

Efecto inmunomodulador de micropartículas derivadas de monocitos estimulados con inhibidores de las Janus Kinasas

Ana María Daza-Zapata^{1,2}, Mauricio Rojas-López^{1,3}

RESUMEN

Introducción

Los inhibidores de las Janus Kinasas (**JAKi**), utilizados para el tratamiento de malignidades, enfermedades autoinmunes y de inmunodeficiencias, inducen eventos adversos como la a trombosis y neutropenia. En líneas de hepatocarcinoma y mieloma humanos, los JAKi promueven la exposición de la fosfatidil serina vinculada apoptosis. Los JAKi inhiben la activación de linfocitos T, su proliferación y producción de INF γ . La activación como la muerte celular pueden generar Vesículas Extracelulares (**EV**), estructuras derivadas de la membrana plasmática que tienen un tamaño entre 100 y 1000 nm, pueden contener organelos, ácidos nucleicos, citoquinas y pueden tener en su superficie integri- nas, selectinas y lípidos mediando su interacción con componentes del sistema inmunitario y modulando su actividad. Las EV se consideran como sensores de la homeostasis debido a que reflejan el balance entre la estimulación, la proliferación y la muerte celulares.

El objetivo general es evaluar el efecto modulador de las EV derivadas de fagocitos mononucleares tratados con JAKi sobre componentes del sistema inmunitario de personas sanas. Se determinaron las concentraciones no citotóxicas, pero inhibitorias de cada JAKi. Mononucleares totales de sangre periférica (PBMC) se trataron con diluciones de Baricitinib e Itacitinib por 24 h y se tiñeron con DIOC₆ y PI para evaluar el daño mitocondrial y en membrana plasmática, respectivamente. Las concentraciones no citotóxicas (Itacitinib 25 μ M y Baricitinib 200 nM) inhibieron eficientemente la fosforilación

de STAT1 y la expresión del HLA-DR inducida por IFN γ . A esas dosis de los JAKi, se han tratado promonocitos U937 y linfocitos Jurkat (control); de los sobrenadantes se han aislado las EV mediante centrifugaciones y lavados con PBS para eliminar trazas de los JAKi.

La caracterización de las variaciones en el número, tamaño relativo y fenotipo de las EV derivadas Jurkat y U937 por citometría de flujo, mediante la evaluación superficial de CD45, HMGB1, Fosfatidil serina, CD4 y HLA-DR, no muestra diferencias en su número, tamaño y fenotipo.

Las EV de ambas líneas tratadas con Itacitinib y Baricitinib, pero no las tratadas con su diluyente, promueven la agregación plaquetaria. Es mayor la agregación inducida por EV derivadas de células tratadas con Itacitinib y aún mayor el efecto en la agregación de las EV derivadas de U937.

Se han hecho ensayos de unión a células de sangre periférica expuestas a las EV marcadas con CFSE. Un 60% de los neutrófilos, un 50% de los monocitos y un 10% de los linfocitos captan las EV derivadas de ambas líneas celulares independiente del tratamiento. Sin embargo, hay una tendencia de dos veces mayor a la internalización de las EV derivadas de U937 tratadas con Itacitinib en comparación con las EV control. Se colige que las EV deben diferir en su composición para que explique los efectos en la agregación plaquetaria y la interacción con leucocitos.

EV aisladas de monocitos de sangre periférica después de 24H de tratamiento con los JAKi se exponen a mononucleares autólogos de sangre periférica de controles teñidos con CFSE, se estimulan con PHA y tratan con las EV por 120 h. Las EV derivadas de monocitos tratados con Itacitinib modulan la proliferación de linfocitos T.

En conclusión, la composición de las EV en lípidos y proteínas es afectada por los JAKi, induciendo causa efectos diferenciales en agregación plaquetaria, unión hacia fagocitos y proliferación de linfocitos T. Se realizará la separación de los **ácidos grasos de las EV mediante cromatografía de gases** y se analizarán con un detector de arreglo de diodos. Se validarán los experimentos mediante ensayos de proliferación realizados con linfocitos de sangre periférica estimulados con PHA

¹ Estudiante de Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en Inmunología

² Grupo de Inmunología celular e Inmunogénica, Sede de Investigación Universitaria (SIU), Universidad de Antioquia (UDEA), Medellín, Colombia

³ Unidad de Citometría de Flujo, Sede de Investigación Universitaria (SIU), Universidad de Antioquia (UDEA), Medellín, Colombia

Correspondencia: . Ana María Daza, Amaria.daza@udea.edu.co. Tel: (574) - 219 64 63

Financiación del proyecto: Colciencias

y tratados con EV aisladas de U937 y Jurkat tratadas con diferentes JAKi y se medirán las citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos de mononucleares.

PALABRAS CLAVE

Monocitos, vesículas extracelulares, Inhibidores de las Janus Kinasas, Baricitinib, Itacitinib.

KEY WORDS

Monocytes, extracellular vesicles, Janus Kinases Inhibitors, Baricitinib, Itacitinib.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baxter, E.J., et al., *Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders*. Lancet, 2005. **365**(9464): p. 1054-61.
2. Constantinescu, S.N., M. Girardot, and C. Pecquet, *Mining for JAK-STAT mutations in cancer*. Trends Biochem Sci, 2008. **33**(3): p. 122-31.
3. Remmers, E.F., et al., *STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus*. N Engl J Med, 2007. **357**(10): p. 977-86.
4. Macchi, P., et al., *Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID)*. Nature, 1995. **377**(6544): p. 65-8.
5. Kubo, S., et al., *Janus Kinase Inhibitor Baricitinib Modulates Human Innate and Adaptive Immune System*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1510.
6. Monaghan, K.A., et al., *The novel JAK inhibitor CYT387 suppresses multiple signalling pathways, prevents proliferation and induces apoptosis in phenotypically diverse myeloma cells*. Leukemia, 2011. **25**(12): p. 1891-9.
7. Fuke, H., et al., *Jak inhibitor induces S phase cell-cycle arrest and augments TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **363**(3): p. 738-44.
8. Burbano, C., et al., *Microparticles That Form Immune Complexes as Modulatory Structures in Autoimmune Responses*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 267590.
9. Saboor, M., et al., *Platelet receptors; an instrumental of platelet physiology*. Pak J Med Sci, 2013. **29**(3): p. 891-6.
10. Mohanty, P., et al., *Both lipid and protein intakes stimulate increased generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells*. Am J Clin Nutr, 2002. **75**(4): p. 767-72.
11. Freyssinet, J.M., *Cellular microparticles: what are they bad or good for?* J Thromb Haemost, 2003. **1**(7): p. 1655-62.