

Investigação do papel de VLPs CD40L na polarização de macrófagos M1/M2 e atividade antitumoral

Palavras-Chave: câncer, VLP, CD40

Autores(as):

THIAGO LUIZ ROCHA NATIVIDADE, LNBIO – CNPEM
Dra. ISADORA FERRAZ SEMIONATTO, LNBIO - CNPEM
Prof. Dr. MARCIO CHAIM BAJGELMAN, LNBIO - CNPEM

INTRODUÇÃO:

Macrófagos são células mieloides essenciais para o funcionamento orquestrado da imunidade inata e adaptativa (HIRAYAMA; IIDA; NAKASE, 2017). Sua habilidade de fagocitar, digerir e apresentar antígenos por meio de suas moléculas de MHC classe II, fazem destas células apresentadoras profissionais de antígenos (APC) as células T, obtendo um papel fundamental no desenvolvimento das respostas imunológicas (GUERRIERO, 2019; JOFFE; BAKALAR; FLETCHER, 2020; KILIAN et al., 2023; MUNTJEWERFF; MEESTERS; VAN DEN BOGAART, 2020). Além de tal papel, os macrófagos vêm sendo descritos como importantes reguladores da resposta imune antitumoral (DENARDO; RUFFELL, 2019). Os macrófagos associados ao tumor (TAMs) são algumas das células imunológicas mais abundantes no microambiente tumoral (TME) (PATHRIA; LOUIS; VARNER, 2019).

Com base na plasticidade e adaptabilidade dos macrófagos a diferentes ambientes, o microambiente tumoral pode ser composto por TAMs polarizados em dois subtipos extremos, o fenótipo M1, antitumoral, e M2, pró-tumoral (GAO; LIANG; WANG, 2022; ITALIANI; BORASCHI, 2014; OSHI et al., 2020). Macrófagos M1 são reconhecidos pela sua potente atividade antitumoral (TANG; SHIMADA; IKEGAKI, 2022), secretando citocinas pró-inflamatórias, induzindo a expressão de moléculas coestimulatórias e produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (MARTINEZ; GORDON, 2014). Embora eles estejam presentes no microambiente tumoral, os macrófagos que se infiltram no tumor são, em sua maioria, caracterizados pelo perfil M2 (PAN et al., 2020), reconhecidos por estimular o desenvolvimento tumoral através da secreção de citocinas anti-inflamatórias, promoção da angiogênese e neovascularização e expressão de moléculas imunossupressoras na sua superfície, suprimindo das respostas imunes adaptativas no crescimento do tumor e nos processos metastáticos (HE et al., 2013; ZHU et al., 2020). Em vista da dupla função que os macrófagos, estratégias capazes de aumentarem a relação M1/M2 dentro do estroma tumoral são cada vez mais relevantes (JAYASINGAM et al., 2020), com o aumento da proporção M1/M2 no estroma de tumores colorretais associada com maior sobrevida de pacientes com câncer (VÄYRYNEN et al., 2021).

Em paralelo, a sinalização de CD40, proteína transmembrana presente em APCs e outros tipos celulares, desempenha um papel central na ativação e polarização de macrófagos para o fenótipo M1 (BEATTY et al., 2011). Junto com o seu ligante, CD40L, o receptor CD40 realiza a ponte entre a imunidade inata e adaptativa, induzindo respostas imunes eficientes contra o câncer (DE SILVA et al., 2020). Em macrófagos, a sinalização de CD40/CD40L redireciona estas células para um perfil M1, tornando-as capazes de destruir as células tumorais (BUHTOIAROV et al., 2005; HOVES et al., 2018). Neste cenário, a utilização de partículas semelhantes a vírus (VLPs), como sistemas para a veiculação direcionada do ligante de CD40 para o interior do sítio tumoral, pode funcionar como uma

alternativa promissora para a imunomodulação de macrófagos infiltrantes e reeducação destas células para um perfil citotóxico efetor (BANSKOTA et al., 2022; LIU et al., 2023; PALAMETA et al., 2022). Por serem derivadas de vírus, as VLPs carregam consigo propriedades imunogênicas e antigênicas que são amplamente exploradas na produção de vacinas para diferentes doenças como Hepatite B (HBV) (Engerix-B®; GenHevac B®, Recombivax®), HPV (Gardasil® e Cervarix®) e influenza A (Inflexal®).

Num trabalho recente de nosso grupo, demonstrou-se que VLPs engenheiradas com as moléculas imunomoduladoras 4-1BBL e OX40L estimularam a proliferação de linfócitos T, inibiram a função supressora de células T reguladoras (T reg) e potencializaram a eliminação de células de câncer (PALAMETA et al., 2022). Neste projeto, planejamos utilizar VLPs decoradas com um ligante de CD40, funcionando como uma plataforma sinalizadora para a reeducação dos TAMs e repolarização de macrófagos M2 intra-tumorais para um perfil M1, consequentemente atuando na morte das células tumorais e potencialização da resposta imune efetora inata e adaptativa.

RESULTADOS

O projeto teve início em abril deste ano. Como resultado principal destacamos a padronização do isolamento de células primárias da medula óssea de camundongos, bem como a padronização do protocolo de diferenciação destes precursores para macrófagos. Também padronizamos ensaios de citometria de fluxo para caracterização fenotípica de macrófagos M1 e M2. No momento trabalhamos no desenvolvimento de ensaios *in vitro* para explorar a polarização de macrófagos M1/M2 por meio da utilização de VLPs imunomoduladoras contendo CD40L.

METODOLOGIA:

- **Produção de VLPs:** As preparações de VLPs foram geradas e caracterizadas no Laboratório de Vetores Virais do CNPEM, por meio da co-transfecção de vetores plasmidiais codificando os componentes da partícula e imunomodulador CD40L, conforme descrito previamente (Palameta et al., 2022).
- **Isolamento, caracterização e cultivo de macrófagos:** Utilizamos macrófagos derivados de medula óssea de animais Balb/c. Após os camundongos serem eutanasiados seguindo as recomendações do comitê de ética, suas células precursoras nas medulas tibiais são retiradas e postas para diferenciação de macrófagos *in vitro*, em presença de meio de cultura contendo M-CSF e IL4. Após 48h de incubação, as culturas celulares primárias são analisadas por citometria de fluxo e marcação com anticorpos anti-F4/80, anti-CD 11b, anti-CD68, anti-CD11c e anti-MHC II.
- **Ensaio de polarização de macrófagos derivados da medula óssea para os subtipos M1 e M2:** A padronização de ensaios *in vitro* para a diferenciação dos BMDMs e polarização para os perfis de macrófagos M1 e M2, com base em protocolos descritos na literatura (BERTANI et al., 2017). Para isso, estimulamos BMDMs com fatores e citocinas apropriadas para que possamos obter os diferentes subtipos de macrófagos. Ensaios de caracterização possibilitam avaliar o perfil de expressão de genes específicos pela técnica de qRT-PCR e de marcadores celulares por meio de citometria de fluxo.
- **Avaliação *in vitro* da repolarização de macrófagos M2 para o perfil M1 mediada pelas VLPs CD40L:** A sinalização de CD40L mediada pelas VLPs contendo CD40L pode reprogramar macrófagos M2, pro-tumorais, para o perfil M1, antitumoral. Neste contexto, são realizados ensaios *in vitro* nos quais co- macrófagos alternativamente ativados são cultivados na presença de VLPs CD40L em concentrações e condições específicas. Em seguida, ensaios de ELISA, citometria de fluxo e qRT-PCRs são utilizados para analisar a repolarização de macrófagos M2 para o fenótipo pró-inflamatório M1, estimulando portanto potentes repostas imunes antitumorais.

EXPECTATIVAS E DISCUSSÃO:

Neste projeto, planejamos avaliar a utilização de VLPs imunomodulatórias contendo o ligante de CD40L, que atua na estimulação de células apresentadoras, para modular o fenótipo de repolarização de macrófagos M1/M2. Dados da literatura demonstram que a sinalização de CD40L pode modular a polarização M1/M2 (BEATTY et al., 2011), e em nosso modelo, queremos verificar se células macrofágicas isoladas de animais imunocompetentes Balb/C e polarizadas para um fenótipo M2 pró-tumoral, podem ser repolarizadas em função da estimulação com VLPs contendo CD40L, e adquirindo fenótipo M1 anti-tumoral. Além disso, o uso de agonistas de CD40 mostraram-se eficientes em reprogramar os TAMs para um perfil pró inflamatório, aumentando o potencial tumoricida de macrófagos infratumorais e a sensibilidade das células de mesotelioma, câncer colorretal e câncer de bexiga as terapias bloqueadoras dos checkpoints imunológicos (HOVES et al., 2018; MANGSBO et al., 2015). No caso de nosso grupo, já foi demonstrado que VLPs engenheiradas com as moléculas imunomoduladoras 4-1BBL e OX40L estimularam a proliferação de linfócitos T, inibiram a função supressora de células T reguladoras (T reg) e potencializaram a eliminação de células de câncer (PALAMETA et al., 2022). Em dados ainda não publicados, nós também demonstramos que VLPs contendo a proteína CD40L foram eficientes em maturar células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDC) e induzir a morte de células tumorais por meio de mecanismos de apoptose.

O projeto iniciou em Abril de 2024, e os dados obtidos até o momento demonstram a possibilidade de obtermos macrófagos primários a partir de células de medula óssea, indução de polarização M1/M2, bem como caracterização fenotípica por citometria de fluxo.

Portanto, tendo em vista o potencial de VLPs para sinalização celular e modulação do sistema imune, este projeto apresenta potencial para contribuir com insights no desenvolvimento de novas estratégias para imunoterapia de câncer.

BIBLIOGRAFIA

- HIRAYAMA, D.; IIDA, T.; NAKASE, H. The Phagocytic Function of Macrophage Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 92, p. 1–14, 29 dez. 2017.
- GUERRIERO, J. L. Macrophages: Their Untold Story in T Cell Activation and Function. Em: GUERREIRO, J. L. (Ed.). *Biology of T Cells*. Boston: International Review of Cell and Molecular Biology, 2019. v. 342p. 73–93.
- JOFFE, A. M.; BAKALAR, M. H.; FLETCHER, D. A. Macrophage phagocytosis assay with reconstituted target particles. *Nature Protocols*, v. 15, n. 7, p. 2230–2246, 19 jul. 2020.
- KILIAN, M. et al. MHC class II-restricted antigen presentation is required to prevent dysfunction of cytotoxic T cells by blood-borne myeloids in brain tumors. *Cancer Cell*, v. 41, n. 2, p. 235–251, fev. 2023.
- MUNTJEWERFF, E. M.; MEESTERS, L. D.; VAN DEN BOGAART, G. Antigen CrossPresentation by Macrophages. *Frontiers in Immunology*, v. 11, n. 1276, p. 1–12, 8 jul. 2020.
- DENARDO, D. G.; RUFFELL, B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, v. 19, n. 6, p. 369–382, 4 jun. 2019.

- PATHRIA, P.; LOUIS, T. L.; VARNER, J. A. Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer. *Trends in Immunology*, v. 40, n. 4, p. 310–327, abr. 2019.
- GAO, J.; LIANG, Y.; WANG, L. Shaping Polarization Of Tumor-Associated Macrophages In Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, v. 13, 30 jun. 2022.
- ITALIANI, P.; BORASCHI, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in Immunology*, v. 5, 17 out. 2014.
- OSHI, M. et al. M1 Macrophage and M1/M2 ratio defined by transcriptomic signatures resemble only part of their conventional clinical characteristics in breast cancer. *Scientific Reports*, v. 10, n. 16554, 6 out. 2020.
- TANG, X. X.; SHIMADA, H.; IKEGAKI, N. Macrophage-mediated anti-tumor immunity against high-risk neuroblastoma. *Genes & Immunity*, v. 23, n. 3–4, p. 129–140, 7 maio 2022.
- MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports*, v. 6, 3 mar. 2014.
- PAN, Y. et al. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Frontiers in Immunology*, v. 11, 3 dez. 2020.
- HE, Y. et al. High MUC2 Expression in Ovarian Cancer Is Inversely Associated with the M1/M2 Ratio of Tumor-Associated Macrophages and Patient Survival Time. *PLoS ONE*, v. 8, n. 12, 6 dez. 2013.
- ZHU, Z. et al. PD-L1-Mediated Immunosuppression in Glioblastoma Is Associated With the Infiltration and M2-Polarization of Tumor-Associated Macrophages. *Frontiers in Immunology*, v. 11, 30 nov. 2020.
- JAYASINGAM, S. D. et al. Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice. *Frontiers in Oncology*, v. 9, 24 jan. 2020.
- VÄYRYNEN, J. P. et al. The Prognostic Role of Macrophage Polarization in the Colorectal Cancer Microenvironment. *Cancer Immunology Research*, v. 9, n. 1, p. 8– 19, 1 jan. 2021.
- BEATTY, G. L. et al. CD40 Agonists Alter Tumor Stroma and Show Efficacy Against Pancreatic Carcinoma in Mice and Humans. *Science*, v. 331, n. 6024, p. 1612–1616, 25 mar. 2011.
- DE SILVA, S. et al. CD40 Enhances Type I Interferon Responses Downstream of CD47 Blockade, Bridging Innate and Adaptive Immunity. *Cancer Immunology Research*, v. 8, n. 2, p. 230–245, 1 fev. 2020
- BUHTOJAROV, I. N. et al. CD40 Ligation Activates Murine Macrophages via an IFN- γ Dependent Mechanism Resulting in Tumor Cell Destruction In Vitro. *The Journal of Immunology*, v. 174, n. 10, p. 6013–6022, 15 maio 2005.
- HOVES, S. et al. Rapid activation of tumor-associated macrophages boosts preexisting tumor immunity. *Journal of Experimental Medicine*, v. 215, n. 3, p. 859–876, 5 mar. 2018.
- BANSKOTA, S. et al. Engineered virus-like particles for efficient in vivo delivery of therapeutic proteins. *Cell*, v. 185, p. 250–265, jan. 2022.

- LIU, H. et al. Sustained Intratumoral Administration of Agonist CD40 Antibody Overcomes Immunosuppressive Tumor Microenvironment in Pancreatic Cancer. *Advanced Science*, v. 10, n. 9, p. 1–15, 19 mar. 2023.
- PALAMETA, S. et al. Boosting antitumor response with PSMA-targeted immunomodulatory VLPs, harboring costimulatory TNFSF ligands and GM-CSF cytokine. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 2022.
- BERTANI, F. R., et al. "Classification of M1/M2-polarized human macrophages by label-free hyperspectral reflectance confocal microscopy and multivariate analysis." *Scientific reports* 7.1 (2017): 8965.
- MANGSBO, S. M. et al. The Human Agonistic CD40 Antibody ADC-1013 Eradicates Bladder Tumors and Generates T-cell–Dependent Tumor Immunity. *Clinical Cancer Research*, v. 21, n. 5, p. 1115–1126, 1 mar. 2015.