

Patrícia Raquel Lima da Silva

Imunoterapia Tumoral com Células Dendríticas

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2013

Patrícia Raquel Lima da Silva

Imunoterapia Tumoral com Células Dendríticas

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2013

Patrícia Raquel Lima Silva

Imunoterapia tumoral com Células Dendríticas

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para a obtenção do grau
de mestre em Ciências Farmacêuticas

Patrícia Raquel Lima Silva

Porto, 2013

Resumo

As células dendríticas (DCs) são mais as potentes células apresentadoras de antígenos (APCs) com um papel duplo na indução da imunidade inata e adaptativa, como também na indução de tolerância pelas células T. Nos últimos anos, novas formas de imunoterapia tumoral têm sido desenvolvidas, nomeadamente, estratégias que usam células dendríticas para induzir uma resposta imune específica antitumoral. Numerosos estudos indicaram que imunoterapias, que utilizam vacinas baseadas em células dendríticas, apresentam resultados promissores em alguns tipos de cancro e que estas podem ser administradas seguramente. Infelizmente, estes estudos ainda são pouco consistentes em termos de eficácia clínica e como tal não é ainda evidente uma boa relação custo/benefício para estes pacientes.

Palavras-chave: Células Dendríticas, Vacinação Antitumoral, Imunoterapia.

Abstract

Dendritic cells (DCs) are the most potent antigen-presenting cells (APCs) that play a dual role both in the induction of innate and adaptive immunity as well as T cell tolerance induction. In the last years new forms of tumor immunotherapy have been developed namely strategies that use DCs to induce a specific antitumor immune response. Several studies using dendritic cells based vaccines, show promising results in a high variety of cancers and they can be safely administered.

Unfortunately, they have yet to demonstrate consistent responses or clinical efficacy and it's still unclear a good cost/benefit ratio for each patient.

Keywords: Dendritic Cells, Antitumoral Vaccination, Immunotherapy.

Índice de Figuras	iv
Lista de Abreviaturas	v
I – Introdução	1
II – Sistema Imunológico	2
2.1) Descrição Geral do Sistema Imunológico	2
2.1.1) Imunidade Inata e Adaptativa	3
2.1.2) Linfócitos T	5
III – Células Dendríticas	8
3.1) Origem e Diferenciação das Células Dendríticas (DCs)	8
3.2) Moléculas que Reconhecem o Antígeno	10
3.3) Processamento do Antígeno e Apresentação às Células T	12
IV- Imunoterapia Tumoral	16
4.1) Definição e Tipos de Imunoterapia Tumoral	16
V – Imunoterapia Tumoral com DCs	18
5.1) Indução de Maturação das Células Dendríticas <i>in vitro</i>	19
5.1.1) Obtenção de DCs Humanas, Preparação de Antígenos, Carregamento das DCs e Administração	20
5.2) Tumores Testados e Resposta dos Linfócitos T	22
5.3) Eficácia	26
VI – Vacinação Antitumoral baseada em DCs carregadas <i>in vitro</i> versus <i>in vivo</i>	27
6.1) Carregamento direto <i>in vivo</i> de antígenos tumorais nas células dendríticas	28
VII – Conclusão	30
Bibliografia	33

Índice de Figuras

Figura 1 - Interação entre a imunidade inata e adaptativa.	5
Figura 2 - Três abordagens da imunoterapia tumoral baseada em células dendríticas.	19
Figura 3 - Pontos-chave para melhorar a vacinação com células dendríticas em pacientes com cancro.	27

Lista de Abreviaturas

- APCs** – *Antigen Presentation Cells*
- BCR** – *B Cell Receptor*
- CEA** – *Carcinoembryonic Antigen*
- CD** – *Cluster of Differentiation*
- CDR** – *Regiões Determinantes de Complementaridade*
- CLR** – *C-type Lectin Receptor*
- CT** – *Células Tumorais*
- DCs** – *Dendritic Cells*
- Flt3** – *Fms-like Tyrosine Kinase 3*
- Flt3-L** – *Fms-like Tyrosine Kinase 3 Ligand*
- GM-CSF** – *Granulocyte-monocyte Colony Stimulation Factor*
- VEA** – *Veias Endoteliais Altas*
- IFN- γ** – *Interferão-gama*
- IL** – *Interleucina*
- LFA-1** – *Leucocyte Function Associated Antigen-1*
- mAbs** – *Monoclonal Antibodies*
- mDC** – *Myeloid Dendritic Cell*
- MHC** – *Major Hystocompatibility Complex*
- NK** – *Natural Killer*
- PAMP** – *Pathogen Associated Molecular Patterns*
- pDC** – *Plasmacytoid Dendritic Cell*
- PRRS** – *Pattern Recognition Receptors*
- TAP** – *Transportador Associado ao Processamento de Antígenos*
- Tc** – *Linfócito T citotóxico*
- TCR** – *T Cell Receptor*
- TGF** – *Transforming Growth Factor*
- Th** – *Linfócito T helper*
- TLR** – *Toll-like Receptor*
- TNF- α** – *Tumoral Necrosis Factor – α*
- Treg** – *Linfócito T regulador*
- VEGF** – *Vascular Endothelial Growth Factor*

I - Introdução

O sistema imunológico tem a capacidade de responder a diversas agressões externas, nomeadamente as de natureza antigénica que sejam estranhas ao organismo, quer seja um microrganismo ou uma macromolécula, e a diversas agressões internas, como células alteradas ou tumorais. Assim, pode definir-se a Imunidade como um conjunto de mecanismos de defesa de que o nosso organismo dispõe para se proteger de agressões que o ameaçam, mantendo o equilíbrio homeostático. O sistema imunológico, em condições normais, não apresenta qualquer tipo de resposta a um estímulo antigénico expresso por células próprias, situação que se designa por tolerância imunológica. (Arosa *et al.*, 2012). A reação do sistema imunológico pode dividir-se em dois tipos de respostas interligadas: imunidade inata e imunidade adaptativa, podendo estas ser humorais e celulares. A imunidade humoral está envolvida no combate de corpos estranhos presentes na corrente sanguínea através da produção de anticorpos pelos linfócitos B. Por outro lado, a imunidade celular é responsável pela eliminação de células tumorais e de microrganismos intracelulares mediada pela ação das células T (Akira, 2011). A imunidade inata é mediada, maioritariamente, pelos neutrófilos, macrófagos, *natural killer* (NK) e células dendríticas (DCs), designadas geralmente por células fagocitárias, pois estas fagocitam o corpo estranho e destroem-no (Akira, 2011). Além desta capacidade, as DCs desempenham um papel importante na relação da imunidade inata com a imunidade adaptativa. São células apresentadoras de antígenos (APCs) especializadas em iniciar e regular a resposta adaptativa (Banchereau e Steinman, 1998). Têm a habilidade de reconhecer antígenos através dos *Toll-like receptors* (TLRs) (Akira, 2011), de os processar e apresentar, no contexto do Complexo Major de Histocompatibilidade classe I (MHC-I) e classe II (MHC-II) juntamente com moléculas co-estimuladoras, aos linfócitos T para que estes iniciem uma resposta imune contra esses antígenos (Benencia *et al.*, 2012; Banchereau *et al.*, 2000). Esta propriedade faz com que as DCs se tornem uma via de tratamento tumoral a explorar (Benencia *et al.*, 2012).

A imunoterapia tumoral incide na utilização dos elementos do sistema imunológico para eliminar ou neutralizar células tumorais e os fatores que beneficiem a sobrevivência tumoral. Aplicando estratégias com base na imunidade adaptativa foram desenvolvidos

vários meios de estimular as respostas imunes antitumorais, como por exemplo, a vacinação antitumoral, a transferência adotiva de células imunes (linfócitos) e inibição da supressão imunológica (Arosa *et al.*, 2012).

As vacinas antitumorais baseiam-se na mobilização de células do sistema imunológico e na amplificação de respostas imunes que reconheçam o tumor e que procedem à sua eliminação. Existem vários tipos de vacinas: vacinas de células tumorais totais, de proteínas, de péptidos, de citocinas ou de moléculas de co estimulação, de anticorpos anti-idiotípicos, de vetores e, por fim, vacinas de DCs (Arosa *et al.*, 2012). Estas representam um método no qual as DCs são utilizadas como APCs estimulando células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas para os antígenos tumorais (Engleman, 1997). Para o tratamento de doenças cancerígenas, as vacinas de DCs demonstraram ser bastante promissoras em vários ensaios clínicos (Zhang e Engleman, 2006). Podem ser carregadas com péptidos, proteínas, idiotípicos e corpos apoptóticos provenientes de células tumorais (Arosa *et al.*, 2012). Em estudos em ratinhos pode-se constatar que DCs carregadas com antígenos tumorais foram capazes de induzir uma resposta protetora tumoral e produzir uma imunidade terapêutica em cancros já estabelecidos (Yu e Restifo, 2002). A imunogenicidade dos antígenos entregues pelas DCs foi também estudada em humanos saudáveis (Dhodapkar *et al.*, 2002) que demonstraram algumas respostas clínicas e imunológicas sem uma significativa toxicidade (Davis *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 1996).

Assim, procedeu-se ao estudo da imunoterapia tumoral usando DCs para definir qual a sua eficácia na indução de uma resposta imunológica e a sua viabilidade clínica.

II - O Sistema Imunológico

2.1 – Descrição geral do Sistema Imunológico

O sistema imunológico é responsável por desencadear respostas protetoras contra agressões externas - antígenos, quer sejam microrganismos ou macromoléculas, e também contra células internas alteradas ou tumorais. Para isso, o nosso corpo é

composto por órgãos com funções específicas (órgãos linfóides) e uma grande variedade de células capazes de desencadear e produzir uma resposta imunológica.

Os órgãos linfóides podem ser diferenciados em dois grupos:

- **Órgãos linfóides primários**, que são constituídos pela medula óssea e pelo timo, são órgãos que proporcionam microambientes favoráveis para a linfopoiese, isto é, para a produção de linfócitos a partir de um progenitor linfoide não diferenciado, que ainda apresenta a capacidade de se diferenciar em linfócitos T, B, Nk e DCs. Os linfócitos após maturação ainda são *naive* ou ingênuos e migram para os órgãos linfóides secundários para posterior ativação, diferenciação e proliferação (Arosa *et al.*, 2012).
- **Órgãos linfóides secundários**, que são constituídos pelo baço, pelos gânglios linfáticos (ou nódulos linfáticos) e pelos tecidos associados às mucosas (placas de Peyer, amígdalas, adenoides e apêndice), são locais de encontro entre os linfócitos *naive* e o antigénio para o qual são específicos. Concentram e retém antigénios (solúveis ou transportados por DCs) provenientes de diversos tecidos do corpo através da linfa, assim como linfócitos e APCs, proporcionando as condições ideais para que se estabeleça o início das respostas imunológicas (Arosa *et al.*, 2012).

2.1.1) Imunidade Inata e Adaptativa

A **imunidade inata** é a primeira reação imunológica que o organismo exhibe aquando do contacto com substâncias antigénicas. Esta é uma resposta imediata com uma especificidade de largo espectro, reconhecendo apenas padrões moleculares conservados nos microrganismos ou PAMPs através de recetores específicos das células fagocíticas (macrófagos e células dendríticas) designados por recetores de padrões moleculares ou PRRs. De entre os PRRs cabe salientar os recetores de lectina tipo C ou CLR, o recetor de manose e os *Toll-like receptors* ou TLRs, sendo estes últimos capazes de reconhecer uma grande variedade de PAMPs. Deste reconhecimento resulta a ativação da célula fagocítica que pode levar à internalização do microrganismo, assim como à libertação de citocinas e mediadores inflamatórios, desencadeando um processo inflamatório (Arosa *et al.*, 2012). Ao contrário da imunidade adaptativa, de cada vez que o organismo é exposto ao agente patogénico, a resposta imunológica é sempre a mesma, uma vez que não existe memória relativamente a exposições anteriores. Por

exemplo, sempre que uma bactéria é reconhecida, ela é fagocitada com a mesma velocidade e eficácia (Seeley *et al.*, 2003).

Os principais componentes da imunidade inata são:

- Fatores mecânicos, como a pele e as mucosas, que formam uma barreira protetora impedindo que substâncias estranhas entrem nos tecidos do organismo e removem-nas de diversas formas (Arosa *et al.*, 2012; Seeley *et al.*, 2003).
- Mediadores químicos, que atuam diretamente contra os microrganismos ou que ativam outros mecanismos que levam à destruição dos mesmos, como por exemplo lisozima, histamina, prostaglandinas, os leucotrienos, os pirogênios e o complemento (Seeley *et al.*, 2003).
- Células envolvidas na fagocitose e na produção de substâncias químicas (citocinas e mediadores inflamatórios) que participam na resposta imunitária, ou seja, neutrófilos, macrófagos e DCs, estas duas últimas que além de células fagocíticas, desempenham um papel importante na relação da imunidade inata com a adaptativa, são APCs (Seeley *et al.*, 2003).
- Resposta inflamatória: a inflamação é o processo de que o organismo dispõe para localizar, neutralizar ou eliminar um agente agressor. Quando o agente imunogênico invade o organismo o sistema imunológico inato é ativado, isto é, há libertação de mediadores pró-inflamatórios (citocinas, proteases do plasma, mediadores lipídicos, etc) que promovem a vasodilatação, o aumento de permeabilidade vascular, o aumento da aderência das células endoteliais e migração de moléculas do plasma e leucócitos do sangue para os tecidos onde se encontra o foco inflamatório (Arosa *et al.*, 2012; Seeley *et al.*, 2003).

As citocinas libertadas por células do próprio tecido inflamado, como macrófagos, células dendríticas e células NK como interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6), são importantes na sinalização e interação celular. Depois, as células mononucleares e linfócitos que, entretanto, vão sendo atraídos para o foco inflamatório, são ativados pelos antígenos presentes passando a libertar as suas próprias citocinas (IL-1, IL-2, IL-4, TNF- α , IFN- γ , etc) que favorecem e potenciam a migração e

ativação de determinadas células mais diretamente envolvidas na reação imunológica (Akira, 2011; Arosa *et al.*, 2012; Seeley *et al.*, 2003).

A **imunidade adaptativa**, ao contrário da imunidade inata, é uma resposta imunológica tardia, mas mais específica com capacidade de memória e, devido a este facto, é capaz de produzir uma reação imune mais rápida e eficaz à medida que é exposta ao agente imunogénico (Seeley *et al.*, 2003).

Esta resposta requer a ativação dos linfócitos T e B, sendo esta, realizada principalmente por APCs profissionais, como as DCs, que após capturarem o antígeno, o processam e migram para os gânglios linfáticos regionais onde o apresentam aos linfócitos T, como se pode observar na Figura 1.

Enquanto o recetor dos linfócitos B reconhece o antígeno na sua forma nativa (não processado), o recetor dos linfócitos T apenas reconhece o antígeno na sua forma fragmentada (péptidos) apresentado no contexto de moléculas de MHC. Sendo assim, deste reconhecimento resulta a ativação e diferenciação dos linfócitos B, que irão produzir anticorpos específicos para o antígeno do agressor, e a ativação e diferenciação dos linfócitos T, que levarão à formação de células efetoras e reguladoras da resposta imune (Arosa *et al.*, 2012).

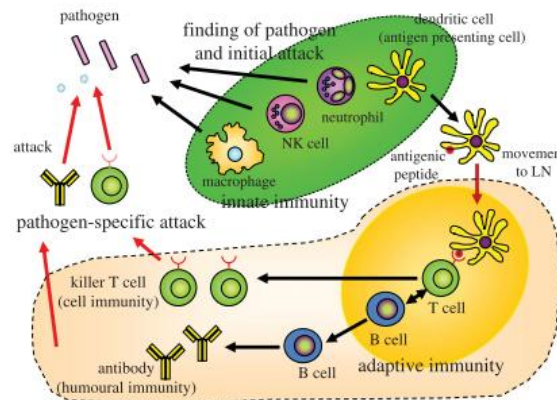


Figura 1 - Interação entre a imunidade inata e adaptativa. Fonte: Akira, 2011

2.1.2) Linfócitos T

Os linfócitos T, como referido anteriormente, são uma das linhagens linfocitárias originadas a partir de precursores hematopoiéticos da medula óssea que completam a sua maturação no timo.

Os linfócitos pertencem basicamente a três grupos: linfócitos T helper, linfócitos T citotóxicos, linfócitos T reguladores e linfócitos NKT (Arosa *et al.*, 2012).

Os linfócitos Th (T *helper*), expressam CD4, representam 40-50% dos linfócitos em circulação e a sua função é produzir citocinas que, por sua vez, vão ajudar na ativação de outras células do sistema imunitário. A formação do complexo trimolecular TCR/Péptido/MHC permite a apresentação do péptido, pela APC, à célula Th, sendo esta restrita à apresentação de antígenos por moléculas de MHC classe II. Após ativação, os linfócitos Th entram num processo de diferenciação e podem originar quatro tipos de linfócitos: Th1, Th2, Th17 e Treg (Goldsby *et al.*, 2006).

Os linfócitos Th1 são caracterizados pela produção de IL-2, IFN- γ e TNF- β . A IL-2 tem como função regular o crescimento dos próprios linfócitos Th1 como também dos linfócitos T CD8+. O IFN- γ exerce funções determinantes na amplificação da resposta imunológica, nomeadamente ao nível da ativação de macrófagos, do desenvolvimento de linfócitos Th1 e Tc1, do aumento da citotoxicidade dos linfócitos Tc1 e NK e do aumento da capacidade apresentadora de antígenos por células dendríticas através do aumento do complexo MHC:péptido na membrana plasmática. Em suma, os linfócitos Th1 são responsáveis por potenciar respostas contra bactérias intracelulares e vírus mediadas por outros tipos de linfócitos (linfócitos T CD8⁺, NKT e NK), estando assim envolvidos na regulação de respostas celulares (Goldsby *et al.*, 2006).

Os linfócitos Th2 estão caracterizados pela produção de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 citocinas anti-inflamatórias que interferem na regulação da produção de anticorpos por linfócitos B, na ativação de eosinófilos, na desgranulação de mastócitos, na inibição da formação de linfócitos Th1 e na inibição da ativação dos macrófagos. Por outras palavras, os linfócitos Th2 são responsáveis por regular a resposta mediadas por anticorpos contra agentes patogénicos extracelulares e alérgenos, estando envolvidos na regulação de respostas humorais e doenças alérgicas (Goldsby *et al.*, 2006).

Os linfócitos Th17 são caracterizados pela produção de IL-17 e são responsáveis por promover respostas imunológicas contra bactérias extracelulares e fungos, através do

recrutamento de monócitos e neutrófilos, estando também envolvidos na patogénese de algumas doenças autoimunes (Arosa *et al.*, 2012).

Os linfócitos T citotóxicos ou Tc, expressam CD8, representam 20-25% dos linfócitos em circulação no sangue e a sua função é eliminar outras células, nomeadamente tumorais ou infetadas. As células Tc são restritas à apresentação de antígenos por moléculas de MHC classe I e são caracterizados pela produção das citocinas IFN- γ e TNF- α e de enzimas líticas do tipo perforina e granzimas, responsáveis pela eliminação de células alvo. Esta eliminação também pode ser induzida diretamente pela ligação Fas-FasL (Arosa *et al.*, 2012).

Os linfócitos T reguladores funcionam como controladores da resposta imune desempenhando, um papel importante na manutenção da tolerância imunológica a antígenos inócuos na periferia e na prevenção da autoimunidade, alergias, e, de uma maneira geral, são responsáveis pela supressão de respostas do sistema imunológico (Lehtimäki e Lahesmaa, 2013).

Os linfócitos NKT são células que existem no sangue periférico humano em percentagem diminuta: 1-2%, com características mistas de linfócitos T e NK, determinantes em patologias infecciosas e auto-imunes. Expressam um tipo particular de TCR que reconhece antígenos de origem glicolípida, no contexto do MHC não clássico CD1d e uma vez ativadas são citotóxicas e produzem citocinas como IL-4 e IFN- γ (Wu e Kaer, 2009).

Embora as NKT possam atuar diretamente eliminando as células tumorais, pensa-se que a sua eficácia advém do efeito sobre as células NK, T CD8⁺ e DCs nomeadamente, nestas últimas, induzindo a sua ativação/maturação através da produção de IFN- γ (Terabe e Berzofsky, 2008).

A ativação T começa com o reconhecimento por parte do complexo TCR/CD3 de péptidos antigénicos expostos na superfície de APCs em associação com moléculas de MHC. O sinal proveniente da interação TCR/CD3-MHC:péptido é o sinal de ativação primário (“sinal 1”), que confere especificidade à resposta adaptativa. Porém, este sinal, por si só, não é eficaz, para induzir uma ativação que leve os linfócitos T CD4⁺ naive e

os linfócitos T CD8⁺ naive a entrar no ciclo celular e proliferar, sendo necessário sinais acessórios. Estes sinais acessórios são transmitidos pelo recetor CD28, considerado o “sinal 2”, que levará à formação de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ com características fenotípicas e funcionais diferentes do linfócito T naive inicial (Arosa *et al.*, 2012).

Existem recetores de adesão, que permitem aos linfócitos T uma interação mais prolongada com as APCs, permitindo iniciar respostas imunológicas eficazes. Os linfócitos T naive que saem do timo expressam moléculas de adesão como a Selectina L (CD62L), recetor de quimiocinas CCR7 (CD197) ou a integrina LFA-1 (CD11a) (Arosa *et al.*, 2012).

III – Células Dendríticas

3.1) Origem e Diferenciação das Células Dendríticas (DCs)

As DCs são produzidas na medula óssea a partir de precursores de células hematopoiéticas e a sua ontogenia exata é ainda pouco definida. Inicialmente, devido à sua semelhança com os monócitos e/ou macrófagos na sua distribuição nos tecidos linfóides, na morfologia, no fenótipo, na atividade enzimática e na capacidade fagocítica, as DC e as células de Langerhans da epiderme foram consideradas como pertencentes à linhagem mieloide. No entanto, uma série de estudos em ratinhos e humanos *in vivo* e *in vitro*, demonstraram a existência de DCs com proveniência da linhagem linfoide. Recentemente, evidenciou-se que tanto os precursores linfóides como os mieloides que expressem Flt3 (*Fms-like tyrosine kinase 3*) possuem a capacidade de se diferenciar em todos os tipos de células dendríticas (Ramos *et al.*, 2013).

Existem dois modelos propostos para a origem dos diferentes tipos de células- o modelo de plasticidade funcional e o modelo de linhagem especializada. Ambos definem três etapas de diferenciação: precursoras de DC, DC imaturas e DC maduras (Ardavín *et al.*, 2001; Arosa *et al.*, 2012).

O **modelo de plasticidade** funcional sugere que os diferentes tipos de células dendríticas derivam de uma única linhagem celular hematopoiética e que a sua diversidade de funções na qual se irão especializar depende de fatores do meio ambiente. O **modelo da linhagem especializada** sugere que os vários tipos de DC derivam de linhagens independentes. Provavelmente, a realidade *in vivo* será a mistura destes dois modelos, pois apesar de ocorrer a separação de linhagens para diferentes tipos de DC, verifica-se um grau de plasticidade funcional tanto nos precursores como nos diferentes tipos de DCs. Este facto parece estar dependente de diversos fatores, tais como: condições experimentais, dose e tipo de antígenos, o microambiente do meio envolvente no momento de maturação (citocinas, quimiocinas, ligandos dos recetores TLR) e o estado de ativação das DCs que se reflete no perfil de ativação de linfócitos T induzidos por DCs (Arosa *et al.*, 2012).

Distribuição e Localização

Os vários tipos de DCs estão classificados com base nas características específicas que apresentam, nomeadamente a expressão de marcadores de superfície, a localização no organismo, as funções específicas que desempenham e ainda a diversidade dos estímulos inflamatórios e infecciosos que induzem a diferenciação (Arosa *et al.*, 2012).

Nos humanos, as células dendríticas possuem características homogéneas com base nos marcadores de superfície CD11c e CD123. As DCs, assim, são agrupadas em duas populações principais designadas por:

- **DC mieloide (mDC):** CD11c⁺CD123^{baixo}CD14⁻CD1a⁺
- **DC plasmacitóide (pDC):** CD11c^{-/baixo}BDCA2⁺CD123⁺(IL-3R)

As **pDC** localizam-se principalmente nos órgãos linfóides e no sangue, e desempenham um papel crucial na imunidade inata antiviral e na autoimunidade. Possuem a capacidade de produzir elevadas quantidades de interferão tipo I (α e β), o que lhes confere capacidades antivirais e, em determinadas circunstâncias, propriedades antitumorais. Uma vez que não utilizam os vasos linfáticos para migração do sangue para os gânglios linfáticos, são únicas no processo de migração, pois migram através das veias endoteliais altas (VEA). Além disso, são capazes de realizar apresentação

cruzada (*cross-presentation*) de antígenos acopladas a MHC classe I devido a possuírem compartimentos endossomais especiais (Arosa *et al.*, 2012; McKenna *et al.*, 2005).

As **mDC** localizam-se no sangue e nos tecidos e migram para os órgãos linfáticos secundários através dos vasos linfáticos aferentes. No sangue, as mDC encontram-se classificadas como DC inflamatórias, que produzem grandes quantidades de TNF- α e respondem aos componentes do complemento. Nos tecidos são classificadas de acordo com a sua localização e expressão de recetores: células de Langerhans, DCs intersticiais ou da mucosa, ou DCs da derme (Arosa *et al.*, 2012; Zhang e Engleman, 2006).

3.2) Moléculas que Reconhecem o Antígeno

A função principal das DCs é a apresentação de antígenos aos linfócitos T; são consideradas APCs profissionais e são capazes de captar, endocitar e processar qualquer tipo de antígeno e apresentá-lo no contexto de moléculas de MHC. Comparativamente com os macrófagos e as células B são as APCs mais capazes, uma vez que expressam moléculas MHC II constitutivamente. Outra das características que as distinguem como APCs profissionais é que sofrem um processo de diferenciação pelo qual as DC imaturas, com grande capacidade de endocitose e baixa expressão de moléculas MHC-II, diferenciam-se em DCs maduras caracterizadas por uma baixa capacidade de endocitose mas com elevada expressão de moléculas de MHC-II. Ou seja, enquanto as DCs imaturas têm uma grande capacidade de endocitar e processar antígenos endógenos e exógenos, encontrando-se em órgãos e tecidos periféricos, as DCs maduras estão especializadas na ativação de linfócitos T, encontrando-se maioritariamente nos órgãos linfóides secundários.

Regra geral, os antígenos endógenos apresentados pelas DCs no contexto MHC-I, ativam linfócitos TCD8⁺ enquanto os antígenos exógenos apresentados pelas DCs no contexto MHC-II, ativam linfócitos TCD4⁺; uma das propriedades que também caracteriza as DCs é a capacidade de apresentação cruzada de antígenos exógenos por moléculas MHC-I aos linfócitos T CD8⁺, como foi já referido atrás (Arosa *et al.*, 2012).

Recetores das Células Dendríticas envolvidos no Reconhecimento e Captação de Antígenos

Os mecanismos envolvidos na captação de antígenos pelas DCs incluem a fagocitose, a endocitose e a pinocitose. Os recetores expressos na captação de antígenos são do tipo FcR, recetores do complemento, recetores de manose e PRRs. Os PRRs incluem vários grupos de moléculas, nomeadamente: NOD, os recetores de lectina tipo C (CLR) e os recetores TLR (Kanazawa, 2007).

Os **NOD** encontram-se no interior da DC e são capazes de se ligar aos peptidoglicanos bacterianos (Kanazawa, 2007).

Os **CLR** reconhecem e internalizam antígenos para os compartimentos intracelulares das DCs que, subsequentemente, levam ao processamento e apresentação dos mesmos via MHC-I e MHC-II. Os recetores de manose/CD206, a “*langerin*”/CD207, presente nas células de Langerhans, o DC-SIGN/CD209 e o DEC205/CD205 são exemplos de recetores CLR (Kanazawa, 2007).

O recetor DEC205 tem sido alvo de estudos para imunoterapia, pois medeia a endocitose e o processamento endossomal das moléculas MHC-II, promovendo a eficiente apresentação de antígenos e ativação de linfócitos T CD4⁺. Por outro lado é também capaz de fazer a apresentação cruzada de antígenos exógenos no contexto MHC-I a células TCD8⁺ (Bonifaz, *et al.*, 2002).

Estudos recentes demonstraram que os CLR, além de estarem envolvidos na internalização de antígenos pelas DCs, também estão envolvidos na ativação das vias de sinalização intracelular, nomeadamente o fator nuclear de transcrição *kappa* B (NF- κ B), e também na indução de expressão de citocinas que determinam a polarização de linfócitos Th (Arosa *et al.*, 2012).

Os **recetores TLR** são proteínas transmembranares que estão presentes em DCs, macrófagos, fibroblastos e células epiteliais. Estão envolvidos no reconhecimento dos antígenos e posterior ativação de mecanismos de sinalização celular que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IFN- γ), quimiocinas, moléculas de adesão (ICAM-1), moléculas coestimuladoras, moléculas do complexo

major de histocompatibilidade (MHC), bem como moléculas efetoras (péptidos antimicrobianos e espécies reativas de oxigênio). A ativação dos TLR pelos ligandos exógenos ou endógenos induz a maturação e ativação das DC, determinando desta forma o início da resposta imunológica (Arosa *et al.*, 2012).

Os TLR têm diversos tipos e diferentes localizações na DC, nomeadamente à superfície celular e em compartimentos endossomais (Takeda *et al.*, 2003).

Os diferentes tipos de DCs humanas apresentam uma expressão quase específica de TLR. As mDC expressam principalmente TLR3 e TLR4, enquanto as pDC expressam TLR9, TLR7 e TLR8. As DC diferenciadas a partir de monócitos (na presença de IL-4 e GM-CSF), expressam TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR8.

Agentes que são agonistas do TLR9 têm a capacidade de induzir a ativação e maturação das pDC parecem ser um potencial adjuvante em vacinas no tratamento tumoral, infecções e alergias (Arosa *et al.*, 2012; Takeda *et al.*, 2003).

3.3) Processamento do Antígeno e Apresentação às Células T

Antes de detetar o antígeno as DCs encontram-se numa fase imatura. Após o captarem, as DC fagocitam o antígeno e de seguida entram num processo de ativação, maturação e migração para os gânglios linfáticos, onde iniciam uma resposta imune celular T específica para o antígeno. Aquando do processo de maturação e migração, as DCs processam o antígeno em fragmentos mais pequenos para que possam ser apresentados aos linfócitos T (Hamdy *et al.*, 2011).

Processamento de Antígenos pelas DC

O processamento de antígenos pelas DCs ocorre essencialmente através de três vias: via endocítica, em que os antígenos são acoplados a moléculas de MHC-II, via citosólica, em que os antígenos são acoplados a moléculas de MHC-I, e por fim, na apresentação de antígenos lipídicos, que são acoplados a moléculas CD1 (Goldsby *et al.*, 2006).

Através da **via endocítica** os antígenos são captados extracelularmente por endocitose, fagocitose e pinocitose, formando-se endossomas que, por sua vez, sofrem maturação e fusão com lisossomas. Nestes existem enzimas hidrolíticas que clivam o antígeno em moléculas mais pequenas, péptidos, que de seguida são acoplados a moléculas de MHC-II formando um complexo. O complexo MHC:péptido, durante o processo de maturação das células dendríticas, é transportado para a superfície celular para que possa ocorrer a apresentação antigénica aos linfócitos T CD4⁺ naive (Goldsby *et al.*, 2006).

Através da **via citosólica**, os antígenos intracelulares (que podem ser proteínas próprias ou de origem patogénica – viral) são ubiquitinados e degradados em péptidos por proteossomas. Por intermédio do transportador associado ao processamento de antígenos (TAP), os péptidos dirigem-se para o retículo endoplasmático onde se ligam às moléculas de MHC-I. O complexo MHC:péptido é posteriormente transportado para a superfície celular para que possa ocorrer a apresentação do antígeno aos linfócitos T CD8⁺ naive (Goldsby *et al.*, 2006).

As DCs têm uma capacidade única de apresentar antígenos exógenos através de moléculas MHC-I, sendo esta função designado como **apresentação cruzada de antígenos (*cross-presentation*)**. Os antígenos exógenos, que podem ser provenientes de células tumorais apoptóticas ou de células infetadas apoptóticas (virais ou bacterianas), são degradados pelo proteossoma e acoplados a moléculas de MHC-I para serem apresentados aos linfócitos T CD8⁺ naive. Este processo assegura que as DCs conseguem criar uma resposta imunológica citotóxica contra células tumorais ou infetadas. No entanto, o processo de *cross-presentation* pode originar, por parte dos linfócitos T CD8⁺, tanto uma imunidade eficaz (*cross-priming*) como induzir tolerância (*cross-tolerance*). Mesmo assim, este mecanismo de apresentação tem sido bastante relevante para a formulação de vacinas antitumorais (Arosa *et al.*, 2012; Hamdy *et al.*, 2011; Goldsby *et al.*, 2006).

Os antígenos lipídicos, presentes em microrganismos (micobactérias) ou em tecidos endógenos, são apresentados aos linfócitos pelas DC através de moléculas CD1. Estas são essenciais na apresentação de glicolípidos específicos (ceramidas galactosiladas) às células NKT; as DC plasmacitoides não possuem moléculas CD1 (Golsby *et al.*, 2006; Arosa *et al.*, 2012).

Maturação de Células Dendríticas

O antígeno induz as DC imaturas a adquirirem diferentes características fenotípicas e funcionais. Num estado imaturo, as DC possuem baixa capacidade de estimular respostas imunológicas e uma elevada competência para captar antígenos. Ao iniciar um processo de maturação, as DC perdem os recetores fagocíticos e aumentam a sua capacidade de migração dos tecidos periféricos para os órgãos linfóides secundários, onde apresentam partículas antigénicas aos linfócitos naive. O processamento de antígenos é regulado de forma coordenada pela maturação das DC, pois devido a uma diminuição do pH dos endossomas o processamento é facilitado e permite que o complexo MHC:péptido seja transportado para a superfície celular (Arosa *et al.*, 2012). As DC maduras sintetizam altos níveis de IL-12 que aumenta a capacidade de induzir respostas inatas (células NK) e adaptativas (células B e T). Além disso, também expressam moléculas adjuvantes essenciais para a sua migração para os órgão linfáticos e para interagir com os recetores das células T. O aumento de moléculas de adesão (CD54, ICAM1), da proteína CD83, e de recetores de quimiocinas favorecem a sua migração. O aumento da expressão de moléculas MHC classe I e II e de moléculas coestimuladoras CD40, CD83, CD80 e CD86 durante a maturação é crucial para que se estabeleça a sinapse imunológica e consequente estimulação dos linfócitos (Arosa *et al.*, 2012).

Os estímulos que induzem a maturação incluem produtos de microrganismos que se ligam aos recetores de reconhecimento padrão, complexos imunes que atuam nos recetores Fc, moléculas inflamatórias que são libertadas pelas células do hospedeiro, nomeadamente, CD40L, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ , e moléculas libertadas de tecidos danificados, como ácido úrico (Arosa *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2004).

Migração das Células Dendríticas

A migração das DCs para os tecidos inflamados e para os tecidos linfóides é mediada pela alteração da sua resposta a diferentes quimiocinas durante o seu desenvolvimento. As DCs imaturas expressam uma grande variedade de recetores de quimiocinas, como CCR1, CCR5 e CCR6. Estes recetores participam na sua localização nos tecidos periféricos e também no recrutamento das DCs para os locais de infeção. Por exemplo,

o CCR6 (que tem como ligando o CCL20) responde à proteína inflamatória do macrófago -3α (MIP-3 α) que é produzida nos pulmões e no fígado, enquanto o CCR5 e o CCR1 respondem a mediadores inflamatórios dos tecidos periféricos, como MIP-1 α . Além disso, o CCR5 é um recetor essencial como coestimulador das células T (Sozzani *et al.*, 1999).

Durante a maturação, a DC reduz a expressão dos recetores referidos acima, para poder sair dos tecidos periféricos, e aumenta a expressão do CCR7, que a direciona para os órgãos linfáticos onde se encontram as células T. Este também se encontra envolvido na migração de células T naive e Treg (Arosa *et al.*, 2012; Hamdy *et al.*, 2011).

Indução de Imunidade e Tolerância

As DCs, quanto à capacidade de induzir respostas imunológicas, podem ser agrupadas em dois grupos: DC imunogénicas e DC tolerogénicas.

As **DC imunogénicas** são caracterizadas por expressarem altos níveis de moléculas MHC-II e recetores coestimuladores CD80, CD86 e CD40, assim como produzirem elevadas quantidades de citocinas inflamatórias, após reconhecimento e captação de antígenos. Como resultado, possuem uma elevada capacidade de apresentação de antígenos e de ativação dos linfócitos T naive; as DC imunogénicas são maioritariamente DC mielóides (Gehring *et al.*, 2008).

As **DC tolerogénicas** são caracterizadas por expressarem baixos níveis de moléculas MHC-II e de recetores coestimuladores CD80, CD86 e CD40 e pela produção de citocinas supressoras, como IL-10 e TNF- β . Como resultado, possuem fraca capacidade de induzir a ativação de células T naive, no entanto, as DC tolerogénicas têm um papel importante na manutenção da tolerância imunológica na periferia (Steinman *et al.*, 2003).

IV – Imunoterapia Tumoral

4.1) Definição e tipos de Imunoterapia Tumoral

A imunoterapia tumoral consiste na utilização de elementos do sistema imunológico para eliminar ou neutralizar células tumorais e os fatores que beneficiem a sobrevivência tumoral, tendo como principais objetivos não danificar as células normais e ter efeitos colaterais reduzidos. Aplicando estratégias com base na imunidade adaptativa e inata foram desenvolvidos vários meios de estimular as respostas imunes antitumorais, como por exemplo, a vacinação antitumoral, a transferência adotiva de células imunes (linfócitos), a inibição da supressão imune e a utilização de determinadas citocinas que ativam células da imunidade inata (Riether *et al.*, 2013).

Vários componentes da imunidade inata são explorados como estratégias imunoterapêuticas devido à sua capacidade de identificar células tumorais ou o *stress* tecidual associado com o tumor. Uma dessas estratégias é a utilização de **citocinas**, que são potentes agentes moduladores envolvidos na homeostasia imunológica, na regulação da resposta inflamatória e na aplicação de mecanismos tolerogênicos. Citocinas como IFN- γ (que ativam macrófagos e DCs a produzirem IL-12), TNF- α (agente antitumoral), IL-12 (ativam células da imunidade inata) e GM-CSF (promovem a mobilização e proliferação de células de linhagem mieloide e de mediadores inflamatórios) são consideradas como agentes ideais para a imunoterapia de tumores. No entanto, embora estudos em animais tivessem criado grandes expectativas, a administração local (sistêmica) das mesmas tem sido dificultada pela toxicidade severa demonstrada por algumas delas limitando a sua eficácia. Mas, estudos recentes, revelaram que o transporte de citocinas encapsuladas em lipossomas modificados superficialmente (adição de PAMPs) permite que estas não sejam neutralizadas *in vivo* e que haja uma liberação prolongada de citocinas no local específico evitando essa toxicidade (Arosa *et al.*, 2012; Christian e Hunter, 2012; Kindt *et al.*, 2007).

Uma outra estratégia, baseada na imunidade humoral adquirida é a utilização de **anticorpos monoclonais (mAbs)**, que fazem parte integrante do tratamento de linfomas e de tumores sólidos. Também designada como imunoterapia passiva, esta terapia

consiste na produção de anticorpos específicos para antígenos expressos por células tumorais (CT) que depois são administrados aos doentes. Os mAbs ligam-se a antígenos membranares das CT e ativam a sua lise, podem funcionar como transportadores de substâncias citotóxicas, podem bloquear moléculas essenciais para a viabilidade e proliferação das CT e podem-se conjugar com radioisótopos para que as CT sejam posteriormente expostas aos efeitos da radioatividade; em determinados casos podem induzir sinais apoptóticos e, através do envolvimento de linfócitos NK ou macrófagos, levar também à ativação de citotoxicidade dependente de anticorpos e mediada por células (Arosa *et al.*, 2012; Riether *et al.*, 2013; Weiner *et al.*, 2012). Apesar da sua especificidade e baixa toxicidade, comparada com terapias standard, a terapia baseada em mAbs tem um custo elevado, um tempo de vida curto e está dependente de aplicações repetidas (Hamdy *et al.*, 2011).

Estratégias utilizando a imunidade celular adquirida, também consideradas imunoterapias ativas, têm como finalidade a mobilização e estimulação de células que medeiam respostas imunes específicas antitumorais. Podem resultar em respostas imunes policlonais multifacetadas, como por exemplo, a ativação simultânea de APCs, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, linfócitos B, células NK e granulócitos (Hamdy *et al.*, 2011).

A geração *in vitro* de células efetoras e a sua transferência para o paciente, é uma das imunoterapias celulares testada; alguns estudos em pacientes com melanoma metastático usaram células T autólogas, específicas para antígenos tumorais, expandidas *in vitro* e injetadas, de novo, de modo a induzir uma maior resposta antitumoral; problemas com este tipo de terapia advém da incapacidade destas células T persistirem em circulação e na escolha das células mais imunogénicas para os antígenos tumorais (Yee *et al.*, 2002).

A **vacinação tumoral**, é outra estratégia celular, que se baseia na mobilização de células do sistema imunológico e na amplificação de respostas imunes que reconheçam o tumor e que procedem à sua eliminação. Existem vários tipos de vacinas: vacinas de células tumorais totais, de proteínas, de péptidos, de citocinas ou de moléculas de coestimulação, de anticorpos anti-idiotípicos, de vetores e, por fim, **vacinas de DCs**. (Arosa *et al.*, 2012; Riether *et al.*, 2013). Estas representam um método no qual as DCs são utilizadas como APCs profissionais estimulando células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas

para os antígenos tumorais (Engleman, 1997). Para o tratamento de doenças cancerígenas, as vacinas de DCs demonstraram ser bastante promissoras em vários ensaios clínicos (Zhang e Engleman, 2006). Podem ser carregadas com lisados tumorais, péptidos, proteínas e idiotípicos provenientes de células tumorais (Arosa *et al.*, 2012). Estudos em ratinhos demonstraram que DCs carregadas com antígenos tumorais foram capazes de induzir uma resposta protetora tumoral e produzir uma imunidade terapêutica em câncros já estabelecidos (Yu e Restifo, 2002). A imunogenicidade dos antígenos entregues pelas DCs foi também estudada em humanos saudáveis (Dhodapkar *et al.*, 2002) que demonstraram algumas respostas clínicas e imunológicas sem uma significativa toxicidade (Davis *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 1996).

V – Imunoterapia Tumoral com Células Dendríticas

Em comparação com outras células apresentadoras de antígenos, o facto de as DCs possuírem uma potente capacidade de apresentação de antígenos aos linfócitos T naive e de estimular o sistema imunológico adaptativo, tem contribuído para o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas, nomeadamente, em vacinas antitumorais. Além disto, a capacidade de promoverem tolerância periférica tem suscitado grande interesse na utilização destas células em terapias que visam bloquear as respostas imunológicas exacerbadas, como as que ocorrem nas doenças autoimunes, nas alergias e na rejeição dos transplantes (Arosa *et al.*, 2012; Frankenberger e Schendel, 2012).

Num ambiente tumoral, as DCs parecem ter uma funcionalidade menos imunoestimuladora, devido às células tumorais induzirem a produção de citocinas imunossupressoras (como por exemplo, IL-6, IL-10 e TGF- β) e de induzirem as DCs a ativarem linfócitos T reguladores ou supressores. Esta limitação pode ser ultrapassada pela geração de DCs a partir de precursores do sangue periférico e pela sua ativação *in vitro* com fatores pró-inflamatórios. Neste contexto, a utilização de DCs no tratamento de cancro tem sido alvo de intensa investigação, quer em modelos animais quer humanos (Arosa *et al.*, 2012; Bauer, 2011).

Nos últimos anos, têm sido realizados três tipos abordagens imunoterapêuticas tumorais usando DCs em humanos (Figura 2):

- Maturação de DCs do doente *in vitro* na presença de antígenos tumorais;
- Carregamento direto *in vivo* de antígenos tumorais nas DCs;
- Carregamento direto *in vivo* de anticorpos anti-DC carregados com antígenos (Palucka *et al.*, 2009).

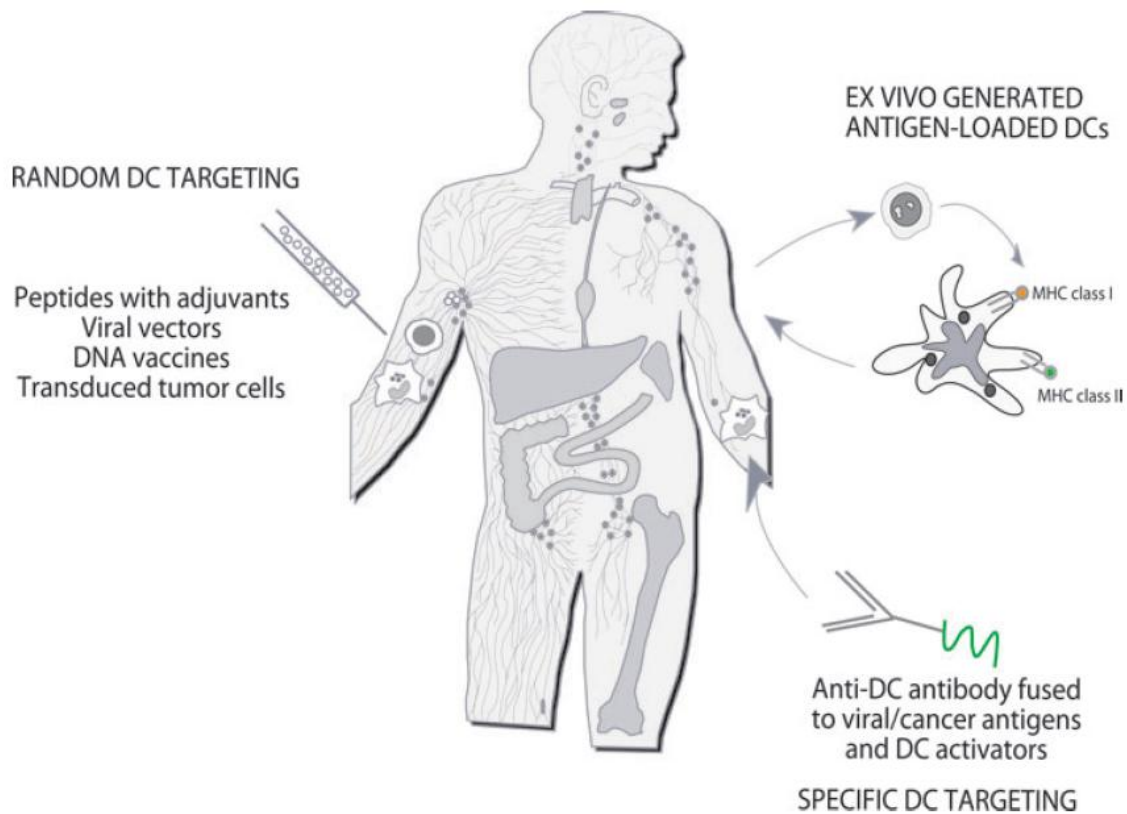


Figura 2 - Três abordagens da imunoterapia tumoral baseada em células dendríticas.

Fonte: Palucka *et al.*, 2009.

5.1 – Indução da Maturação das Células Dendríticas *In Vitro*

O desenvolvimento de estratégias para gerar DCs *in vitro* surgiu para contornar os problemas relacionados com a disfunção das DCs endógenas dos pacientes com cancro, permitindo garantir o carregamento das DCs com antígenos tumorais e, assim, controlar a entrega de sinais próprios para uma imunização eficaz. Para que o desenvolvimento de uma vacina baseada em DCs seja efetiva relativamente à ativação

de uma imunidade antitumoral inata e adaptativa é preciso ter em conta três sinais interativos: (1) adequada apresentação do complexo MHC:péptido para indução de uma resposta específica ao antígeno pelas células T (“sinal 1”), com expressão simultânea de ligandos de ativação para estimulação de células NK; (2) coestimulação positiva dominante através de moléculas como CD40, CD80 e CD86 (“sinal 2”); (3) secreção de citocinas que polarizam respostas imunes direcionadas a Th1/Tc para criar uma reposta antitumoral (“sinal 3”); (Frankenberger e Schendel, 2012; Kirkwood *et al.*, 2012).

A produção de DCs *in vitro*, permite que estas adquiram determinadas características que são críticas para indução de uma resposta imune efetiva antitumoral, tais como, a interação preferencial com células imunitárias efetoras (sem ser as células Treg) e a indução de mecanismos efetores nas células T CD4⁺ e T CD8⁺, para aumentar seletivamente os linfócitos Th1, Tc e linfócitos NK (Kirkwood *et al.*, 2012).

5.1.1) Obtenção de Células Dendríticas Humanas, Preparação de Antígenos, Carregamento das DC e Administração.

O tipo de DCs normalmente escolhidas para terapia tumoral são as populações mieloides (mDC), pois, são as principais produtoras de IL-12, que é uma citocina fundamental para o desenvolvimento de respostas Th1; além disso, estas, também são capazes de produzir GM-CSF, TGF- β , IL-1 β , IL-6 e IL-23. Consequentemente, conseguem induzir outro tipo de respostas como Th2 e respostas T citotóxicas específicas para o antígeno tumoral. Isto faz com que sejam uma ferramenta adequada para terapia tumoral (Skalova *et al.*, 2010).

Normalmente, as DCs são obtidas a partir de monócitos isolados do sangue periférico, mas também podem ser obtidas a partir de precursores da medula óssea (Nguyen-Pham *et al.*, 2012).

Vários métodos foram estudados para a obtenção de monócitos. Os métodos que demonstraram um maior rendimento na produção de monócitos com um maior grau de pureza foram os métodos de separação imunomagnética e os de elutriação. No entanto, comparados os dois métodos, o de elutriação, que consiste em constantes centrifugações combinadas com um líquido corrente que separa as células por densidade e tamanho, foi

o preferível pois consegue-se obter uma pureza relativamente alta ($82 \pm 3\%$) e um número de monócitos elevado ($87 \pm 7\%$) (Skalova *et al.*, 2010).

Após o isolamento dos monócitos ($CD14^+$), estes são colocados num meio de cultura na presença de GM-CSF e de IL-4 para gerar DCs imaturas. Este método permite gerar grandes quantidades de DCs com aplicação clínica (Li *et al.*, 2012; Hamdy *et al.*, 2011). Embora as DCs imaturas tenham fraca capacidade de induzir a proliferação de células T naive e de expressar moléculas de coestimulação, estas têm grande habilidade em captar antigénios e processá-los (Li *et al.*, 2012). É nesta fase de imaturação que são então carregadas com antigénios tumorais através da adição de péptidos, proteínas ou lisados tumorais pelo meio de cultura ou então pela transfecção de ADN complementar que codifica antigénios tumorais (Hamdy *et al.*, 2011). De seguida, deve-se proceder ao estímulo de maturação das DCs, pois estas, já maduras, expressam mais moléculas MHC classe I e II, moléculas de coestimulação (CD86 e CD80) e moléculas de adesão (como a CD54) e secretam múltiplas citocinas imunoreguladoras. Vários estímulos de maturação foram estudados, a aplicação de LPS, TNF- α , CD40L, *monocyte-conditioned medium* (MCM) e um cocktail de citocinas (IL-1 β , IL-6, PGE₂ e TNF- α) podem ser usados para induzir a maturação de DCs. Assim, adquirem maior capacidade de apresentação de antigénios e, por sua vez, estimulam a ativação e proliferação de células T, ativando o sistema imunológico. Desta forma, o processo de maturação de DC é um passo chave para a preparação destas vacinas (Li *et al.*, 2012; Hamdy *et al.*, 2011).

O LPS, componente da parede celular de bactérias Gram⁻, pode induzir a maturação via ativação dos TLR, no entanto, este reagente bacteriano não é viável para aplicação clínica. CD40L é uma glicoproteína membranar que interage com o CD40 das DCs, induzindo a sua maturação, redução da capacidade de captar antigénios, promove a produção de IL-12 e aumenta a capacidade de ativação e proliferação dos linfócitos. O MCM é um meio caracterizado por citocinas produzidas por células mononucleares, incluindo IL-1 β , IL-6 e TNF- α , no entanto, tem que ser adaptado individualmente para cada paciente e a sua preparação é bastante complexa. Para ultrapassar este limite, foi usado um cocktail de citocinas que imitam o MCM e, da mesma forma, induzem a maturação das DC. Este método, usado pela primeira vez por Jonuleit *et al.* em 1997, combina diversas citocinas tais como, IL-1 β , IL-6, PGE₂ e TNF- α , e é possível de ser

aplicado clinicamente. Além disso, foi demonstrado, que através do cocktail de citocinas, as DCs maduras produziam com mais eficácia IL-12 (Li *et al.*, 2012).

Geradas desta forma, as DCs são consideradas *standard* DCs (sDCs), mas com a adição de IFN- α , IFN- γ e do ácido *polyinosinic:polycytidylic* [poly(I:C)] ao cocktail de citocinas estas denominam-se α DC1s ou *alpha-type-1-polarized* DCs, que demonstram uma potencia mais forte na geração de células T citotóxicas antitumorais, células Th1 e células NK em modelos humanos *in vitro* e em modelos animais (ratinhos) *in vivo* (Danylesko *et al.*, 2012; Kirkwood *et al.*, 2012).

O passo final é a administração da DC madura completamente carregada ao paciente, que pode ser realizada pela via subcutânea, intravenosa, intradérmica, intratumoral, intranodular ou intralinfática (Hamdy *et al.*, 2011). A migração de DCs maduras é mais eficiente quando estas são administradas via intradérmica, intralinfática ou via intranodular quando comparadas com a via intravenosa. Consistentemente com este estudo, observou-se que, em pacientes com cancro da próstata injetados via intradérmica ou intralinfática, houve uma maior produção de linfócitos T específicos para o antígeno tumoral do que aqueles que receberam as DCs carregadas via intravenosa. No entanto, em todas as formas de administração existe uma certa dificuldade de migração para os órgãos linfóides periféricos (Zhang e Engleman, 2006).

5.2) Tumores Testados e Resposta dos Linfócitos T

O resultado final da apresentação de antígenos pelas DC pode ser ativação das células T ou indução de tolerância pelas células T, dependendo do seu estado de ativação ou maturação (Matar *et al.*, 2009). O resultado esperado da imunoterapia baseada em DC é que haja uma potente ativação de células T *helper*, que por sua vez vão induzir a resposta de células T citotóxicas e a produção de anticorpos pelas células B. Assim, seria de esperar uma resposta imune efetiva tumoral juntamente com uma resposta imune de memória. No entanto, isto nem sempre acontece (Kirkwood *et al.*, 2012).

Os primeiros resultados promissores que levaram ao estudo da vacinação terapêutica tumoral baseada em DCs, ocorreram nos anos 1990 no linfoma folicular e melanoma,

que utilizaram DCs imaturas ou parcialmente imaturas (vacinas de primeira geração). Estas, por sua vez, expressavam níveis baixos de moléculas coestimuladoras e baixa imunogenicidade. Subsequentemente, implementaram o uso de DCs maduras constituindo estas as vacinas de segunda geração aplicadas clinicamente com DCs. No entanto, a primeira vacina antitumoral com DCs aprovada pela FDA (Food and Drug Administration) é uma vacina de primeira geração, chamada Sipuleucel-T (Provenge®), que está aprovada para todos os tipos de cancro (Kirkwood *et al.*, 2012).

Num estudo randomizado de fase III, homens que sofriam de **cancro da próstata** resistente a hormonoterapia ou castrante (CRPC) metastisado, foram tratados com DCs autólogas geradas a partir de células do sangue periférico e cultivadas *in vitro* com GM-CSF e com um antígeno específico da próstata, ácido fosfatase (PA2024). Esta imunoterapia celular, designada Sipuleucel-T (Provenge®), induziu uma resposta imune nestes pacientes, reduzindo o risco de morte em 22% e aumentando o *overall survival* (OS) por 4,1 meses comparado com o grupo placebo (Riether *et al.*, 2013). Apesar da diferença substancial no OS, a Sipuleucel-T não altera a progressão da doença a curto prazo (Gerritsen, 2012).

O **cancro do pulmão** é uma das maiores causas de mortalidade provocadas por doenças cancerígenas. Apesar de tratamentos agressivos com cirurgia, radioterapias e quimioterapias, o tempo de vida dos doentes permanece baixo. Mesmo nos estados iniciais da doença facilmente se desenvolvem metástases. Por isso, uma terapia sistémica tornou-se um requisito para o cancro do pulmão. Uma das estratégias testadas foi a imunoterapia com DCs, em que pacientes com cancro no pulmão foram tratados com DCs autólogas carregadas com péptidos derivados de CEA (*carcinoembryonic antigen*). Respostas imunológicas, medidas por testes na pele e por ensaios com células T *in vitro*, foram reportadas na maioria dos pacientes. No entanto, não foi obtido uma resposta clinica objetiva, embora durante a imunoterapia a doença permanecesse estável (Raez *et al.*, 2005).

O **mieloma múltiplo (MM)** é uma doença maligna das células B que é caracterizada pela proliferação de células plasmáticas na medula óssea, excreção de proteínas monoclonais na urina, destruição óssea, anemia, disfunções renais e hipercalcemia e geralmente apresenta, por parte dos pacientes, uma fraca resposta imunológica. A

imunoterapia celular aplicada nesta doença parece ser bastante promissora. Idiotípicos isolados, lisados de células do mieloma, células mortas do mieloma ou DCs transfectadas com RNA proveniente do tumor têm sido usados para imunoterapia com DCs. Citocinas inibitórias do sistema imunológico, como TGF- β , IL-10, IL-6 e VEGF, que são produzidas pelas células do mieloma, conseguem, no entanto, modular a resposta imunológica do paciente, incluindo a anulação da função das DCs, pela ativação constitutiva de STAT3. Por isso, apesar das respostas imunes observadas nos ensaios clínicos, a resposta clínica dos pacientes com MM raramente melhorou após vacinação com DCs. Tem-se realizado vários estudos para melhorar a eficácia deste tipo de terapia (Nguyen-Pham *et al.*, 2012).

O **cancro do ovário** é uma doença ginecológica maligna com uma elevada taxa de mortalidade. As respostas imunes antitumorais estão associadas com um aumento significativo da OS em mulheres com este tipo de cancro. Ao aumentar estas respostas, pode ser, então, possível influenciar significativamente o seu prognóstico. Um dos estudos realizados para imunoterapia do cancro do ovário foi a comparação de vacinação subcutânea de p53 (antígeno tumoral do cancro do ovário) versus a administração intravenosa com DCs carregadas com p53 realizados num ensaio fase II em mulheres com cancro na fase III, IV ou com cancro recorrente. A vacina subcutânea foi administrada com adjuvantes como o Montanide e GM-CSG, e a citocina IL-2 foi administrada em ambos. Ambas as abordagens resultarem numa resposta imune T específica para o p53 com semelhante tolerabilidade e segurança, o que significa que a estratégia menos exigente poderá ser uma abordagem mais efetiva do que a baseada em DC. No entanto, a vacinação baseada em péptidos tem pouca imunogenicidade e necessita de adjuvantes, além disso, não mostrou benefícios clínicos significativos. Outro estudo realizado, que se encontra recentemente em ensaios de fase I, está a ser realizado em mulheres com cancro do ovário recorrente ou progressivo. Neste estudo, as DCs são carregadas com lisados autólogos de células tumorais e administradas via intranodular. 50% das mulheres demonstraram uma estabilização da doença e apenas duas pacientes demonstraram ter respostas T linfoproliferativas. Neste momento, estão a ser avaliadas a viabilidade e a imunogenicidade das DCs com o lisado tumoral. No geral, não houve grande impacto no tempo de vida das pacientes nem uma estimulação eficiente de células T (Smaldone *et al.*, 2012).

No **cancro de células renais**, foi aplicada uma técnica em que DCs alogénicas derivadas de monócitos foram carregadas com células tumorais autólogas num campo elétrico. Após administração subcutânea e seguimento dos pacientes ao longo de 13 meses, significativas respostas clínicas foram verificadas em 7 dos 17 pacientes: em 4 deles houve completa remissão de todas as lesões tumorais metastisadas, em 2 houve 50% de regressão tumoral e 1 deles teve uma resposta mista (Wu *et al.*, 2004).

Em relação ao **cancro gástrico**, a vacinação com DCs parece ser uma imunoterapia bastante promissora, no entanto, não conseguiu substituir a cirurgia e outras terapias adjuvantes, como a quimioterapia e radioterapia (Wu *et al.*, 2004).

Em pacientes com **carcinoma pancreático avançado ou recorrente**, foi realizada aplicação de vacinas com DCs carregadas com lisados tumorais, estimuladas com TNF- α e PGE₂ e administradas via intradérmica. Todos os pacientes faziam também quimioterapia com gemtabicina. Dos doze pacientes testados, um paciente desenvolveu uma remissão parcial e dois pacientes permaneceram estáveis. Embora antes da vacinação já tenham sido detetados células T reativas, após a aplicação imunoterapêutica, houve um aumento de células T reativas contra as células tumorais. Em conclusão, os pacientes que receberam este tratamento conseguiram produzir uma maior resposta antitumoral e ao mesmo tempo de forma viável e segura (Bauer *et al.*, 2011).

O **carcinoma hepatocelular (HCC)** é o quinto tipo de cancro mais comum e encontra-se frequentemente associado, em estado avançado, ao **carcinoma colorectal (CRC)**. Metástases hepáticas estão presentes em 15-25% dos pacientes no momento em que se diagnosticou CRC, sendo que, após o diagnóstico da doença, o tempo previsto de vida em pacientes não tratados é entre 6 a 12 meses (Matar *et al.*, 2009). Morse *et al.* reportou um ensaio clínico em fase I, que consistiu na administração de DC autólogas carregadas com péptidos CEA (CAP-1) em 21 pacientes que padeciam de CRC metastisado no fígado e o procedimento foi bem tolerado. Um paciente demonstrou uma resposta mínima e outro demonstrou uma estabilização da doença. Mais recentemente, o mesmo grupo avançou com outro estudo em fase I em 14 pacientes (12 com CRC e 2 com cancro do pulmão) aos quais foi administrado DCs transfectadas com um vetor viral que codificava para CEA e moléculas coestimuladoras. A imunização destes

pacientes foi segura e foi capaz de ativar uma potente resposta imune específica T. Com o intuito de aumentar o número de DC circulantes, Fong *et al.* incubou DCs com o ligando de Flt3 (fator de crescimento hematopoiético) antes de as injetar, carregadas com péptidos derivados de CEA, em 12 pacientes com cancro do pulmão ou do colon. Dois pacientes demonstraram uma resposta objetiva e dois tiveram uma estabilização na progressão da doença.

5.4) Eficácia

Em quase todos os estudos, a aplicação de DCs foi segura, bem tolerada e com efeitos secundários mínimos, no entanto, não foram demonstrados resultados significativos em relação ao tempo de vida do paciente e da qualidade de vida. Uma forma de aumentar a capacidade de ação das DCs é a preparação de vacinas mais eficientes. Para isso é necessário identificar antígenos tumorais específicos e otimizar as formas de os carregar nas DC, encontrar uma combinação adequada de citocinas de maturação que irão permitir a preparação de DCs que produzam um ótimo espectro de citocinas capazes de induzir fortes respostas imunes citotóxicas específicas contra o tumor e ao mesmo tempo minimizar reações não desejadas, maximizar o rendimento de DC para vacinação sem efeitos secundários para o paciente e, por fim, estabelecer um painel de testes para avaliação da resposta clínica (Skalova *et al.*, 2010).

Sendo assim, existem alguns pontos-chave que são fundamentais para aumentar a eficácia da imunoterapia baseada em DCs (Figura 3):

- Aumentar a maturação e a ativação das DCs por citocinas Th1 polarizadoras e por indutores do recetor TLR.
- Aumentar a apresentação cruzada de antígenos tumorais pelas DCs;
- Bloquear a atividade imunossupressora, que pode ser criada pelo microambiente tumoral;
- Regulação da ativação de células Treg e de células supressoras derivadas da via mieloide (MSDC);
- Regulação das características migratórias das DC, através da estimulação da expressão de CCR7 (Nguyen-Pham *et al.*, 2012).

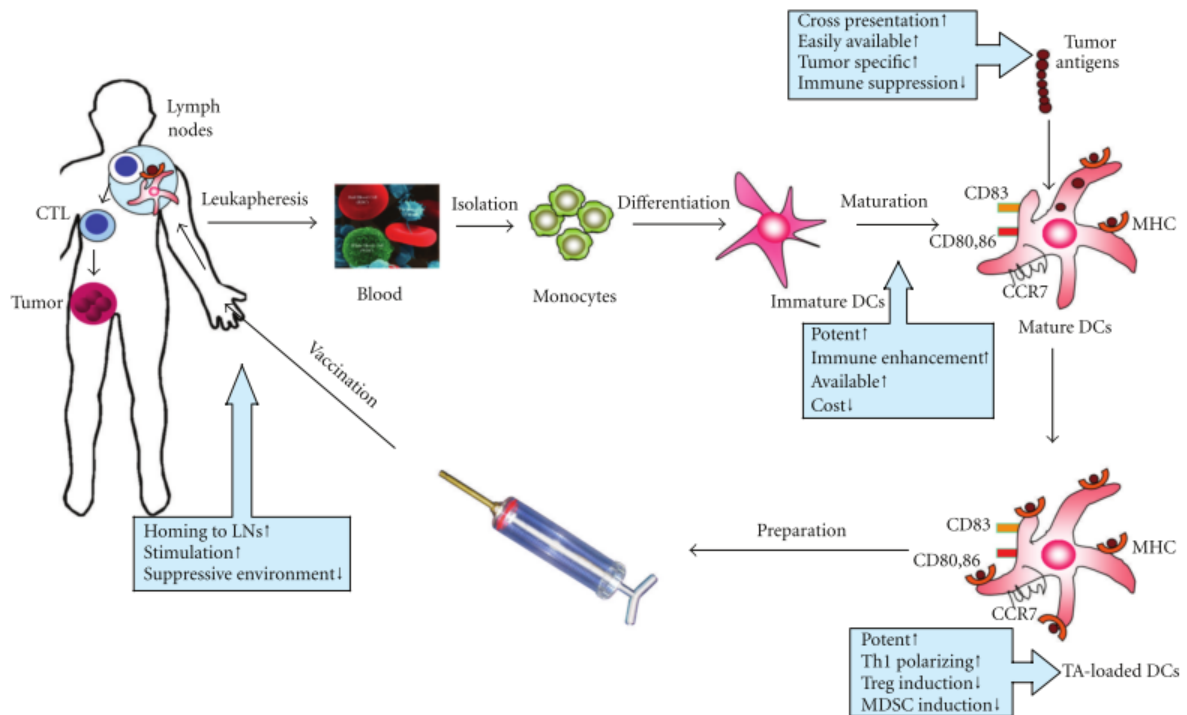


Figura 3 - Pontos-chave para melhorar a vacinação com células dendríticas em pacientes com cancro. CTL: linfócito T citotóxico; TA: antígeno tumoral; LNs: nódulos linfáticos; Treg: células T reguladoras; MDSC: célula supressora derivada mieloide. Fonte: Nguyen-Pham *et al.*, 2012.

VI - Vacinação antitumoral baseada em DCs carregadas *in vitro* versus *in vivo*.

Como referido anteriormente, a estratégia utilizando DCs carregadas *in vitro* é segura, bem tolerada e é capaz de induzir respostas imunes celulares. No entanto, a taxa global de respostas clínicas objetivas em pacientes corresponde apenas a 7%. O maior problema é que a migração das DC geradas *in vitro* para os gânglios linfáticos é ineficiente. Apenas 3-5% das DC injetadas conseguem realmente migrar para os gânglios linfáticos e apresentar o antígeno às células T. Por outro lado, têm de ser produzidas especificamente para cada indivíduo, o que requer um elevado consumo de tempo, trabalho laboratorial extensivo e um elevado custo. Além de que, o excessivo manuseamento físico dos precursores das DC, aumenta o risco de contaminação por endotoxinas (Hamdy *et al.*, 2011).

Os protocolos *standard* para cultura e ativação das DC estão em falta, o que leva a que diferentes laboratórios produzam vacinas com qualidades diferentes. O tempo de vida do complexo MHC:péptido na superfície da DC é relativamente curto, para além de que os péptidos ou lisados tumorais adicionados às DCs em cultura assumem todo o tipo de proteínas no meio de cultura, diminuindo o número de complexos MHC:péptidos efetivos. Por fim, existem diversos parâmetros variáveis no processo (por exemplo, dose de DCs e frequência de administração) o que faz que se torne irreprodutível (Hamdy *et al.*, 2011).

A alternativa para melhorar este tipo de estratégia imunoterapêutica é carregar as DC in vivo com antigénios tumorais com adjuvantes apropriados. Este tipo de estratégia permite que a entrega de antigénios e a estimulação da maturação seja realizada no seu ambiente natural, no entanto, estudos prévios, demonstraram que o tempo em que o antigénio e o adjuvante demoram a alcançar as DC é crucial e tem efeitos profundos no efeito da resposta imune. Se a estimulação é induzida muito tarde após o carregamento do antigénio pode levar a respostas de tolerância. Por outro lado, se o antigénio for administrado quando as DC já estão maduras este não vai ser eficientemente apresentado (Hamdy *et al.*, 2011).

A entrega conjunta do antigénio tumoral com os adjuvantes maximiza a ativação imune e limita a toxicidade não desejada que normalmente resulta da administração sistémica de adjuvantes. Além disso, o fornecimento de partículas de antigénios proporciona um fornecimento contínuo de péptidos a serem apresentados pela moléculas de MHC recentemente formadas na superfície das DCs (Hamdy *et al.*, 2011).

6.1) Carregamento direto *in vivo* de antigénios tumorais nas células dendríticas.

Esta técnica, testada mais recentemente, possui, do ponto de vista clínico, uma aplicação mais ampla. Como já foi referido, esta estratégia terapêutica visa a libertação direta *in vivo* de antigénios tumorais nas DCs, e tem como objetivo final modular a resposta imunológicas das DCs, nomeadamente, a ativação de respostas antitumorais mediadas

pelos linfócitos T citotóxicos (Arosa *et al.*, 2012). Assim sendo, para evitar a manipulação das DCs *in vitro* vários estudos foram realizados em ratinhos (Zhang e Engleman, 2006).

Um dos estudos consiste na administração de Flt3-L (fator de crescimento hematopoiético) a um ratinho com melanoma, seguida pela injeção subcutânea de oligodesoxinucliotídeo contendo componentes de citosina e guanina não metilados (CpG), um potente agonista do TLR-9, juntamente com o antigénio tumoral. Assim, foi possível gerar uma resposta antitumoral significativa mediada por linfócitos T CD8⁺. No entanto, a indução de uma resposta imune forte e prolongada está dependente da acumulação das DCs na pele, provocada pelo Flt3-L, que torna possível o carregamento e a ativação das DCs através da uma injeção subcutânea (antigénio tumoral + CpG). Esta técnica também aparenta ser efetiva com proteínas não modificadas produzidas pelo tumor e usadas como antigénios. Por exemplo, foi também observada uma proteção tumoral contra o melanoma, quando um péptido derivado do mesmo, Trp2, foi usado como antigénio juntamente com Flt3-L e CpG. Esta abordagem induziu um número elevado de células específicas para o Trp2, mesmo tendo este um fraco poder imunogénico (Zhang e Engleman, 2006).

Outras estratégias de vacinação continuam a ser exploradas em que o objetivo é dirigir as DC circulantes ao tumor para que estas assumam todo o tipo de antigénios tumorais locais e iniciem uma imunidade tumoral sistémica. Infelizmente, estas, tendem a ser fenotípica e funcionalmente imaturas e, ao invés de promoverem uma resposta imune antitumoral pró-inflamatória, estão mais propensas a induzir células Treg e a produzir IL-10, que são muito abundantes em ambientes tumorais, como também levam à anergia e supressão T (Zhang e Engleman, 2006).

Recentemente, foi demonstrado que em ratinhos com adenocarcinoma do colon e melanoma que o recrutamento simultâneo de DCs ao tumor juntamente com a ativação da DCs pode ser empregue com sucesso como terapêutica tumoral sem a necessidade de identificação de antigénios tumorais relevantes. O uso da quimiocina CCL20 para atrair DCs CD11c⁺ foi suficiente para induzir uma completa regressão do adenocarcinoma do colon. Adicionalmente, o recrutamento das DCs ao local tumoral pela CCL20 foi mais eficiente, criando um maior número de DCs antitumorais do que com o Flt3-L. De

facto, nenhum dos ratinhos injetados com Flt3-L durante oito dias consecutivos demonstraram uma regressão do cancro, em comparação com os 100% de sobrevivência induzido pelo uso de CCL20 (Zhang e Engleman, 2006).

Em contraste, a secreção de CCL20 pelas células tumorais do melanoma não teve nenhum efeito no crescimento tumoral, apesar da entrada massiva de DCs CD11⁺ no tumor, o que sugere que fatores adicionais podem ser necessários para induzir uma resposta antitumoral. Quando o CCL20 é combinado com injeções intratumorais de CpG, a capacidade coestimuladora das DC tumorais é regulada, restaurando a sua capacidade de induzir células T citotóxicas. Assim sendo, os ratinhos portadores de melanoma demonstraram uma regressão no crescimento do tumor e aumento de sobrevivência (Zhang e Engleman, 2006).

Todas estas observações constituem um ponto de partida para a utilização concertada de DCs em situações oncológicas, quer de um modo isolado quer em associação com outras modalidades terapêuticas (Arosa *et al.*, 2012; Zhang e Engleman, 2006).

VII- Conclusão

O sistema imunológico é um sistema bastante complexo que envolve vários mecanismos de interação. O estudo do seu modo de ação em determinadas situações, nomeadamente as de ataque à homeostasia do organismo, permitiu que fossem desenvolvidos vários métodos relativos ao tratamento de determinadas patologias, como doenças cancerígenas ou autoimunes. No caso de patologias tumorais, é imperativo que se encontrem formas de tratamento cada vez mais específicas e eficazes, contornando os variados efeitos secundários de uma terapia clássica de quimio e /ou radioterapia. Uma das abordagens aplicadas, é a imunoterapia, que consiste na utilização de elementos do sistema imunológico para eliminar ou neutralizar células tumorais não danificando as células saudáveis. Aplicando estratégias com base na imunidade adaptativa e inata foram desenvolvidos vários meios de estimular as respostas imunes antitumorais, como por exemplo, a vacinação antitumoral, a transferência adotiva de células imunes (linfócitos), a inibição da supressão imune e a utilização de determinadas citocinas que ativam células da imunidade inata (Arosa *et al.*, 2012; Riether *et al.*, 2013).

A vacinação antitumoral baseada em DCs demonstrou ser uma técnica bastante promissora para o tratamento de diversas patologias cancerígenas. Na década de 1990 foram referidos resultados promissores na resposta ao linfoma folicular e ao melanoma, o que levou a que vários estudos fossem desenvolvidos em ratinhos e posteriormente em humanos (Kirkwood *et al.*, 2012).

A estratégia inicial foi desenvolver DCs a partir de precursores da medula óssea ou do sangue periférico (monócitos) em laboratório num meio apropriado, carregá-las com compostos imunogénicos (como péptidos de antígenos tumorais, lisados tumorais, células tumorais apoptóticas, ácidos nucleicos, etc), induzir a sua maturação e de seguida administrá-las ao paciente para que se possa desenvolver uma resposta imune efetiva antitumoral e, por sua vez, uma resposta imune de memória (Hamdy *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Nguyen-Pham *et al.*, 2012).

Esta técnica foi aplicada em vários tipos de cancro, como o melanoma, cancro do pulmão, cancro do ovário, cancro pancreático, cancro gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma colorectal, cancro das células renais e mieloma múltiplo; no entanto, no geral, embora a vacinação com DC fosse bem tolerada e segura relativamente a efeitos colaterais, nem todos os pacientes demonstraram uma resposta imune efetora nem uma resposta clínica sustentada. Ou seja, não houve grandes resultados em relação ao aumento do tempo de sobrevivência do doente, embora, em alguns casos, se verificasse uma estabilização tumoral (Bauer *et al.*, 2011; Fong *et al.*, 2001; Gerritsen, 2012; Kirkwood *et al.*, 2012; Matar *et al.*, 2009; Morse *et al.*, 1999; Nguyen-Pham *et al.*, 2012; Raez *et al.*, 2005; Smaldone *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2004).

Várias razões para este tipo de resposta foram apontadas: a incapacidade de indução de maturação das DC *in vitro* com a adequada combinação de citocinas, a dificuldade de as direcionarem para os órgãos linfáticos secundários; os problemas na identificação de antígenos tumorais específicos e na forma de como induzir a sua apresentação às DCs, etc (Hamdy *et al.*, 2012; Nguyen-Pham *et al.*, 2012; Skalova *et al.*, 2010).

É, ainda, necessário otimizar protocolos standard para a produção destas vacinas para que o resultado clínico seja o mais eficaz possível, ao nível não só da diminuição das

taxas de mortalidade do doente, mas também num aumento da sua qualidade de vida (Hamdy *et al.*, 2012).

De forma a tentar ultrapassar as dificuldades encontradas na geração de DCs *in vitro*, desenvolveu-se outra técnica imunoterapêutica na qual as DCs eram carregadas com antígenos tumorais e com adjuvantes apropriados *in vivo* (equivalente ao ambiente natural; testes realizados em ratinhos com adenocarcinoma do colon e melanoma demonstraram respostas clinicas positivas, com regressão completa ou parcial do tumor, aumentando o seu tempo de vida; testes em humanos serão o passo lógico a seguir (Hamdy *et al.*, 2012).

Em suma, a imunoterapia com DCs é uma técnica bastante promissora e viável em termos clínicos, mas ainda necessita de otimizar determinados aspetos para um resultado clinico efetivo e duradouro.

Bibliografia:

Akira, S. (2011). Innate immunity and adjuvants. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 366(1579), pp. 2748-55.

Ardavín, C. *et al.* (2001). Origin and Differentiation of Dendritic Cells. *Trends in Immunology*, 22(12), pp. 691-700.

Ardavín, C., Amigonera, S. e Sousa, C.R. (2004). Dendritic cells: immunobiology and cancer immunotherapy. *Immunity*, 20, pp.17-23.

Arosa, F.A., Cardoso, E.M. e Pacheco, F.C. (2012). *Fundamentos de Imunologia*. 2^a Edição. Lisboa, Lidel.

Banchereau, J. *et al.* (2000). Immunobiology of Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*, 18, pp. 767-811.

Banchereau, J. e Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(Março), pp. 254-252.

Bauer, C. (2011). Dendritic cell-based vaccination of patients with advanced pancreatic carcinoma: results of a pilot study. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 60, pp. 1097-1107.

Benencia, F. *et al.* (2012). Dendritic Cells The Tumor Microenvironment and the Challenges for na Effective Antitumor Vaccination. *Journal of Biomedicine and Biothechnology*, 2012, pp. 0-15.

Bonifaz, L. *et al.* (2002). Efficient Targeting of Protein Antigen to the Dendritic Cell Receptor DEC-205 in the Steady State Leads to Antigen Presentation on Major Histocompatibility Complex Class I Products and Peripheral CD8⁺ T Cell Tolerance. *Journal of Experimental Medicine*, 196(12), pp. 1627–1638.

Christian, D.A. e Hunter, C.A. (2012). Particle-mediated delivery of cytokines for immunotherapy. *National Institutes of Health*, 4(4), pp. 425-441.

Danylesko, I. *et al.* (2012). Novel Strategies for Immunotherapy in Multiple Myeloma: Previous Experience and Future Directions. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, pp. 1-18.

Davis, I.D. *et al.* (2003). Rational approaches to human cancer immunotherapy. *Journal of leukocyte biology*, 73(1), pp. 3-29.

Dhodapkar, M.V. *et al.* (2002). Mature dendritic cells boost functionally superior CD8+ T-cell in humans without foreign helper epitopes. *The Journal of clinical investigation*, 105, pp. 9-14.

Engleman, E.G. (1997). Dendritic cells: potential role in cancer therapy. *Cytotechnology*, 25(1-3), pp. 1-8.

Fong, L. *et al.* (2001). Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, pp. 8809-8814.

Frankenberger, B. e Schendel, D.J. (2012). Third generation dendritic cell vaccines for tumor immunotherapy. *European Journal of Cell Biology*, 91, pp-53-58.

Gehring, S. *et al.* (2008). Generation and characterization of an immunogenic dendritic cell population. *Journal of Immunological Methods*, 20 (332), pp. 18-30.

Gerritsen, W.R. (2012). The evolving role of immunotherapy in prostate cancer. *Annals of Oncology*, 23(8).

Hamdy, S. *et al.* (2011). Targeting dendritic cells with nano-particulate PLGA cancer vaccine formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, pp. 943-955.

Hsu, F.J. *et al.* (1996). Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nature medicine*, 2(1), pp. 52-58.

Jonuleit, H. *et al.* (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *European Journal of Immunology*, 27, pp. 3135-3142.

Kanazawa, N. (2007). Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. *Journal of Dermatological Science*, 45(2), pp.77-86.

Kindt, T.J., Goldsby, R.A. e Osborne, B.A. (2006). *Kuby Immunology*. 5th edition. W. H. Freeman.

Kindt, T.J., Goldsby, R.A. e Osborne, B.A. (2007). *Imunologia de Kuby*. 6^a Edição, Porto, Artmed.

Kirkwood, J.M. *et al.* (2012). Immunotherapy of Cancer in 2012. *National Institutes of Health*, 62(5), pp.309-335.

Lehtimäki, S. e Lahesmaa, R. (2013). Regulatory T Cells Control Immune Responses through Their Non-Redundant Tissue Specific Features. *Frontiers in Immunology*, 4, p. 294.

Li, D. *et al.* (2012). Maturation induction of human peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 4, pp. 131-134.

Matar, P. *et al.* (2009). Immunotherapy for liver tumors: present status and future prospects. *Journal of Biomedical Science*, 16, pp. 1-30.

McKenna, K., Beignon, A.S. e Bardwaj, N. (2005). Plasmacytoid Dendritic Cells: Linking Innate and Adaptive Immunity. *Journal of Virology*, 79 (1), pp. 17-27.

Morse, M.A. *et al.* (1999). A Phase I study of active immunotherapy with carcinoembryonic antigen peptide (CAP-1) pulsed, autologous human cultured dendritic

cells in patients with metastatic malignancies expressing carcinoembryonic antigen. *Clinical Cancer Research*, 5, pp.1331-1338.

Nguyen-Pham, T. *et al.* (2012). Immunotherapy using Dendritic Cells against Multiple Myeloma: How to Improve?. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, pp. 1-13.

Raez, L.E. *et al.* (2005). Lung Cancer Immunotherapy. *Clinical Medicine and Research*, 3(4), pp. 221-228.

Ramos, M.I., Tak, P.P. e Lebre, M.C. (2013). Fms-like tyrosine kinase 3 ligand-dependent dendritic cells in autoimmune inflammation. *Autoimmunity Reviews*.

Riether, C., Schürch, C. e Ochsenbein, A. (2013). From “magic bullets” to specific cancer immunotherapy. *Swiss Medical Weekly*, 143(January), pp. 1-12.

Seeley, R.R. *et al.* (2003). *Anatomia e Fisiologia*. Loures, Lusociência.

Smaldone, G.M.M., Corr, B. e Chu, C.S. (2012). Immunotherapy in ovarian cancer. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 8(9), pp. 1179-1191.

Skalova, K. *et al.* (2010). Human myeloid dendritic cells for cancer therapy: Does maturation matter? *Vaccine*, 28, pp. 5153-5160.

Sozzani, S. *et al.* (1999). The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking. *Journal of Leukocyte Biology*, 66(1), pp.1-9.

Steinman, R.M. *et al.* (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 21, pp.685-711

Takeda, K., Tsuneyasu, K. e Akira, S. (2003). Toll-like Receptors. *Annual Review of Immunology*, 21, pp. 335-376.

Terabe, M. e Berzofsky, J.A. (2008). The Role of NKT Cells in Tumor Immunity. *Advances in Cancer Research*, 101, pp. 277-348.

Weiner, L.M., Murray, J.C. e Shuptrine, C.W. (2012). Antibody-based immunotherapy of cancer: New insights, new targets. *National Institutes of Health*, 146(6), pp. 1081-1084.

Wu, L. e Kaer, V.L. (2009). Natural killer T cells and autoimmune disease. *Current Molecular Medicine*, 9(1), pp.4-14.

Wu, Y., Wang, L. e Zhang, Y. (2004). Dendritic cells as vectors for immunotherapy of tumor and its application for gastric cancer therapy. *Cellular and Molecular Immunology*, 1(5), pp. 351-356.

Yee, C. *et al.* (2002). Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8⁺ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, pp. 16168–16173.

Yu, Z. e Restifo, N.P. (2002). Cancer vaccines: progress reveals new complexities. *The Journal of clinical investigation*, 110(3), pp. 289-294.

Zhang, C. e Engleman, E.G. (2006). Mechanisms of action of dendritic cell vaccines for the treatment of cancer. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms, Immunodisorders and autoimmunity*, 3(2), pp. 213-218.