

João Miguel Ramalho Constantino

# Imunoterapia com Células Dendríticas: Uma Promessa para Terapia de Cancro

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Maria Teresa Teixeira Cruz Rosete e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



Eu, João Miguel Ramalho Constantino, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº2009027456, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 11 de Julho de 2014.

---

(João Miguel Ramalho Constantino)



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## AGRADECIMENTOS

**É com a maior satisfação e alegria que profiro os meus mais francos e profundos agradecimentos, prestando a merecida homenagem a quem tudo isto tornou possível:**

*À minha orientadora, Professora Doutora Maria Teresa Teixeira Cruz Rosete, pelo constante auxílio e disponibilidade, bem como pela notável orientação dirigida.*

*À minha mãe, pai e irmão, pelo constante acompanhamento e confiança revelados, par a par, com a minha vida académica.*

*A todos os professores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pelo seu esforço e dedicação na transmissão de conhecimentos nas mais diversas áreas.*

*À Gabriela, pela sua simplicidade, pela comunicação de confiança e motivação e por ser um elemento sempre presente.*

*A todos os meus amigos que, desde início, participaram e complementaram o meu percurso enquanto estudante e foram parte do meu crescimento enquanto pessoa.*

*À grandiosa cidade do Conhecimento, COIMBRA.*

## ÍNDICE

LISTA DE ACRÓNIMOS.....	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT .....	7
1   INTRODUÇÃO TEÓRICA.....	7
2   IMUNOBIOLOGIA DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	8
2.1   ORIGEM E LOCALIZAÇÃO.....	8
2.2   RECONHECIMENTO E CAPTAÇÃO DE AGs.....	8
2.3   PROCESSAMENTO E APRESENTAÇÃO DE AGs.....	8
2.4   SUBTIPOS DE DCs .....	9
2.5   SINAIS PARA ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS T.....	9
2.6   INTERAÇÃO ENTRE DCs E O SISTEMAS IMUNE INATO E ADAPTATIVO .....	10
3   CANCRO: ELIMINAÇÃO, EQUILÍBRIO E EVASÃO.....	11
4   MÉTODOS <i>EX-VIVO</i> E <i>IN VIVO</i> DE IMUNOTERAPIA BASEADA EM DCs.....	12
4.1   MÉTODO <i>EX VIVO</i> DE PRODUÇÃO DE DCs .....	12
4.2   MATURAÇÃO DE DCs.....	13
4.3   ESTRATÉGIAS DE CARREGAMENTO DE AGs.....	14
4.4   ADMINISTRAÇÃO <i>IN VIVO</i> DE AGs ACOPLADOS A ANTICORPOS (ACs).....	15
5   ENSAIOS CLÍNICOS: PROGRESSOS EM IMUNOTERAPIA ANTITUMORAL COM DCs.....	15
5.1   DCs CARREGADAS <i>EX VIVO</i> COM LISADOS TUMORAIS OU CORPOS APOPTÓTICOS.....	16
5.2   DCs CARREGADAS <i>EX VIVO</i> COM TAAs.....	16
5.3   DCs CARREGADAS COM mRNA .....	17
5.4   DCs FUNDIDAS <i>EX VIVO</i> COM CÉLULAS TUMORAIS .....	17
5.5   OUTRAS ABORDAGENS BASEADAS EM DCs .....	18
5.6   CONCLUSÕES A CONSIDERAR PARA PRÓXIMAS GERAÇÕES DE DCs .....	18
6   NOVAS ESTRATÉGIAS E PERSPETIVAS FUTURAS .....	19
6.1   ESTRATÉGIAS PARA INIBIR O MICROAMBIENTE TUMORAL .....	19
6.2   <i>IN VIVO</i> DC TARGETING .....	21
6.3   INTERVINENTES DO SISTEMA IMUNITÁRIO COM POTENCIAL PROMISSOR.....	22
6.4   SINERGIA DE COMBINAÇÕES TERAPÊUTICAS.....	23
7   PAPEL DO FARMACÊUTICO.....	23
8   CONCLUSÃO.....	24
9   REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

## LISTA DE ACRÓNIMOS

**APCs** - células apresentadoras de antigénio

**AC** - anticorpo

**AG** - antigénio

**CCR7** - recetor de quimiocina C-C tipo 7

**CD40L** ou **CD154** - ligando do CD40

**CEC** - células endoteliais circulantes

**CLRs** - recetores de lectina do tipo C

**CTC** - células tumorais circulantes

**CTL** - linfócito T citotóxico

**CTLA-4** - antigénio 4 associado ao linfócito T citotóxico

**DAMPs** - padrões moleculares associados ao dano (*damage-associated molecular patterns*)

**DCs** - células dendríticas

**DTH** - hipersensibilidade retardada do tipo IV

**EC** - ensaio clínico

**Flt3L** - citocina ligando do Flt3 (*Fms-like tyrosine kinase 3 ligand*)

**GB** - glóbulos brancos

**GILZ** - *glucocorticoid-induced leucine zipper*

**GM-CSF** - fator estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos

**HSCs** - células estaminais hematopoiéticas

**IDO** - indolamina-2,3-dioxigenase

**IL** - interleucina

**INF- $\alpha/\beta$**  – interferão-alfa/beta

**LCs** - células de *Langerhans*

**PAMPs** - padrões moleculares associados a agentes patogénicos (*pathogen-associated molecular patterns*)

**PAP** - fosfatase ácida prostática

**PBMCs** - células mononucleares do sangue periférico

**PD-1** - recetor de morte programada I

**PGE<sub>2</sub>** - prostaglandina E<sub>2</sub>

**PolyI:C** - ácido polinosínico-policitidílico

**PRRs** - recetores de reconhecimento de padrão (*pattern recognition receptors*)

**siRNA** - *small interfering RNA*

**SOCS** - supressores de sinalização das citocinas

**TAA**s - antigénios associados ao tumor

**TCR** - recetores das células T

**TGF- $\beta$**  - fator de transformação do crescimento  $\beta$

**TLR** - recetores *Toll-like*

**TRAs** - antigénios associados a rejeição tumoral

## RESUMO

As células dendríticas (DCs) são consideradas o centro do sistema imunitário, dado que estabelecem a ligação entre a imunidade inata e adaptativa, apresentando capacidade de controlo não só da resposta imune, mas também da tolerância. Na última década, têm constituído alvo de estudos científicos e clínicos intensivos nomeadamente no que concerne ao desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas contra o cancro, através da vacinação. Deste modo, assume importância crucial conhecer os eventos celulares e moleculares ocorridos durante a diferenciação e maturação das DCs, a regulação dos sistemas imunes inato e adaptativo, o contexto do microambiente tumoral, assim como investigar a aplicação dos mais recentes avanços biotecnológicos, de modo a extrair o maior benefício possível do enorme potencial que as DCs apresentam em estratégias imunoterapêuticas antitumorais.

## ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) are considered the centre of the immune system, given that they establish the link between innate and adaptive immunity, with the ability to control not only the immune response, but also tolerance. For the last decade, they have been the subject of various studies that seek the development of immunotherapeutic strategies against cancer, through vaccination. It is crucial to hold focus on the DCs immunobiology, regulation of innate and adaptive immune systems, the context of the tumor microenvironment, as well as explore the application of the latest advances in biotechnology, in order to extract the greatest possible benefit from their enormous antitumor immunotherapeutic potential.

## I | INTRODUÇÃO TEÓRICA

A imunidade resulta da interligação complexa entre dois sistemas: o sistema imunitário inato (que é *antigen-nonspecific*) e o sistema imunitário adaptativo celular e humoral (que é *antigen-specific*).<sup>1</sup> Primordialmente descritas por *Steinman* e *Cohn*, as DCs funcionam como um elo imprescindível entre ambos os sistemas supracitados.<sup>1,2</sup> Apresentam atividade imunorreguladora, atuando como membros de sentinela do sistema imunitário inato. Evidenciam, além disso, elevada eficiência no desenvolvimento de resposta imunológica, através da produção de citocinas na presença de antígenos (AGs) e moléculas contendo padrões moleculares associados a agentes patogénicos – *pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)* – ou padrões moleculares associados ao dano – *damage-associated molecular patterns (DAMPs)*, também designados por sinais de perigo, que contribuem para o desenvolvimento de uma resposta imunológica robusta.<sup>3</sup> Apesar de corresponderem a uma reduzida população de glóbulos brancos (GB) ou leucócitos, são as mais potentes células

apresentadoras de antígeno (APCs), apelidadas “APCs profissionais”, exibindo a capacidade única de ativação de células T *naive*.<sup>1,3</sup>

## 2 | IMUNOBIOLOGIA DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

### 2.1 | ORIGEM E LOCALIZAÇÃO

As DCs são produzidas a partir de células estaminais hematopoiéticas (HSCs) CD34<sup>+</sup>, na medula óssea.<sup>3</sup> A produção da maior parte dos subtipos de DCs é regulada no estado estável ou *steady state* pela citocina ligando do *Flt3* (Flt3L) ou *Fms-like tyrosine kinase 3 ligand* enquanto na presença de inflamação e infecção outra citocina, o fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), mobiliza números crescentes de DCs derivadas de monócitos.<sup>4</sup>

As DCs imaturas residem em locais com elevado potencial de entrada de AGs, sendo especializadas na captação e processamento antigénicos. Encontram-se abundantemente na pele e nas superfícies internas ou mucosas dos sistemas respiratório e gastrointestinal.<sup>3,4</sup>

### 2.2 | RECONHECIMENTO E CAPTAÇÃO DE AGs

As DCs imaturas efetuam o reconhecimento de *PAMPs* - que não são mais que estruturas altamente conservadas nos microrganismos, designadamente lípidos microbianos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos e intermediários da replicação viral – por via de recetores de reconhecimento de padrão ou *pattern recognition receptors* (PRRs). Existem numerosos PRRs que se encontram envolvidos no reconhecimento inato de agentes patogénicos, nomeadamente recetores *Toll-like* (TLR), recetores *nucleotide-binding-oligomerization-domain* (NOD-like), recetores de lectina do tipo C (CLRs), proteína cinase ativada (PKR) e helicases do tipo RIG-I.<sup>3</sup>

### 2.3 | PROCESSAMENTO E APRESENTAÇÃO DE AGs

As DCs detêm um sistema endocítico especializado, apresentando múltiplos recetores que, após devida captação, dirigem os AGs para compartimentos de processamento. As DCs realizam o processamento de proteínas, convertendo-as em péptidos que são apresentados aos linfócitos T por intermédio de moléculas do complexo major de histocompatibilidade (MHC) – moléculas MHC da classe I e II.<sup>1,4</sup> Os AGs lipídicos, por sua vez, são processados de modo distinto, sendo apresentados por intermédio de moléculas MHC não clássicas e da família CDI.<sup>1</sup>

Após a captação dos AGs, segue-se a apresentação de AGs via MHC-II (via exógena) aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, via MHC-I (via endógena) aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e ainda através de um

processo de apresentação cruzada – *cross-presentation* – que permite apresentar AGs exógenos em contexto MHC-I estimulando células T *killer* CD8<sup>+</sup>. Este processo de apresentação cruzada constitui-se como uma capacidade única das DCs.<sup>4,5</sup>

## 2.4 | SUBTIPOS DE DCs

As DCs não representam uma população homogênea, existem várias subpopulações de DCs que expressam marcadores distintos e exibem funções diferenciadas. Primeiramente, estabelece-se a distinção entre DCs plasmocitóides (pDCs) e DCs mielóides ou convencionais (cDCs). As DCs plasmocitóides (pDCs) constituem um elemento-chave que desempenha funções efetoras no sistema imunitário inato, dada a sua extraordinária capacidade de produção de IFN tipo I, em resposta a infecção viral. Adicionalmente, podem estar envolvidas na tolerância quando no seu estado imaturo. As cDCs, podem ser subdivididos, de acordo com a sua localização em: DCs residentes nos órgãos linfóides; DCs residentes nos tecidos periféricos - como por exemplo, células intersticiais e células de *Langerhans* (na epiderme) - e DCs circulantes. As cDCs reconhecem componentes bacterianos e produzem citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , interleucina 6 (IL-6), IL-12p70 para ativação de subtipos de células T pró-inflamatórias (Th1 e Th17) e, conseqüentemente recrutar linfócitos T citotóxicos (CTLs).<sup>3,4</sup>

## 2.5 | SINAIS PARA ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS T

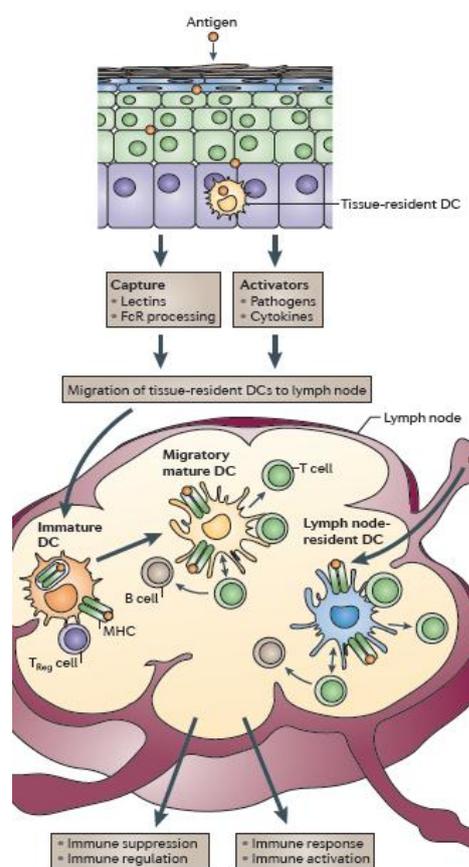
As DCs desempenham um papel crítico na polarização de células T efetoras para uma resposta Th1, Th2, Th17 ou resposta de células T reguladoras (Treg). Após a sua maturação, as DCs são responsáveis pela regulação da expressão de determinadas moléculas, fornecendo 3 tipos de sinais aos linfócitos T que determinam o seu estado de ativação e respetivo fenótipo final:<sup>3</sup>

- Sinal 1: Sinalização específica de AG através de recetores das células T (TCR), mediada pela ligação do complexo MHC-péptido aos TCR. Esta corresponde à interação inicial entre DCs e células T;<sup>3</sup>
- Sinal 2: Coestimulação por moléculas de superfície das APC. É responsável por amplificar ou regular a interação com as células T;<sup>3</sup>
- Sinal 3: Secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Este sinal estimula a diferenciação das células T *naive* em células T efetoras. A IL-12p70 trata-se de uma citocina pró-inflamatória multifuncional bastante estudada, dado que é fundamental na indução de resposta Th1 e CTL. Promove a ativação das células *natural killer* (NK) e células T e induz a produção de IFN- $\gamma$ , que favorece a ativação de CTLs e potencia a ação citotóxica das células NK. Adicionalmente, além da ativação da imunidade inata e adaptativa contra as células

tumorais, a IL-12p70 ainda revela efeitos antitumorais associados à inibição da angiogénese desenvolvida pela IFN- $\gamma$ .<sup>3</sup>

## 2.6 | INTERAÇÃO ENTRE DCs E O SISTEMAS IMUNE INATO E ADAPTATIVO

A localização e a apresentação de AGs determina a seleção de clones específicos, a partir de diversos meios de reconhecimento. De facto, geram-se respostas distintas de células T, consoante a captação do AG é realizada nos tecidos periféricos ou diretamente nos nódulos linfáticos.<sup>1,4</sup> Além disso, a maturação e os diferentes subtipos de DCs facilitam o controlo das diversas respostas de células T, bem como de outras classes de linfócitos, nomeadamente células B e células NK.<sup>4</sup>



### Figura 1 | Iniciação da resposta imunológica.<sup>1</sup>

Nos tecidos periféricos, as DCs captam AGs através de vários mecanismos complementares.<sup>1</sup>

Após captação do AG, as DCs sofrem um processo de maturação altamente regulado e transformam-se em APC extremamente eficientes, detendo a capacidade de induzir resposta imunológica.<sup>3</sup> A maturação encontra-se associada a um decréscimo da atividade de captação antigénica e a uma expressão aumentada dos níveis de moléculas MHC, assim como de múltiplas moléculas coestimuladoras, na sua superfície celular. A maturação das DCs também se relaciona com uma maior secreção de quimiocinas (que atraem células T *naive* e de memória). Durante este processo de maturação, as DCs carregadas com o AG, aumentam os níveis de recetor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7), o que lhes

permite o abandono dos tecidos periféricos (não linfóides), e a migração para os nódulos linfáticos (tecido linfóide).<sup>1,3</sup> Neste local, são responsáveis pela ativação dos linfócitos T e B, na medida em que se verifica o reconhecimento dos AGs sob a forma de complexos MHC-péptido, presente na superfície das DCs. A coestimulação e secreção de várias citocinas proporcionam uma amplificação adicional da apresentação antigénica, sendo crucial para indução de resposta imunológica apropriada.<sup>3</sup>

Como referido previamente, os AGs também podem alcançar diretamente as DCs residentes nos nódulos linfáticos. Nesse caso, estas são as primeiras responsáveis pela apresentação dos péptidos às células T CD4<sup>+</sup> *naive*, o que resulta na produção primordial de

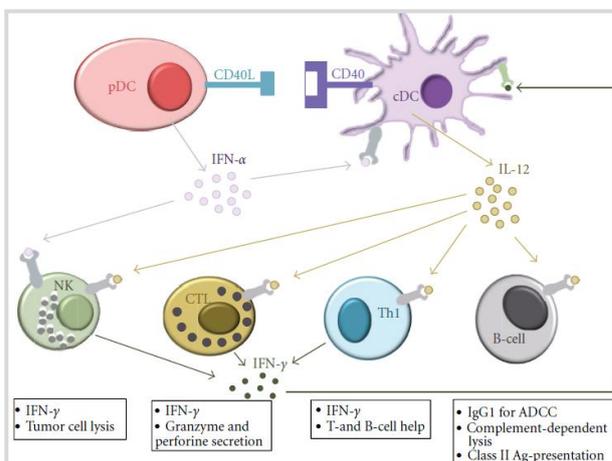
células T, bem como síntese de IL-2 que, por sua vez, facilita a proliferação e expansão clonal de células T.<sup>1</sup>

Na ausência de estímulos, as DCs imaturas encontram-se em *steady state*, pelo que apresentam AGs próprios às células T, induzindo tolerância ora por eliminação de células T, ora através da polarização para células Treg ou supressoras.<sup>4</sup>

Em suma, na sequência da interação entre as DCs e as células T CD4<sup>+</sup> e células T CD8<sup>+</sup> pode ocorrer diferenciação em células T efetoras com funções distintas. As células T CD4<sup>+</sup> podem ser convertidas em células Th1, Th2, Th17 ou células T auxiliares foliculares (Tfh), auxiliando a diferenciação das células B em células secretoras de anticorpos, assim como em células Treg, contrariando as funções de outros linfócitos. Já as células T CD8<sup>+</sup> *naive* podem dar origem a CTLs.<sup>1</sup>

Por último, saliente-se que as DCs também podem interagir com outras células do sistema imunológico, como células NK, fagócitos e mastócitos.<sup>1</sup>

## 2.7 | INTERCOMUNICAÇÃO DAS DCs



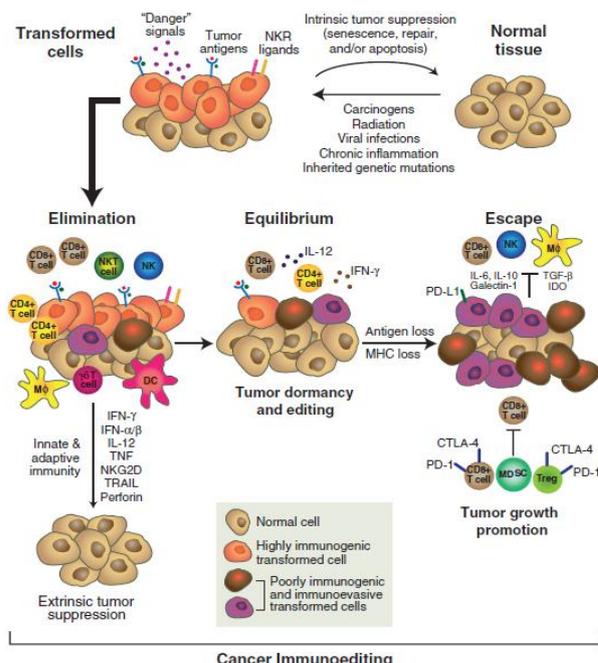
**Figura 2 | Ação cooperativa dos diferentes subtipos de DCs sobre a imunidade inata e adaptativa no combate de tumores e infecções virais.<sup>3</sup>**

Os subtipos de DCs ainda comunicam entre si. Por exemplo, as pDCs produzem interferões e expressam moléculas coestimuladoras ligadas à membrana que recrutam outras DCs para intervirem na

imunidade.<sup>4</sup> Tem sido demonstrado que as pDCs potenciam a resposta imune por *cross-talking* com as cDCs - através da produção de IFN-α – comportando, deste modo, um papel na estimulação da imunidade adaptativa.<sup>3</sup>

## 3 | CANCRO: ELIMINAÇÃO, EQUILÍBRIO E EVASÃO

De acordo com o modelo atualmente aceite de *Cancer Immunoediting*, apesar de uma competente ação do sistema imunitário, os tumores adquirem a capacidade de desenvolvimento e crescimento em três passos sequenciais (eliminação, equilíbrio e evasão). Numa fase inicial – fase de eliminação - verifica-se controlo eficiente do crescimento de células cancerígenas devido à indução de robustas respostas imunes específicas do tumor.<sup>6</sup>



**Figura 3 | Conceito de Cancer Immunoediting.**<sup>6</sup>

A resistência de variantes raras de células tumorais à erradicação na fase inicial de eliminação pode conduzi-las a uma fase de equilíbrio. Supõe-se que a fase de equilíbrio seja a de maior duração, em que o crescimento tumoral é prevenido por mecanismos imunológicos, sendo requeridas células T, IL-12 e INF- $\gamma$  para manutenção das células tumorais num estado funcional de latência/dormência. Contudo, como

consequência da instabilidade genética das células tumorais mantidas em equilíbrio poderão surgir alterações: i) perda de reconhecimento da imunidade adaptativa (perda de AGs ou desenvolvimento de defeitos de processamento ou apresentação antigénica); ii) insensibilidade aos mecanismos efetores imunológicos; ou iii) indução de um estado imunossupressor no contexto de microambiente tumoral. Deste modo, tais modificações, que se traduzem na redução da sua imunogenicidade ou aumento de resistência às ações citotóxicas promovidas pelo sistema imunitário, propiciam o crescimento tumoral descontrolado associado a uma consequente manifestação clínica de cancro – fase de evasão.<sup>6,7</sup>

## 4 | MÉTODOS EX-VIVO E IN VIVO DE IMUNOTERAPIA BASEADA EM DCS

### 4.1 | MÉTODO EX VIVO DE PRODUÇÃO DE DCs

O desenvolvimento de métodos *ex vivo* de produção de DCs é uma das abordagens de uso imunoterapêutico das DCs. Não existe ainda consenso quanto a um método *ex vivo* ideal, podendo recorrer-se à diferenciação a partir de precursores monócitos ou precursores hematopoiéticos CD34<sup>+</sup>, bem como à expansão *in vivo* de DCs circulantes.<sup>8</sup>

#### 4.1.1 | DCs derivadas de monócitos (moDCs)

A diferenciação de DCs a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) obtidas do doente trata-se da técnica utilizada mais comum. Envolve indução de diferenciação dos monócitos em DCs imaturas através de incubação com GM-CSF e IL-4, durante vários dias. Posteriormente, as DCs imaturas podem ser convertidas em DCs maduras através de incubação adicional na presença de estímulos indutores de maturação.<sup>8-10</sup>

Enquanto este método pode durar 5 a 7 dias, um outro método que culmina na obtenção das designadas *fastDCs* permite redução de período de tempo para 2 dias; porém, são requeridos estudos adicionais para testar este procedimento. Baseia-se na incubação de monócitos com GM-CSF e IL-4 durante 24 horas, sendo obtidos monócitos com características semelhantes a DCs imaturas. Estes, por sua vez, são cultivados na presença de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) e prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), durante mais 24 horas, com obtenção de DCs fenotipicamente maduras.<sup>8</sup>

#### 4.1.2 | DCs derivadas de precursores hematopoiéticos CD34<sup>+</sup>

Outra possibilidade prende-se com o uso de precursores CD34<sup>+</sup>. Os precursores CD34<sup>+</sup> são mobilizadas a partir da medula óssea, recorrendo-se ao tratamento dos doentes com GM-CSF (previamente ao procedimento de leucaferese). As células colhidas são cultivadas na presença de GM-CSF, Flt3L e TNF- $\alpha$ , durante uma semana, obtendo-se uma mistura de moDCs, DCs fenotipicamente semelhantes às células de Langerhans (LCs) epidérmicas e uma elevada proporção de células mielóides em diferentes estados de diferenciação. Note-se que a estimulação das células T pode dever-se às LCs em vez das DCs, enquanto as DCs podem desempenhar uma ação mais preponderante sobre a indução de resposta associada às células B.<sup>8</sup>

#### 4.1.3 | Expansão *in vivo* de DCs circulantes

A expansão de DCs circulantes, que constituem menos de 1% das PBMCs, pode ser alcançada através de administração de fatores de crescimento hematopoiético (como Flt3L). A expansão *in vivo* de subtipos de DCs leva à sobre-regulação de marcadores de maturação, produção de citocinas após estimulação, assim como indução de resposta de células T.<sup>8</sup>

## 4.2 | MATURAÇÃO DE DCs

O procedimento de maturação das DCs previamente à vacinação assume particular relevância. Porém, é complexo determinar os estímulos indutores de maturação apropriados para a obtenção de DCs com potente atividade imunoestimuladora. Têm sido testadas várias combinações de possíveis estímulos indutores de maturação, que incluem citocinas pró-inflamatórias, ligando do CD40 (CD40L ou CD154) e agonistas dos TLR.<sup>8-10</sup> A utilização destes últimos resulta na elevação dos níveis de IL-12, o que se pode traduzir numa indução potente de DCs para estimulação de resposta imunológica efetiva.<sup>8</sup>

## 4.3 | ESTRATÉGIAS DE CARREGAMENTO DE AGs

### 4.3.1 | Carregamento de péptidos, proteínas e células tumorais

O mecanismo mais comum para carregamento de DCs envolve a incubação de DCs com péptidos, proteínas ou células tumorais, antes ou após maturação. Os péptidos são carregados diretamente em moléculas MCH-I e II na superfície das DCs, enquanto as proteínas e células tumorais requerem processamento inicial e apresentação por DCs para estimulação de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. A maior desvantagem associada ao uso de péptidos corresponde à necessidade de conhecimento do haplótipo do doente e quais os péptidos próprios que se ligam a estes haplótipos específicos. Já as proteínas e células tumorais apresentam como principal vantagem não serem limitadas a um determinado haplótipo. Contudo, a sua maior desvantagem reside no facto da via MHC-I não se encontrar especificamente ativa, embora existam estudos que apontem para estimulação de células T CD8<sup>+</sup>, o que indica ocorrência de apresentação cruzada.<sup>8</sup>

### 4.3.2 | Vetores virais e bacterianos

O uso de vetores virais ou bacterianos para o carregamento de AGs nas DCs é uma alternativa atrativa, possibilitando a inserção de genes codificantes de AGs tumorais ou proteínas completas, assim como eliminação de genes codificantes de fatores de virulência ou de replicação. Em determinados casos, o vetor pode induzir maturação das DCs, contornando-se, deste modo, a necessidade de aplicação de um procedimento de maturação isolado. A possibilidade de adição de genes codificantes de citocinas ou moléculas coestimuladoras é outra mais-valia que acarreta, visto que permite incremento da imunogenicidade das DCs. Todavia, em contrapartida, a existência de imunidade pré-existente contra o vetor poderá reduzir a capacidade de indução de resposta *in vivo*, sendo que, aquando da ocorrência de tais situações, a segurança do doente passa a constituir a preocupação primária. É de notar que vetores baseados em lentivírus são tipicamente menos imunogénicos, dada a remoção da maioria dos genes codificantes de proteínas virais, sendo possível o seu uso repetido sem indução de resposta imune contra o vetor. Além disso, detêm potencial para estimular sensores citoplasmáticos ou endossomais (isto é, TLRs, RIG-I, PKR, etc.) para ativação do sistema imunitário inato; capacidade adicional de transdução de células quiescentes e em não divisão; potencial para uso como veículo de vacinação terapêutica direta, podendo conjugar-se glicoproteínas que direcionam para tipos celulares específicos, tendo como alvo direto os subtipos de DCs *in vivo*.<sup>8</sup>

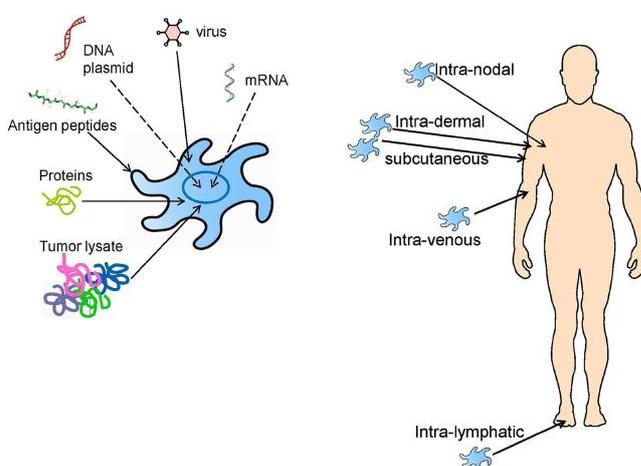
### 4.3.2 | Transfecção de RNAm

O carregamento de DCs com RNAm codificante de AGs associados ao tumor (TAAs) constitui uma opção atrativa, sendo que a transfecção de RNAm demonstrou induzir respostas das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Apresentando semivida curta e não integrando o genoma do hospedeiro, o RNAm pode ser carregado diretamente nas DCs, não exigindo o uso de vetores nem identificação de haplótipos de doentes.<sup>3,8</sup> Possibilita a apresentação de múltiplos epítomos antigénicos, assim como carregamento de estímulos indutores de maturação (como CD40L) ou citocinas. O método que se tem mostrado mais eficiente para introdução do RNAm no interior de DCs é a eletroporação, na medida em que promove um aumento temporário da permeabilidade celular que facilita a entrada do RNAm, sem recurso a reagentes adicionais.<sup>8</sup>

### 4.4 | ADMINISTRAÇÃO *IN VIVO* DE AGs ACOPLADOS A ANTICORPOS (ACs)

A administração *in vivo* de AGs acoplados a ACs específicos para as DCs representa uma abordagem mais recente - fazendo uso de vacinas baseadas em DCs - que contorna todo o processo dispendioso e intensivo de geração de DCs *ex vivo*. Esta estratégia permite a obtenção de vacinas em larga escala, visto que não assenta no conceito de vacina personalizada para cada doente. Mais importante ainda é o facto de permitir a estimulação *in vivo* de subtipos de DCs naturais em múltiplos locais.<sup>8</sup> São inúmeros os fatores a considerar para o desenvolvimento destas vacinas de *DC targeting*, nomeadamente a função biológica do subtipo de DC alvo (ex: indução de imunidade humoral e/ou celular); seleção de AGs e a sua formulação para controlo da doença; expressão de recetores característicos de determinado subtipo de DCs; escolha de adjuvantes e distribuição de subtipos de DCs pelos tecidos.<sup>11</sup>

## 5 | ENSAIOS CLÍNICOS: PROGRESSOS EM IMUNOTERAPIA ANTITUMORAL COM DCs



**Figura 4 | Abordagens de carregamento e administração de vacinas baseadas em DCs que têm sido testadas em ECs.<sup>13</sup>**

Durante a última década, têm sido desenvolvidos múltiplos métodos para carregamento de DCs com TAAs, tanto *ex vivo* como *in vivo*, com o intuito do seu uso sob a forma de vacinas antitumorais

capazes de induzir resposta imunológicas clinicamente relevantes.<sup>12</sup>

Pretende-se, nesta secção, apresentar um sumário dos resultados dos ensaios clínicos (ECs) recentemente completos, bem como a apresentação de alguns exemplos concretos destes ECs, a fim de avaliar os progressos de intervenções baseadas em DCs para terapia antitumoral.

## 5.1 | DCs CARREGADAS EX VIVO COM LISADOS TUMORAIS OU CORPOS APOPTÓTICOS

Esta estratégia terapêutica tem sido alvo de uma variedade ampla de ECs de fase I/II para avaliação da sua segurança e eficácia, englobando linfoma das células B, leucemia linfocítica crónica, linfoma das células T cutâneas, glioma, glioblastoma multiforme, carcinoma da tiróide, carcinoma pulmonar de células grandes, carcinoma da mama, mesotelioma, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma intra-hepático, melanoma, carcinoma das células renais, carcinoma colorrectal, carcinoma das células renais, cancro da próstata, neoplasias malignas pediátricas e cancros avançados mistos. Na sua globalidade, os resultados obtidos foram encorajadores, indicando ausência de toxicidade particular associada a esta estratégia, bem como ativação de resposta imunológica num número elevado de casos.<sup>12</sup>

Num estudo realizado com doentes com melanoma (43 doentes no estadio IV e 7 em estadio III), conclui-se que a vacinação com DCs autólogas carregadas com lisado celular alogénico (TRIMEL) derivado de três linhagens celulares de melanoma resultou em mais de 60% dos doentes com reação de hipersensibilidade retardada do tipo IV (DTH) positiva, associada a um aumento da sua sobrevivência e estabilidade da doença.<sup>14</sup> Note-se que, a partir de alguns estudos como este, foi possível correlacionar o desenvolvimento de respostas imunes antitumorais (avaliado em termos de aparecimento de DTH) com a melhoria de resultados clínicos, pelo que se mantém elevado interesse nesta estratégia imunoterapêutica.<sup>12</sup>

## 5.2 | DCs CARREGADAS EX VIVO COM TAAs

DCs carregadas *ex vivo* com TAAs (sejam proteínas de elevado tamanho, sejam pequenos péptidos) são capazes de gerar respostas imunológicas antitumorais tanto terapêuticas, como preventivas.<sup>12</sup> Desde os primeiros resultados provenientes de um estudo piloto da segurança de DCs carregadas *ex vivo* com TAAs em 4 doentes com linfoma folicular das células B com resultados clínicos evidentes em 3 deles (uma regressão completa, uma regressão parcial e uma resolução completa da doença, mediante avaliação de desaparecimento de marcadores moleculares específicos da doença),<sup>15</sup> inúmeras têm sido as abordagens testadas num número consistente de ECs de fase I/II, envolvendo uma grande

variedade de tumores.<sup>12</sup> No seu conjunto, têm demonstrado a segurança desta estratégia, assim como respostas clínicas completas ou parciais; porém, poucos são aqueles que seguem para ECs de fase III.<sup>12</sup> Exceção disso é, contudo, a vacina sipuleucel-T (carregada e ativada *ex vivo* com a fosfatase ácida prostática (PAP) recombinada com GM-CSF) que obteve, em 2010, aprovação pela FDA para o tratamento do cancro prostático, após EC de fase III que denunciou aumento da sobrevivência média dos doentes em cerca de 4 meses.<sup>16</sup>

### 5.3 | DCs CARREGADAS COM mRNA

O uso de RNA (quer RNA derivado do tumor, quer RNAm codificante de TAAs específicos sintetizados *in vitro*) tem sido testado durante a última década. Múltiplos foram os resultados obtidos constituindo prova inequívoca de que DCs carregadas *ex vivo* com RNA derivado de tumores são passíveis de induzir tanto resposta imune terapêutica, como preventiva. Na sua generalidade, estudos de fase I/II demonstraram que DCs ora transfectadas com RNA derivado do tumor, ora sujeitas a modificação genética para expressão exógena de TAAs são seguras, levando (numa parte dos casos) à ativação de resposta imune antitumoral.<sup>12</sup> A título de exemplo, apresenta-se o tratamento de doentes com melanoma com a vacina TriMixDC-MEL, que recorre à co-eletroporação de DCs com RNAm TriMix (codificante do ligando CD40L, TLR4 constitutivamente ativo e CD70) combinado com um de quatro RNAm codificantes de TAAs (tirosinase, MAGE-A3, MAGE-C2 ou gp100). Procedeu-se à monitorização da presença de células T CD8<sup>+</sup> específicas de TAA infiltrantes na pele nos locais de injeção intradérmica, bem como na circulação sanguínea de doentes com melanoma. Nestes dois compartimentos, 10 de 14 doentes examinados - ou seja, em 71% dos doentes - revelaram reconhecimento de qualquer um dos quatro TAAs presentes na vacina. Na totalidade, foram detetadas 30 respostas de células T específicas de TAA na pele e 29 respostas das células T do sangue periférico, das quais 24 comuns. Uma caracterização detalhada da especificidade antigénica das populações de células T CD8<sup>+</sup> permitiu concluir um determinado grau de compartimentação de células T CD8<sup>+</sup>, dada a sua distribuição na pele e no sangue periférico após terapêutica com TriMixDC-MEL.<sup>17</sup>

### 5.4 | DCs FUNDIDAS EX VIVO COM CÉLULAS TUMORAIS

Esta estratégia baseia-se na formação de células híbridas resultantes da fusão de DCs com células cancerígenas, também designadas por “dendritomas”. ECs de fase I/II que decorreram na última década demonstraram que a administração de dendritomas apresenta segurança, sendo associada ao desenvolvimento de respostas DHT (indicativas de ativação do sistema imunitário) numa alargada proporção de casos.<sup>12</sup> Por exemplo, a vacinação com dendritomas resultantes da fusão de DCs autólogas e células de mieloma derivadas dos doentes com

mieloma múltiplo, em conjunto com GM-CSF, demonstrou indução de respostas imunológicas antitumorais humoral e celular, sendo que a maioria dos doentes com doença avançada revelou estabilização da doença.<sup>18</sup>

### 5.5 | OUTRAS ABORDAGENS BASEADAS EM DCs

Outras estratégias, além das anteriormente descritas, têm explorado o potencial imunogénico das DCs com variáveis graus de sucesso, nomeadamente a administração intratumoral de DCs expandidas *ex vivo* (mas não carregadas com TAAs); DCs baseadas em exossomas; e administração direta de AGs acoplados a ACs (*in vivo DC targeting*).<sup>12</sup> Dada a contínua necessidade de desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas antitumorais, num estudo de fase I realizado com doentes com cancro pulmonar das grandes células, foram testados exossomas - que não são mais que vesículas lipídicas derivadas de células que expressam elevados níveis de um espectro estreito de proteínas celulares. Os exossomas derivados de DCs autólogas e carregados com TAAs evidenciaram viabilidade e boa tolerabilidade, além de alguns doentes revelarem estabilização de longo termo da doença e ativação da resposta específica de células T e aumento da atividade lítica de células NK.<sup>19</sup> A administração intratumoral de DCs expandidas *ex vivo*, que não é aplicável a um alargado conjunto de cancros pela altíssima taxa de morbilidade associada, tem demonstrado melhoria de resultados clínicos em ECs de fase I/II; mas não sempre, muito provavelmente devido ao facto de subtipos distintos de DCs não serem discriminadas de modo apropriado pelos marcadores comuns detetados por imunohistoquímica.<sup>12</sup>

### 5.6 | CONCLUSÕES A CONSIDERAR PARA PRÓXIMAS GERAÇÕES DE ECs

Dado o manancial de ECs usando métodos semelhantes para a maturação de DCs é crucial investigar mudanças de métodos baseadas nos mais recentes resultados. Os resultados de ECs até ao momento divulgados refletem unanimidade quanto à segurança associada à imunoterapia antitumoral baseada em DCs. Como tal, a iniciação desta prática em doentes em estadios menos avançados da doença pode resultar em melhores resultados clínicos.<sup>20</sup>

Um aspeto relevante associado à seleção de TAAs pode centrar-se na identificação de AGs relacionados com o crescimento tumoral. Uma limitada fração de TAAs (aproximadamente 10%) parece ser imunogénica, da qual apenas alguns TAAs constituem genuínos AGs associados a rejeição tumoral (TRAs), isto é, AGs indutores de resposta imunológica resultante em erradicação tumoral. Deste modo, esforços adicionais terão que ser exercidos para identificação de autênticos TRAs, um processo altamente personalizado que envolve sequenciação do exoma seguido de testes de validação funcional.<sup>12,21</sup>

Relativamente ao carregamento de AGs, as vacinas podem conter múltiplos TAAs, de forma a induzir os diferentes efetores do sistema imunitário. As DCs podem ser carregadas com células tumorais inteiras ou lisados de células tumorais ou ainda transfetadas com todo o RNA tumoral, o que leva a uma vacinação com um completo conteúdo antigénico associado ao tumor.<sup>8,21</sup>

Outro aspeto relevante prende-se com a via de administração mais apropriada de vacinas, pois a via intradérmica demonstrou nível reduzido de migração para os nódulos linfáticos (inferior a 2%), enquanto a via intranodular sob controlo de ultrasonda apresenta risco de injeção numa área de gordura, ao invés de na área celular. A monitorização da migração *in vivo* de DCs (como, por exemplo, através de uma nova estratégia baseada em ressonância magnética recorrendo à marcação de vacinas de DCs com perfluoropolietileno (PFPE)<sup>22</sup>) e a otimização de vias de administração poderá contribuir para a obtenção de uma vacinação com DCs mais potente.<sup>13</sup>

A propósito de a administração de DCs poder não resultar numa eficiente localização a nível tumoral e embora DCs extra-tumorais possam fornecer benefícios terapêuticos, estão a ser desenvolvidas estratégias que visam dirigir a migração de DCs para os nichos tumorais.<sup>12</sup>

As vacinas baseadas em DCs podem apresentar limitações enquanto terapêutica isolada, no entanto, em combinação com outras estratégias podem aumentar a eficácia, como será abordado adiante mais detalhadamente. Numerosos são os ECs a decorrerem atualmente focados na combinação da imunoterapia com as terapias convencionais (cirurgia, quimioterapia e radioterapia), dado o seu enorme potencial.<sup>13</sup>

Em última análise, conclui-se que são indubitáveis os progressos no campo da vacinação com DCs através da aplicação de abordagens cada vez mais definidas, focadas e coerentes com base em resultados anteriores. Adivinha-se uma futura geração de vacinas na área de medicina personalizada, isto é, vacinas seletivas para cada doente tendo por base a sua biologia tumoral específica.<sup>13</sup>

## 6 | NOVAS ESTRATÉGIAS E PERSPETIVAS FUTURAS

### 6.1 | ESTRATÉGIAS PARA INIBIR O MICROAMBIENTE TUMORAL

O ambiente imunossupressor medeia inúmeros mecanismos de escape/evasão à imunovigilância antitumoral, designadamente: i) perda de expressão de AGs tumorais; ii) alteração de moléculas MHC; iii) falta de coestimulação; iv) expressão de ligandos inibitórios; v) indução de células T reguladoras; vi) expressão de indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) - enzima implicada na geração de células Treg; vii) produção de citocinas imunossupressoras

(fator de transformação do crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), IL-6 e IL-10). Deste modo, estratégias que visam inibir a tolerância/supressão induzida por tumores podem aumentar a imunogenicidade e potenciar a eficácia *in vivo* de vacinas baseadas em DCs.<sup>8</sup>

#### **6.1.1 | Inibição de moléculas inibitórias**

O bloqueio da interação entre o recetor de morte programada I (PD-1) de células T ativadas e seu ligando (PD-L1) sobreexpresso em vários tumores e DCs tem mostrado aumentar a resposta imunológica *in vitro*. A interferência sobre este mecanismo pode ser realizada com recurso a ACs anti-PD-1,<sup>8</sup> bem como silenciamento dos ligandos PD-L1 e PD-L2 em DCs através de *small interfering RNA* (siRNA).<sup>20,23</sup>

Outro alvo promissor que tem sido sujeito a inibição é o antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4) - envolvido na inibição da ativação de células T – através de ACs anti-CTLA-4, que visa a manutenção das respostas imunológicas mediadas pelas CTLs.<sup>8,20</sup> O ipilimumab trata-se de um AC anti-CTLA-4, que devido ao seu sucesso terapêutico foi aprovado pela FDA em 2011 para o tratamento de melanoma metastático.<sup>20</sup>

Outra possibilidade é o direcionamento de componentes para alvos das vias de sinalização envolvidas na inibição da função de DCs, nomeadamente família de supressores de sinalização das citocinas (SOCS) e *Glucocorticoid-induced leucine zipper* (GILZ). A família SOCS tem mostrado inibir a via de sinalização JAK/STAT - importante para a resposta das DCs a agonistas TLR. Pode recorrer-se ao uso de siRNA para a sua inibição. Também a inibição do GILZ poderá apresentar benefícios terapêuticos, uma vez que tem demonstrado alterar a maturação de DCs em resposta a agonistas TLR e CD40L; além de a sua expressão em macrófagos infiltrantes associados a linfoma de Burkitt contribuir para a falha do sistema imunológico na rejeição do tumor.<sup>11</sup>

#### **6.1.2 | Inibição de células Treg**

Atualmente estão a ser exploradas estratégias imunoterapêuticas dirigidas para citocinas imunossupressoras (IL-10 e TNF- $\beta$ ) com o intuito de aumentar a eficácia de vacinas. A inclusão de anticorpos anti-recetor da IL-10 em terapias combinadas demonstrou aumento da resposta imunológica específica e produção de IL-12. Por sua vez, a inibição da TGF- $\beta$  suprimiu a proliferação de células Treg e aumentou o número de células T específicas de TAA.<sup>11</sup>

#### **6.1.3 | Aumento da coestimulação de células T**

O recetor 4-1BB/CD137 (membro da família do recetor do TNF) é expresso por células T ativadas e reconhece ligandos presentes nas APCs, pelo que se presume que apresente um

papel relevante na sobrevivência de células T CD8<sup>+</sup> de memória. Um AC anti-CD137 demonstrou aumento de rejeição tumoral por promover a sobrevivência de células T CD8<sup>+</sup>, sendo este efeito antitumoral mediado por DCs. Outro recetor promissor parece ser o CD40. A sua expressão em DCs aumenta a conexão com o ligando, CD40L, presente nas células T CD4<sup>+</sup>, gerando-se aumento da produção de moléculas coestimuladoras e citocinas com subsequente ativação de células T CD8<sup>+</sup>. A interação entre CD40 e CD40L pode também aumentar a apresentação cruzada efetuada pelas DCs. Uma nova abordagem para aumento do estado ativado de DCs relaciona-se com o uso de um recetor recombinante contendo o domínio citoplasmático de CD40 fundido com o domínio de ligação do ligando e uma sequência dirigida para a membrana. A ativação de DCs com este recetor recombinante resultou numa ativação prolongada, indução mais potente de células T CD8<sup>+</sup> e erradicação tumoral.<sup>11</sup>

#### 6.1.4 | Ativação de potenciadores imunológicos

As citocinas IL-15, IL-17 e IL-12 têm demonstrado aumentar a sobrevivência e função das células T. O uso de agonistas TLR, por sua vez, tem sido associado à ativação sustentada de DCs, aumento da função de CTLs, aumento dos níveis de IL-2, maior migração em resposta ao ligando CCR7, indução de resposta humoral e indução de células T CD4<sup>+</sup>. De entre alguns exemplos de ligandos TLR eficazes na ativação de resposta imunológica encontra-se o imiquimod (ligando para TLR7 e TL8) usado para o tratamento do carcinoma das células basais superficiais, assim como inúmeros outros testados atualmente em ECs - oligodesoxinucleótidos CpG dirigido para TLR9 e ácido polinosínico-policidílico (polyI:C), que dependendo do seu tamanho, é direcionado para TLR3 ou helicases.<sup>18</sup>

#### 6.2 | *IN VIVO* DC TARGETING

Esta nova abordagem de *in vivo DC targeting*, alternativa aos métodos *ex vivo*, envolve o direcionamento para moléculas específicas de DCs. Os recetores candidatos abrangidos são recetores Fc, CD40 e CLR. Estes últimos são os mais atrativos, na medida em que distintos subtipos de DCs expressam diversos CLR (como DEC205, DC-SIGN, recetores de manose (MR) ou *Dectin-1*). Além disso, os CLR encontraram-se envolvidos na captação de numerosos AGs glicosilados próprios e de patogénios para apresentação antigénica, recrutamento de DCs, interações entre DCs e células T e, conseqüentemente, ativação de resposta imunológica.<sup>8</sup> Acrescente-se a tudo isso que o direcionamento de AGs para CLR resultou no aumento de respostas de ACs.<sup>24</sup> A maioria dos estudos realizados decorreram em ratos, sendo requeridos estudos adicionais que comprovem a eficácia desta estratégia em humanos.<sup>8</sup>

### 6.3 | INTERVINENTES DO SISTEMA IMUNITÁRIO COM POTENCIAL PROMISSOR

Dado que a resposta imunitária resulta de esforços combinados de múltiplos intervenientes do sistema imune, estratégias dirigidas para células NK, células NKT, DCs CD14<sup>+</sup>, LCs e pDCs poderão assumir particular interesse.<sup>8,20,21</sup>

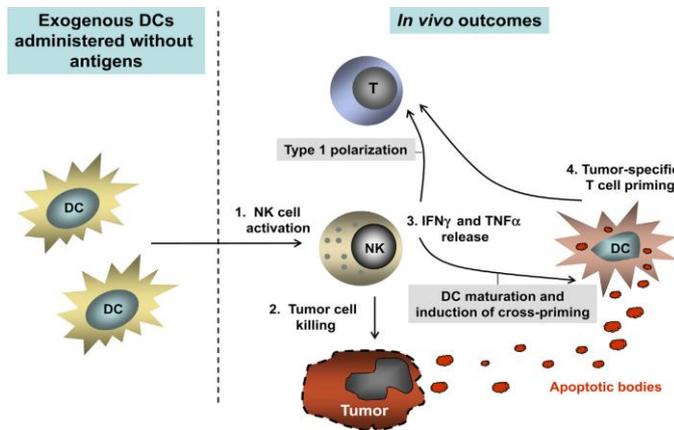


Figura 5 – Mecanismo de resposta imunológica antitumoral associado a DCs exógenas administradas sem AGs.<sup>21</sup>

Vários estudos têm abordado a capacidade de estimulação de células Th1, Tregs e CD8<sup>+</sup> por parte de DCs, enquanto a sua capacidade de *cross-talk*

com células NK tem sido frequentemente ignorada.<sup>20,21</sup> Estas DCs conduzem à ativação de células NK, que atuam diretamente na destruição de células tumorais e corpos apoptóticos. Após ativação, as células NK também libertam citocinas relevantes (INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) que se traduz em múltiplos efeitos no desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa, nomeadamente na polarização de respostas T do tipo I, ativação de DCs e promoção da sua capacidade para apresentação cruzada de antígenos adquiridos após destruição de células tumorais mediada pelas células NK.<sup>21</sup>

Os mecanismos de *cross-talk* entre DCs e células NKT podem potenciar a ativação de DCs e produção de IL-12; de referir ainda que a presença de células NKT disfuncionais em várias neoplasias malignas avançadas sustenta a necessidade de abordagens dirigidas para este tipo de células.<sup>8</sup>

Estudos realizados em subclasses de DCs da pele humana indicam que as LCs parecem ser especializadas na indução de CTLs.<sup>25</sup> Já as DCs CD14<sup>+</sup> da derme revelam indução potente de resposta humoral. Para este caso, o recetor DC-SIGN expresso pelas DCs CD14<sup>+</sup> pode ser usado como alvo.<sup>11,26,27</sup> Deste modo, as vacinas mais eficientes poderão ser as que apresentam como alvos DCs CD14<sup>+</sup> e LCs, com o objetivo de desencadear uma resposta imune humoral e celular.<sup>11</sup> Mais estudos são necessários para clarificar o benefício clínico do uso específico de DCs CD14<sup>+</sup> e pDCs, uma vez que grandes expectativas foram criadas face à recente descoberta que enfatiza o papel das DCs CD14<sup>+</sup> como a subclasse de DCs mais eficiente na apresentação cruzada, bem como o papel das pDCs que podem estar envolvidas na resposta imunitária contra tumores, particularmente devido ao seu potencial como APC profissional.

## 6.4 | SINERGIA DE COMBINAÇÕES TERAPÊUTICAS

### 6.4.1. | Combinação com quimioterapia ou radioterapia convencional

O tratamento citotóxico pode surtir múltiplos efeitos positivos sobre o sistema imunológico, desde a simples libertação de AGs tumorais devido à destruição de células cancerígenas, até aos efeitos imunológicos desencadeados pela ação citotóxica. De facto, a libertação de AGs tumorais potencia a captação e apresentação de um conjunto amplo de AGs para ativação de células T. No que diz respeito aos efeitos imunológicos promovidos pela sua ação citotóxica, destaca-se a sobre-regulação de moléculas imunoestimulatórias (ex. DAMPs), expressão aumentada de AGs tumorais, redução de células supressoras, bem como acréscimo da proliferação e ativação de CTLs.<sup>13</sup>

Como exemplo, 26 doentes afetados por tipos distintos de cancro avançado refratário ao tratamento foram sujeitos a uma terapêutica combinada de radioterapia, DCs imaturas, hemocianina (KLH) e células T; 21 de 26 doentes mostraram uma eliminação bem sucedida de tumores metastáticos e recorrentes no tratamento inicial, sendo que metade revelou resposta completa, sem evidência de recorrência da doença. Estes resultados promissores incentivam a investigação da combinação de métodos convencionais juntamente com imunoterapia antitumoral baseada em DCs.<sup>28</sup>

### 6.4.2. | Combinação de vacinas baseadas em DCs com a supressão de sinais inibitórios

Tal como anteriormente abordado, estratégias de supressão de sinais inibitórios, nomeadamente através do silenciamento em DCs dos ligandos PD-L1 e PD-L2 através de *small interfering RNA* (siRNA),<sup>20,23</sup> bem como o uso do ACs anti-CTLA-4 (como ipilumab) poderão constituir estratégias promissoras para combinação com vacinas baseadas em DCs.<sup>20</sup>

## 7 | PAPEL DO FARMACÊUTICO

Tendo em consideração os sólidos conhecimentos que o farmacêutico detém na área de tecnologia farmacêutica e no âmbito da biotecnologia, este profissional de saúde pode constituir, a meu ver, um elemento de excelência para desenvolvimento de investigação de novas estratégias focadas na viabilização e potenciação da imunoterapia baseada em DCs.

Com a finalidade de exemplificá-lo, apresentam-se dois recentes estudos focados na aplicação de duas tecnologias distintas bastante promissoras: nanoencapsulação associada a *microneedles*,<sup>29</sup> bem como a reprogramação celular.<sup>30</sup>

O primeiro corresponde à utilização de *microneedles*, consistindo num método que facilita a entrada dos AGs por via transdérmica, pois são aplicadas na superfície da pele, atravessando a camada córnea e atingindo as camadas da pele viáveis. Trata-se de uma técnica minimamente invasiva que permite veicular AGs nanoencapsulados especificamente para DCs residentes na pele. Após captação *in situ* dos AGs, as DCs adquirem a capacidade de conduzir as nanopartículas (NPs) de AGs encapsulados para os nódulos linfáticos drenantes cutâneos, onde subsequentemente induzem expansão significativa de células T. A nanoencapsulação facilita a retenção dos AGs nas camadas cutâneas, ao mesmo tempo que potencia a estabilidade dos AGs nas *microneedles*. Em suma, esta estratégia de vacinação é extremamente promissora, uma vez que a administração de NPs poliméricas biodegradáveis através das *microneedles* parece aumentar a sua segurança, eficácia e adesão à terapêutica.<sup>29</sup> O segundo exemplo assenta nos recentes avanços decorrentes da área de reprogramação celular, relacionando-se com o desenvolvimento de protocolos para gerar fontes ilimitadas de DCs a partir de células estaminais pluripotentes induzidas (iPSC). Estudos recentes sugerem que um subtipo de DCs CD141<sup>+</sup> apresenta um potencial elevado na indução de resposta antitumoral; no entanto, este subtipo de DCs existe em quantidades diminutas no sangue periférico, facto que compromete fortemente a sua aplicação clínica. Como tal, foi realizado um estudo que aborda a sua diferenciação a partir de iPSC humanas demonstrando resultados bastante promissores. Tal estratégia foca-se no desenvolvimento de fontes ilimitadas de DCs autólogas eficazes na apresentação cruzada de TAAs no contexto de imunoterapia antitumoral.<sup>30</sup>

## 8 | CONCLUSÃO

A importância das DCs na modulação da imunidade, quarenta e um anos após a sua descoberta, foi recentemente enfatizada com a atribuição do Prémio Nobel da Medicina, em 2011, a Ralph Steinman “pela descoberta das DCs e o seu papel na imunidade adquirida”. Embora tenha sido inicial alvo de algum ceticismo por parte da comunidade médica, a utilização das DCs em imunoterapia continua a constituir uma abordagem terapêutica bastante promissora,<sup>1</sup> facto evidenciado pela sua ampla utilização em ECs com o intuito de originar ou amplificar respostas imunológicas antitumorais. O conceito subjacente baseia-se na instrução das DCs do próprio doente para eliminarem as células tumorais.<sup>3,20</sup> Contudo, a necessidade de otimização das condições para produção de DCs imunoestimuladoras, assim como a tolerância e supressão induzida pelo microambiente tumoral têm contribuído para o seu sucesso limitado. Novas estratégias poderão constituir a chave para o alcance de respostas imunológicas antitumorais eficazes e de elevada duração, traduzíveis em excelentes

resultados clínicos, nomeadamente a associação de vacinas de DCs com novas abordagens que contornem os mecanismos imunossupressores, o aumento da imunogenicidade e a interação e ativação de diversos intervenientes do sistema imunitário, recentemente identificados como críticos para a resposta antitumoral.

Reforce-se, em última análise, que o contributo do farmacêutico nesta área pode ser fundamental através da aplicação dos seus conhecimentos inerentes às áreas de tecnologia e biotecnologia farmacêutica.

**“Just as immunotherapy is moving to the forefront of cancer therapy, DC-based therapy is moving to the forefront of cancer immunotherapy.”<sup>1</sup>**

(Karolina Palucka e Jacques Banchereau)

## 9 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. - Cancer immunotherapy via dendritic cells. **Nat. Rev. Cancer.** 12 (2012) 265–277.
2. BANCHEREAU, J; STEINMAN, R. M. - Dendritic cells and the control of immunity. **Nature.** 392 (1998) 245–252.
3. BRUSSEL, I.; BERNEMAN, Z. N.; COOLS, N. - Optimizing Dendritic Cell-Based Immunotherapy: Tackling the Complexity of Different Arms of the Immune System. **Mediators Inflamm** - 2012 (2012) 1–14.
4. STEINMAN, R. M.; BANCHEREAU, J. - Taking dendritic cells into medicine. **Nature.** 449 (2007) 419–426.
5. BOURDREAU, J. E. [et al.] - Engineering dendritic cells to enhance cancer immunotherapy. **Mol. Ther.** 19 (2011) 841–853.
6. SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. - Cancer immunoediting: integrating immunity’s roles in cancer suppression and promotion. **Science.** 331 (2011) 1565–1570.
7. ZITVOGEL, L.; TESNIERE, A.; KROEMER, G. - Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. **Nat. Rev. Immunol.** 6 (2006) 715–727.
8. SABADO, R. L.; BHARDWAJ, N. Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment. **Immunotherapy.** 2 (2010) 37–56.
9. AMEDEI, A. [et al.] - Novel immunotherapeutic strategies of gastric cancer treatment. **J. Biomed. Biotechnol.** (2011) 17p.

10. NICOLETTE, C. A. [et al.] - Dendritic cells for active immunotherapy: Optimizing design and manufacture in order to develop commercially and clinically viable products. **Vaccine**. 25 (2007).
11. UENO, H. [et al.] - Targeting human dendritic cell subsets for improved vaccines. **Semin. Immunol**. 23 (2011) 21–27.
12. GALLUZZI, L. [et al.] - Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy. **Oncoimmunology** 1 (2012) 1111–1134.
13. BUTTERFIELD, L. H. - Dendritic Cells in Cancer Immunotherapy Clinical Trials: Are We Making Progress? **Front. Immunol**. 4:454 (2013).
14. LÓPEZ, M. N. [et al.] - Prolonged survival of dendritic cell-vaccinated melanoma patients correlates with tumor-specific delayed type IV hypersensitivity response and reduction of tumor growth factor beta-expressing T cells. **J. Clin. Oncol**. 27 (2009) 945–52.
15. HSU, F. J. [et al.] - Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. **Nat. Med**. 2 (1996) 52–58.
16. KANTOFF, P. W. [et al.] - Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. **N. Engl. J. Med**. 363 (2010) 411–422.
17. BENTEYN, D. [et al.] - Characterization of CD 8 + T-Cell responses in the peripheral blood and skin injection sites of melanoma patients treated with mRNA electroporated autologous dendritic cells (TriMixDC-MEL). **Biomed Res. Int**. (2013) 8p.
18. ROSENBLATT, J. [et al.] - Vaccination with dendritic cell/tumor fusion cells results in cellular and humoral antitumor immune responses in patients with multiple myeloma. **Blood** 117 (2011) 393–402.
19. MORSE, M. A. [et al.] - A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. **J. Transl. Med**. 3:9 (2005).
20. H. YI, D.; APPEL, S. - Current Status and Future Perspectives of Dendritic Cell-Based Cancer Immunotherapy. **Scand. J. Immunol**. 78 (2013) 167–171.
21. BONACCORSI, I. [et al.] - Novel perspectives on dendritic cell-based immunotherapy of cancer. **Immunol. Lett**. 155 (2013) 6–10.
22. HELFER, B. M. [et al.] - Functional assessment of human dendritic cells labeled for in vivo (19)F magnetic resonance imaging cell tracking. **Cytotherapy** 12 (2010) 238–250.

23. HOBO, W. [et al.] - Improving dendritic cell vaccine immunogenicity by silencing PD-I ligands using siRNA-lipid nanoparticles combined with antigen mRNA electroporation. **Cancer Immunol. Immunother.** 62 (2013) 285–297.
24. BOSCARDIN, S. B. [et al.] - Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *J. Exp. Med.* 203 (2006) 599–606.
25. KLECHEVSKY, E. [et al.] - Cross-priming CD8<sup>+</sup> T cells by targeting antigens to human dendritic cells through DCIR. **Blood.** 116 (2010) 1685–1697.
26. TACKEN, P. J. [et al.] - Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. **Blood** 106 (2005) 1278–1285.
27. KRETZ-ROMMEL, A. [et al.] - In vivo targeting of antigens to human dendritic cells through DC-SIGN elicits stimulatory immune responses and inhibits tumor growth in grafted mouse models. **J. Immunother.** 30 (2007) 715–726.
28. HASUMI, K. [et al.] - Therapeutic Response in Patients with Advanced Malignancies Treated with Combined Dendritic Cell–Activated T Cell Based Immunotherapy and Intensity–Modulated Radiotherapy. **Cancers.** 3 (2011) 2223–2242.
29. ZARIC, M. [et al.] - Skin dendritic cell targeting via microneedle arrays laden with antigen-encapsulated poly- D, L -Lactide- Co -Glycolide nanoparticles induces efficient antitumor and antiviral immune responses. **ACS Nano.** 7 (2013) 2042–2055.
30. SILK, K. M. [et al.] - Cross-presentation of tumour antigens by human induced pluripotent stem cell-derived CD141<sup>+</sup>XCRI<sup>+</sup> dendritic cells. **Gene Ther.** 19 (2012) 1035–1040.