

Reactivitat creuada entre limfòcits T CD8+ infiltrants de vitiligen i de melanoma: implicacions per a la vigilància immunològica antitumoral.

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

Miguel Durán Gálvez
Grau en Biotecnologia

INTRODUCCIÓ

Vitiligen

- Dermatosi autoimmune contra melanòcits (0,5-2% població) [1].
- Patogènesi multifactorial [2]:
 - Limfòcits T CD8+ (SILs) i de memòria.
 - Eix IFN- γ -CXCL9/10-CXCR3.

Melanoma

- Càncer de pell més agressiu (1-2% càncers) [3].
- Molt immunogènic: neoantígens i TILs [4].
- Sobreexpressió PD-L1 [5].

Melanocyte Differentiation Antigens (MDAs).

TYR, TYRP1/2, gp100, MART1.

El vitiligen protegeix contra el melanoma

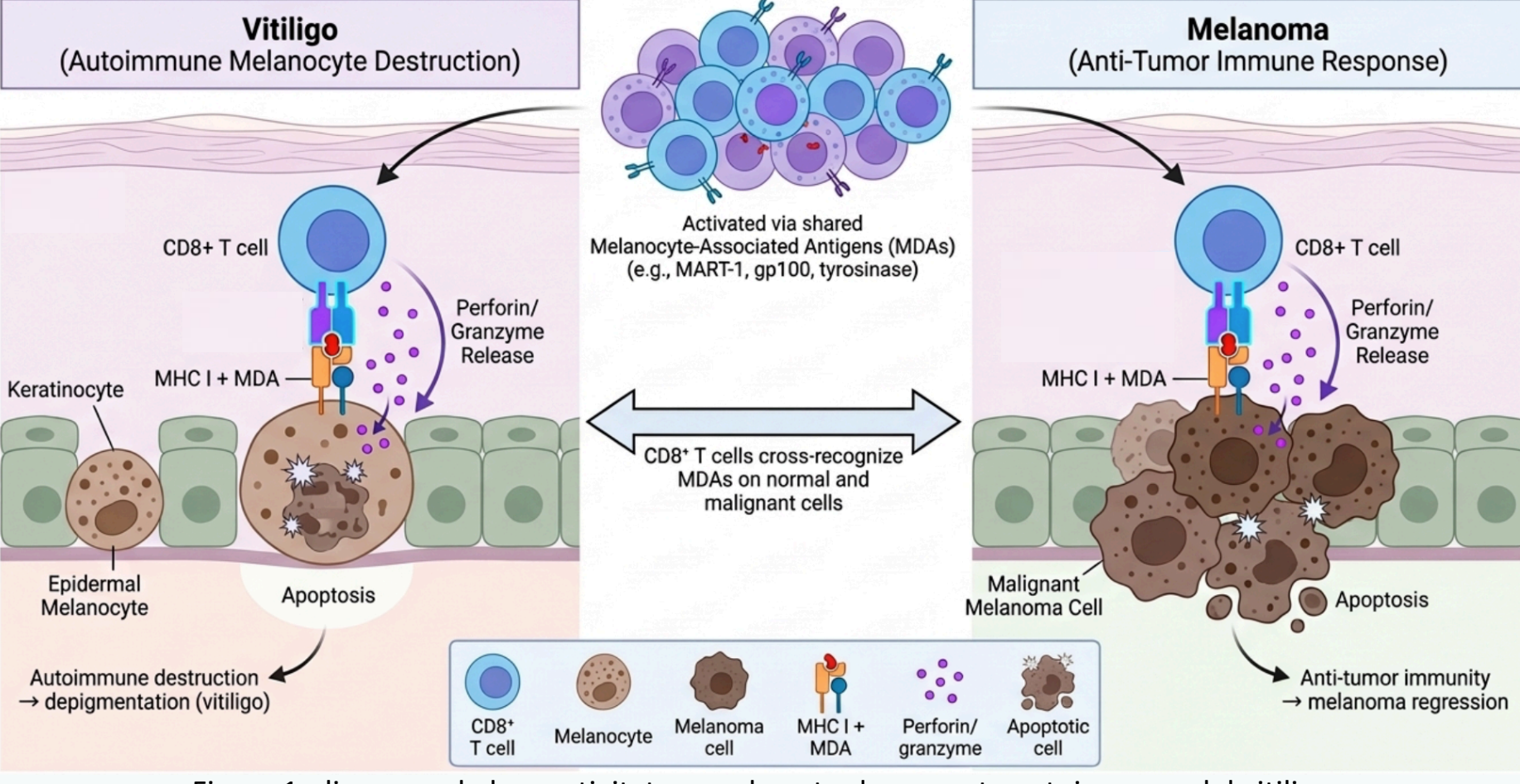


Figura 1: diagrama de la reactivitat creuada entre la resposta autoimmune del vitiligen i la resposta immune antitumoral contra el melanoma
 ↓35% melanoma ↓50% progrès ↓75% mortalitat [5].

HIPÒTESI I OBJECTIUS

Els limfòcits T CD8+ infiltrants de vitiligen (SILs) i de melanoma (TILs) comparteixen clonotips de TCR i especificitat antigènica, actuant com a mecanisme de vigilància immunològica antitumoral.

- Aïllar limfòcits T CD8+.
- Caracteritzar fenotip, clonotip i activació.
- Identificar antígens i neoantígens compartits.
- Avaluar funció antitumoral *in vitro*.
- Validar *in vivo*.

METODOLOGIA

1 Obtenció de mostres

Gradient Ficoll-Plaque

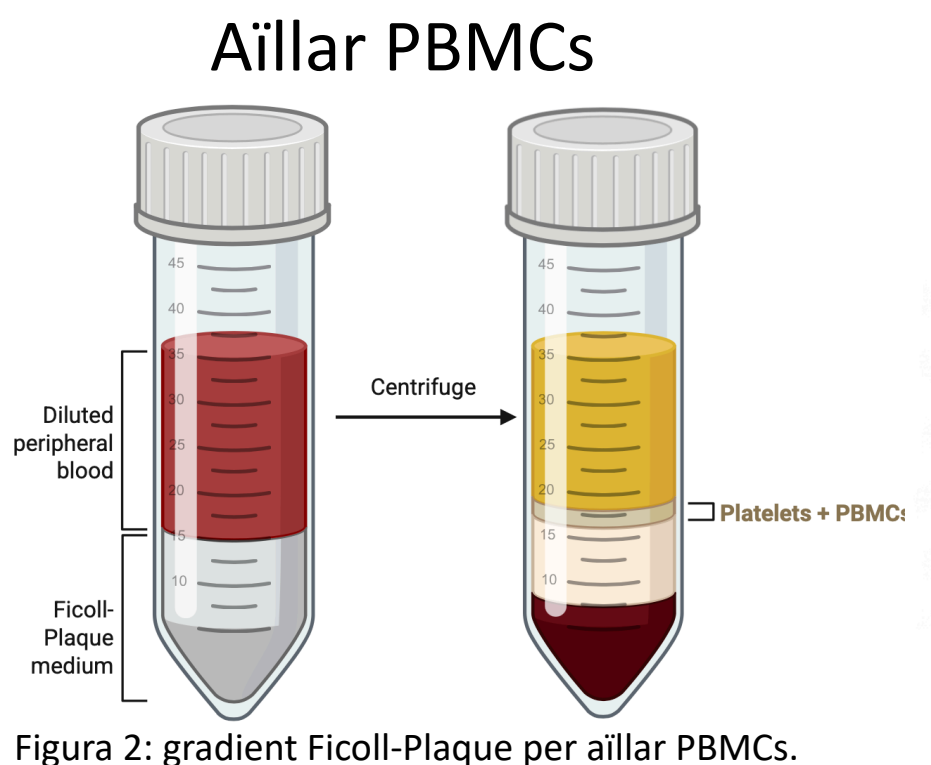


Figura 2: gradient Ficoll-Plaque per aïllar PBMCs.

Biòpsies vitiligen i melanoma

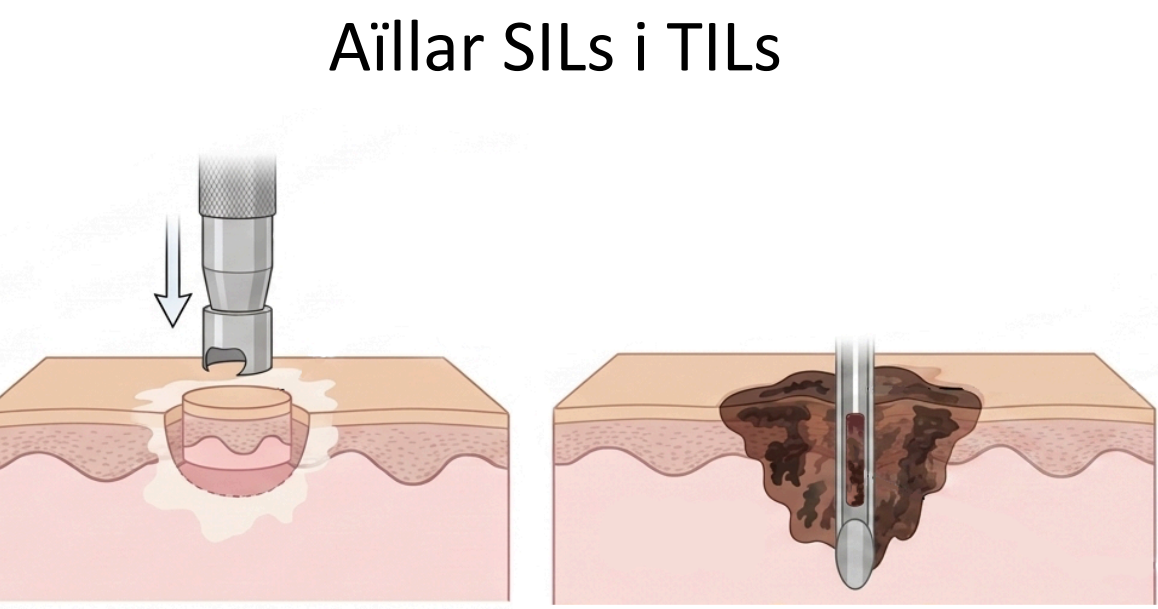


Figura 3: biòpsies per punxó i agulla gruixuda per aïllar SILs i TILs de teixit amb vitiligen i melanoma.

- Backup (congelació).
- Aïllament T CD8+.
- Mostra tumoral.

2 Caracterització fenotípica

Caracterització TCR

Detectar clonotips compartits SILs i TILs

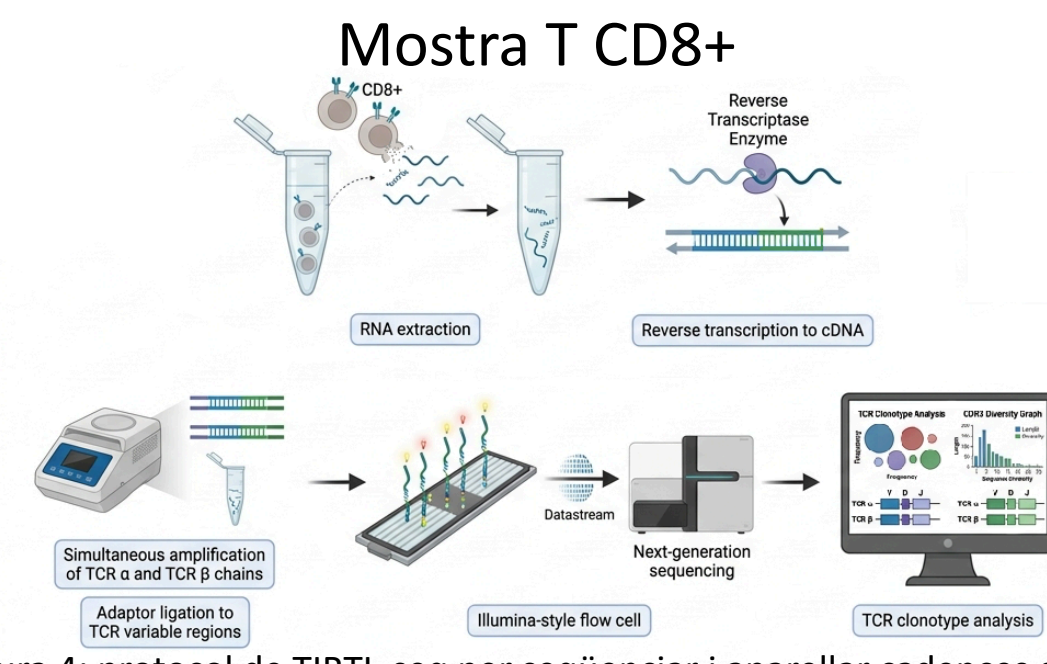


Figura 4: protocol de TIRTL-seq per seqüenciar i aparellar cadenes de TCRs.

Citometria de flux

Marcadors memòria/activació

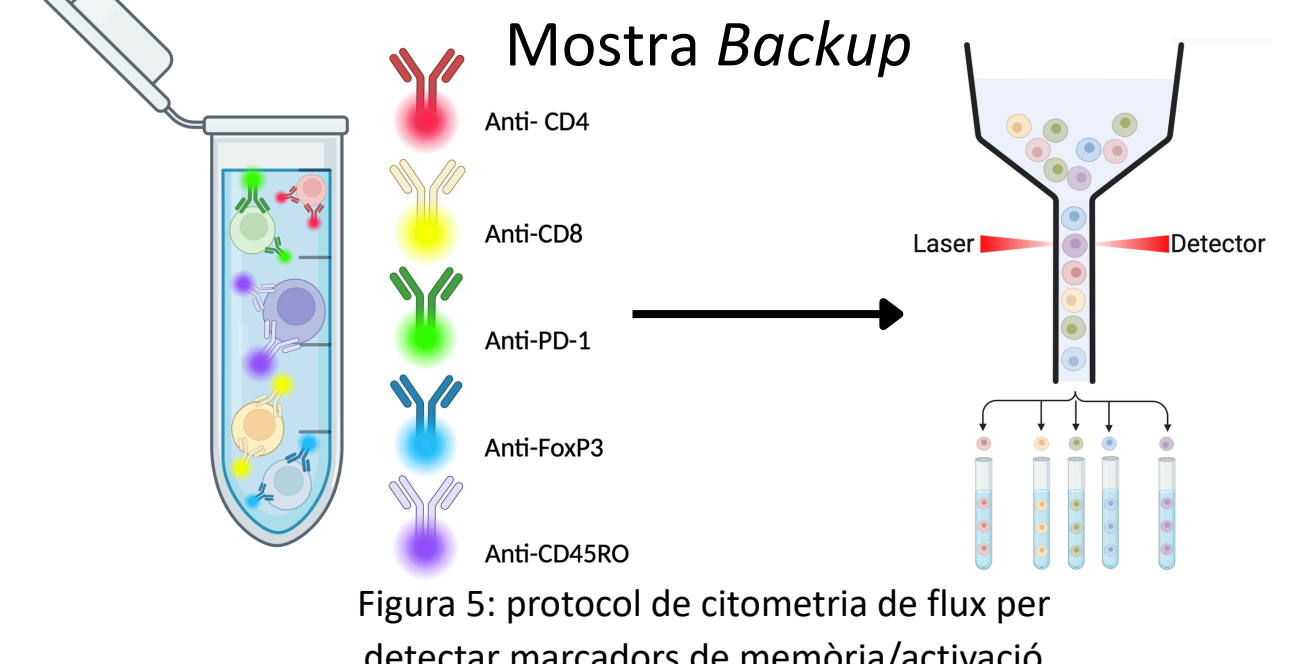


Figura 5: protocol de citometria de flux per detectar marcadors de memòria/activació.

3 Anàlisi d'antígens

Screening amb multimers MHC-I

Identificació antígens clàssics

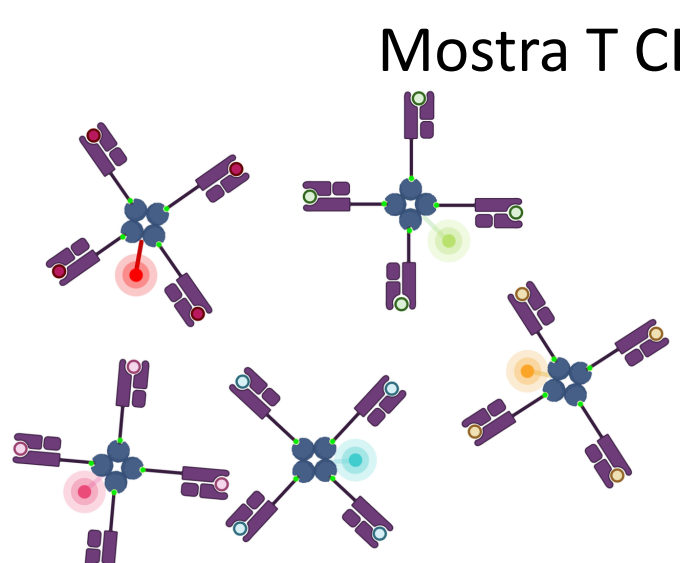


Figura 6: tetràmers amb estreptavidina, quatre MHC-I (HLA-A*0201), b2-microglobulina i els pèptids de MDAs.

Seqüenciació de l'exoma (WES)

Identificació neoantígens

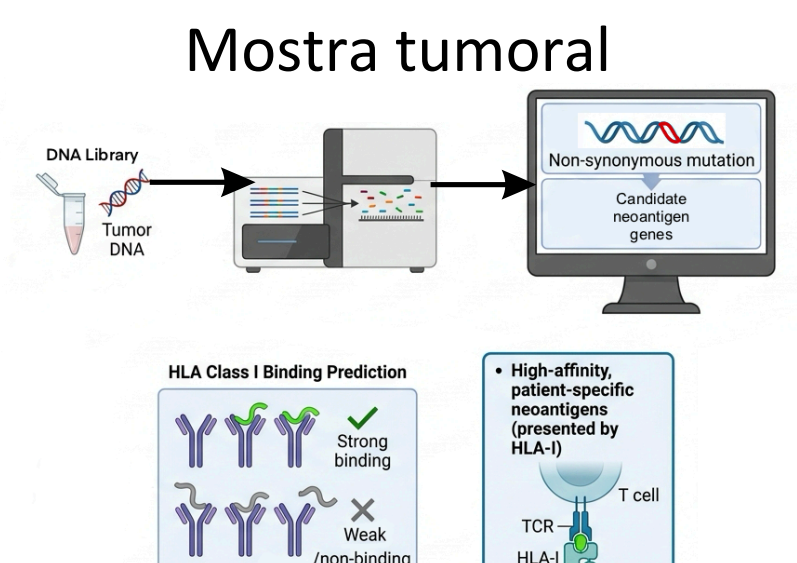


Figura 7: protocol de WES i predicció bioinformàtica de neoantígens.

4 Assajos in vitro

Assaig granzima B

Avaluació citotoxicitat SILs/TILs

Co-cultiu
Mostra tumoral/HLA-matched + Mostra T CD8+ (SILs/TILs/PBMCs)

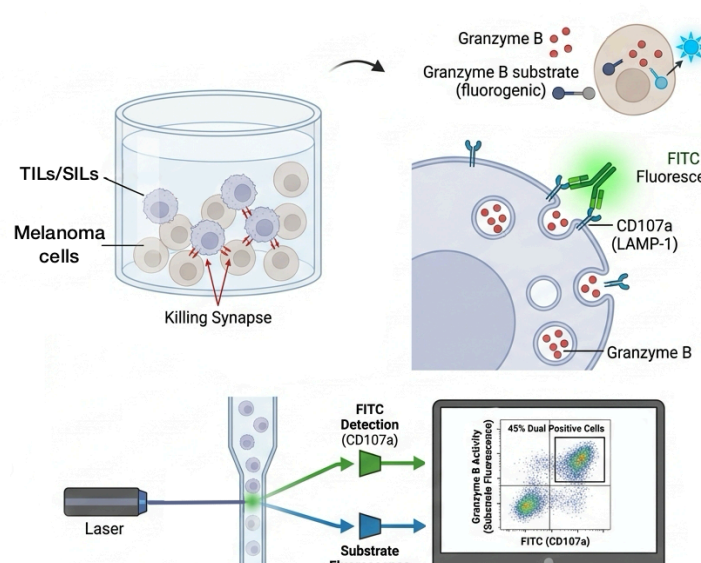


Figura 8: protocol de l'assaig de citotoxicitat i detecció de granzima B.

ELISpot INF- γ

Quantificació activació SILs/TILs

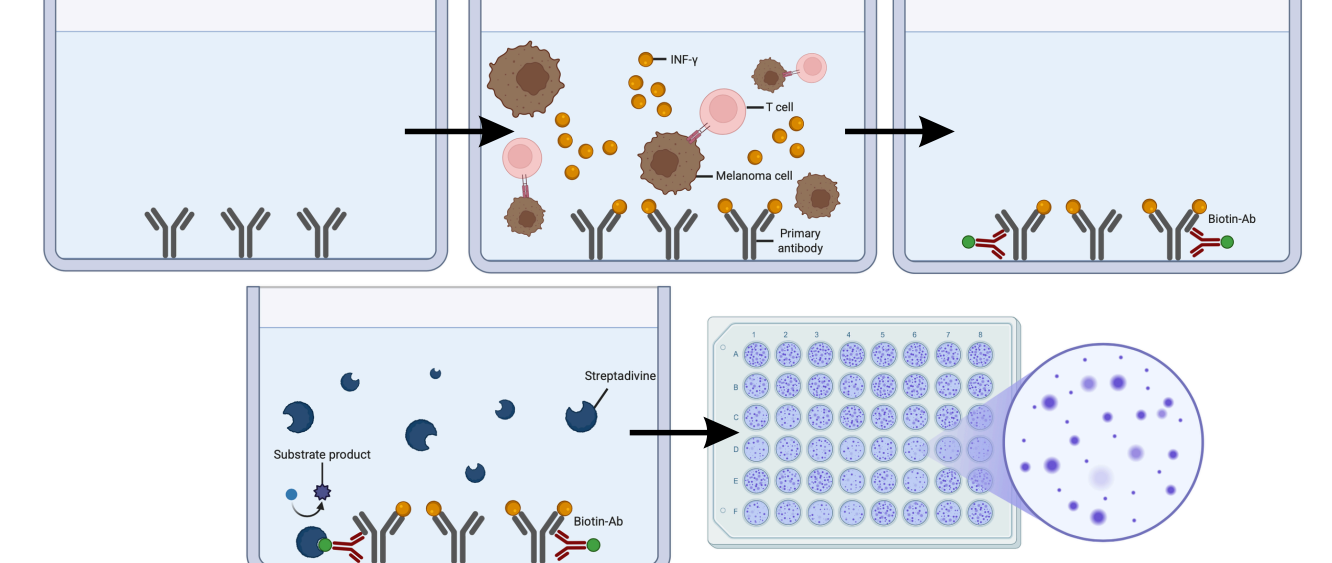


Figura 9: protocol de l'ELISpot per detectar l'activació dels limfòcits T CD8+ i la secreció d'INF- γ .

5 Validació in vivo

Ratolins PDX i transferència adoptiva

Estudiar interacció SILs/TILs-melanoma
Mostra T CD8+ i mostra tumoral/HLA-matched

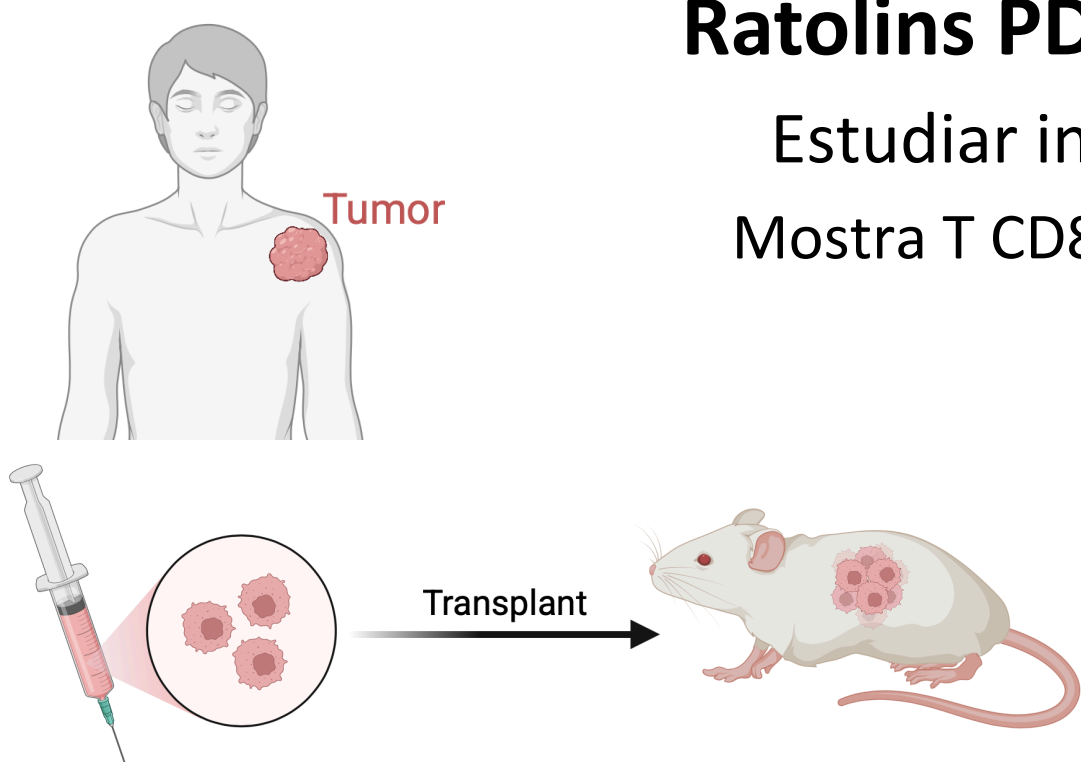


Figura 10: esquema del desenvolupament de models murins PDX.

Grup (5-8 ratolins)	Tractament
Control negatiu	NO melanoma, NO SILs
Control negatiu	NO melanoma, limfòcits donant sa
Control negatiu	Melanoma, NO limfòcits
Capacitat terapèutica	Melanoma, SILs/TILs
Capacitat protectora	SILs, melanoma posteriorment
Complementació immunoteràpia	Melanoma, TILs, anti-PD-1

Taula 1: diferents grups de ratolins per la validació *in vivo*.

Cronograma

Objectius	Trimestres primer any				Trimestres segon any				Trimestres tercer any				Trimestres quart any				Trimestres cinquè any			
	1r	2n	3r	4r	1r	2n	3r	4r	1r	2n	3r	4r	1r	2n	3r	4r	1r	2n	3r	4r
Preparació i permisos	█																			
Obtenció de mostres					█															
Caracterització fenotip									█											
Anàlisi d'antígens													█							
Assajos <i>in vitro</i>													█							
Validació <i>in vivo</i>																	█			

Figura 11: cronograma d'execució del projecte segons els objectius, distribuït per trimestres durant els cinc anys de desenvolupament.

RESULTATS ESPERATS

- Benefici al 70% dels pacients no responedors a ICI [5].
- Nova teràpia: Cèl·lules T de donants amb vitiligen.
- Reducció de l'estigma.
- Primera evidència experimental de reactivitat creuada [4].
- Nous neoantígens no descrits per al vitiligen [2].
- Vitiligen: Model de vigilància immunològica antitumoral i biomarcador predictiu.
- Reducció d'hospitalitzacions i tractaments pal·liatius.
- Teràpia més accessible que les CAR-T actuals.
- Estalvi sanitari: Biomarcadors per seleccionar pacients.

IMPLICACIONS

- Consentiment informat.
- Privacitat i voluntarietat.
- Aprovació pel CEIm/CEEA.
- Tres Rs (Russell i Burch).
- Eutanàsia anticipada:
 - Tumor > 1500mm³.
 - Pes < 30%.
 - Dolor/Ulceració.
- Laboratori BSL-2.
- Campana flux laminar + EPI.
- Contenedors bioperillosos.

PRESSUPOST

- Personal d'investigació.
- Reactius i consumibles:
 - Tetràmers, kits, anticossos.
- Animals i manteniment.
- Serveis externs:
 - TIRTL-seq, citometries...
- Es reserven imprevistos.

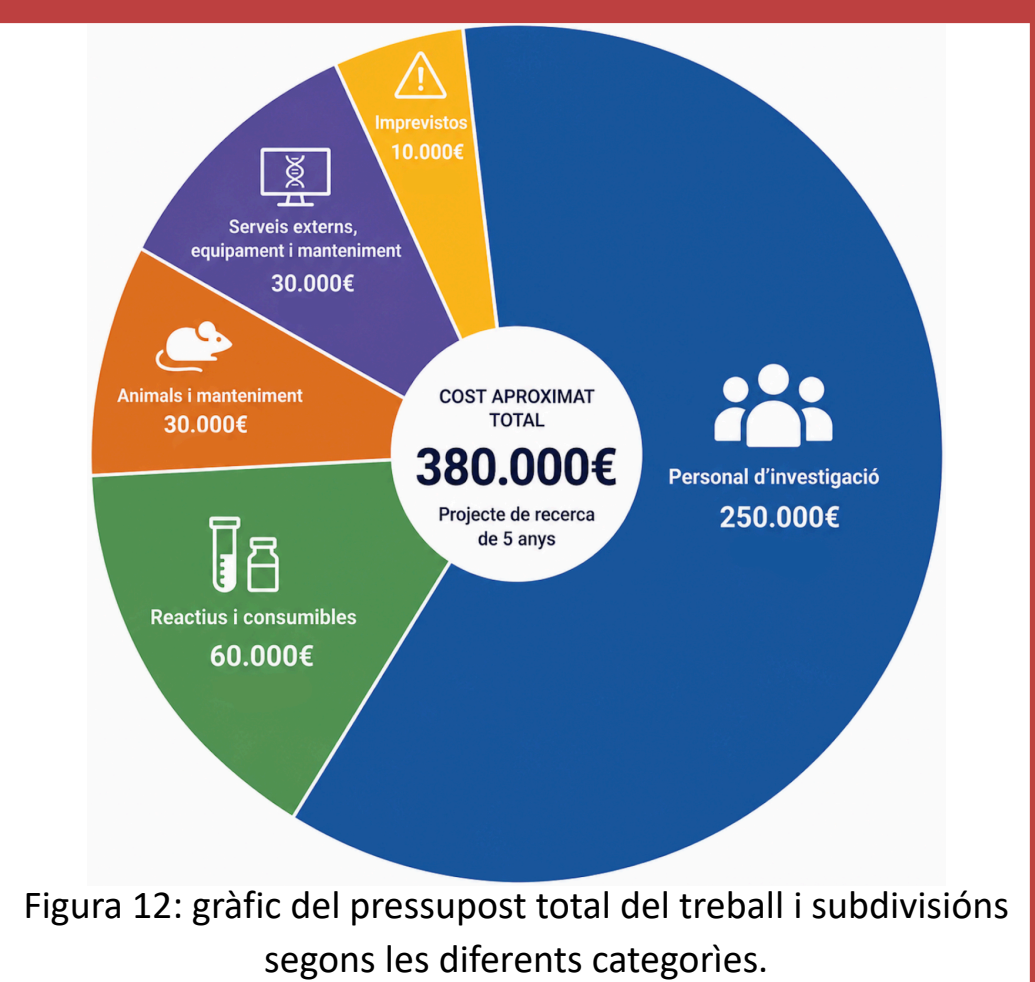


Figura 12: gràfic del pressupost total del treball i subdivisions segons les diferents categories.

CONCLUSIONS

- Disseny experimental sobre reactivitat creuada i vigilància antitumoral.
- Limitacions:
 - Restricció a tetràmer HLA-A*0201.
 - Falsos positius predicció bioinformàtica.
 - Ratolins immunodeprimits: falta d'interacció S.I.

BIBLIOGRAFIA:

[1] Seneschal, J., Bae, J.M., Ezzedine, K. et al. Vitiligo. *Nat Rev Dis Primers* 11, 85 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41572-025-00670-x>
 [2] Frisoli, M. L., Essien, K., & Harris, J. E. (2020). Vitiligo: Mechanisms of pathogenesis and treatment. *Annual Review of Immunology*, 38, 621-648. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-100919-023531>
 [3] Schandendorf, D., van Akkooi, A. C. J., Berking, C., Griewank, K. G., Gutzmer, R., Hauschild, A., Stang, A., Roesch, A., & Ugurel, S. (2018). Melanoma. *The Lancet*, 392(10151), 971-984. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31559-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31559-9)
 [4] Failla CM, Carbone ML, Fortes C, Pagnanelli G, D'Atti S. Melanoma and Vitiligo: In Good Company. *Int J Mol Sci*. 2019 Nov 15;20(22):5731. doi: 10.3390/ijms2025731. PMID: 31731645; PMCID: PMC6888090.
 [5] Teulings, H. E., Limpens, J., Jansen, S. N., Zwinderman, A. H., Reitsma, J. B., Spuls, P. I., & Luiten, R. M. (2015). Vitiligo-like depigmentation in patients with stage III-IV melanoma receiving immunotherapy and its association with survival: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Oncology*, 33(7), 773-781. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.4756>