

Annabelle Vogt¹, Regina M. Hillebrand², Esther Raskopf¹, Ingo H. Schmidt-Wolf¹, Christian P. Strassburg¹, Maria A. Gonzalez-Carmona¹

¹Departamento de Medicina General del Hospital Universitario de Bonn ²Centro de Oncología integrada (CIO) del Hospital Universitario de Bonn

Introducción:

Células dendríticas (CD) son células profesionales presentadoras de antígenos con capacidad de iniciar una respuesta de células T de antígeno específica. La co-estimulación entre las células presentadoras de antígeno y las células efectoras T es esencial para una respuesta inmunológica efectiva. Una interacción clave en este contexto es la interacción de CD40/CD40Ligando (CD40L). En trabajos anteriores, nuestro grupo mostró que la utilización de CD40L fortalece la respuesta inmunológica de CD contra el HCC *in vivo*. En este nuevo trabajo hemos estudiado el efecto de CD40L en CD humanas y en la respuesta inmunológica frente a células tumorales de carcinoma hepatocelular y colangiocelular.

Métodos:

Para la expresión de CD40L se construyeron adenovectores codificadores del CD40L humano (Ad-hCD40L). CD procedentes de adultos sanos fueron pulsadas con lisados tumorales el día +5 y transducidas con Ad-CD40L el día +6. En el día +8 se estudió la expresión de diferentes marcadores de CD mediante citometría de flujo y de citoquinas mediante ELISA. En el día +8 las CD fueron cocultivadas con efectores celulares citoquin-inducidos autólogos (CIK). Posteriormente se evaluaron el grado de proliferación mediante un test de MTT así como la capacidad citotóxica frente a células tumorales de carcinoma hepatocelular (HepG2, Huh7 y CCL13) y de carcinoma colangiocelular (EGI-1 y Mz-ChA-2). La inducción de apoptosis fue estudiada determinando la fracción Sub-G1.

Resultados:

La transducción de CD con Ad-hCD40L indujo una expresión de CD40L en 35% de las CD y un aumento significativo de CD83 (90%) y de la chemoquina CCR7 (60%). Además, la expresión de CD40L inducía una mayor expresión de citoquinas Th1, como IL-12 e IFN γ . CD pulsadas con lisados tumorales y transducidas con Ad-hCD40L inducían una mayor proliferación de las células efectoras, así como una mayor citotoxicidad específica frente a células tumorales de carcinoma hepatocelular (HepG2, Huh7 y CCL13) y células tumorales de carcinoma colangiocelular (EGI-1 y Mz-ChA-2) en comparación con los controles ($p < 0,05$). Por último, el sobrenadante de hCD40L-CD aumentaba significativamente la cantidad de células tumorales en apoptosis en comparación con los sobrenadantes de CD transducidas con Ad-Mock o CD sin transducción adenoviral.

Discusión:

Los datos presentados muestran que la expresión mediante adenovirus de CD40L llevan a un aumento significativo de la estimulación inmunológica de las CD pulsadas con antígenos tumorales caracterizada por una mayor expresión de moléculas co-estimuladoras, chemoquinas y citoquinas de Th1. Esta mayor estimulación se traslada a su vez en un incremento de la proliferación de células efectoras así como mayor citotoxicidad y apoptosis de células tumorales de carcinoma hepatocelular y colangiocelular. En resumen los datos muestran que CD40L representa una propuesta prometedora para mejorar la terapia inmunológica con CD de los carcinomas hepatocelular y colangiocelular.

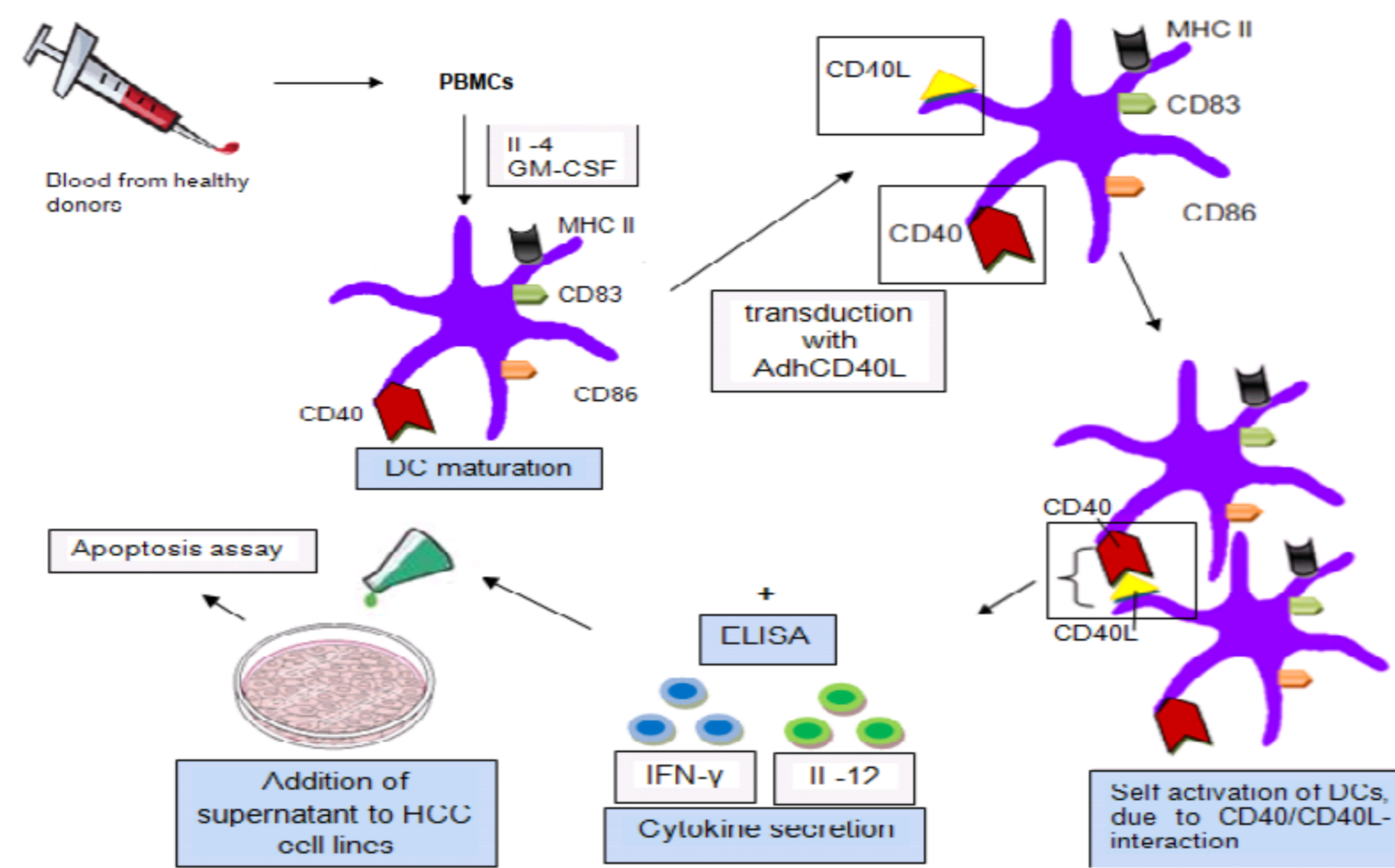


Figura 1: Representación esquemática del experimento. Células dendríticas procedentes de sangre periférica de adultos sanos fueron pulsadas con lisados tumorales de carcinoma hepatocelular y carcinoma colangiocelular el día +5 y transducidas con los vectores adenovirales Ad-hCD40L o Ad-Mock el día +6. En el día +8 las CD fueron caracterizadas y cocultivadas con efectores celulares citoquin-inducidos autólogos (CIK).

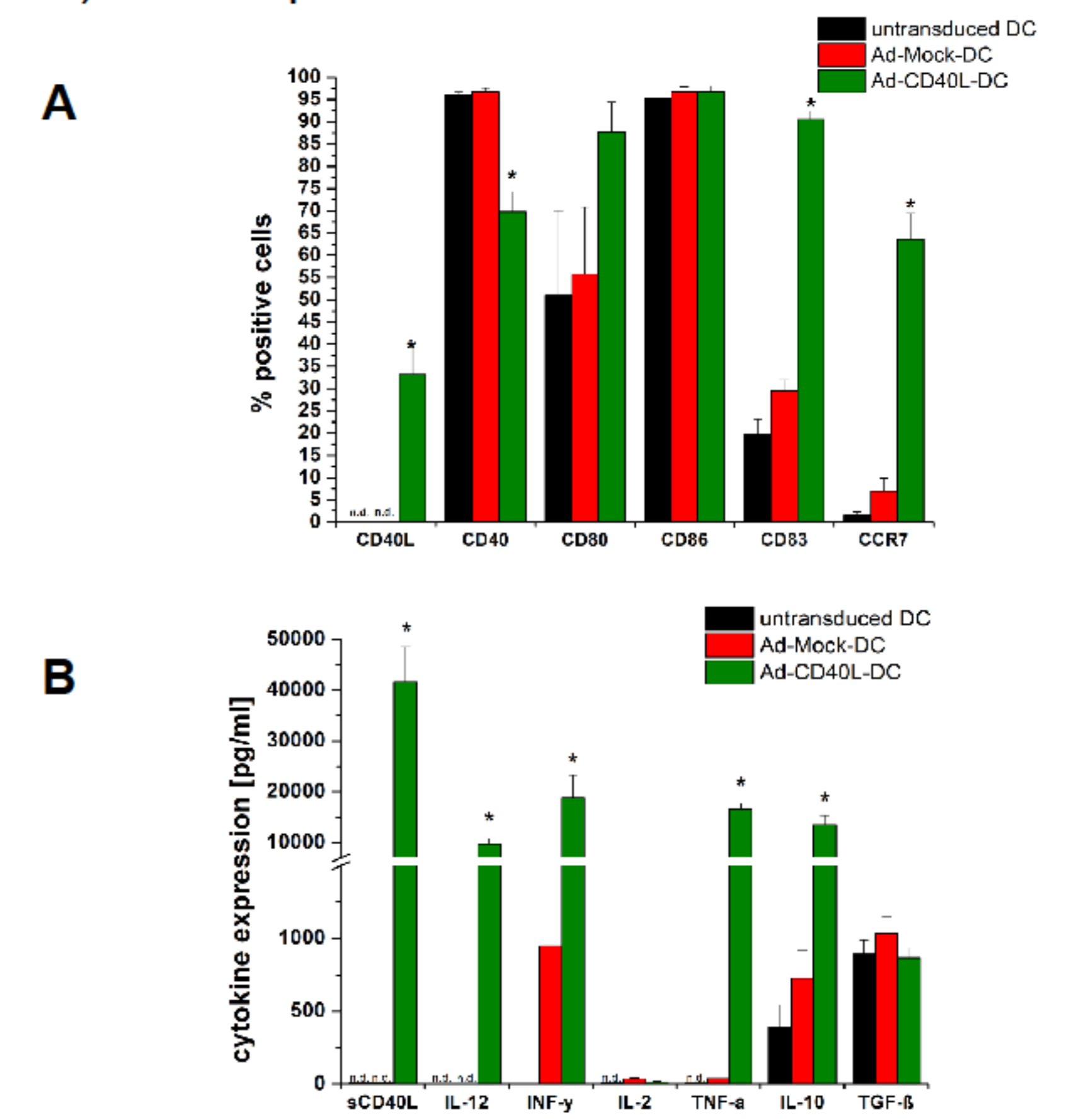


Figura 2: Citometría de flujo de diferentes marcadores superficiales y moléculas co-estimuladoras (A). Expresión de citoquinas en el sobrenadante de las células dendríticas mediante ELISA 48 h después de las transducción con Ad-hCD40L.

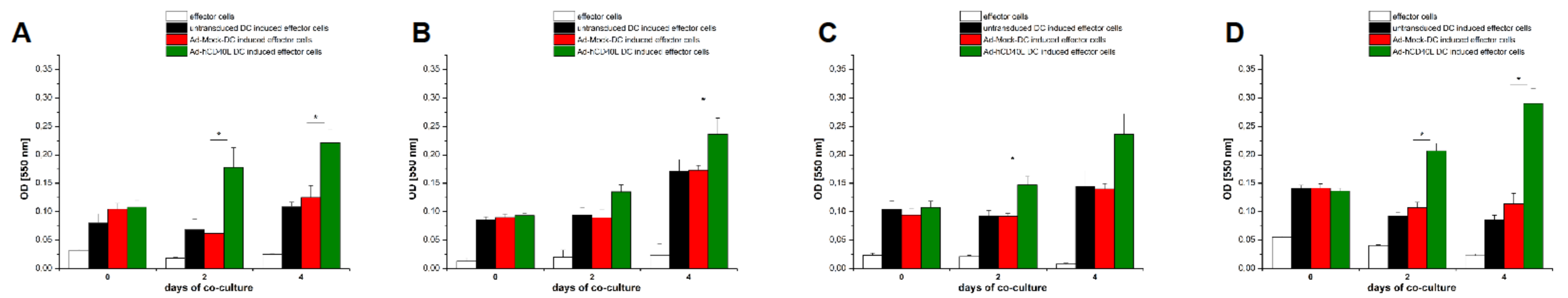


Figura 3: Proliferación de efectores celulares citoquin-inducidos autólogos (CIK) mediante MTT tras ser co-cultivados con células dendríticas transducidas con Ad-hCD40L, Ad-Mock o sin transducción. Las gráficas representan los valores medios y la desviación estándar. * $p < 0,05$. (A: proliferación de CIK frente a células Huh-7, B: células HepG2; C: células CCL13; D: células EGI-1).

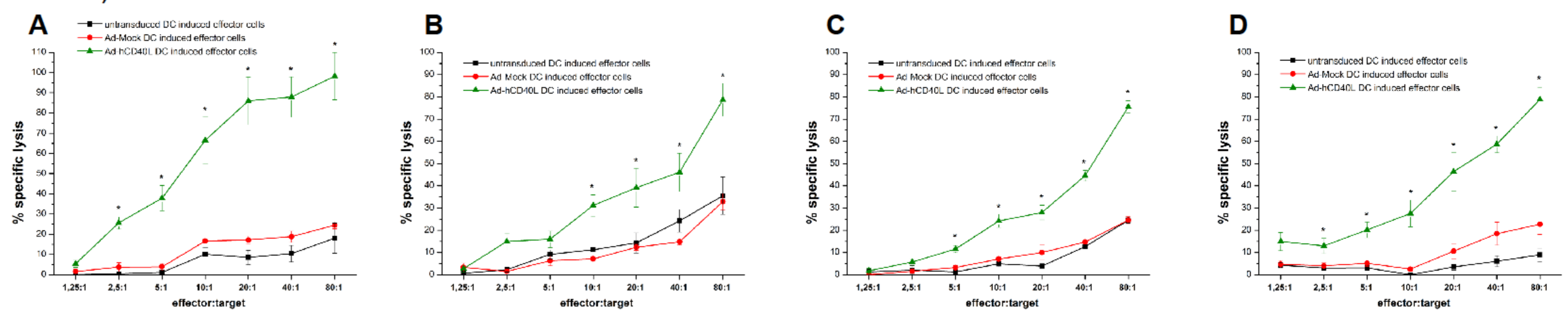


Figura 4: Citotoxicidad de efectores celulares citoquin-inducidos autólogos (CIK) frente a células de carcinoma hepatocelular humano Huh7 (A), HepG2 (B) y CCL13 (C), así como frente a células de carcinoma colangiocelular EGI-1 (D). Las células CIK fueron previamente co-cultivadas con las células dendríticas durante 4 días. La citotoxicidad fue calculada mediante el Cytotox One Assays. Las gráficas representan los valores medios y la desviación estándar. * $p < 0,05$.

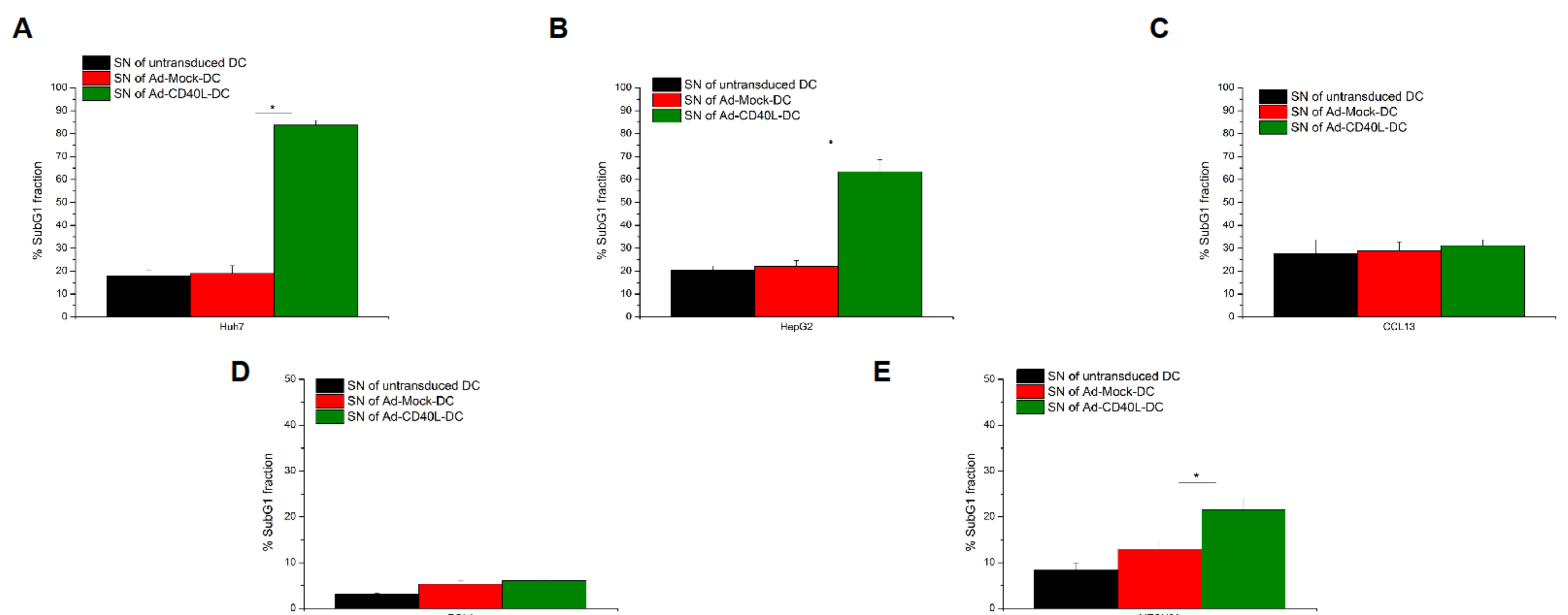


Figura 5: Inducción de apoptosis en células tumorales humanas de carcinoma hepatocelular (Huh-7, HepG2 y CCL-13) y carcinoma colangiocelular (EGI-1 y Mz-ChA-2) mediante determinación de la fracción Sub-G1 por análisis de citometría de flujo.