

Ana Filipa Simões Henriques

Vacinas de células dendríticas para indução de tolerância: Aplicação na Diabetes *Mellitus* Tipo I

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Bruno Neves e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Filipa Simões Henriques

Vacinas de células dendríticas para indução de tolerância: Aplicação na Diabetes *Mellitus* Tipo I

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Bruno Neves e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Ana Filipa Simões Henriques, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009010511, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de 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, 8 de julho de 2015.

O Tutor

(Dr. Bruno Miguel Rodrigues das Neves)

A Aluna

(Ana Filipa Simões Henriques)

Agradecimentos

Um muito obrigado:

Ao Professor Doutor Bruno Neves, pelos esclarecimentos e pela disponibilidade e brevidade durante todo o processo de desenvolvimento desta monografia.

Aos meus pais e avós que sempre me lembraram o caminho a seguir mesmo quando as dúvidas surgiam, não somente nestes seis anos, mas em todo o meu percurso académico.

Lista de Abreviaturas

Células NK: Células natural killers

CLPs: Progenitores comuns linfóides

CMPs: Progenitores comuns mielóides

DCs: Células dendríticas

DM1: Diabetes *Mellitus* tipo 1

DM2: Diabetes *Mellitus* tipo 2

HSC: Células estaminais hematopoiéticas

IL-4: Interleucina 4

MAPKs: Cinases proteicas ativadas por mitogénios

mDCs: DCs mielóides

MHC: Complexo major de histocompatibilidade

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro

pDCs: DCs plasmocitóides

Ratinhos NOD: ratinhos ‘nonobese diabetic’

TCR: Recetor de célula T

tDCs: DCs tolerogénicas

Th1: Linfócitos T auxiliares de tipo 1

Treg: células T reguladoras

Resumo

A Diabetes Mellitus Tipo I (DMI) é uma doença crônica caracterizada pela destruição autoimune das células beta (células β) pancreáticas produtoras de insulina. A etiologia exata da DMI é desconhecida, no entanto uma predisposição genética e a exposição a fatores ambientais, tais como infecções virais e toxinas têm sido associados à perda de tolerância a antígenos das células β .

Atualmente o tratamento da DMI passa essencialmente pela administração exógena de insulina de forma a controlar os níveis de glicemia. Dado o caráter autoimune da patologia, novas abordagens terapêuticas têm-se focado na minimização da destruição das células β pelos linfócitos T auxiliares de tipo I (Th1) e T CD8⁺. Neste contexto, uma das estratégias mais promissoras passa pela indução de tolerância através da utilização de células dendríticas tolerogênicas (tDC). As células dendríticas são células apresentadoras de antígenos com uma capacidade invulgar de modular as respostas imunológicas. Têm por essa razão sido amplamente utilizadas no *design* de imunoterapias para doenças do foro oncológico e infeccioso ou para a indução de tolerância em doenças autoimunes, transplantes e alergias. No caso concreto da DMI, vários estudos pré-clínicos demonstraram que a administração de tDCs geradas *ex vivo* induz tolerância aos antígenos das células β diminuindo a sua destruição e por conseguinte o estabelecimento da doença. As evidências de eficácia da abordagem em humanos são, no entanto, ainda praticamente inexistentes.

A presente monografia visa deste modo transmitir uma perspetiva do estado da arte no que se refere às abordagens que recorrem a vacinas de células dendríticas para a prevenção/tratamento da DMI.

Palavras-chave: diabetes tipo I, doenças autoimunes, indução de tolerância, vacinas de células dendríticas.

Abstract

Type I Diabetes (T1D) is a chronic disease characterized by the autoimmune destruction of insulin producer cells – the pancreatic beta cells (β cells). Even though the etiology of this disease remains unknown, certain genetic and ambient factors such as viral infections and toxins, have been linked to the loss of tolerance to β cells antigens.

The treatment of T1D relies on the administration of exogenous insulin in order to control the glucose blood levels. Because of its autoimmune character, novel therapeutic approaches are focused in reducing β cell destruction by Th1 and CD8⁺ cytotoxic T cells. One of the most encouraging strategies consists in the induction of tolerance by means of tolerogenic dendritic cells (tDC). Dendritic cells are antigen presenting cells that are able to modulate immunological responses, and for that are widely used in the design of immunotherapies for cancer, infection and tolerance induction in autoimmune diseases, allergy and transplants. In the particular case of T1D, several pre-clinical studies have demonstrated that the administration of *ex-vivo* manipulated tDCs can induce tolerance to β cells antigens, reducing their destruction and promoting disease stabilization. However, evidence is still needed regarding the efficacy of this approach in humans.

Therefore, the aim of this work is to provide an overview of the various therapeutic approaches based on the use of dendritic cells for the prevention and treatment of T1D.

Key-words: type I diabetes, autoimmune diseases, tolerance induction, dendritic cells vaccines.

Índice

<i>Agradecimentos</i>	IV
<i>Lista de Abreviaturas</i>	V
<i>Resumo</i>	VI
<i>Abstract</i>	VII
1. Introdução	1
2. Imunobiologia das células dendríticas	4
2.1 Origem / Classificação	4
2.2 Captação, processamento e apresentação de antígenos	5
2.3 Maturação	6
2.4 Interação DCs - linfócito T	7
3. Células dendríticas na indução de tolerância	8
4. Desenvolvimento de vacinas de células dendríticas para o tratamento da DMI	10
5. Conclusão	15
Bibliografia	16

I. Introdução

A Diabetes Mellitus (DM) constitui um conjunto de distúrbios metabólicos caracterizados por hiperglicemia decorrente de resistência periférica à ação da insulina e/ou diminuição parcial ou total da produção desta. A DM assume nos nossos dias proporções de verdadeira pandemia, com uma incidência de cerca de 7 a 10% da população mundial o que corresponde aproximadamente a 382 milhões de pessoas. A Organização Mundial de Saúde estima que a DM seja responsável por cerca de 4 milhões de mortes anualmente. Estes números devem ser encarados com redobrada preocupação uma vez que as estimativas apontam para que possam duplicar até 2030 (WHO, 2015).

No caso concreto de Portugal, a prevalência é de 12,9%, na população entre os 20-79 anos, sendo mais frequente no sexo masculino do que no sexo feminino (SPD, 2015).

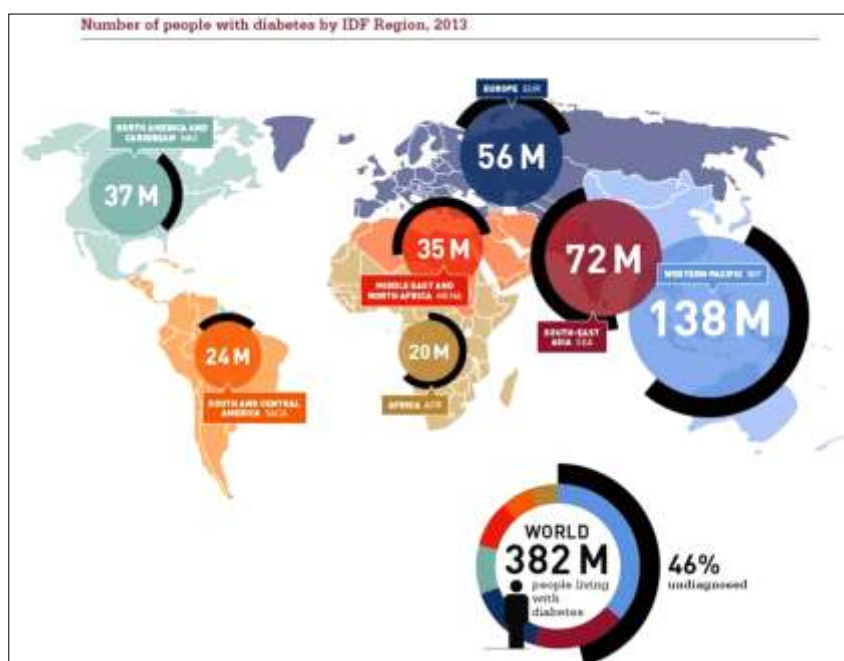


Figura I - Prevalência de diabetes no mundo.

As elevadas taxas de morbidade e mortalidade associadas à DM decorrem em primeira análise de níveis elevados de glucose sanguínea mantidos ao longo do tempo. A hiperglicemia mantida causa danos fundamentalmente a nível da micro e macro vascularização, estando na origem de complicações como a retinopatia, nefropatia e neuropatia diabéticas (SEELEY, STEPHENS, TATE).

A DM pode ser classificada em três tipos: Diabetes Tipo I (DMI), Diabetes Tipo 2 (DM2) e Diabetes Gestacional. A DM2 é de etiologia multifatorial tendo uma forte componente ambiental e genética. É caracterizada inicialmente por resistência dos tecidos à ação da insulina e acarreta a longo prazo uma disfunção das células β com consequente diminuição na capacidade de produção de insulina. É a forma de DM de maior prevalência, representando entre 85 a 90% dos casos. A diabetes gestacional é provocada por um aumento da resistência à insulina no final do 2º trimestre e durante todo o 3º trimestre devido à presença de hormonas anti insulínicas (cortisol, estradiol, prolactina, progesterona). Estas hormonas diminuem o número de recetores de insulina e afetam a sinalização intracelular por eles veiculada.

Por sua vez a DMI é caracterizada pela total ausência de produção de insulina em consequência da destruição autoimune das células β pancreáticas. A etiologia exata da DM tipo I é desconhecida, no entanto predisposição genética e exposição a fatores ambientais, tais como vírus e toxinas têm sido associados à perda de tolerância a antígenos das células β . A nível de tratamento, a DM de tipo 2 e diabetes gestacional são controladas com recurso antidiabéticos orais e eventualmente insulina. Por sua vez, a DM tipo I requer obrigatoriamente a administração de insulina exógena, sendo o processo efetuado essencialmente por injeção subcutânea (BELLE, COPPIETERS E HERRATH, 2011).

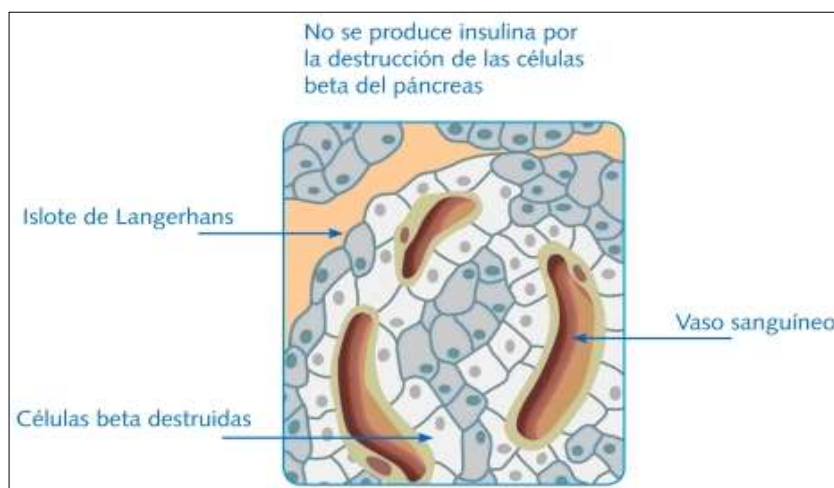


Figura 2 – Defeito na libertação de insulina por destruição das células β (Retirado de <http://www.vivirotradiabetes.es/Pacientes/La-Diabetes-a-Fondo/Diabetes-tipo-I.aspx?idpage=4806>)

Nos últimos anos a comunidade científica tem encetado enormes esforços no sentido de desenvolver novas abordagens terapêuticas para o tratamento e prevenção da DM tipo I. Tratando-se de uma doença autoimune, a dessensibilização por administração direta de

antígenos das células β pancreáticas, tais como DMI, GAD65 e pró-insulina ou a utilização de células dendríticas tolerogénicas (TDCs) tem vindo a receber particular atenção (CREUSOT *et al.*, 2014). As células dendríticas são células apresentadoras de antígeno com a capacidade única de estimularem linfócitos T naïve diferenciando-os nas suas diferentes populações efetoras ou reguladoras. São deste modo elementos fundamentais na interface entre a imunidade inata e imunidade adaptativa, modulando as respostas imunológicas (Steinman, 2007). Devido a esta enorme plasticidade funcional, as células dendríticas tem sido usadas no desenvolvimento de imunoterapias quer para a indução de imunidade em doenças oncológicas e infeção quer para a indução de tolerância e casos de doenças autoimunes, rejeição de transplantes e alergias.

Inúmeros ensaios pré-clínicos demonstraram que células dendríticas carregadas *ex vivo* com antígenos relevantes na DMI ao serem administradas nos modelos animais induzem uma resposta protetora. Esta proteção advém fundamentalmente da polarização de linfócitos T naïve em células T reguladoras (Tregs). A transposição desta abordagem para o uso clínico está apenas a dar os primeiros passos e carece ainda de investigação mais aprofundada. Poucos são os ensaios realizados em humanos, no entanto os resultados existentes são encorajadores. Vários estudos relatam a reativação da produção do péptido C após administração de DCs imaturas autólogas em doentes que não o expressaram durante anos (GIANNOUKAKIS E TRUCCO, 2012).

A imunoterapia com células dendríticas tolerogénicas afigura-se deste modo como uma das mais promissoras abordagens para a prevenção e tratamento da DMI, podendo oferecer inegáveis benefícios na diminuição da progressão da doença.

2. Imunobiologia das células dendríticas

2.1 Origem / Classificação

As células dendríticas constituem uma população heterogênea de células que inclui várias subpopulações distintas sendo no entanto todas originadas a partir de células estaminais hematopoiéticas (HSC).

Estas HSC dão origem a diversos precursores que à medida que sofrem um comprometimento com certa linhagem celular ao nível da medula, vão reduzindo as suas possibilidades de diferenciação (especialização). Os referidos precursores são os progenitores comuns mielóides e os progenitores comuns linfóides (BANCHEREAU *et al.*, 2000).

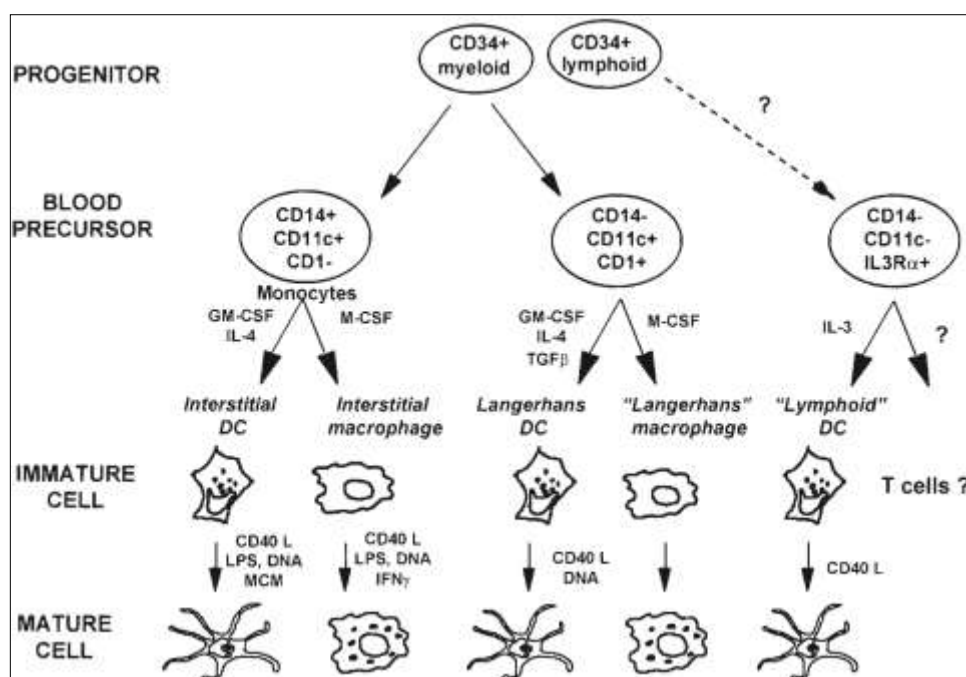


Figura 3 - Modelo do comprometimento gradual a partir de HSC
Retirado de "Immunobiology of dendritic cells"– Banchereau J, *et al.*

O conhecimento das subpopulações de DCs no humano é muito limitado pela dificuldade na obtenção de amostras, sendo principalmente estudadas as populações da pele e do sangue.

Os dois grandes tipos de DCs descritas no humano são definidos com base nos seus marcadores de superfície englobam: as DCs mielóides (mDCs) e as DCs plasmocitóides (pDCs) (NIKOLIC *et al.*, 2009).

As mDCs encontram-se nos tecidos como pele e mucosas e no sangue. A pele contém dois tipos de mDCs: os precursores diretos das células de *Langerhans* na epiderme, células com um fenótipo $CD4^+/CD1a^+/CD11c^{hi}/CD1c^+/CD207$ e as DCs intersticiais/dérmicas (que podem ser subdivididas em duas populações de acordo com a expressão de CD1a e CD14). Por sua vez, o sangue contém duas populações de mDCs caracterizadas pela expressão variável de CD1c e CD141. As DCs $CD141^+$ são altamente eficientes na apresentação cruzada de antígenos, e a sua interação com células NK e com células T $CD8^+$ é favorecida pela expressão do receptor de quimiocinas XCR1 (BACHEM *et al.*, 2010).

Por sua vez, as pDCs são o único tipo de DC de origem linfóide conhecida no ser humano. Estas células têm uma forte plasticidade funcional ao serem capazes de polarizar Th1, Th2 e Treg. As suas principais funções passam pela resposta antiviral, pela produção de elevadas doses de interferão tipo I ($IFN-\alpha/\beta$) e pela sua eficiência na apresentação cruzada de antígenos virais a linfócitos T $CD8^+$ (HOEFFEL *et al.*, 2007).

2.2 Captação, processamento e apresentação de antígenos

As DCs imaturas são altamente eficientes na captação de antígenos, dispondo para tal de diversos mecanismos, nomeadamente, a macropinocitose, a endocitose mediada por recetores e a fagocitose.

Os antígenos captados são posteriormente processados e apresentados através de diferentes vias, de acordo com a sua natureza molecular (proteica ou lipídica) e origem (intracelular ou extracelular). Estão deste modo descritas a via exógena (endossómica), a via endógena (proteossómica) e a apresentação de antígenos lipídicos via moléculas da família CDI.

A via exógena possibilita a apresentação de antígenos acoplados a moléculas MHC classe II. Nesta via as DCs captam antígenos exógenos e internalizam-nos em endossomas que, ao se fundirem com lisossomas, originam fagolisossomas. Estas vesículas são ricas em enzimas proteolíticas que auxiliam na degradação de antígenos e na ativação das moléculas

MHC. O complexo peptídeo antigénico-MHC II atravessa o citoplasma e é então apresentado aos linfócitos T CD4⁺ (LIU E NUSSENZWEIG, 2010; MARIANI, 2003).

Pela via endógena, os antígenos são apresentados acoplados a moléculas MHC classe I. Nesta via os peptídeos originados pela degradação proteossomal são acoplados a moléculas MHC-I sendo posteriormente apresentados aos linfócitos T CD8⁺ (LIPSCOMB E MASTEN, 2002).

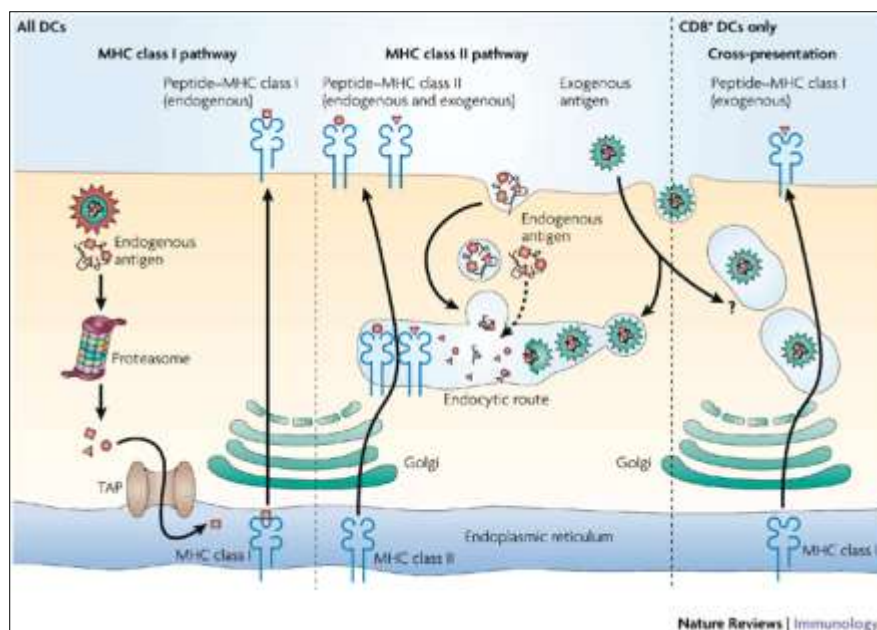


Figura 4 - Vias de apresentação de antígenos pelos DCs Retirado de “Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo” – Villadangos, J. and Schnorrer, P.

Por último os antígenos de natureza lipídica, como por exemplo alguns glicolípidos formam complexos com proteínas da família CDI, sendo posteriormente apresentados a linfócitos T CD8⁺, linfócitos T CD4⁺CD8⁻, linfócitos T γ/δ ou aos linfócitos *natural killer* das células T (NKT) (ADAMS, 2014; MOODY E PORCELLI, 2003).

2.3 Maturação

A maturação das DCs constitui um importante processo que condiciona a sua atividade funcional. Esta etapa é caracterizada por alterações morfológicas, fenotípicas e funcionais desencadeadas após o contacto de uma DC imatura com um sinal de “alarme” (antígeno/agente patogénico).

Este processo está associado a vários fatores, nomeadamente: a perda de recetores endocíticos/fagocíticos, a supra-regulação de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD83 e CD86, a alteração da morfologia e a alteração no perfil de citocinas libertadas (SUMMERS *et al.*, 2004).

Numa fase mais tardia da maturação, ocorre uma alteração do perfil de expressão de recetores de quimiocinas, com uma diminuição na expressão de recetores de quimiocinas inflamatórias e um aumento da expressão de recetores de quimiocinas constitutivas linfóides como o CCR7 e CXCR4. Esta alteração permite a migração das DCs para órgãos linfóides secundários e favorece a interação das DCs com células B e T nesses locais (BANCHEREAU *et al.*, 2000).

Estas alterações fenotípicas decorrem da ativação de diversas vias de sinalização intracelulares das quais se destacam a via das MAPKs (cinases proteicas ativadas por mitogénios) e do fator de transcrição NF- κ B. Estes desempenham um papel crucial na fase de maturação das DCs pela regulação da expressão de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80) e das citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α) (NAKAHARA *et al.*, 2006).

2.4 Interação DCs - linfócito T

As DCs captam e processam antígenos na periferia migrando em seguida para os nódulos linfáticos onde vão apresentar os antígenos que captaram aos linfócitos T naïve (CD4⁺ e CD8⁺).

Durante a apresentação antigénica são necessários 3 sinais para um correto *priming* dos linfócitos: 1) interação do complexo antígeno-MHC da DC com o recetor TCR do linfócito, 2) interação das moléculas co-estimuladoras da DC com os respetivos recetores no linfócito, 3) as citocinas que estão presentes durante esta interação (LIPSCOMB E MASTEN, 2002).

Aplicação na Diabetes Mellitus Tipo I

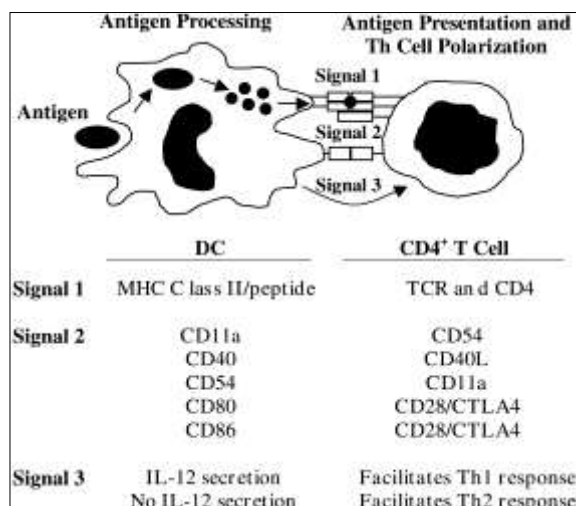


Figura 5 - Etapas de interação DC - Linfócito T
Retirado de "Dendritic Cells: Immune Regulators in Health and Disease"

O perfil de citocinas presente no microambiente onde decorre a apresentação antigénica é um ponto fundamental para a polarização dos linfócitos T nas suas diferentes populações efetoras (Th1, Th2, Th17) ou reguladoras (Tregs, Tr1).

3. Células dendríticas na indução de tolerância

As DCs desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e na manutenção da tolerância periférica a auto antígenos, através de indução da apoptose ou anergia de células T; e/ou indução da diferenciação de Tregs que irão controlar as populações efetoras (GAD, CLAEISSON e PEDERSEN, 2003; MELO e CARVALHO, 2009). A comprovar esta importantíssima função de homeostasia, foi mostrado que modelos animais desprovidos de DCs, desenvolvem doenças autoimunes fatais (STEINMAN E POPE, 2002).

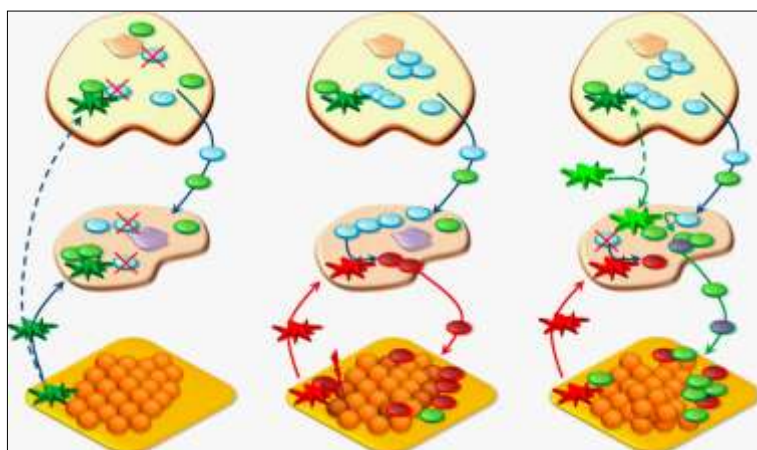


Figura 6 - Indução de tolerância aos antígenos das células β (a indução, a perda e o restauro da tolerância ao nível dos ilhéus).

A capacidade de as DCs induzirem tolerância está intimamente ligada ao seu estado de maturação e ao perfil de citocinas presente no microambiente onde ocorre a apresentação antigénica. Inicialmente foi proposto que apenas as DCs num estado imaturo (baixa expressão de moléculas co-estimuladoras, baixa produção de citocinas) teriam capacidade para induzir tolerância no entanto sabe-se atualmente que o processo é bastante mais complexo e resulta de um equilíbrio entre co-estimulação positiva e co-estimulação negativa (STEINMAN e BANCHEREAU, 2007).

Em situações não patológicas, as células T auto-reactivas que escapam à deleção a nível do timo são eliminadas a perifericamente pelas DCs através de diversos mecanismos, nomeadamente produção de fatores solúveis como IL-10, TGF- β e indoleamina 2,3 desoxigenase (IDO) ou através da polarização de Tregs (GAD, CLAESSEON e PEDERSEN, 2003; IDOYAGA *et al.*, 2014). Os linfócitos T reguladores estão envolvidos na manutenção de tolerância a autoantígenos e no controlo das reações imunogénicas contra antígenos exógenos através da inibição de respostas mediadas pelas populações efetoras de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺.

As Tregs, cuja subpopulação mais estudada é o CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, são potentes inibidores da ativação de células T sendo também eficazes na supressão de células T CD4⁺ e CD8⁺ já ativadas. Foram identificados até ao momento dois tipos de linfócitos Treg Foxp3⁺ CD25⁺CD4⁺: os linfócitos Treg nativos, originados centralmente a nível do timo, e os linfócitos Treg adaptativos, originados perifericamente a partir de linfócitos T *naive* Foxp3⁺ CD25⁺CD4⁺. Vários trabalhos têm demonstrado o que as DCs estão fortemente envolvidas na diferenciação periférica dos linfócitos Treg adaptativos (RUFFNER E ROBBINS, 2010).

Esta capacidade levou a que as DCs fossem encaradas como potenciais meios terapêuticos para indução de tolerância em doenças autoimunes, transplantes e alergias.

4. Desenvolvimento de vacinas de células dendríticas para o tratamento da DMI

Como atrás referido a DM de tipo I é uma doença autoimune caracterizada pela destruição das células β pancreáticas produtoras de insulina nos ilhéus de *Langerhans*. Esta destruição envolve uma resposta celular (células T antígeno-específicas) e uma resposta humoral (produção de anticorpos pelas células B). Entre os principais autoantígenos associados à DMI encontram-se proteínas das células β tais como a GAD65, IA-2, ZnT-8, chromogranin A e pró-insulina (HARRISON, 2005).

Um dos objetivos principais para a prevenção e/ou reversão da DMI é a restauração de tolerância eficaz e duradoura, evitando a destruição das células β ainda funcionais e ajudando a regeneração da massa celular produtora de insulina (CREUSOT *et al.*, 2014).

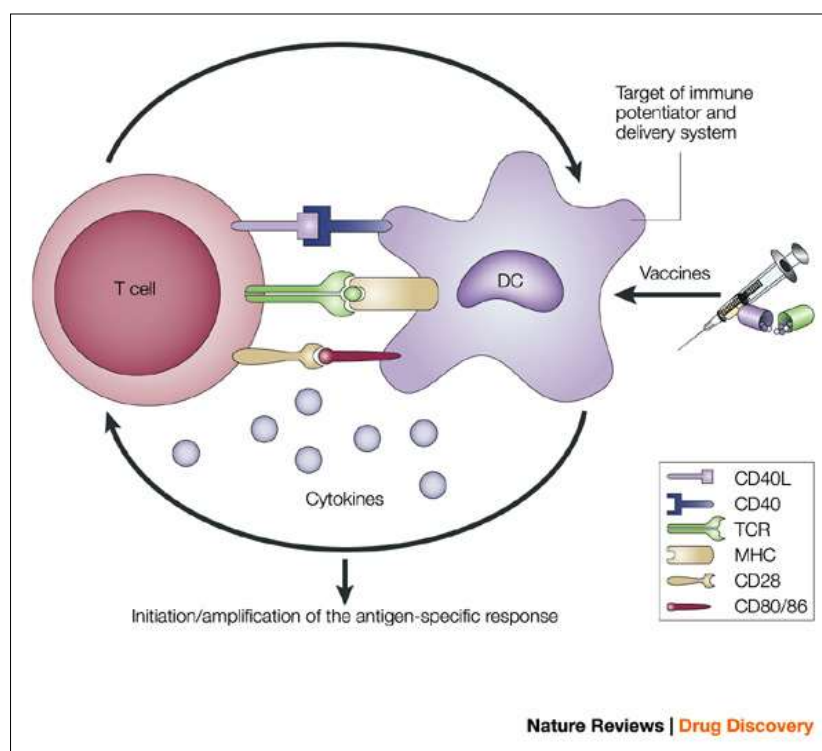


Figura 7 - APC como ponte entre a resposta inata e a específica de antígeno

Retirado de “Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants” - Derek T. O'Hagan & Nicholas M. Valiante

Deste modo, uma das abordagens mais promissoras envolve a utilização de imunoterapia personalizada de DCs para a indução de tolerância específica. Nesta abordagem são usadas normalmente DCs obtidas por diferenciação *ex vivo* de monócitos

isolados do sangue periférico do paciente. As células num estado imaturo são então expostas a fatores que lhes induzem um perfil tolerogénico e usadas nesta forma ou em alternativa são carregadas com antígenos de células β a fim de induzirem tolerância específica para esses antígenos. Espera-se deste modo que induzam anergia nos linfócitos T auto-reativos e/ou polarização de linfócitos T reguladores com capacidade imunossupressora (GIANNOUKAKIS E TRUCCO, 2012).

Encontram-se sumarizados na tabela abaixo apresentada as principais vantagens e desvantagens do procedimento.

Tabela 1: Vantagens e desvantagens das vacinas de DCs no tratamento da DMI.

Vantagens (CREUSOT <i>et al.</i> , 2014)	Desvantagens (GIANNOUKAKIS e TRUCCO, 2012)
São geradas por uma fonte acessível: o sangue.	Estabilidade e persistência do resultado tolerogénico.
As DCs tolerogénicas têm natureza migratória sendo capazes de migrar desde o local da inoculação até ao local alvo desejado.	'Reforço' de administrações DC pode ser necessário (a eficácia do reforço é desconhecida, uma vez que o destinatário pode ser refratário aos efeitos das administrações múltiplas ao longo do tempo).
São suscetíveis à manipulação <i>in vitro</i> , seja por modificação ou suplementação das condições da cultura ou por silenciamento ou sobre-expressão de genes.	É teoricamente possível que surja uma resposta indesejada ao "reforço", nomeadamente, uma proliferação inespecífica de células/moléculas pró-inflamatórias que irão substituir quaisquer redes celulares tolerogénicas.
Têm a capacidade de regular a atividade, persistência e semi-vida de outras células regulatórias como CD4+ Tregs e CD8+ Tregs, o que viabiliza a criação de múltiplas camadas de tolerância onde a especificidade antigénica é um processo dinâmico.	A possibilidade das DCs tolerogénicas facilitarem a proliferação de tumores malignos não detectados em doentes (requer uma monitorização do estado imunológico).

Nas últimas décadas, inúmeros estudos em modelos animais de DMI têm demonstrado que as vacinas de células dendríticas são seguras e capazes de induzir uma efetiva resposta tolerogénica. A transposição para a aplicação clínica tem, no entanto, sido lenta e pautada por resultados muitas vezes aquém das expectativas (HARRISON, 2005).

São de seguida realizados alguns estudos que demonstram o enorme potencial do uso de vacinas de DCs na prevenção/tratamento da DMI, sendo também evidenciadas as perspectivas futuras para a referida abordagem.

Num dos estudos, os autores demonstraram que DCs imaturas, tratadas *in vitro* com inibidores do fator de transcrição NF- κ B e oligodesoxirribonucleótidos antisense (AS-ODN) para as moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86, mostraram ter efeitos positivos na prevenção de diabetes no ratinho NOD (nonobese diabetic). Os resultados obtidos mostram que injeções múltiplas de DCs tratadas com AS-ODN são capazes de manter os ratinhos sem doença, não interferindo no entanto na atividade global das células T contra aloantígenos (GIANNOUKAKIS E TRUCCO, 2012).

Os resultados promissores obtidos neste estudo pré-clínico, juntamente com o baixo risco associado ao procedimento, permitiu a aprovação pela FDA de um ensaio clínico de Fase I. Este ensaio demonstrou pela primeira vez que a administração de DCs tolerogénicas em humanos poderia apresentar potenciais benefícios na restauração da função residual das células β . Esta observação pioneira representou um gigantesco passo em frente no desenvolvimento da imunoterapia para autoimunidade e especificamente para DMI, especialmente levando-se em consideração a reativação da produção de C-peptídeo em doentes com DMI que não o expressavam há anos.

Depois de demonstrar que as DCs tolerogénicas são seguras e bem toleradas em pacientes com DMI, está agendado um ensaio clínico de fase II de novos doentes com DMI. Além de avaliar a frequência e função imunorreguladora das populações das células em doentes recentemente diagnosticados com DMI, este ensaio destina-se a testar a eficácia das DCs tolerogénicas na melhoria funcional das células β .

Num outro estudo, as DCs foram geradas a partir da medula óssea de murinhos NOD e transduzidas com vetores adenovirais que codificam a citoquina IL-4 (DC/sIL-4). Este modelo animal de DMI caracteriza-se pelo desenvolvimento da patologia por volta das 12 a 14 semanas de idade em sequência da destruição autoimune gradual das suas células β

pancreáticas. No referido estudo, ratinhos fêmea NOD foram separados em dois grupos, normoglicêmicos (150 mg/dL) e pré-diabéticos (entre 150 e 250 mg/dL) com base em medições de glucose no sangue, sendo realizada posteriormente a administração de 10^6 DCs através de uma única injeção IV.

A administração da vacina de DCs ao grupo de murganhos normoglicêmicos (de 12 semanas de idade) reduziu significativamente o número de animais que desenvolveram diabetes. Por outro lado a administração de DCs nos animais pré diabéticos retardou significativamente a evolução da patologia, reduzindo a infiltração mononuclear nos ilhéus de *Langerhans* e aumentando a frequência de Tregs nos gânglios pancreáticos. Os autores concluíram deste modo que a administração de DC transduzidas para expressar IL-4, pode se efetuada numa fase precoce prevenir a instalação da DMI ou se numa fase tardia minorar a progressão da doença (RUFFNER AND ROBBINS, 2010). Usando uma abordagem semelhante (transdução viral), Li e colaboradores demonstraram que DCs geneticamente modificadas para expressarem o recetor de co-estimulação negativa atenuador de linfócitos T e B (BTLA) quando administradas em murganhos NOD têm capacidade de induzir tolerância, minimizando os efeitos destrutivos das células T $CD8^+$ citotóxicas e atenuando a severidade da doença (LI *et al.*, 2011).

Creusot e colaboradores, usando células dendríticas transfetadas por eletroporação com mRNA codificante da IL-4 (eDC/IL-4) reportaram também resultados bastante promissores. Embora tenham verificado que a indução de expressão da citocina se tenha mantido apenas por 24h iniciais, esta mostrou ser suficiente para induzir efeitos nos murganhos vacinados, tanto na prevenção como no tratamento da doença (CREUSOT *et al.*, 2010). Este estudo representou uma evidência de que a eletroporação de DCs com mRNA é uma técnica alternativa ao uso de vetores virais sendo viável, segura e efetiva. Este procedimento pode deste modo ser usado para a modificação de DCs com o intuito de expressar produtos imunorregulatórios, úteis na terapia de doenças autoimunes.

Encontram-se também na literatura abordagens de vacinação com DCs que seguem protocolos mais simples e que reportam igualmente resultados interessantes. Usando DCs diferenciadas na presença de IL-10 de forma a apresentarem um perfil tolerogénico, Tai e a sua equipa conseguiram prevenir o desenvolvimento de DMI quer em murganhos NOD quer no modelo humanizado HLA-DQ8/RIP-B7.1 (TAI *et al.*, 2011). Os autores mostraram

que o efeito tolerogênico não antigénio-específico conseguido com a administração das DCs tratadas com IL-10 se deveu à indução por estas de células Tregs.

Tendo em conta que o diagnóstico da DMI no humano ocorre numa fase da doença em que a destruição das células β é já bastante extensa, uma abordagem terapêutica que tem sido cada vez mais estudada é a transplantação de células pancreáticas. No entanto na maior parte das vezes as células transplantadas acabam por ser destruídas pelas células T efectoras existentes. Tornou-se deste modo evidente que é necessário acompanhar o transplante com uma abordagem que reestabeleça a tolerância e previna que as células transplantadas sejam também elas destruídas. Nesse sentido vários têm sido os estudos que tentam averiguar os benefícios da vacinação com DCs tolerogénicas. Num estudo realizado em murganhos NOD que tinham recebido um transplante de células β , Li e os seus colaboradores mostraram que a administração de DCs transduzidas para expressarem o antigénio pancreático GAD65 conduzia a um aumento da sobrevivência das células transplantadas. Esta proteção mostrou ser e devida à supressão das células th1 e CD8^+ citotóxicas específicas do antigénio GAD65 (Li *et al.*, 2010).

Uma outra abordagem para indução de tolerância específica a antigénios das células β que tem vindo a ganhar cada vez mais relevância passa pelo carregamento das DCs com lisados ou corpos apoptóticos das células β . Dado que são relativamente poucos os antigénios conhecidos com direta associação à DMI, esta abordagem permite contornar esta questão sendo usado o proteoma total da célula β . Esta estratégia mostrou ser eficaz no restabelecimento de tolerância periférica, diminuindo a incidência e a progressão da doença num modelo de DMI de progressão acelerada (MARIN-GALLEN *et al.*, 2009). Os autores mostraram que as DCs carregadas com corpos apoptóticos de células β apresentavam um perfil tolerogénico caracterizado por reduzida expressão de CD40, CD86 e de citocinas pro inflamatórias.

Atendendo a que a manipulação e diferenciação *ex vivo* de DCs para aplicações clínicas é um processo extremamente moroso e dispendioso, foi desenvolvida nos últimos anos uma abordagem alternativa. Esta nova estratégia passa por entregar antigénios *in vivo* às DCs endógenas, ligando-os a anticorpos monoclonais específicos para recetores que existam preferencialmente nas DCs. Entre os principais recetores visados encontram-se o DEC-205, CD40, DC-SIGN, DCIR, recetor de manose, Cleac9A e XCRI. No contexto do tratamento da DMI esta abordagem demonstrou ser uma opção válida, tendo já sido efetuados vários

estudos pré-clínicos com resultados bastante promissores. A entrega *in vivo* de antígenos de células β a DCs endógenas através da fusão destes com um anticorpo para o receptor DEC-205, mostrou resultar na diminuição da progressão da DMI em murinhos NOD (MUKHOPADHAYA *et al.*, 2008). A nível celular, a administração destes anticorpos híbridos resultou na deleção das células T CD8⁺ auto-reativas através da expansão de Tregs antígeno-específicas. Estes resultados vieram demonstrar que o direcionamento *in vivo* de antígenos para DCs endógenas é uma abordagem válida e que poderá, pelas vantagens que apresenta, representar o futuro da imunoterapia celular baseada em DCs.

5. Conclusão

Pelo atrás exposto torna-se claro que existe evidência experimental suficiente que justifica o uso de DCs no tratamento de doenças autoimunes, nomeadamente a DMI. Ainda é necessário muito trabalho nesta área, principalmente na definição do subtipo de DCs mais adequado, na natureza dos antígenos a carregar e na compreensão da interação entre as DCs e outras células do sistema imune envolvidas na destruição/proteção das células β .

Tirando partido da base científica já existente e dos recentes resultados altamente promissores, é previsível que a curto prazo o número de ensaios clínicos para avaliação e vacinas de DCs no tratamento de DMI aumente substancialmente (Mukherjee e Dilozeno, 2010).

Só desta forma, com dados clínicos objetivos será possível tirar ilações acerca da real mais valia desta abordagem terapêutica.

Bibliografia

<http://www.spd.pt> Sociedade Portuguesa de Diabetologia acessado em 01/07/2015

Capítulo 22 - Sistema Linfático e Imunidade. In: SEELEY, R.; STEPHENS, T.; TATE, P. - Anatomia & Fisiologia. Lusociência, 2003. ISBN: 972-8930-07-0, 798-803.

ADAMS, Erin J. - Lipid presentation by human CD1 molecules and the diverse T cell populations that respond to them. **Current opinion in immunology**. . ISSN 1879-0372. 26:2014) 1-6. doi: 10.1016/j.coi.2013.09.005.

BACHEM, Annabell *et al.* - Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. **The Journal of experimental medicine**. . ISSN 1540-9538. 207:6 (2010) 1273-81. doi: 10.1084/jem.20100348.

BANCHEREAU, Jacques *et al.* - Immunobiology of. Figure 1 (2000) 767-811.

BELLE, T. O. M. L. V. A. N.; COPPIETERS, K. E. N. T.; HERRATH, Matthias G. V. O. N. - Type 1 Diabetes: Etiology , Immunology , and Therapeutic Strategies. 2011) 79–118. doi: 10.1152/physrev.00003.2010.

CREUSOT, Rémi J. *et al.* - A short pulse of IL-4 delivered by DCs electroporated with modified mRNA can both prevent and treat autoimmune diabetes in NOD mice. **Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy**. . ISSN 1525-0024. 18:12 (2010) 2112–20. doi: 10.1038/mt.2010.146.

CREUSOT, Rémi J. *et al.* - It's time to bring dendritic cell therapy to type 1 diabetes. **Diabetes**. . ISSN 1939-327X. 63:1 (2014) 20–30. doi: 10.2337/db13-0886.

GAD, Monika; CLAEISSON, Mogens Helweg; PEDERSEN, Anders E. L. M. - Dendritic cells in peripheral tolerance and immunity. 1:11 (2003).

GIANNOUKAKIS, Nick; TRUCCO, Massimo - Dendritic cell therapy for Type 1 diabetes suppression. **Immunotherapy**. . ISSN 1750-7448. 4:10 (2012) 1063-74. doi: 10.2217/imt.12.76.

HARRISON, Leonard C. - The prospect of vaccination to prevent type 1 diabetes. **Human vaccines**. . ISSN 1554-8600. 1:4 (2005) 143-150.

HOEFFEL, Guillaume *et al.* - Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. **Immunity**. . ISSN 1074-7613. 27:3 (2007) 481-92. doi: 10.1016/j.immuni.2007.07.021.

IDOYAGA, Juliana *et al.* - Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction. **The Journal of Clinical Investigation**. 4:2014) 1-11. doi: 10.1172/JCI65260.conditions.

LI, Qiansheng *et al.* - Administration of dendritic cells dual expressing DcR3 and GAD65 mediates the suppression of T cells and induces long-term acceptance of pancreatic-islet transplantation. **Vaccine**. . ISSN 1873-2518. 28:52 (2010) 8300-5. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.09.094.

LI, Shufa *et al.* - Dendritic cells expressing BTLA induces CD8+ T cell tolerance and attenuates the severity of diabetes. **Vaccine**. . ISSN 1873-2518. 29:44 (2011) 7747-51. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.07.125.

LIPSCOMB, Mary F.; MASTEN, Barbara J. - Dendritic cells: immune regulators in health and disease. **Physiological reviews**. . ISSN 0031-9333. 82:1 (2002) 97-130. doi: 10.1152/physrev.00023.2001.

LIU, Kang; NUSSENZWEIG, Michel C. - Origin and development of dendritic cells. **Immunological reviews**. . ISSN 1600-065X. 234:1 (2010) 45–54. doi: 10.1111/j.0105-2896.2009.00879.x.

MARIANI, Sara M. - Conference Report Dendritic Cells : Myths and Reality. **Annual Meeting of the American Society for Cell Biology**.(2003) 13-17.

MARIN-GALLEN, S. *et al.* - Dendritic cells pulsed with antigen-specific apoptotic bodies prevent experimental type I diabetes. **Clinical & Experimental Immunology**. . ISSN 00099104. 160:2 (2009) 207–214. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.04082.x.

MELO, Karina Mescouto; CARVALHO, Beatriz Tavares Costa - **Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas**, atual. 2009.

MOODY, D. Branch; PORCELLI, Steven A. - Intracellular pathways of CD1 antigen presentation. **Nature Reviews Immunology**. . ISSN 14741733. 3:1 (2003) 11-22. doi: 10.1038/nri979.

MUKHERJEE, G.; DILORENZO, T. P. - The immunotherapeutic potential of dendritic cells in type I diabetes. **Clinical and experimental immunology**. . ISSN 1365-2249. 161:2 (2010) 197–207. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04157.x.

MUKHOPADHAYA, Arunika *et al.* - Selective delivery of beta cell antigen to dendritic cells in vivo leads to deletion and tolerance of autoreactive CD8+ T cells in NOD mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. . ISSN 1091-6490. 105:17 (2008) 6374–9. doi: 10.1073/pnas.0802644105.

NAKAHARA, Takeshi *et al.* - Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. **Journal of dermatological science**. . ISSN 0923-1811. 42:1 (2006) 1-11. doi: 10.1016/j.jdermsci.2005.11.004.

NIKOLIC, Tatjana *et al.* - Plasmacytoid dendritic cells in autoimmune diabetes - potential tools for immunotherapy. **Immunobiology**. . ISSN 1878-3279. 214:9-10 (2009) 791-9. doi: 10.1016/j.imbio.2009.06.002.

RUFFNER, Melanie A.; ROBBINS, Paul D. - Dendritic cells transduced to express interleukin 4 reduce diabetes onset in both normoglycemic and prediabetic nonobese diabetic mice. **PLoS one**. . ISSN 1932-6203. 5:7 (2010) e11848. doi: 10.1371/journal.pone.0011848.

STEINMAN, Ralph M. - Dendritic cells: understanding immunogenicity. **European journal of immunology**. . ISSN 0014-2980. 37 Suppl 1:2007) S53-60. doi: 10.1002/eji.200737400.

STEINMAN, Ralph M.; BANCHEREAU, Jacques - Taking dendritic cells into medicine. **Nature**. . ISSN 1476-4687. 449:7161 (2007) 419-26. doi: 10.1038/nature06175.

STEINMAN, Ralph M.; POPE, Melissa - Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. **The Journal of clinical investigation**. . ISSN 0021-9738. 109:12 (2002) 1519-26. doi: 10.1172/JCI15962.

SUMMERS, Kelly L. *et al.* - **Dendritic Cells and Immunoregulation in the Pathogenesis and Prevention of Type I Diabetes**, atual. 2004.

TAI, Ningwen *et al.* - IL-10-conditioned dendritic cells prevent autoimmune diabetes in NOD and humanized HLA-DQ8/RIP-B7.1 mice. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**. . ISSN 1521-7035. 139:3 (2011) 336-49. doi: 10.1016/j.clim.2011.03.003.