

La activación de CD47 en cáncer de mama estimula la respuesta inmune antitumoral induciendo memoria inmunológica.

Kenny M. Calvillo-Rodríguez^a, Luis Gómez-Morales^{a,b}, Ashanti C. Uscanga-Palomeque^a, Diana E. Caballero-Hernández^a, Philippe Karoyan^a, Cristina Rodríguez-Padilla^a, Ana C. Martínez-Torres^{a*}.

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

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

*ana.martinezto@uanl.edu.mx

Palabras clave: PKHB1, CD47, MCI.

Introducción

La activación de CD47 por péptidos sintéticos derivados del dominio C-terminal de la trombospondina-1, como el PKHB1, inducen muerte celular induciendo cambios morfológicos en el retículo endoplásmico y la exposición de calreticulina (CRT), en células de leucemia linfocítica crónica (CLL). La exposición de CRT es el principal marcador de muerte celular inmunogénica (MCI), la cual es reconocida como un determinante crítico de la eficiencia en la terapia del cáncer. La MCI es capaz de estimular la respuesta inmune antitumoral y generar memoria inmunológica, induciendo la eliminación completa del tumor. La MCI se caracteriza por la exposición y liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) como CRT, HSP70, HSP90, ATP y HMGB1, los cuales promueven la respuesta inmune antitumoral. Sin embargo, la liberación de DAMPs no es suficiente para considerar que un agente citotóxico induce MCI. Para evaluar el alcance de la MCI son necesarias vacunaciones profilácticas o terapéuticas y la posterior evaluación de su efecto antitumoral preventivo o terapéutico, respectivamente. Debido a la importancia de la MCI en la terapia contra el cáncer y a las características de la muerte inducida por el PKHB1 en CLL, el objetivo de este trabajo fue evaluar la inmunogenicidad de la muerte celular inducida por la activación de CD47 en células tumorales.

Parte experimental

Se utilizaron células de cáncer de mama humano (MCF-7 y MDA-MB231) y murino (4T1), y se evaluó la exposición de fosfatidilserina (Ann-V) y la permeabilidad de la membrana celular (PI). La liberación de DAMPs se evaluó por microscopía confocal (exposición de CRT), western blot (CRT, HSP70 y HSP90), ELISA (HMGB1) y Bioluminiscencia (ATP). Se obtuvieron células dendríticas (CDs) a partir de la diferenciación de sus precursores en médula ósea de ratones BALB/c (IL-4 y GM-CSF). Se analizaron moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) en células dendríticas expuestas a células tumorales tratadas previamente con PKHB1. Las CDs se co-cultivaron con linfocitos T CD3+ de ratones BALB/c, y ulteriormente con células tumorales. La activación de linfocitos T se analizó por la liberación de IFN γ (ELISA) y la muerte específica de células tumorales (pérdida de Calcein-AM). Se evaluó el efecto de la vacunación profiláctica y terapéutica con células tumorales tratadas con PKHB1 sobre el establecimiento tumoral en un modelo de cáncer de mama murino.

Finalmente se evaluó la memoria a largo plazo de los ratones vacunados de forma profiláctica y terapéutica.

Resultado y discusión

Se determinó la concentración citotóxica 50 (CC₅₀) del PKHB1 en cada una de las líneas celulares probadas: 4T1 (300 μ M), MDA-MB (200 μ M) y MFC-7 (300 μ M). Se observó la liberación de DAMPs característicos de muerte inmunogénica: HSP70, HSP90, CRT, HMGB1 y ATP en células tratadas con PKHB1. Por otra parte, las células tumorales tratadas con PKHB1 indujeron la maduración de CDs al promover un aumento en la expresión de CD80, CD86 y liberación de TNF α . Las CDs estimuladas promueven la liberación de IL-2 e IFN γ , y la lisis específica de células tumorales, por linfocitos T activados (*ex vivo*). También se demostró que la vacunación profiláctica y terapéutica con células tumorales tratadas con PKHB1 en ratones BALB-c, previno el crecimiento tumoral de células 4T1 y L5178Y-R. Finalmente se demostró que ambos tipos de vacunaciones inducen memoria inmunológica a largo plazo en los ratones que lograron remisión.

Conclusiones

Nuestros resultados, nos permiten evidenciar el alcance de la inmunogenicidad de la muerte inducida por la activación de CD47, al observar su efecto en el establecimiento de la respuesta inmune anti-tumoral (*ex vivo*) y comprobándolo de diferentes formas en experimentos *in vivo*. Nuestros resultados abren la puerta a evaluar su efecto en otros tipos de cáncer ya que la inmunogenicidad de la muerte inducida por CD47 parece ser un mecanismo conservado.

Agradecimientos

Agradecemos a Rodolfo Mendoza R. por el apoyo técnico brindado. Al laboratorio de Inmunología y Virología, por el apoyo económico y de infraestructura para llevar a cabo esta investigación. KMCR, LGM, y ACUP agradecen al CONACyT por la beca de manutención. ACMT agradece a la SEP-CONACyT- ANUIES-ECOS, por el apoyo 291297.

Referencias

1. Denèfle, T., et al. *J med chem.* 2016. 59(18), 8412-8421.
2. Martínez-Torres, AC, et al. *PLoS Med.* 2015. 12, 1-37.
3. Garg, et al., *Int. J. Dev. Biol.* 2015. 59: 131-14.