

El péptido agonista de CD47, PKHB1 induce muerte inmunogénica en células de leucemia linfocítica aguda de células T

Ashanti C. Uscanga-Palomeque¹, Kenny M. Calvillo-Rodríguez¹, Luis Gómez-Morales^{1,2}, Diana E. Caballero-Hernández¹, Philippe Karoyan², Cristina Rodríguez-Padilla¹, Ana C. Martínez-Torres¹¶.

1. Universidad Autónoma de Nuevo León; Facultad de Ciencias Biológicas; Laboratorio de Inmunología y Virología. México.

2. Université Pierre et Marie Curie (Paris VI)- ENS-CNRS; Chimie Moléculaire FR 2769, Laboratoire des Biomolécules. France.

¶ Autor responsable: ana.martinezto@uanl.edu.mx.

Palabras claves: PKHB1, CD47, T-ALL, MCR, MCI.

Introducción

La leucemia linfocítica aguda (ALL) es la principal causa de muerte en individuos menores de 20 años¹, representando un problema mundial de salud. Las ALL se puede clasificar como de células B (B-ALL) y de células T (T-ALL). La T-ALL, presenta mayor resistencia a los tratamientos actuales². Recientemente, se ha observado que algunos fármacos, provocan muerte celular inmunogénica (MCI), caracterizada por la emisión de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) capaces de despertar al sistema inmune (SI) para combatir células de cáncer³. Los principales DAMPs incluyen calreticulina (CRT), proteínas de shock térmico (HSP79 y 90), ATP, y la proteína de cromatina no histona, high-mobility group box 1 (HMGB1). Por lo que la búsqueda de nuevos tratamientos que puedan generar MCI ha tomado importancia. En este sentido, el péptido agonista de CD47, PKHB1, ha demostrado inducir la exposición de CRT en células de leucemia linfocítica crónica (CLL)⁴. Además, PKHB1 es capaz de generar muerte independiente de caspasas en diferentes tipos de neoplasias⁵. Por lo anterior este trabajo se centró en determinar si PKHB1 es capaz de generar MCI en diferentes líneas de T-ALL y su efecto *in vivo*.

Parte experimental

Se evaluó la muerte celular, analizando la exposición a fosfatidilserina (Ann-V), la permeabilización de la membrana celular (PI), la respuesta al inhibidor de caspasas (Q-VD-OPh) y el quelador de calcio (BAPTA) en las líneas celulares de T-ALL (CEM y MOLT-4) y la línea de linfoblastos tumorales murino (L5178Y-R). Se evaluó MCI mediante la exposición y liberación de DAMPS después del tratamiento con PKHB1. La exposición de CRT se analizó mediante citometría de flujo, la liberación de ATP por quimioluminiscencia, y la emisión de HMGB1 por medio de ELISA. Además, mediante WB se analizó la liberación de HSP70, HSP90, HMGB1, y CRT. *In vivo* se evaluó la administración de la vacuna antitumoral profiláctica y se determinó la memoria inmunológica en ratones BALB/c.

Resultado y discusión

Nuestros resultados indican que el tratamiento con PKHB1 genera una muerte rápida (2h), independiente de caspasas, pero dependiente de calcio en las células estudiadas, estos resultados son similares a los presentados en CLL⁴. Por otro

lado, PKHB1 indujo MCI ya que su administración provocó la exposición de CRT y la liberación de DAMPs *in vitro*. Por otro lado, la administración de la vacuna profiláctica inhibió el establecimiento tumoral *in vivo*, además, ratones en completa remisión a causa de la administración semanal del péptido (200µg/µL), retados nuevamente a células viables, no presentaron crecimiento tumoral, por lo que se infiere que PKHB1 fue capaz de generar memoria inmunogénica en este modelo inmunocompetente.

Conclusiones

El péptido PKHB1, es capaz de inducir muerte celular dependiente de calcio e independiente de caspasas en células de leucemia linfocítica aguda de células T. Además, de inducir la exposición de calreticulina, y la liberación de HSP70, HSP90, ATP y HMGB1 en las líneas CEM, MOLT-4 y L5178Y-R. Finalmente, la vacunación con células tratadas con PKHB1 evitó el crecimiento tumoral en ratones retados con células viables y generó memoria inmunogénica. En conjunto, nuestros resultados mejoran el conocimiento del potencial de los péptidos agonistas de CD47 como una herramienta terapéutica para tratar T-ALL, generando una memoria inmunológica anti-tumoral.

Agradecimientos

Al laboratorio de Inmunología y Virología, por el apoyo económico y de infraestructura para llevar a cabo esta investigación. Al CONACyT por las becas nacionales a ACUP, KMCR, y LGM, y al SEP-CONACYT-ANUIES-ECOS, por el apoyo 291297 a ACMT.

Referencias

1. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/cancer2017_Nal.pdf (Consultado el 1 enero del 2018)
2. Li Y, Buijs-Gladdines JGCAM, Cante´- Barrett K, Stubbs AP, Vroegindewij EM, Smits WK, et al. PLoS Med. 2016. 13.
3. Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., & Kroemer, G. *Nat Rev Immun.* 2017. 17, 97–111
4. Martínez-Torres, A. C., Quiney, C., Attout, T., Boulet, H., Herbi, L., Vela, L., ... & Davi, F. *PLoS Med.* 2015. 12, 1–37
5. Denèfle, T., Boulet, H., Herbi, L., Newton, C., Martínez-Torres, A. C., Guez, A., ... & Lardé, E. *J med chem.* 2016. 59(18), 8412-8421.