

## El lisado tumoral obtenido por PKHB1 induce la activación del sistema inmune y la regresión tumoral

Rodolfo Mendoza Reveles<sup>a</sup>, Kenny M. Calvillo-Rodriguez<sup>a</sup>, Ashanti C. Uscanga-Palomenque<sup>a</sup>, Luis Gómez-Morales<sup>a,b</sup>, Diana E. Caballero-Hernández<sup>a</sup>, Philippe Karoyan<sup>b</sup>, Ana C. Martínez-Torres<sup>a\*</sup>, Cristina Rodríguez-Padilla<sup>a</sup>.

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.

\*Autor responsable: [ana.martinezto@uanl.edu.mx](mailto:ana.martinezto@uanl.edu.mx).

**Palabras claves:** PKHB1, CD47, MCI.

### Introducción

La leucemia linfocítica aguda (ALL) es el cáncer pediátrico más común<sup>1</sup>. Actualmente, las opciones de tratamiento para pacientes con reincidencia de ALL se basan principalmente en inmunoterapias. Sin embargo, las malignidades hematológicas se asocian comúnmente con una baja inmunogenicidad y tolerancia inmune<sup>2</sup>, lo que puede contribuir tanto a dificultades asociadas con el desarrollo de inmunoterapias eficaces contra esta enfermedad como a la recaída de la misma. Recientemente demostramos que PKHB1, un péptido agonista de CD47 derivado de la TSP1, induce muerte celular inmunogénica (ICD) en líneas celulares de leucemia linfocítica aguda de células T (T-ALL)<sup>3</sup> y su homólogo murino, L5178Y-R (línea celular de linfoblastos tumorales T-murinos). Promoviendo la exposición y liberación de patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), además, la vacunación profiláctica con células L5178Y-R tratadas con PKHB1 previno el establecimiento de tumores *in vivo*. Por todo lo anterior, en este trabajo buscamos entender el mecanismo de la inmunogenicidad de las células muertas por PKHB1, *ex vivo*, y determinar si la ICD inducida por PKHB1 podría ser usada como una posible herramienta terapéutica.

### Parte experimental

Se evaluó la exposición de fosfatidilserina (Ann-V), la permeabilidad de la membrana celular (PI), la exposición de calreticulina (CRT) por citometría de flujo. Se obtuvieron células dendríticas a partir de la diferenciación de sus precursores en médula ósea de ratones BALB/c (usando IL-4 y GM-CSF). Se analizaron las moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 y CD11c) en células dendríticas expuestas a células tumorales muertas por el tratamiento con PKHB1 (PKHB1-TCL) y se analizó la liberación de TNF $\alpha$  en el sobrenadante de las células dendríticas anteriormente mencionadas. Las células dendríticas se co-cultivaron con linfocitos T CD3<sup>+</sup> de ratones BALB/c, y ulteriormente con las células tumorales. La activación de los linfocitos T, se analizó por la liberación de IFN $\gamma$  (ELISA) y de IL-2 (FACS), así como por la muerte específica de células tumorales (pérdida de Calceína-AM). Finalmente se evaluó el efecto de la vacunación terapéutica con PKHB1-TCL sobre el establecimiento tumoral en un modelo de linfoma murino.

### Resultado y discusión

Se observó una fuerte correlación entre el porcentaje de muerte celular y la exposición de calreticulina, encontrando

que a la concentración citotóxica total (CC<sub>100</sub>), el 90% de las células exponen calreticulina. Además, se observó que el PKHB1-TLC es capaz de inducir la maduración de DCs al aumentar los marcadores de maduración CD80, CD86 y la liberación de TNF $\alpha$ . A su vez, se observó que las DCs estimuladas con PKHB1-TLC son capaces de estimular células T mediante la liberación de IL-2 e INF $\gamma$ . Se comprobó la activación de las células T al observar la liberación de INF $\gamma$  en los co-cultivos con células L5178Y-R. Se comprobó la citotoxicidad de las células T activas mediante la evaluación de la pérdida de calceína de las células L5178Y-R después del co-cultivo. Por último, se observó una regresión tumoral, impactando en el mantenimiento de la sobrevida del 80% de los ratones tratados con el PKHB1-TLC

### Conclusiones

Nuestros resultados *in vitro*, *ex vivo*, e *in vivo* muestran que el tratamiento con PKHB1-TCL induce ICD mediante la liberación de calreticulina, la cual promueve la maduración de DCs y la consecuente presentación de antígenos y activación de células T, provocando así la regresión tumoral en ratones singénicos trasplantados con células L5178Y-R. Esto resalta la inmunogenicidad de la muerte celular inducida por la activación de CD47, por PKHB1, como una herramienta terapéutica potencial para superar la baja inmunogenicidad y la tolerancia inmunitaria en T-ALL.

### Agradecimientos

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

### Referencias

1. Terwilliger T, Abdul-Hay M.. Blood Cancer J. 2017;7(6):e577.
2. Li Y, *et al.* PLoS medicine. 2016;13(12):e1002200
3. Uscanga-Palomeque, A. C., *et al.* 2019 Cancer science, 110(1), 256. 28.