



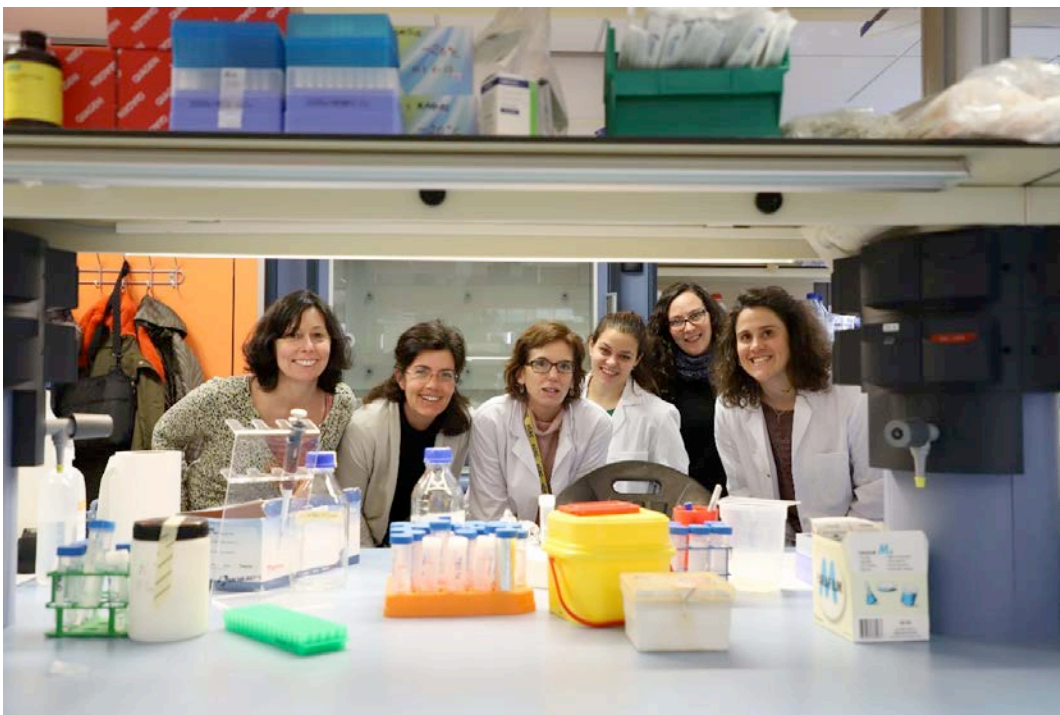
Fundació
La Marató de TV3

19è SIMPOSIUM
Càncer

PAPER DE LA PROTEÏNA SCAVENGER Sp α EN LA INTERACCIÓ ENTRE MACRÒFAGS, CÈL·LULES HEPÀTIQUES ESTRELLADES I HEPATÒCITS EN EL CÀNCER DE FETGE

Maria Rosa Sarrias Fornés

Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol



1. Resum del projecte

Més d'un 80% de la massa total del fetge està formada per hepatòcits. En condicions normals, els hepatòcits regulen funcions essencials bioquímiques, metabòliques i immunològiques. Tanmateix, una agressió crònica, la inflamació subsegüent i la fibrosi descontrolada poden conduir finalment a la seva transformació neoplàsica. El carcinoma hepatocel·lular (HCC) és el principal tipus de càncer de fetge, el cinquè càncer més freqüent i la tercera causa més freqüent de mort per càncer en el món.

El microambient tumoral (TME) és un factor clau en la regulació de la transformació neoplàsica, el creixement i la invasió tumoral, l'evasió immune de l'hoste i, fins i tot, la resistència terapèutica. El TME es compon de cèl·lules, factors solubles, molècules de senyalització, matriu extracel·lular i forces mecàniques. El nostre objectiu principal va ser estudiar les interaccions del TME a l'HCC. Més específicament ens hem centrat en la intercomunicació entre dos tipus de cèl·lules hepàtiques clau, és a dir, els macròfags i les cèl·lules estrellades hepàtiques (HSC), amb els hepatòcits. Els nostres estudis funcionals s'han centrat en l'activitat de CD5L (anteriorment anomenada Spq), una proteïna secretada per macròfags que actua com a moduladora de l'activitat inflamatòria del macròfag, un mecanisme clau del desenvolupament de l'HCC. El nostre segon objectiu, amb una orientació més clínica, es basa en els resultats anteriors, en els quals es van determinar canvis significatius en els nivells de CD5L de plasma entre els pacients cirròtics i HCC, i pretén explorar el potencial de CD5L com a eina de diagnòstic per millorar la gestió del pacient HCC.

Els objectius específics del projecte van ser:

1. Determinació del paper de CD5L en la comunicació intercel·lular que porta a la progressió tumoral i a la invasió.
2. Detecció de l'expressió de CD5L i col·localització amb tipus cel·lulars específics en teixits HCC humans.

3. Determinació del valor de CD5L com a biomarcador de la hipertensió portal i complicacions derivades. Determinació dels nivells plasmàtics de CD5L en pacients cirròtics i amb HCC amb diferents graus d'hipertensió portal.

2. Resultats obtinguts

L'objectiu general del projecte era estudiar el paper de la proteïna CD5L en el context del microambient proinflamatori i profibrogènic que té lloc en el càncer de fetge. Hem analitzat la fisiologia i comunicació de tres tipus cel·lulars clau en el fetge: les cèl·lules hepàtiques estrellades (HSC), els macròfags, i els hepatòcits. També hem avaluat el valor diagnòstic i pronòstic de CD5L en dany hepàtic, inclòs el càncer hepatocel·lular (HCC).

Hem estudiat mecanismes clau en fibrosi, molt freqüentment un estat que desencadena en cirrosi i HCC, utilitzant cèl·lules estrellades aïllades de teixit i un model de ratolí de fibrosi induïda amb tetraclorur de carboni. Hem determinat que CD5L havia augmentat en els fetges dels ratolins lesionats. Per avaluar *in vivo* el paper de CD5L en el dany hepàtic i la fibrosi, hem administrat CD5L recombinant en aquests ratolins i hem estudiat per tècniques d'immunohistoquímica, immunofluorescència, RT-qPCR, transferència de proteïnes (*western blotting*) i citometria de flux la capacitat d'aquesta proteïna d'alterar la fibrosi, el dany hepàtic i la inflamació generada. El nostre estudi identifica per primera vegada CD5L com a actor clau en la fibrosi hepàtica. Actualment estem redactant el manuscrit amb aquests resultats i l'enviarem a publicar ben aviat. Finalment, volem afegir que en aquest àmbit hem col·laborat també en l'estudi d'una altra molècula secretada al microambient hepàtic, la pentraxina-3 (PTX3). El 2017 es va publicar en la revista *Hepatology* un treball sobre el paper de la PTX3. En aquest treball es presentaven evidències experimentals i de mostres humanes que suggereixen que, a més de ser un biomarcador potencial per a l'hepatitis alcohòlica, la PTX3 frena el dany hepàtic i la inflamació induïts per LPS (2).

Pel que fa a la **resposta del macròfag**, els nostres resultats indiquen que CD5L indueix un patró antiinflamatori en macròfags a través de l'activació de l'autofàgia. L'autofàgia és

un procés catabòlic en el qual el citoplasma, incloent l'excés d'òrgànuls o els deteriorats o aberrants, són segregats en vesícules de doble membrana i alliberats dins el lisosoma o vacúol per a descompondre'ls i eventualment reciclar-ne les macromolècules resultants. Els estudis més recents apunten que l'autofàgia, a més de constituir un procés reparatiu, està implicada en fenòmens de mort cel·lular i càncer.

La inducció de mecanismes d'autofàgia per CD5L s'assoleix a través del receptor scavenger de superfície cel·lular CD36, un receptor multiligand expressat en una àmplia varietat de tipus de cèl·lules. Les nostres dades representen la primera evidència que CD36 està implicat en l'autofàgia i apunten a una contribució significativa de l'eix CD5L-CD36 en la inducció de l'autofàgia en macròfags (3, 4).

A continuació, hem estudiat la participació de CD5L en el càncer de fetge. La immunohistoquímica de CD5L en 60 teixits HCC i 34 cirròtics no tumorals adjacents ens ha mostrat marcatge de CD5L en macròfags i hepatòcits. Per quantificar l'expressió de CD5L en els macròfags hem dut a terme **estudis d'immunofluorescència**, que han mostrat que l'expressió elevada de CD5L en macròfags (detectats amb CD68) s'associa a taxes de supervivència més baixes. Per comprendre millor les accions de CD5L en macròfags, hem establert un model *in vitro* que permet comparar els canvis fenotípics i funcionals induïts per CD5L amb els induïts per estímuls de polarització establerts (IFN/LPS, IL4 i IL10). Hem estudiat marcadors fenotípics mitjançant RT-qPCR i citometria de flux i hem construït un algoritme matemàtic per analitzar-los. També hem comparat la resposta inflammatòria a LPS, les capacitats fagocítiques i la inducció de l'autofàgia. Col·lectivament, els resultats mostren que CD5L condueix els monòcits a un fenotip M2 (5). Les nostres dades representen la primera evidència que CD5L s'expressa en macròfags en HCC. A més, suggereixen que CD5L indueix un fenotip i diverses funcions en monòcits que afavoririen un microambient tumoral més permissiu. En conseqüència, CD5L podria ser un objectiu potencial per a futures teràpies dirigides per polarització de macròfags en càncer de fetge. Hem generat diverses eines i estem treballant en aquesta direcció.

Per altra banda, en les mateixes mostres de teixit, **la tinció immunohistoquímica** de CD5L en hepatòcits va ser més important en el tumor que en el teixit no tumoral. Curiosament, el CD5L elevat es correlaciona amb la proliferació elevada (Ki67) i una supervivència més baixa. En conseqüència, hem detectat l'expressió de CD5L a **les línies cel·lulars del càncer de fetge** Huh7, HepG2 i SNU-398. Hem demostrat també que CD5L promou la formació de colònies i la proliferació cel·lular i protegeix contra l'apoptosi induïda per l'agent quimioterapèutic cisplatí. Per trobar una explicació molecular a aquestes funcions, hem identificat nous lligands de CD5L en les cèl·lules de càncer de fetge mitjançant immunoprecipitació seguida d'espectrometria de masses. Entre els lligands, hem seleccionat i validat la xaperona molecular de la resposta a proteïnes desplegadas (UPR), HSPA5, per a la seva validació. Els estudis funcionals van revelar que CD5L activa els mecanismes d'UPR i autofàgia en cèl·lules Huh7, de manera que es proporciona un nou vincle molecular entre la UPR i l'autofàgia en el càncer de fetge (6).

CD5L es troba circulant en sèrum/plasma en grans quantitats. En aquest sentit, en estudis previs havíem observat **canvis significatius en els nivells de CD5L de plasma** entre els pacients cirròtics i HCC, i també preteníem explorar el potencial de CD5L com a eina de diagnòstic per millorar la gestió del pacient HCC. Hem completat una col·lecció de mostres de donants sans ($n = 8$) i de donants amb hepatitis crònica ($n = 91$), amb cirrosi ($n = 90$) i HCC ($n = 180$). Les dades clíniques associades inclouen 90 paràmetres clinicopatològics que abasten edat, sexe, diagnòstic, tractament, etiologia, nivells d' α -fetoproteïna, plaquetes, creatinina, sodi, albúmina, presència de varius esofàgiques, Child, FIB4, recidiva, invasió o BCLC, entre d'altres. Fent servir un equip d'ELISA que hem desenvolupat al laboratori, hem observat correlacions interessants entre els nivells plasmàtics de CD5L i certes complicacions de la cirrosi.

En conclusió, hem abordat amb èxit els objectius proposats. Els nostres resultats suggereixen un paper clau de CD5L en els processos cel·lulars de resposta al dany hepàtic. Molts d'aquests resultats han estat publicats i d'altres són la base d'estudis que s'estan desenvolupant amb l'objectiu de continuar desxifrant aquests mecanismes complexos i assolir la transferència a la pràctica clínica.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

Els nostres resultats suggereixen que CD5L té una funció clau en patologia hepàtica en la comunicació entre els diferents tipus cel·lulars implicats. El desenvolupament d'un tumor en HCC generalment és causat per un dany crònic en el fetge, que provoca una inflamació persistent i una fibrosi descontrolada. Nosaltres hem abordat tant el procés fibròtic com l'estadi final de la malaltia, l'HCC.

En fibrosi hepàtica, hem determinat que la utilització d'una forma recombinant de CD5L *in vivo* en ratolins podria modular el procés fibròtic i inflamatori, per tant, els nostres coneixements obren la porta a noves teràpies basades en l'ús d'aquesta proteïna, anàlegs o derivats. Aquesta troballa podria tenir grans implicacions terapèutiques per al maneig clínic d'aquesta patologia i obre la porta a nous estudis funcionals que durem a terme aviat.

Igualment, en HCC —objectiu central del nostre estudi—, hem determinat la rellevància de la intercomunicació cel·lular, com postulàvem en la nostra hipòtesi. Les cèl·lules tumorals hepàtiques secreten factors solubles que modifiquen el comportament del macròfag. Un dels factors (CD5L) podria ser una diana terapèutica. La seva inhibició amb un anticòs monoclonal generat al laboratori facilita la reprogramació del macròfag *in vitro*. Estem iniciant experiments preclínic per abordar-ne el possible ús terapèutic i ja ens hem posat en contacte amb empreses farmacèutiques que han mostrat interès pel producte. L'anticòs anti-CD5L que hem desenvolupat i estudiat gràcies a aquest projecte podria tenir un impacte terapèutic en el maneig del pacient amb HCC i altres neoplàsies on el macròfag tingui un paper rellevant.

A més a més, en HCC hem trobat una nova via per la qual la cèl·lula tumoral prolifera i es protegeix de l'apoptosi. Aquesta troballa (l'eix CD5L-HSPA5-UPR i la seva relació amb l'autofàgia) és d'un àmbit més bàsic, però és molt rellevant atesa la importància d'aquestes vies cel·lulars en l'homeòstasi de la cèl·lula tumoral.

Finalment, hem determinat que CD5L podria ser un marcador plasmàtic de certes complicacions de la cirrosi. Aquest resultat suggereix que CD5L podria ser una eina mínimament invasiva per al seguiment de pacients, la qual cosa milloraria molt el seu maneig clínic. Actualment estem desenvolupant un equip d'ELISA que permeti fer aquests mesuraments en la pràctica clínica.

4. Bibliografia científica generada

1. Perea L, Coll M, Sanjurjo L, Blaya D, Taghdouini AE, Rodrigo-Torres D, Altamirano J, Graupera I, Aguilar-Bravo B, Llopis M, *et al.*
Pentraxin-3 modulates lipopolysaccharide-induced inflammatory response and attenuates liver injury. Hepatology (2017) doi:10.1002/hep.29215.
2. Bárcena C, Aran G, Perea L, Téllez É, Sanjurjo L, Masnou H, García M, Kremer L, Sala M, Armengol C, Sancho-Bru P, Sarrias MR.
Manuscrit en preparació.
3. Sanjurjo L, Amézaga N, Aran G, Naranjo-Gómez M, Arias L, Armengol C, Borrás FE, Sarrias MR.
The human CD5L/AIM-CD36 axis: A novel autophagy inducer in macrophages that modulates inflammatory responses.
Autophagy (2015) 11:487–502. doi:10.1080/15548627.2015.1017183.
4. Sanjurjo L, Aran G, Roher N, Valledor AF, Sarrias MR.
AIM/CD5L: a key protein in the control of immune homeostasis and inflammatory disease.
J Leukoc Biol (2015) 98:173–84. doi:10.1189/jlb.3RU0215-074R.
5. Sanjurjo L, Aran G, Téllez É, Amézaga N, Armengol C, López-Codina D, Prats C.
M-RS. CD5L promotes M2 macrophage polarization through autophagy-mediated upregulation of ID3. Front Immunol. 2018 Mar 12;9:480. doi: 10.3389/fimmu.2018.00480.

6. Aran G, Sanjurjo L, Bárcena C, Simon-Coma M, Téllez É, Vázquez-Vitali M, Garrido M, Guerra L, Díaz E, Ojanguren I, Elortza F, Planas R, Sala M, Armengol C, Sarrias MR. *CD5L is upregulated in hepatocellular carcinoma and promotes liver cancer cell proliferation and antiapoptotic responses by binding to HSPA5 (GRP78).* FASEB J. 2018 Feb 20:fj201700941RR. doi: 10.1096/fj.201700941RR. (Publicació electrònica prèvia a la impressió.)