
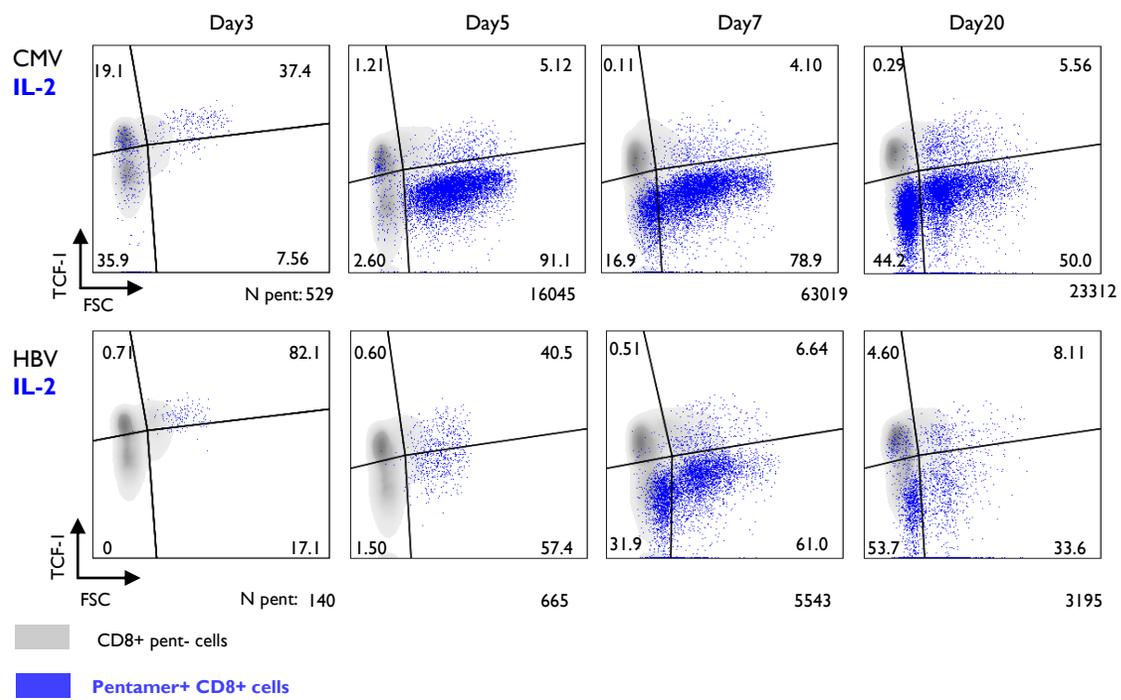
3. DIA 7: Análisis de Fenotipos y estado mitocondrial

4. DIAS 6,7,12,15,20: Análisis longitudinal de células progenitoras y progenie

MATERIAL Y MÉTODOS: ESTRATEGIA DE VISUALIZACIÓN DE CÉLULAS T CD8+VHB ESPECIFICAS PROGENITORAS

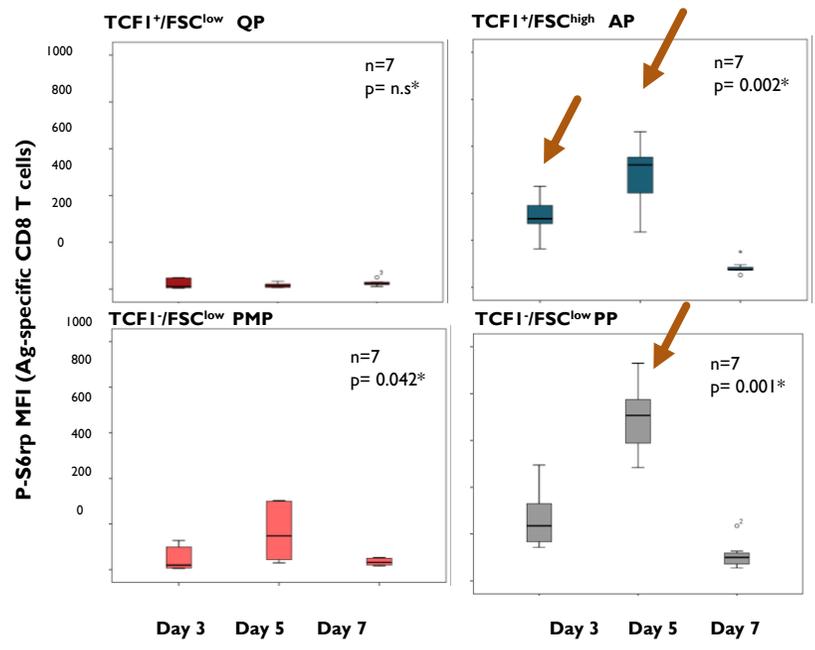
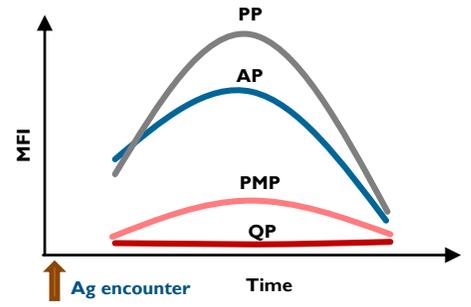
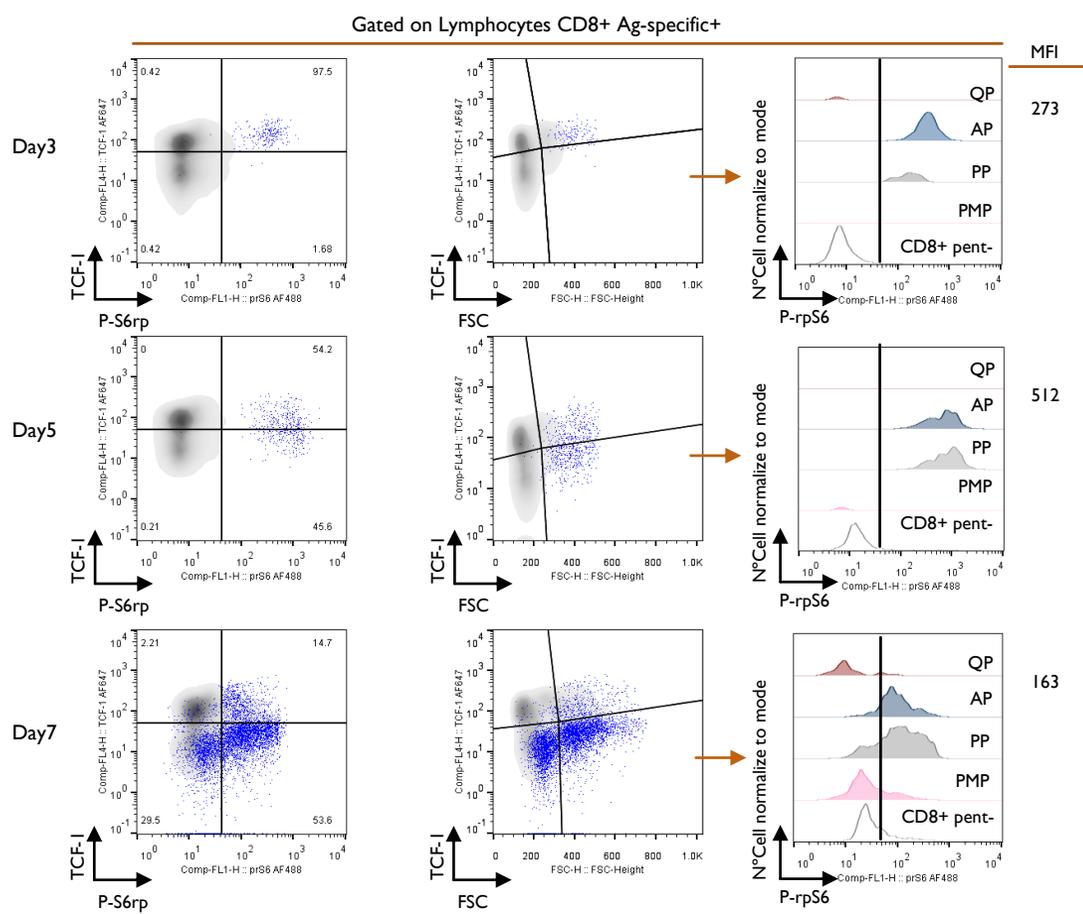


RESULTADOS: VISUALIZACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS



Para detectar las células progenitoras, realizamos una cinética de visualización en distintos días y observamos que las células aumentaban su tamaño e iban perdiendo TCF1 según proliferaban. De manera que el pool progenitor se observaba mejor en los primeros 3 días y luego daban paso a progenies más efectoras TCF-1-, mucho más abundantes

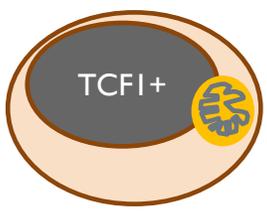
RESULTADOS: PROLIFERACIÓN DEL POOL PROGENITOR Y EL POOL PROGENIE



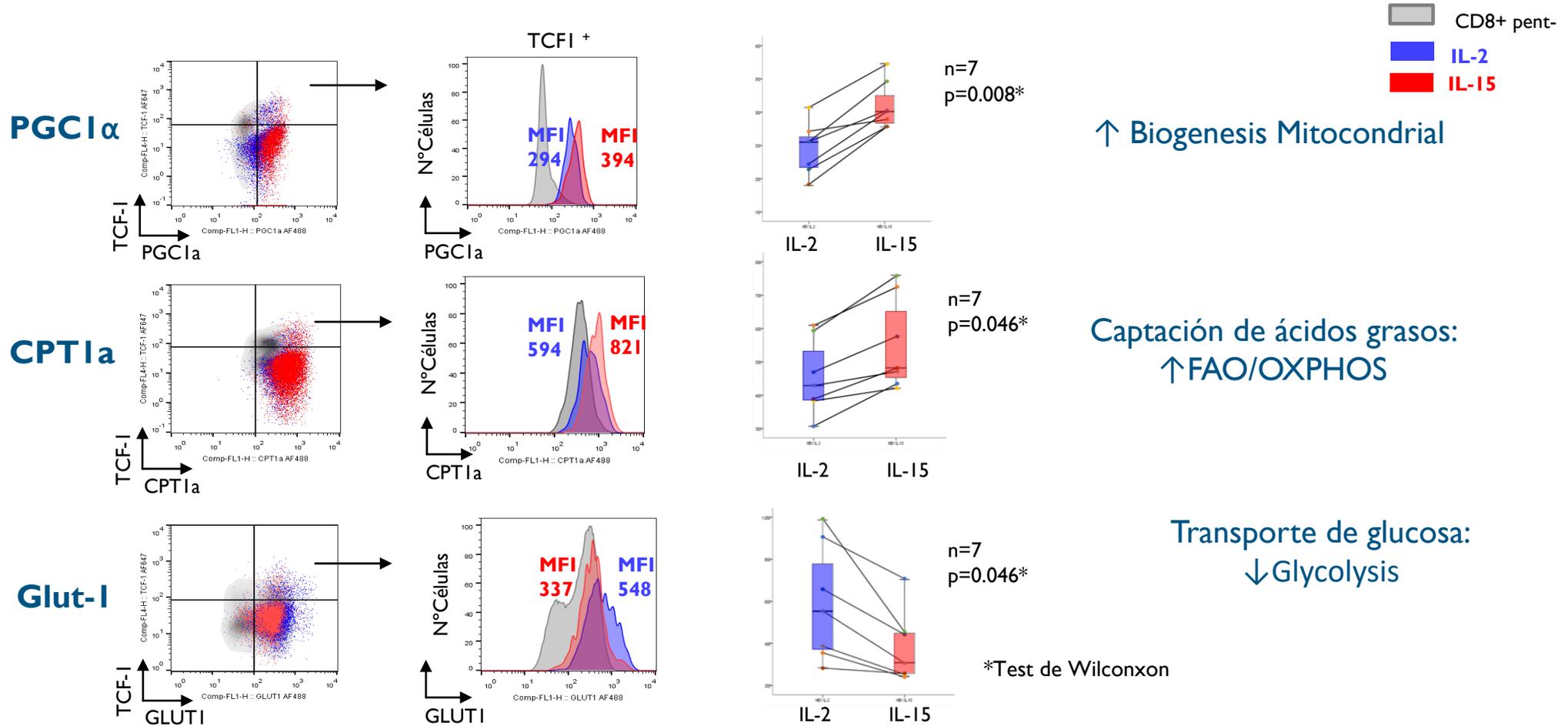
En paralelo, observamos el nivel de fosforilación de la proteína ribosomal S6, como marcaje de la activación de mTORC1 y por tanto de la producción de proteínas, y observamos que se sobreexpresaba en los días 3-5 en la células progenitoras y a partir del día 5 en la progenie.

Seleccionamos el día 5 para observar las progenitoras y el día 10 para observar la progenie

RESULTADOS: EFECTO DE LA IL-15 SOBRE EL METABOLISMO MITOCONDRIAL



Progenitoras

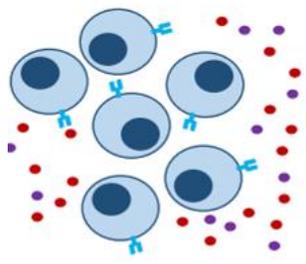


↑ Biogenesis Mitocondrial

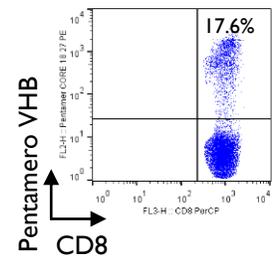
Captación de ácidos grasos:
↑FAO/OXPHOS

Transporte de glucosa:
↓Glycolysis

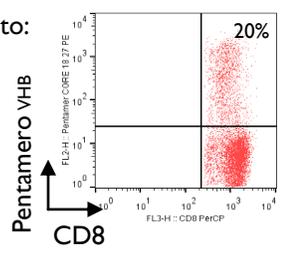
RESULTADOS: EFECTO DE IL-15 SOBRE LAS CAPACIDADES EFECTORAS



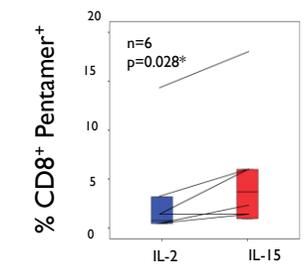
Frecuencia de células T CD8 VHB específicas



n° absoluto: 6574

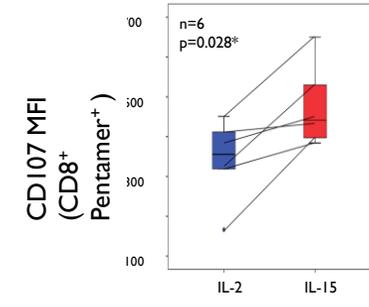
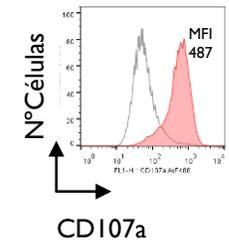
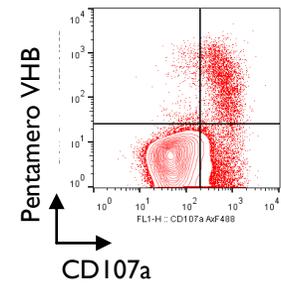
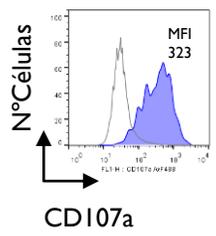
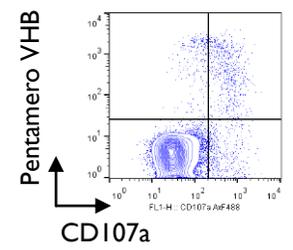


n° absoluto: 51617

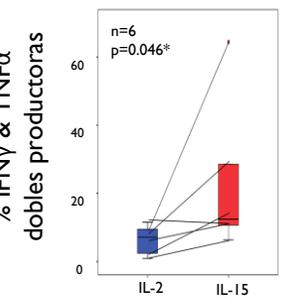
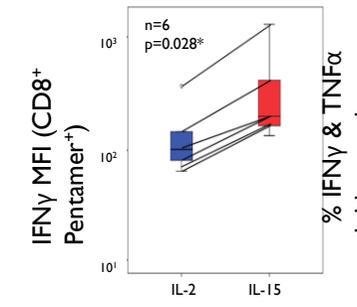
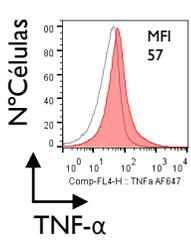
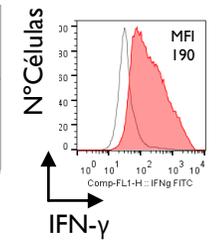
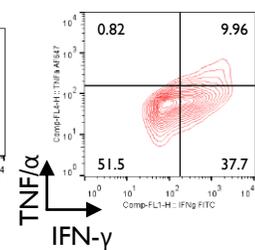
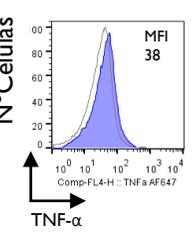
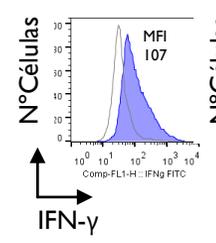
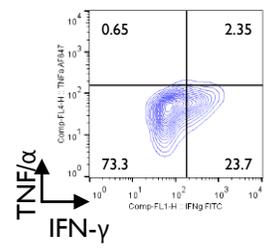


*Test de Wilconxon
IL-2 (blue)
IL-15 (red)

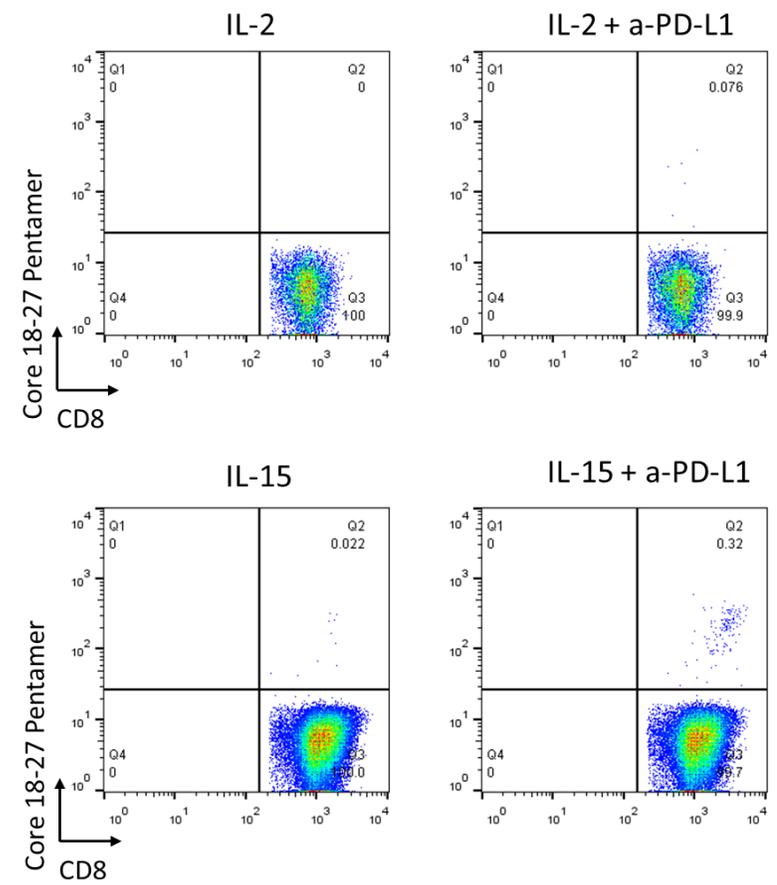
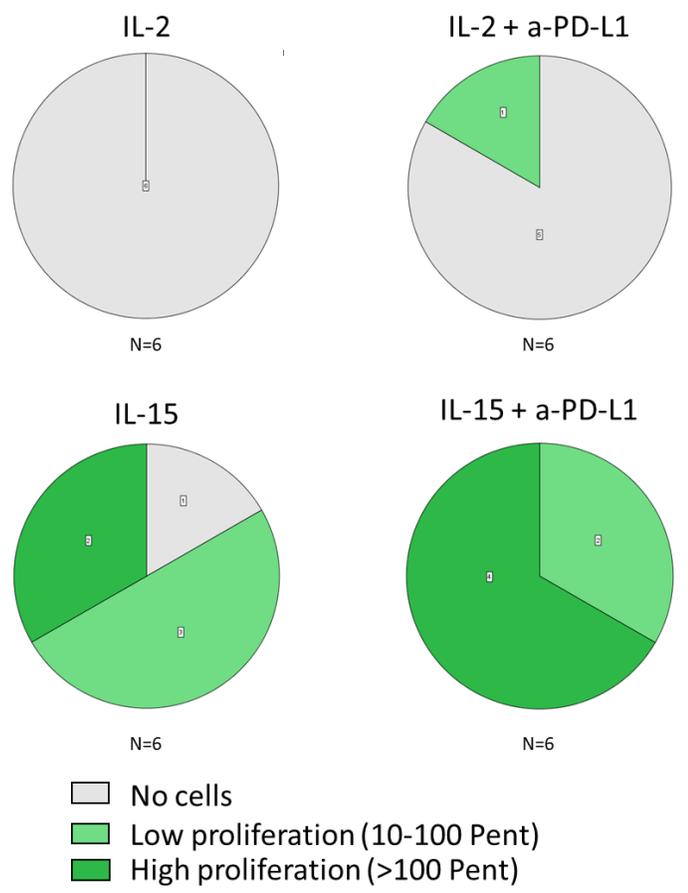
CD107a

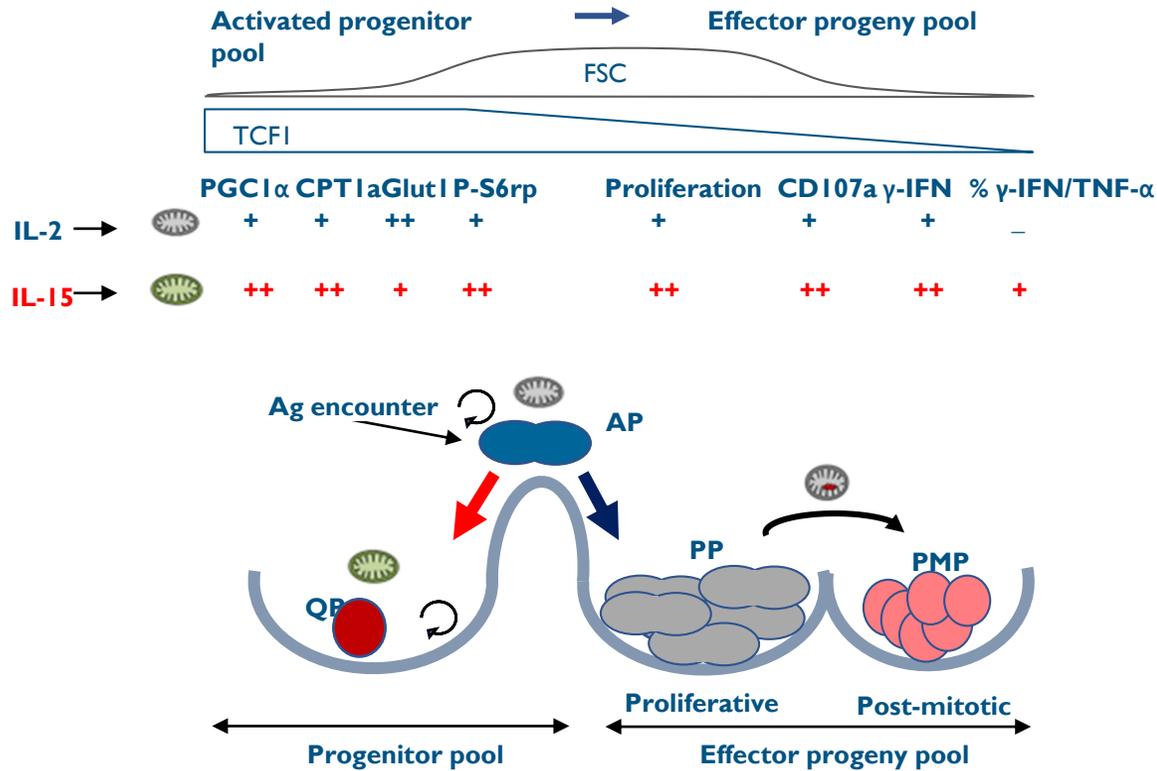


IFN/TNF



RESULTADOS : EFECTO SINÉRGICO DE α PD-L1 + IL-15





- Las células progenitoras TCF-1+ dan lugar a la progenie TCF-1- y somos capaces de detectar los distintos pools de células T CD8+ VHB-específicas
- IL-15 es capaz de restaurar el **metabolismo mitocondrial** de las células T CD8-VHB específicas progenitoras
- IL-15 restaura además la **función efectora** de las células T CD8-VHB específicas que serán capaces de proliferar más y producir mayor cantidad de citoquinas (IFNγ, TNFα, CD107a)
- El tratamiento combinado de IL-15 + aPD-L1 tiene un efecto sinérgico y podría utilizarse como estrategia de tratamiento in vitro para revigorizar las células T CD8-VHB específicas para su posterior transferencia adoptiva a los pacientes con hepatitis crónica por virus B.

FINANCIACIÓN



AGRADECIMIENTOS:

PACIENTES

SERVICIO DE HEPATOLOGIA TRASLACIONAL HOSPITAL DE GUADALAJARA

INSTITUTO DE SALUD CARLOS III/ EUROPEAN REGIONAL DEVELOPMENT FUND

julia.pena@edu.uah.es