

Projeto para Iniciação Científica – 25/04/2019

Proponente: Dr. Marcio Bajgelman – LNBio

Título: Desenvolvimento de modelos PDX para exploração de estratégias imunomodulatórias

Abstract

O desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento de câncer se baseia na utilização de modelos para avaliação e comprovação do efeito biológico. Ensaio em cultura de células são altamente acessíveis e podem ser utilizados para fornecer provas de conceito que justifiquem testes em sistemas biológicos mais complexos, tal como utilização de modelos animais. No campo da imunoterapia de câncer, em que o objetivo consiste em mobilizar células do sistema imune para detectar e eliminar células tumorais, a utilização de animais imunocompetentes desafiados com tumores singênicos é uma ferramenta muito informativa para validar a funcionalidade de uma estratégia, contudo, apesar de haver similaridades entre células de animais e células humanas, podem haver diferenças estruturais em proteínas e sítios alvo que restrinjam uma estratégia terapêutica apenas a espécie testada. No caso de estratégias desenvolvidas para terapia de humanos, é possível utilizar modelos animais humanizados, que aceitem enxertos xenográficos. Neste projeto desenvolveremos modelos de camundongos para teste de vacinas antitumorais. Neste modelo, animais imunodeprimidos serão desafiados com tumores derivados de células primárias humanas. Estes animais também receberão enxerto de leucócitos humanos e combinações terapêuticas de vacinas antitumorais e anticorpos monoclonais. O sucesso deste projeto possibilitará explorar a eficiência de combinações terapêuticas para imunomodulação antitumoral mediada por vacinas derivadas de células tumorais geneticamente modificadas e de anticorpos monoclonais biossimilares produzidos no LNBio – CNPEM.

Introdução e estado da arte

Trabalhos prévios de nosso grupo demonstram a possibilidade de utilizar combinações de vacinas imunomodulatórias para inibir o crescimento de tumores em animais imunocompetentes desafiados com tumores singênicos (Manrique-Rincon et al. 2017, Manrique-Rincon et al. 2018). Além de observarmos combinações que potencializaram o efeito antitumoral, também verificamos combinações que induziram uma proteção em animais re-desafiados numa segunda vez, que resistiram a formação de tumores. A relevância desta observação consiste em comparar este novo desafio com uma recidiva, em que a terapia imunomodulatória conseguiria prevenir o surgimento de novos tumores após o tratamento. Dados da literatura sugerem que um grande número de pacientes em tratamento para câncer de mama, por exemplo, apresentam uma melhora inicial, e podem se tornar refratários aos tratamentos ao longo do tempo (Ahmad 2013). A taxa de sobrevivência livre de doença é um parâmetro essencial para medir a qualidade e efetividade da terapia administrada (Warren and Yabroff 2015). Tendo em vista o câncer de mama, observa-se uma grande heterogeneidade na doença, caracterizada por uma diversidade histológica, mutações genéticas e perfil de expressão gênica (Shipitsin et al. 2007, Allred et al. 2008, Dobrolecki et al. 2016). Sendo assim, o efeito biológico de uma terapia também pode variar entre diferentes pacientes. Dessa forma, justifica-se o desenvolvimento de modelos que possibilitem prever a eficiência de abordagens terapêuticas dirigidas ao tratamento de câncer humano, o que poderia se traduzir, num futuro, como a possibilidade de desenvolver tratamentos personalizados, mais efetivos que atendam a demanda individual do paciente. Neste sentido, são desenvolvidos animais PDX (patient-derived xenograft) que possibilitam explorar as nuances imuno-oncológicas de tumores derivados de pacientes em animais experimentais (Dobrolecki et al. 2016).

Os modelos de camundongos PDX são gerados a partir de linhagens de animais imunodeprimidos, como nude, Rag(-), Il2RG(-), SCID, NOD/SCID, NSG entre outros. Estes animais apresentam diferentes deficiências no sistema imunológico que viabilizam aceitar enxertos xenográficos. O cruzamento entre estas linhagens pode favorecer determinadas condições experimentais,

aumentando a estabilidade do enxerto e evitando se GVHD (graft versus host disease) .

Neste projeto, planejamos utilizar animais PDX para avaliar o efeito terapêutico de vacinas imunomodulatórias e anticorpos monoclonais gerados no LNBio CNPEM. Assim, podemos avaliar a eficácia de estratégias de imunomodulação e interferência no crescimento destes tumores, derivados de células primárias num microambiente tridimensional em que a célula de câncer interage com outros tipos celulares, recebe sinalizações parácrinas numa condição mais aproximada de um tratamento clínico.

Objetivos

O alvo central deste projeto consiste em desenvolver animais PDX para explorar a eficácia terapêutica de combinações vacinais e anticorpos monoclonais desenvolvidos no LNBio – CNPEM

Objetivos específicos

- 1.Imortalização de linhagens tumorais primárias humanas.
- 2.Enxerto de células tumorais em animais NOD/SCID
- 3.Estabelecimento de vacinas antitumorais
- 4.Enxerto de PBMCs humanos
- 5.Desafio de animais hPBMC com tumores primários e tratamento com vacinas

Plano de pesquisa e metodologias

1.Imortalização de linhagens tumorais primárias humanas.

Receberemos células primárias de uma parceria com um instituto de oncologia. Estas células serão modificadas com um vetor retroviral que codifica o gene hTERT. Este vetor codifica uma subunidade catalítica da telomerase transcriptase reversa, que regenera os telômeros, protegendo danos cromossômicos e evitando-se a senescência celular após múltiplas divisões (Bodnar et al. 1998, Smith et al. 2013). Dessa forma, planejamos utilizar um vetor retroviral codificando hTERT para imortalizar células primárias que poderão ao mesmo tempo serem enxertadas em animais.

2.Enxerto de células tumorais em animais NOD/SCID

Em paralelo ao experimento de imortalização celular, também enxertaremos parte das células tumorais em animais. Poderão ser feitas passagens entre animais, para o estabelecimento de PDX. Dados da literatura sugerem que linhagens PDX podem apresentar estabilidade genômica e proteômica por até 15 transplantes sucessivos em camundongos (Zhang et al. 2013).

3.Estabelecimento de vacinas antitumorais

Uma vez que tivermos linhagens tumorais imortalizadas procederemos o estabelecimento de linhagens vacinais a partir da transdução viral. Utilizaremos vetores virais produzidos no LNBio-CNPEM, codificando imunomoduladores e um cassete de resistência ao antibiótico G418. A seleção com G418 possibilitará a seleção de um pool de células expressando o transgene de interesse. Estas linhagens serão caracterizadas com ensaios de citometria de fluxo , expandidas e congeladas.

4.Enxerto de PBMCs humanos

Em contraste ao modelo animal imunocompetente desafiado com tumores singênicos, os modelos xenográficos comprometem a exploração de estratégias de imunomodulação, pois os animais são imunodeprimidos. Uma alternativa para isso, consiste em enxertar PBMCs em animais PDX, de forma que o animal tenha o tumor e o PBMC do próprio doador. Neste projeto planejamos fazer ensaios de padronização para enxerto de PBMCs. Testaremos diferentes rotas

de injeção, como intraorbital e veia caudal. Também poderemos depletar células da medula óssea dos animais recipientes, com irradiação.

5.Desafio de animais PBMCs com tumores primários e tratamento com vacinas

Animais contendo enxertos de PBMCs poderão ser desafiados com células tumorais provenientes do próprio doador. Estes animais também poderão receber vacinas antitumorais e anticorpos monoclonais para avaliar efeito biológico.

Perspectivas

O Desenvolvimento de modelos animais PDX que apresentam PBMCs humanas poderá viabilizar o estudo de estratégias de imunomodulação antitumoral. Dados anteriores de nosso grupo, demonstram que certas combinações terapêuticas apresentaram grande eficácia (Manrique-Rincon et al. 2017), além de induzirem um efeito protetor a longo termo, prevenindo a recorrência de tumores em animais redesafiados. Neste projeto poderemos transpor a estratégia utilizada com tumores de camundongo para utilização de tumores humanos e combinações de vacinas terapêuticas geradas em humanos. Estas vacinas poderão ser avaliadas em modelos animais que apresentam componentes do sistema imunológico humano, mimetizando condições mais aproximadas com a realidade clínica. Estes modelos também poderão ser utilizados para verificar a eficácia de anticorpos monoclonais imunomodulatórios gerados no LNBio-CNPEM. O sucesso deste projeto poderá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas baseadas na combinação de vacinas antitumorais, anticorpos monoclonais, ou mesmo para o desenvolvimento de ensaios para predição de estratégias que poderão ser utilizadas na clínica com pacientes.

Bibliografia

- Ahmad, A. (2013). "Pathways to breast cancer recurrence." ISRN Oncol **2013**: 290568.
- Allred, D. C., Y. Wu, S. Mao, I. D. Nagtegaal, S. Lee, C. M. Perou, et al. (2008). "Ductal carcinoma in situ and the emergence of diversity during breast cancer evolution." Clin Cancer Res **14**(2): 370-378.
- Bodnar, A. G., M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C. P. Chiu, G. B. Morin, et al. (1998). "Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells." Science **279**(5349): 349-352.
- Dobrolecki, L. E., S. D. Airhart, D. G. Alferez, S. Aparicio, F. Behbod, M. Bentires-Alj, et al. (2016). "Patient-derived xenograft (PDX) models in basic and translational breast cancer research." Cancer Metastasis Rev **35**(4): 547-573.
- Manrique-Rincon, A. J., C. M. Beraldo, J. M. Toscaro and M. C. Bajgelman (2017). "Exploring Synergy in Combinations of Tumor-Derived Vaccines That Harbor 4-1BBL, OX40L, and GM-CSF." Front Immunol **8**: 1150.
- Manrique-Rincon, A. J., A. C. de Carvalho, M. E. Ribeiro de Camargo, K. G. Franchini and M. C. Bajgelman (2018). "Development of a flow cytometry assay which allows to evaluate the efficiency of immunomodulatory vaccines to enhance T cell-mediated antitumor response." J Biotechnol **284**: 11-16.
- Shipitsin, M., L. L. Campbell, P. Argani, S. Weremowicz, N. Bloushtain-Qimron, J. Yao, et al. (2007). "Molecular definition of breast tumor heterogeneity." Cancer Cell **11**(3): 259-273.
- Smith, M. C., E. T. Goddard, M. Perusina Lanfranca and D. J. Davido (2013). "hTERT extends the life of human fibroblasts without compromising type I interferon signaling." PLoS One **8**(3): e58233.
- Warren, J. L. and K. R. Yabroff (2015). "Challenges and opportunities in measuring cancer recurrence in the United States." J Natl Cancer Inst **107**(8).
- Zhang, X., S. Claerhout, A. Prat, L. E. Dobrolecki, I. Petrovic, Q. Lai, et al. (2013). "A renewable tissue resource of phenotypically stable, biologically and ethnically diverse, patient-derived human breast cancer xenograft models." Cancer Res **73**(15): 4885-4897.