

**SUBPROJECT 6:** To study TAMs (Tumor Associate Macrophages) and tumor microenvironment in acute promyelocytic leucemia (APL) and in melanoma.

**Principal Investigator:** *Eduardo Magalhães Rego*

## **Abstract**

Recent advances in understanding the biology of the tumors revealed details about the interactions between cancer cells and the adjacent microenvironment that are critical for the initiation and spread of cancer. Among these we highlight those interactions between tumor cells and the host immune system, resulting in no recognition, promotion of tumor growth, remodeling of the surrounding tissue and facilitating metastasis (GRIVENNIKOV, GRETEN, KARIN, 2010). Our interest is, particularly, in tumor-associated macrophages (TAM) because they induce immunosuppression favorable to tumor growth (SOLINAS et al., 2009). TAM originates from monocytes that are recruited from the circulation by chemotactic factors produced by the tumor or derived from extracellular matrix. Among them, we highlight CCL2, CCL7, MCSF, CXCL8, CXCL12, VEGF, PDGF and fibronectins (MANTOVANI et al, 2010; SOLINAS et al, 2009). Once present in tumor microenvironment, monocytes pass through polarization process, directing them to M2 macrophages (activated by alternative pathways). This occurs due to the absence of factors that drive to M1, as IFN- $\gamma$ , associated with the presence of IL -4 and IL-13 secreted by Th2 lymphocytes; and TGF- $\beta$  and IL-10 produced by regulatory T lymphocytes (SOLINAS et al, 2009). TAM tend to accumulate and form a gradient in areas of hypoxia as central necrotic region of the tumor tissues, possibly via hypoxia-induced factors produced by the tumor, such as VEGF, CXCL12 and its receptor CXCR4 (Knowles; HARRIS, 2007). TAM promote tumor growth and neoangiogenesis by synthesizing lymphangiogenesis factors such as, EGF, TGF-B, PDGF and VEGF. On the other hand, TAF can help in occurrence of metastasis by IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . Interestingly, the TAM also helps in the occurrence of suppression of adaptive immunity. This is due to the recruitment of Th2 and Treg lymphocytes via CCL17, CCL22, IL-10 (ZHOU et al., 2009).

This project aims to study the TAM and the tumor microenvironment in acute promyelocytic leukemia (APL) and melanoma. The first disease has distinct genetic, morphological and clinical characteristics that are largely reproduced in transgenic murine model hCG-PML-RARA, in such a way that it became one of the most used models for the study of leukemogenesis (REGO ET AL., 2006). There is little information about the bone marrow microenvironment in APL, and no data on monocyte/macrophage cells in this disease. We know however that the blast cells of APL secrete IL1 $\beta$ , TGF $\beta$  and CXCL4 (SHIKABURA et al, 2005; KINI et al, 2001;.. BRIDGES-de Figueiredo et al, 2011) and our group demonstrated that monotherapy with halofuginone, one small molecule inhibitor of TGF $\beta$  signaling, significantly reduced tumor mass in the murine model (de Figueiredo-Pontes et al., 2011). Now we propose the following tests: a) Comparison of the proteins profile found in plasma from bone marrow aspirates of patients with APL and in healthy individuals.

This comprehensive proteomic analysis may identify factors secreted by the tumor environment that promote tumor growth and may serve as biomarkers and/or therapeutic targets; b) Characterize the TAMs in the bone marrow of transgenic mice at different ages; c) From proteomic analysis will select targets to be assessed also in transgenic murine model; d) Based on proteomic and validation analysis in the murine model we plan to conduct functional studies of these targets by performing overexpression of these target genes by lentiviral vectors and inactivation of these cells using shRNAs in the transgenic model hCG-PML/RARA; and finally) we intend to use nanoparticles as therapeutic approach to inhibit or inactivate signaling pathways associated with aberrant activation leukaemogenic process.

The second disease to be evaluated is melanoma, whose incidence and mortality were estimated at 76,250 and 4.1/100,000 men and 1.7/100,000 women, respectively. In Brazil, data from 2012 INCA estimate for this year 6230 new cases with a mortality rate of 1392 people for melanoma. The curative treatment for melanoma is surgical and it is limited to the initial stages of the disease, and may be used only with reservations in metastatic disease and anatomically amenable to resection (Balch et al., 2009). For locally advanced or metastatic lymph node disease, adjuvant immunotherapy has increasingly prominent role, being given different treatment regimens based on interferon- $\alpha$  or pegylated interferon. Patients with in-transit metastases or satellites may benefit, depending on the location, local chemotherapy with melphalan or intralesional interleukin-2. In patients with brain metastatic disease, can also make use of systemic chemotherapy with fotemustine. Moreover, in young patients without metastases in the central nervous system, biochemotherapy scheme may be employed (Cisplatin + Vinblastine + DITC + IL-2 + IFN + high doses of GCSF) or CVD chemotherapy regimen (cisplatin + vinblastine + DTIC).

The biochemotherapy, despite major toxicity associated, is related to higher overall response rates (40-60%), however with disease-free survival at 3 years of only 5-10% (BEDIKIAN et al., 2008). Therefore, when the disease is locally advanced or metastatic, despite extensive therapeutic arsenal, overall survival has remained virtually unchanged.

Between 2010 and 2011, two drugs had important results in the treatment of metastatic melanoma. The ipilimumab, a monoclonal antibody directed against CTLA-4 receptor produces a cytotoxic T lymphocyte stimulating nonspecific immunity which provides better control and increased survival. This benefit was observed in patients previously treated in the first line or in combination with dacarbazine. In another approach, patients expressing V600E mutation BRAF9 gene (present in 40 to 60% of cutaneous melanomas) have benefited from Vemurafenib, a specific inhibitor of BRAF kinase. Compared to dacarbazine, the drug led to an increase in overall survival, increase in progression-free survival and improved response rate (Chapman et al., 2011).

## **Goals**

Regarding melanoma, our project aims are:



## Researchers

Dimas T. Covas  
Houtan Noushmehr  
Valtencir Zucolotto

Fernando Queiroz Cunha  
Lewis Greene  
Wilson Araujo Silva Jr

## Associated Researchers

Daniel de Carvalho  
Sharon Pitteri

Christopher Mason

## References

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010; 140(6):883-99.

Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol.* 2009 ;86(5):1065-73.

Mantovani A et al. The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2010; 21(1): 27-39.

Knowles H and Harris AL. Macrophages and the hypoxic tumour microenvironment. *Frontiers in Bioscience* 2007; 12: 4298-4314.

Zhou J et al. Increased intratumoral regulatory T cells are related to intratumoral macrophages and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *International Journal of Cancer* 2009; 125 (7): 1640-8.

Rego EM et al. Leukemia with distinct phenotypes in transgenic mice expressing PML/RAR alpha, PLZF/RAR alpha or NPM/RAR alpha. *Oncogene* 2006;25(13):1974-9.

Shibakura M et al. Induction of CXC and CC chemokines by all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Leuk Res.* 2005; 29(7):755-9.

Kini AR et al. Angiogenesis in acute promyelocytic leukemia: induction by vascular endothelial growth factor and inhibition by all-trans retinoic acid. *Blood* 2001;97(12):3919-24.

de Figueiredo-Pontes LL et al. Halofuginone has anti-proliferative effects in acute promyelocytic leukemia by modulating the transforming growth factor beta signaling pathway. *PLoS One* 2011;6(10):e26713.

Balch CM et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 2009;27(36):6199-206.

Bedikian AY et al. Prognostic factors that determine the long-term survival of patients with unresectable metastatic melanoma. *Cancer Invest.* 2008;26(6):624-33.

Chapman PB et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011;364(26):2507-16.

**SUBPROJETO 6:** Macrófagos Associados a Tumor: isolamento, caracterização e estudo funcional em modelos animais.

**Pesquisador Responsável:** Eduardo Magalhães Rego

## Introdução

Avanços recentes na compreensão da biologia dos tumores revelaram detalhes sobre as interações entre as células do câncer e o microambiente adjacente que são fundamentais para a iniciação e propagação do câncer. Entre estas interações destacam-se aquelas entre as células tumorais e o sistema imune do hospedeiro, resultando em escapes de reconhecimento, promoção de crescimento tumoral, remodelamento de tecidos circunvizinhos e facilitação de metástases (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Nosso interesse recai em particular nos macrófagos associados ao tumor (TAM), pois provém uma condição "indutora de imunossupressão" favorável ao crescimento tumoral (SOLINAS et al., 2009). Os TAM originam-se de monócitos da circulação recrutados através de fatores quimiotáticos produzidos pelo tumor ou derivados da matriz extracelular. Dentre eles, destacam-se CCL2, CCL7, MCSF, CXCL8, CXCL12, VEGF, PDGF e fibronectinas (MANTOVANI et al., 2010; SOLINAS et al., 2009). Uma vez presentes no microambiente tumoral, os monócitos passam por processo de polarização, direcionando-se para macrófagos tipo M2 (ativados pelas chamadas vias alternativas). Isso ocorre em função da ausência de fatores que orientam para M1, tal como IFN- $\gamma$ , associada à presença de IL-4 e IL-13 secretadas por linfócitos Th2; e TGF- $\beta$  e IL-10 produzidos por linfócitos T reguladores (SOLINAS et al., 2009). Os TAM tendem a acumular-se e formar um gradiente em áreas de hipóxia como a região central necrótica dos tecidos tumorais, possivelmente via fatores induzidos pela hipóxia produzidos pelo próprio tumor, tais como VEGF, CXCL12 e seu receptor CXCR4 (KNOWLES; HARRIS, 2007). Os TAM promovem crescimento tumoral, neoangiogênese e linfangiogênese através da síntese de fatores como EGF, TGF- $\beta$ , PDGF e VEGF. Por outro lado, podem auxiliar na ocorrência de metástases através de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . De maneira interessante, os TAM ainda auxiliam a ocorrência de supressão da imunidade adaptativa. Isso se dá a partir de recrutamento de linfócitos Th2 e Tregs por meio de CCL17, CCL22, IL-10 (ZHOU et al., 2009).

O presente projeto objetiva estudar os TAM e o microambiente tumoral na leucemia promielocítica aguda (LPA) e no melanoma. A primeira doença apresenta características genéticas, morfológicas, clínicas distintas que são em grande parte reproduzidas no modelo murino transgênico hCG-PML-RARA, de tal sorte que este tornou-se um dos modelos mais usados para o estudo da leucemogênese (REGO ET AL., 2006). Existem poucas informações sobre o microambiente da medula óssea na LPA, e nenhum dado sobre as células monocíticas/macrofágicas nesta doença. Sabemos entretanto que as células blásticas da LPA secretam IL1 $\beta$ , TGF $\beta$  e CXCL4 (SHIKABURA et al., 2005; KINI et al., 2001; DE FIGUEIREDO-PONTES et al., 2011) e

nosso grupo demonstrou que a monoterapia com halofuginona, uma pequena molécula inibidora da sinalização do TGF $\beta$ , reduziu significativamente a massa tumoral no modelo murinho (DE FIGUEIREDO-PONTES et al., 2011). Agora propomos as seguintes análises: a) Comparação do perfil de proteínas encontradas no plasma de aspirados de medula óssea de pacientes com LPA e de indivíduos saudáveis. Esta análise proteômica ampla poderá identificar fatores secretados pelo meio ambiente tumoral que promovem o crescimento tumoral e que podem servir de biomarcadores e/ou de alvos terapêuticos; b) Caracterizar os TAMs na medula óssea de camundongos transgênicos em diferentes idades; c) A partir da análise proteômica selecionaremos alvos a serem avaliados também no modelo murino transgênico; d) Com base na análise proteômica e na análise de validação no modelo murino pretendemos realizar o estudo funcional destes alvos realizando a superexpressão destes genes-alvo por meio de vetores lentivirais e a inativação dos mesmos usando shRNAs em células do modelo transgênico hCG-PML/RARA; finalmente e) pretendemos usar nanopartículas como abordagem terapêutica para inibir ou inativar vias de sinalização com ativação aberrante associada ao processo leucemogênico.

A segunda doença a ser avaliada é o melanoma, cuja incidência e mortalidade foram estimados em 76.250 e em 4,1/100.000 homens e 1,7/100.000 mulheres, respectivamente. No Brasil, dados de 2012 do INCA estimam para este ano 6230 novos casos com mortalidade de 1392 pessoas por melanoma. O tratamento curativo do melanoma é cirúrgico e limita-se aos estádios iniciais da doença, podendo ser empregado com reservas na doença metastática única e anatomicamente passível de ressecção (BALCH et al., 2009). Para doença localmente avançada ou com metástase linfonodal, a imunoterapia adjuvante tem papel de destaque crescente, sendo indicados diferentes regimes terapêuticos com base em interferon- $\alpha$  ou interferon peguilado. Pacientes com metástases em trânsito ou satélites podem se beneficiar, a depender da localização, de quimioterapia local com melfalana ou interleucina-2 intralesional. Em pacientes com doença metastática cerebral, pode-se lançar mão de quimioterapia sistêmica com fotemustina. Por outro lado, em pacientes jovens e sem metástases em sistema nervoso central, pode ser empregado esquema de bioquimioterapia (cisplatina + DITC + vimblastina + IL-2 em altas doses + IFN + GCSF) ou quimioterapia com esquema CVD (cisplatina + vimblastina + DTIC). A bioquimioterapia, apesar da importante toxicidade associada, é relacionada com maiores taxas de resposta global (40 a 60%), entretanto com sobrevida livre de doença em 3 anos de apenas 5 a 10% (BEDIKIAN et al., 2008).. Dessa forma, quando se considera doença localmente avançada ou metastática, a despeito de extenso arsenal terapêutico, a sobrevida global manteve-se praticamente inalterada.

Entre 2010 e 2011, entretanto, duas drogas tiveram resultados importantes no tratamento do melanoma metastático. O ipilimumabe, um anticorpo monoclonal dirigido contra o receptor CTLA-4 do linfócito T citotóxico produz um estímulo inespecífico na imunidade que proporciona melhor controle e aumento de sobrevida. Este benefício foi observado em pacientes previamente tratados, ou na primeira linha em combinação com a dacarbazina. Numa outra frente, pacientes que expressam a mutação V600e do gene BRAF9 (presente entre 40 a 60% dos

melanomas cutâneos) beneficiaram-se de vemurafenibe, um inibidor específico da quinase do BRAF. Em comparação à dacarbazina, a droga proporcionou aumento de sobrevida global, incremento de sobrevida livre de progressão e melhora da taxa de resposta (Chapman et al., 2011).

## **Objetivos**

Em relação ao melanoma, nosso projeto pretende:

- a) desenvolver um modelo in vivo de melanoma com e sem mutação no gene BRAF para ensaios pré-clínicos;
- b) investigar se há promoção de crescimento ou iniciação tumoral associado ao aumento de TAM induzido por condições clinicamente relevantes e previamente associadas ao aumento de atividade de Tregs;
- c) Investigar a participação de TGF- $\beta$  na possível indução de crescimento tumoral, avaliando também seu papel no possível aumento de TAMs induzido por Tregs.

## **Metas**

1. *Desenvolver um modelo in vivo de melanoma com e sem mutação no gene BRAF para ensaios pré-clínicos*
2. *Investigar se há promoção de crescimento ou iniciação tumoral associado ao aumento de TAM induzido por condições clinicamente relevantes e previamente associadas ao aumento de atividade de Tregs;*
3. *Investigar se há promoção de crescimento ou iniciação tumoral associado ao aumento de TAM induzido por condições clinicamente relevantes e previamente associadas ao aumento de atividade de Tregs*
4. *Investigar a participação de TGF- $\beta$  no aumento de TAMs (meta 2).*
5. *Comparação do perfil de proteínas encontradas no plasma de aspirados de medula óssea de pacientes com LPA e de indivíduos saudáveis*
6. *Caracterizar os TAMs na medula óssea de camundongos transgênicos em diferentes idades*
7. *estudo funcional de alvos selecionados a partir da análise proteômica usando vetores lentivirais e o modelo transgênico hCG-PML/RARA*
8. *usar nanopartículas como abordagem terapêutica para inibir ou inativar vias de sinalização com ativação aberrante associada ao processo leucemogênico.*



## Cronograma de execução referente a seis anos de projeto

Metas	Semestres											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	■	■	■	■								
2	■	■	■	■								
3			■	■	■	■	■	■	■	■		
4									■	■	■	■
5					■	■	■	■	■	■	■	■
6				■	■	■	■	■				
7						■	■	■	■	■	■	■
8			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

### Pesquisadores:

Dimas T. Covas  
Houtan Noushmehr  
Valtencir Zucolotto

Fernando Queiroz Cunha  
Lewis Greene  
Wilson Araujo Silva Jr

### Pesquisadores Colaboradores:

Daniel de Carvalho  
Sharon Pitteri

Christopher Mason

### Referências

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010; 140(6):883-99.

Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol.* 2009 ;86(5):1065-73.

- Mantovani A et al. The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2010; 21(1): 27-39.
- Knowles H and Harris AL. Macrophages and the hypoxic tumour microenvironment. *Frontiers in Bioscience* 2007; 12: 4298-4314.
- Zhou J et al. Increased intratumoral regulatory T cells are related to intratumoral macrophages and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *International Journal of Cancer* 2009; 125 (7): 1640-8.
- Rego EM et al. Leukemia with distinct phenotypes in transgenic mice expressing PML/RAR alpha, PLZF/RAR alpha or NPM/RAR alpha. *Oncogene* 2006;25(13):1974-9.
- Shibakura M et al. Induction of CXC and CC chemokines by all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Leuk Res.* 2005; 29(7):755-9.
- Kini AR et al. Angiogenesis in acute promyelocytic leukemia: induction by vascular endothelial growth factor and inhibition by all-trans retinoic acid. *Blood* 2001;97(12):3919-24.
- de Figueiredo-Pontes LL et al. Halofuginone has anti-proliferative effects in acute promyelocytic leukemia by modulating the transforming growth factor beta signaling pathway. *PLoS One* 2011;6(10):e26713.
- Balch CM et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 2009;27(36):6199-206.
- Bedikian AY et al. Prognostic factors that determine the long-term survival of patients with unresectable metastatic melanoma. *Cancer Invest.* 2008;26(6):624-33.
- Chapman PB et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011;364(26):2507-16.