

Luis Miguel Vieira Nina

Terapias celulares baseadas em células dendríticas para o tratamento da Esclerose Múltipla

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

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Luís Miguel Vieira Nina

Terapias celulares baseadas em células dendríticas para o tratamento da Esclerose Múltipla

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

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

○ Tutor

(Professor Doutor Bruno Miguel Rodrigues das Neves)

○ Aluno

(Luís Miguel Vieira Nina)

Eu, Luís Miguel Vieira Nina, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o número 2008120209, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade 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, 5 de Julho de 2016.

Assinatura

Agradecimentos

Durante a realização deste meu trabalho beneficiei de importantes apoios e incentivos aos quais não podia deixar de agradecer.

Aos meus pais dirijo um agradecimento especial, pelo apoio incondicional, carinho e amizade.

Ao Professor Doutor Bruno Neves pelo apoio que sempre me deu, pela disponibilidade, pelo incentivo demonstrados e pela paciência ao longo de todo este percurso.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) e aos seus Professores, pelos conhecimentos que me transmitiram.

Lista de Abreviaturas

- APCs** - Células Apresentadoras de Antígenos
- BHH** - Barreira Hemato-Encefálica
- cDCs** - Células Dendríticas Convencionais
- Células NK** - Células *Natural Killer*
- CTL** - linfócitos T citotóxicos
- CLPs** - Progenitores Comuns Linfoides
- CMPs** - Progenitores Comuns Mieloides
- CTL** - Linfócitos T citotóxicos
- DCs** - Células Dendríticas
- EAE** - Encefalite auto-imune experimental
- EM** - Esclerose Múltipla
- EMPS** - Esclerose Múltipla Progressiva Secundária
- EMRR** - Esclerose Múltipla Remitente Recorrente
- Flt3+** - Tirosina Cinase 3 Ligando
- GA** - Acetato Glatirâmero
- HLA** - Antígeno Leucocitário Humano
- HSCs** - Células Estaminais Hematopoiéticas
- IDO** - Indoleamina 2,3 desoxigenase
- IFN** - Interferão
- Ig** - Imunoglobulina
- LCR** - Líquido Cefalorraquidiano
- MHC** - Complexo Major de Histocompatibilidade
- MBP** - Proteína básica mielina
- NKT** - Células *Natural Killer* dos Linfócitos T
- pDCs** - Células Dendríticas Plasmocitoides

PLP - Proteína Proteolipídica

TCR - Recetor dos linfócitos T

TLR - Recetores *Toll-like*

SNC - Sistema Nervoso Central

Th - Linfócito T auxiliar

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

ToIDCs - Células Dendríticas Tolerogénicas

Treg - Linfócito T regulador

Resumo

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune crónica que afeta o sistema nervoso central. O processo degenerativo ocorre em consequência da destruição da bainha de mielina por parte de células T auto-reativas e auto-anticorpos, causando interferência na comunicação entre o cérebro, espinal medula e outras áreas do corpo. A etiologia da doença não é ainda totalmente conhecida embora fatores genéticos e ambientais como por exemplo infeções virais possam desempenhar um papel importante. A EM não tem cura sendo o tratamento fundamentalmente direcionado para a diminuição dos sintomas e dos episódios de recorrência.

Dado o carácter autoimune da patologia, novas abordagens terapêuticas têm-se focado na modulação do sistema imune, nomeadamente na indução de tolerância a antígenos relevantes na EM. Neste contexto, uma das estratégias mais promissoras passa pela indução de tolerância através da utilização de células dendríticas (DCs) tolerogénicas (ToIDCs). As DCs são células apresentadoras de antígenos com uma capacidade inigualável de controlar as respostas imunes, podendo induzir imunidade ou tolerância.

A utilização de ToIDCs carregadas com antígenos mielínicos tem revelado excelentes resultados em diversos modelos animais de EM. Nestes estudos pré clínicos as vacinas de ToIDCs mostraram ser seguras e induzir tolerância a auto-antígenos quer por indução de células T reguladoras quer por inibição direta de células efetoras. Apesar dos resultados serem extremamente promissores a transposição para a prática clínica tem sido bastante lenta, sendo no entanto expectável que possa vir a ser implantada num futuro próximo com um impacto significativo na melhoria da qualidade de vida dos doentes com EM.

A presente monografia visa desta forma transmitir uma perspetiva sobre o estado atual das vacinas baseadas em DCs para a prevenção e tratamento da EM.

Palavras-chave: Células dendríticas, células dendríticas tolerogénicas, doenças autoimunes, Esclerose Múltipla, indução de tolerância, vacinas de células dendríticas.

Abstract

Multiple Sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease that affects the central nervous system. The degenerative process occurs due to the destruction of the myelin sheath by auto reactive T cells and auto antibodies. This causes interferences in the communication between the brain, spinal cord and other body areas. The disease's etiology is not yet fully known although genetic and environmental factors, such as viral infections, may play an important role. MS has no cure and the treatment is mainly directed to the reduction of symptoms and recurrent episodes.

In view of the autoimmune nature of the pathology, new therapeutic approaches have focused on the modulation of the immune system, namely in the induction of tolerance to the relevant antigens in MS. In this context, one of the most promising strategies involves the induction of tolerance by using tolerogenic dendritic cells (ToIDCs). DCs are antigen-presenting cells with an unrivalled ability to control immune responses by inducing immunity or tolerance.

The use of ToIDCs loaded with myelin antigens has showed excellent results in several animal models of MS. In these preclinical studies, ToIDCs vaccines showed to be safe and to induce tolerance to auto antigens by induction of regulatory T cells or by direct inhibition of effector cells. Despite the extremely promising results, the transposition into clinical practice has been rather slow. However, it is expected that it may be deployed in the near future with a significant impact on improving the quality of life of MS patients.

This monograph intends to convey an overview of the current state of DC based vaccines for the prevention and treatment of MS.

Keywords: Dendritic cells, tolerogenic dendritic cells, autoimmune diseases, multiple sclerosis, tolerance induction, dendritic cells vaccines.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	v
Resumo	vii
Abstract	viii
1. Introdução	1
1.1 Abordagem Terapêutica	2
2. Immunobiologia das DCs	2
2.1 Origem e Diferenciação	2
2.2 Captação, processamento e apresentação de antígenos	3
2.3 Maturação e interação com linfócitos T	4
3. O possível papel das DCs na fisiopatologia da esclerose múltipla	5
4. O uso de vacinas de DCs para indução de tolerância em doenças auto-imunes	8
5. Vacinas das DCs ou seus derivados na indução de tolerância em modelos de esclerose múltipla	9
6. Conclusão	11
Bibliografia	12

I. Introdução

A esclerose múltipla (EM) é uma doença neurológica de carácter devastador, que se manifesta predominante em adultos jovens podendo atingir níveis de incidência de 150/10.000 habitantes em certas regiões do globo. Em Portugal o número de casos de EM é idêntico às séries internacionais, estimando a Direção Geral de Saúde que este atinga 5.000 portugueses. Contudo, existe uma grande falta de conhecimento acerca da doença no seio da população, o que pode atrasar o diagnóstico e tratamento e levar a uma subestimativa do real número de doentes.

Atendendo à enorme perda de capacidades físicas e cognitivas que acarreta, a esclerose múltipla apresenta um elevadíssimo impacto a nível socioeconómico (1).

A sua etiologia não é totalmente conhecida embora se saiba tratar-se de uma doença auto-imune com carácter inflamatório crónico em que células T auto-reactivas e auto-anticorpos levam à destruição da bainha de mielina dos axónios neuronais, cerebrais e medulares (2). Neste processo há uma acumulação de células T, células B e macrófagos ativados na substância branca do SNC, meninges, fluido cérebro espinal e produção de Ig intratecal (3).

Pode desta forma afirmar-se que esta patologia está claramente associada a um processo onde o sistema imunitário desempenha um papel central, havendo uma perda de tolerância a antigénios endógenos. Existem também evidências de alterações genéticas associadas ao desenvolvimento da esclerose múltipla, nomeadamente polimorfismos no complexo HLA- DRB1*150, o qual está intimamente envolvido com a apresentação antigénica por células do sistema imune (4).

A nível clínico a esclerose múltipla pode apresentar-se de diferentes formas, sendo normalmente dividido em duas grandes categorias: doença remitente-recorrente (EMRR) e doença progressiva, sendo que os doentes portadores desta segunda forma, evoluem muitas vezes para a esclerose múltipla secundária progressiva (EMSP) (5). Segundo a Sociedade Portuguesa de Esclerose Múltipla, os sintomas mais comuns são a fadiga, neurite ótica, perda de força muscular nos braços e pernas, alterações de sensibilidade e dores faciais na qual se destaca a nevralgia do trigémeo. Ocorrem também alterações a nível urinário, intestinal, de equilíbrio ou coordenação, assim como alterações de humor e cognitivas.

1.1- Abordagem terapêutica

Até aos dias de hoje não existe ainda cura para a EM. A terapêutica existente visa fundamentalmente o alívio dos sintomas e também a redução da frequência de recaídas (2).

Entre as várias opções terapêuticas de primeira linha fazem parte os corticosteroides, interferões, acetato glatirâmero (GA) e citostáticos como a azatioprina, a mitoxantrona e ciclofosfamida.

A terapia corticosteroide tem como base a metilprednisolona intravenosa e é usada para acelerar a recuperação clínica, sendo mais eficaz aquando da fase aguda das recaídas da EM. Os interferões nomeadamente o interferão- β age como imunomodulador sendo usado predominantemente na EM remitente-recorrente. Por sua vez o acetato glatirâmero é um conjunto de polipeptídicos sintéticos constituídos por quatro aminoácidos, nomeadamente o ácido glutâmico, a lisina, a alanina e a tirosina, o qual tem sido usado no tratamento de EMRR. Bioquimicamente, o GA é um análogo da proteína básica mielina (MBP), competindo diretamente com esta para a ligação às moléculas do complexo major de histocompatibilidade (MHC) nas células apresentadoras de antígeno.

Relativamente aos fármacos citostáticos, a mitoxantrona e a azathioprina são os mais relevantes, pela forte ação imunossupressora (2). A mitoxantrona tem como alvo a microglia no SNC, induzindo a apoptose desta (6), ao passo que a azathioprina possui como sua forma ativa a 6-mercaptopurina (6-MP) um potente imunossupressor frequentemente usado em transplantes de órgãos e também na limitação de lesões autoimunes, como as verificadas na EM (2).

Recentemente, fruto de alguns casos de sucesso a nível pré-clínico/clínico, a utilização de vacinas celulares para a modulação do sistema imune, tem vindo a ser encarada como uma abordagem bastante promissora para o tratamento da EM. Atendendo às suas características peculiares que abaixo se enunciarão, de entre essas novas abordagens terapêuticas destacam-se as vacinas de células dendríticas (DCs) ou os seus sucedâneos.

2. Imunobiologia das DCs

2.1- Origem e Diferenciação

As DCs são células da imunidade inata com uma capacidade inigualável de captar, processar e apresentar antígenos às diferentes populações de linfócitos T. Estas células são deste modo centrais no estabelecimento de um equilíbrio entre a imunidade e a tolerância.

A ontogenia exata das DCs encontra-se ainda por esclarecer, no entanto, pode afirmar-se de uma forma geral que todos os tipos de DCs conhecidos até à data têm a sua origem num precursor hematopoiético comum. Na medula óssea, as recém-formadas Células Estaminais Hematopoiéticas (HSCs), geram um conjunto de precursores como os progenitores comuns mieloides (CMPs) e os progenitores comuns linfoides (CLPs), que por sua vez darão posteriormente origem aos precursores de macrófagos e linfócitos e aos vários subtipos de DCs (7).

Estudos recentes mostraram que independentemente da linhagem do precursor, o seu potencial para originar os diferentes tipos de DCs está diretamente associado com a expressão e capacidade de resposta à tirosiainase 3 ligando (Flt3L). No mesmo sentido o modelo de comprometimento gradual proposto por Naik e colaboradores (8) propõe que não há uma pré destinação para os diferentes precursores originarem um determinado tipo de DCs mas sim um comprometimento gradual com uma determinada linhagem (7).

Atendendo à sua enorme heterogeneidade, a classificação das DCs humanas é uma área em constante evolução, embora em termos gerais estas possam ser divididas em dois grupos principais: DCs convencionais (cDCs) e DCs plasmocitoides (pDCs) (7). As primeiras são de linhagem mieloide e encontram-se nos tecidos e sangue periférico estando principalmente ligadas ao desenvolvimento de respostas Th1 e Th2. Ao invés as pDCs, são o único subtipo de DCs de origem linfóide no humano (9). As pDCs estão presentes no sangue e órgãos linfoides e são capazes de induzir respostas Th1, Th2 ou tolerância através de indução de células T reguladoras (Tregs) (10). Desempenham ainda um papel fundamental na resposta anti tumoral no combate a infeções virais pela sua capacidade de ativarem linfócitos CD8⁺ citotóxicos.

2.2- Captação, processamento e apresentação de antígenos

As DCs são células apresentadoras de antígenos com a especial capacidade de reconhecer agentes patogénicos e/ou moléculas originadas por dano celular, sinalizando depois a presença de perigo para as células do sistema imune adaptativo (11). O reconhecimento de agentes patogénicos ou seus constituintes por parte das DCs é levado a cabo por um conjunto de recetores designados de recetores de reconhecimento de padrões nos quais se destacam os recetores do tipo Toll (TLRs) e os recetores de lecitinas do tipo C (CLRs). A captação de antígenos por parte das DCs pode ser realizada por diferentes

processos, sendo os mais comuns a endocitose mediada por recetores, fagocitose mediada por recetores e macropinocitose.

As DCs são também extremamente eficientes no processamento de antígenos apresentando-os aos linfócitos T sob a forma de péptidos antigénicos acoplados a moléculas Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC) (12). Assim, os antígenos são processados pelas DCs de acordo com a sua origem e natureza molecular, existindo três formas de processamento e apresentação: uma via exógena (ou endossómica), a via endógena (ou proteossómica) e ainda uma via usada na apresentação de antígenos lipídicos acoplados a moléculas da família CDI.

Na via exógena, os antígenos de natureza proteica formam complexos com moléculas MHC classe II sendo apresentados a linfócitos T CD4+. Pela via endógena, os antígenos de natureza proteica provenientes de degradação proteossomal de proteínas que se encontram no citoplasma são apresentados a linfócitos T CD8+ através de moléculas MHC classe I. Por fim, os antígenos lipídicos são acoplados a moléculas da família CDI e apresentados a células *natural killer* dos linfócitos T (NKT). Para além destes processos de apresentação as DCs possuem ainda a capacidade única de apresentarem antígenos exógenos via MHC I, num processo designado de apresentação cruzada. Este tipo de apresentação assume especial relevância na resposta imunológica a tumores e infeções virais (7).

2.3- Maturação e interação com linfócitos T

De uma forma genérica as DCs podem ser vistas como sentinelas que patrulham os tecidos periféricos em busca de potenciais agentes patogénicos ou sinais de perigo. Encontram-se inicialmente num estado imaturo mas após entrarem em contato com um sinal de "perigo", elas vão sofrer um conjunto de alterações do ponto de vista morfológico, funcional e fenotípico, que se traduzem num processo designado de maturação. No decorrer deste processo, as DCs migram dos tecidos periféricos para os tecidos linfoides e adquirem a capacidade de apresentar os antígenos que captaram aos linfócitos T CD4+ pela via MHC-II e aos linfócitos T CD8+ pela via MHC-I (7).

Esta interação resulta na activação dos linfócitos T CD8+ e na polarização dos linfócitos T CD4+ nos seus diferentes tipos de células efetoras e reguladoras, requerendo estes processos o fornecimento de três sinais distintos pelas DCs (13).

O 1º sinal trata-se do reconhecimento dos complexos MHC-antígeno pelos recetores TCR no linfócito, sendo que este sinal 1 sem a presença do sinal 2 e 3 promove tolerância, ocorrendo a inactivação dos linfócitos T naïve, através de processos que envolvem deleção ou anergia.

O 2º sinal resulta da regulação entre os sinais co-estimulatórios positivos e negativos que resultam da interação das moléculas co-estimuladoras expressas pelas DCs com os respectivos ligandos presentes nos linfócitos T, como por exemplo a ligação da molécula CD28 expressa pelos linfócitos aos ligandos CD80 e CD86 expressos pelas DCs maduras. Este sinal 2, pode desencadear uma resposta imunogénica, ou pelo contrário, provocar tolerância (7).

O 3º sinal resulta das quimiocinas e citocinas presentes no microambiente onde se dá a apresentação antigénica. Será este microambiente que irá promover a activação dos linfócitos T CD8+ a linfócitos T citotóxicos (CTL) (14) e a polarização dos T CD4+ em células efectoras (Th1, Th2 e Th17) (15) ou reguladoras (Tregs adaptativas, Tr1 e Th3) (16).

3. O possível papel das DCs na fisiopatologia da esclerose múltipla

Nos últimos anos surgiram diversas evidências de que as DCs se encontram funcional e fenotipicamente alteradas em pacientes com EM. Adicionalmente estudos com modelos animais de EM como por exemplo o modelo de encefalomielite auto-imune experimental (EAE) vieram demonstrar que as DCs podem ter um papel de grande relevo no desenvolvimento e progressão da patologia (17).

Vários trabalhos têm mostrado a presença abundante de cDCs e pDCs nas lesões inflamatórias do SNC e líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com EM (18). No LCR, a frequência dos cDCs está dependente da duração da doença, uma vez que estas são encontradas mais frequentemente numa síndrome clinicamente isolado e em pacientes numa fase inicial da doença, diminuindo com o tempo (19). É também observado um aumento do número das pDCs no LCR de pacientes com EM, comparando com os níveis das mesmas em pacientes com outras doenças neurológicas não inflamatórias. Além disso, as pDCs também se encontram aumentadas no LCR durante as recaídas, em comparação com os pacientes em remissão (20).

Além da frequência, também o fenótipo das DCs se encontra alterado em pacientes com EM, variando consoante o estado clínico do paciente.

As cDCs circulantes dos pacientes com EMPS apresentam uma expressão mais elevada de marcadores co-estimulatórios, quando comparada com os pacientes com EMRR e com os controlos saudáveis. Estas células apresentam deste modo um fenótipo pró-inflamatório mais exacerbado (21).

As cDCs de pacientes com EMRR também apresentam um aumento de expressão de marcadores de ativação quando comparadas com os controlos saudáveis (22). Por outro lado nos pacientes com EMPS, as DCs apresentam-se mais imaturas face aos padrões normais, uma vez que as moléculas CD80 e CD86 se encontram sub-expressas (23).

Outra observação interessante prende-se com o facto das cDCs presentes no LCR de doentes com EM revelarem um estado de maturação mais avançado quando comparado com as cDCs circulantes (19). Juntamente com os marcadores de ativação, também os níveis do recetor de quimiocinas CCR5, se encontram aumentados nas cDCs no LCR quando comparado com as cDCs circulantes (24). Este facto pode indicar que níveis elevados de CCL3 e CCL5, os ligandos do recetor CCR5, são responsáveis pelo aumento de cDCs no LCR de doentes com EM em fase inicial (25).

Em ambos os pacientes com EM remitente-recorrente ou progressiva secundária, o perfil de citocinas das cDC encontra-se alterado, havendo um aumento da produção de citocinas pró- inflamatórias tais como IL-12p70, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IL-23p19 (26).

Segundo um estudo realizado relativamente á produção de citocinas pela cDCs, há ainda outro facto a constatar: foram detetados nestas células em pacientes com EMRR, níveis elevados de mRNA de osteopontina, que resultam do facto das células T CD4+ aumentarem a expressão dos recetores de osteopontina (CD44, CD51 e β 3 integrina). Como consequência, as células T CD4+, após a estimulação pela osteopontina, produzem IFN- γ e IL-17 em maior quantidade do que o observado em indivíduos saudáveis (27). Em resumo, as cDCs dos pacientes com EM apresentam um fenótipo pró- inflamatório que aparenta correlacionar-se com o desenvolvimento e estadio da patologia.

No que se refere às pDCs e ao seu fenótipo, ao contrário do observado para as cDCs, os seus valores aproximam-se mais dos valores de indivíduos saudáveis (28). Schwab e colaboradores mostraram que este tipo de DCs se divide em dois conjuntos nos pacientes com EM: pDCs do tipo 1 e pDCs do tipo 2. As primeiras expressam níveis elevados de CD123, níveis baixos de CD86 e TLR2, e são a principal fonte de IFN- α . Estimulam ainda as células T a produzirem IL-10. Por sua vez as pDCs do tipo 2 apresentam elevados níveis de

CD86 e TLR2, níveis baixos de CD123, produzem IL-6 e TNF- α , e medeiam a diferenciação das células T naíve em células Th17, produtoras de IL-17 (29).

Nos pacientes com EM, o fenótipo e a função das pDCs encontra-se alterado, como demonstrado pela menor expressão de CD86 e de ligando 4-1BB (uma glicoproteína membranar), em comparação com os controlos saudáveis. Apresentam também uma menor capacidade de maturação após estimulação com CD40L ou IL-3 (30). Além da mudança de fenótipo das pDCs, na EM a secreção de citocinas também se encontra alterada, dado que, as pDCs de pacientes com EM apresentam menor capacidade de secreção de IFN- α após estimulação com CpG, em relação aos controlos saudáveis. Esta diminuição traduz-se numa menor capacidade de estimulação e indução de proliferação de linfócitos alogénicos (30).

O papel relevante das DCs no desenvolvimento e progressão da EM é ainda evidenciado pelo facto de se começar agora a verificar que algumas das ações farmacológicas das principais abordagens terapêuticas convencionais se deverem à modulação destas células. Deste modo, no tratamento a curto prazo com metilprednisolona intravenosa, observa-se uma diminuição das pDCs e cDCs no sangue periférico, um aumento das Tregs e ainda uma redução das DCs imunogénicas (31). Apesar do mecanismo não ser ainda totalmente conhecido, sabe-se que o IFN- β pode afetar a imunobiologia das DCs, dado que induz a secreção de citocinas anti-inflamatórias, inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias e de quimiocinas, estando desta forma conotado com a inibição da ativação das células T e diminuição da infiltração destas no SNC. Além disso, o INF- β também impede a migração das DCs através da inibição da expressão de CCR7 e da metaloprotease da matriz 9, o que compromete a apresentação de antigénios e contribui para um ambiente anti-inflamatório. Dados clínicos mostram que o INF- β em pacientes com EMRR altera o fenótipo das DCs e diminui o seu número em circulação (32).

Também o Acetato Glatirâmero regula a secreção de citocinas pelas DCs, reduzindo a produção de IL-12 (33), reduzindo a sua penetração na barreira hematoencefálica, durante a neuro-inflamação (34) e tem um papel importante no seu fenótipo anti-inflamatório, uma vez que inibe a expressão de CD40 o que possibilita um baixo risco de recaídas (2).

Por fim, a mitoxantrona é capaz de reduzir o desempenho das DCs no que respeita á apresentação dos antigénios e também reduz a apoptose daquelas (35) ao passo que a azathioprine inibe a ativação das DCs e induz a diferenciação das DCs para um fenótipo menos imunogénico (36).

4. O uso de vacinas de DCs para indução de tolerância em doenças auto-imunes

As DCs são extremamente importantes no estabelecimento e manutenção de tolerância periférica a auto antígenos. Esta característica advém da sua capacidade de induzir apoptose ou anergia das células T e de promover a diferenciação de linfócitos Tregs que por sua vez irão controlar as populações efetoras. Este papel central na manutenção de tolerância foi enfatizado pela demonstração que modelos animais desprovidos de DCs, acabam por sucumbir a doenças autoimunes (37). 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 é agora aceite que o processo é bastante mais complexo e resulta de um equilíbrio entre co-estimulação positiva e co-estimulação negativa (37).

Em condições normais as células T auto-reativas que escapam à deleção a nível do timo são eliminadas na periferia 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 (38). As Tregs mais estudadas, as CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, são potentes inibidores da ativação de células T sendo também eficazes na supressão de células T CD4⁺ e CD8⁺ já ativadas. Esta população subdivide-se em dois tipos: os linfócitos Treg nativos, originados centralmente a nível do timo, e os linfócitos Treg adaptativos, originados periféricamente a partir de linfócitos T naïve FOXP3⁺ CD25⁻CD4⁺. Grande parte dos estudos mostra que as DCs estão fortemente envolvidas na diferenciação periférica dos linfócitos Treg adaptativos (39).

Graças ao maior conhecimento que se tem vindo a acumular acerca das capacidades tolerogénicas das DCs, estas têm vindo a ser encaradas como potenciais meios terapêuticos para indução de tolerância em doenças autoimunes, transplantes e alergias. Relativamente ao seu uso em doenças autoimunes grande parte dos estudos encontram-se ainda numa fase pré clínica em que são usados modelos animais de diversas doenças como diabetes tipo I, artrite reumatoide, lupus ou EM (40). Apesar dos resultados altamente promissores a transposição para a clínica têm-se revelado algo lenta havendo no entanto já alguns ensaios clínicos em curso.

5. Vacinas das DCs ou seus derivados na indução de tolerância em modelos de esclerose múltipla

As abordagens terapêuticas para tratamento de EM baseadas em DCs visam fundamentalmente diminuir o seu potencial imunogênico e aumentar as suas características tolerogênicas (ToIDCs). Assim, o objetivo terapêutico passa pelo restabelecimento da tolerância periférica específica a determinados antígenios através da administração de ToIDCs diferenciadas ex-vivo. Na seguinte figura está representado um esquema do potencial uso das ToIDCs no tratamento da EM (41).

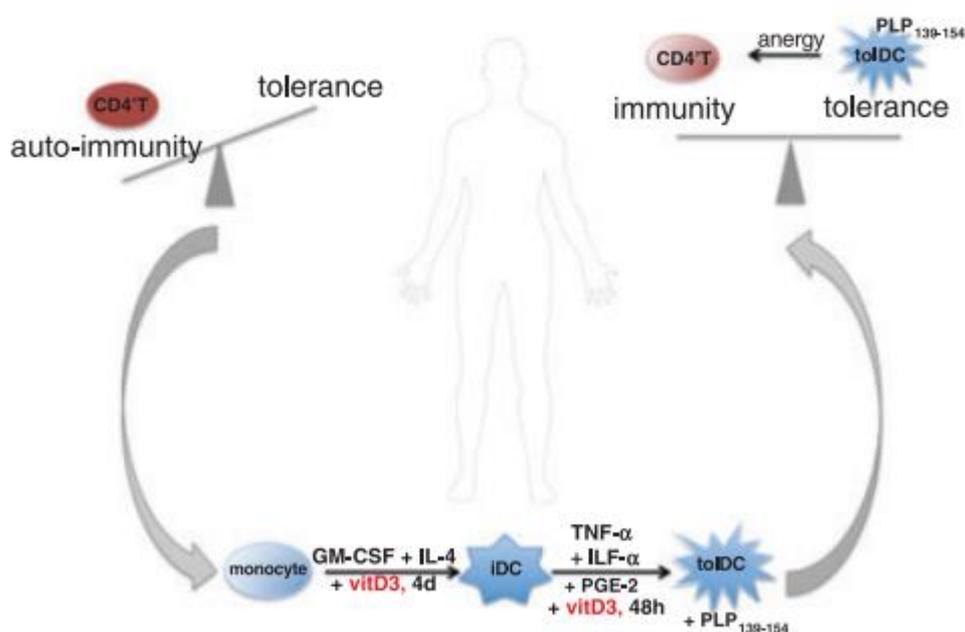


Figura 1 – Uso das ToIDCs no restabelecimento do equilíbrio entre a imunidade e a tolerância na EM (imagem retirada de Catharina C. Gross, Helmut Jonuleit and Heinz Wiendl; Fulfilling the dream: tolerogenic dendritic cells to treat multiple sclerosis) (42).

Os dados atuais relativos a esta abordagem resultam fundamentalmente do uso de modelos animais de EM, nomeadamente do modelo EAE (41). Na comparação dos resultados relatados na literatura devem ter-se em atenção algumas variantes tais como: a fonte e o procedimento de produção usados para a preparação das ToIDCs, o método e via de administração, os antígenios usados para a indução de tolerância e o momento exato em que é estabelecida a tolerância (43).

María José Mansilla e colaboradores, usando ToIDCs obtidas por diferenciação com vitamina D3 e carregadas com peptídeos de mielina de oligodendrócito (MOG),

demonstraram que estas células quando injetadas em murganhos com EAE levam a uma diminuição de células T aloreativas e a uma melhoria dos sinais e manifestações clínicas da patologia (43). Este efeito foi em parte devido à indução pelas ToIDCs de células Tregs produtoras de IL-10. O tratamento mostrou ainda ser bem tolerado a longo termo e proporcionar uma prolongada manutenção da tolerância mediada pela indução de células B reguladoras, redução de células NK e ativação de célula NKT imunoreguladoras (43). Este estudo demonstrou claramente que esta abordagem poderá, aquando da sua transposição para a prática clínica, apresentar enormes benefícios terapêuticos para os pacientes.

Numa tentativa de aproximação ao uso clínico, Raich-Regué e colaboradores diferenciaram ToIDCs a partir de monócitos do sangue periférico de pacientes com EM remitente-recorrente. As células foram diferenciadas na presença da vitamina D e carregadas com antigénios de mielina como por exemplo o peptídeo mielina derivado da proteína proteolipídica (PLP 139-154). O processo de diferenciação destas ToIDCs de pacientes mostrou ser tão efetivo quanto ao procedimento a partir de sangue de doadores saudáveis (44). No entanto o resultado mais promissor prendeu-se com o facto de estas ToIDCs conseguirem induzir de forma estável hiporesponsividade específica em células T reativas à mielina de pacientes com EM remitente-recorrente.

Num outro estudo recente, o tratamento de DCs diferenciadas *ex-vivo* e tratadas posteriormente com mitomicina C mostrou induzir a expressão nestas de cerca de uma centena de genes ligados à imunossupressão (45). Os investigadores mostraram que estas células quando carregadas com antigénios mielínicos inibiam a proliferação de linfócitos T *in vitro*. De forma surpreendente verificaram que os animais vacinados com estas ToIDCs se tornavam resistentes à indução de EAE (45). Posteriormente os autores mostraram que células monocíticas do baço (precursoras das DCs) tratadas com mitomicina C e carregadas com acetato glatirâmico quando injetadas em animais com EAE diminuía significativamente a progressão da doença. Este efeito mostrou ser devido a uma diminuição de células T auto-reativas em parte por aumento de Tregs CD25+, CD4+,FoxP3+ (46). Para além das DCs têm sido testados alguns derivados como por exemplo vesículas exossomais (47). Foi mostrado que culturas de DCs após serem estimuladas com baixos níveis de IFN- γ , libertam exossomas (IFN- γ -DC-EXOS) que contêm micro-mRNAs que por si aumentam o grau de mielinização, reduzem o stress oxidativo, além de melhorarem a re-mielinização, em resposta a um episódio de desmielinização induzido por lisolecitina (47). A administração intranasal de IFN- γ -DC-EXOS em murganhos com EAE provoca alterações na mielina, promovendo a re-mielinização das áreas afetadas no SNS. *In vitro*, o tratamento de

Terapias celulares baseadas em células dendríticas para o tratamento da Esclerose Múltipla

oligodendrócitos com estes FN- γ -DC-EXOS, produz também um efeito protetor dos mesmos podendo ser esta a explicação para o impacto positivo na re-mielinização (47).

6. Conclusão

Sendo a Esclerose Múltipla uma doença crónica autoimune com enorme impacto nas atividades diárias dos doentes e cuja progressão leva à sua incapacidade total, urge encontrar formas mais eficazes de retardar os sintomas e de tratar esta patologia.

A imunoterapia por vacinas de células dendríticas tolerogénicas surge deste modo como uma abordagem extremamente promissora. Os dados pré-clínicos são bastante animadores e sustentam a sua experimentação a nível clínico. Neste sentido foi recentemente aprovado um ensaio clínico onde é testada a segurança e eficácia da administração de DCs tolerogénicas a doentes com EM. É expectável que este tipo de terapias venha a ser implementado num futuro próximo trazendo ganhos consideráveis para o bem-estar dos doentes.

Bibliografia

- 1- Mohammad, G. Mohammad et al., **Dendritic Cells and Multiple Sclerosis: Disease, Tolerance and Therapy.** Int J Mol Sci. (2012); 14(1):547-62.
- 2- Zhong Xiang Xie et al., **Role of the Immunogenic and Tolerogenic Subsets of Dendritic Cells in Multiple Sclerosis.** Mediators Inflamm. (2015); 2015:513295.
- 3- SERAFINI, B. **Dendritic Cells in and Sclerosis lesions, Maturation Stage, Myelin Uptake, and Interaction with Proliferating T Cells.** J Neuropathol Exp Neurol. (2006); (2):124-41.
- 4 - PATSOPOULOD, N. A. et al., **Genome-wide meta-analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci.** Ann. Neurol. Ann Neurol. (2011); 70, 897-912. (2011); 70(6):897-912.
- 5 - LASSMANN, H., et al. **Progressive multiple sclerosis: Pathology and pathogenesis.** Nat. Rev. Neurol. 2012, Nat Rev Neurol. (2012), 5;8(11):647-56.
- 6 - J. M. Li, Y. Yang, et al., - **Mitoxantrone exerts both cytotoxic and immunoregulatory effects on activated microglial cells, Immunopharmacology and Immunotoxicology,** Immunopharmacol Immunotoxicol. (2012); vol. 34, no. 1, pp. 36-41.
- 7- Neves BMR. **Modulação das células dendríticas por estímulos alérgicos e infecciosos.** Tese de Doutoramento em farmácia, na especialidade de biologia celular e molecular. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Coimbra: Universidade de Coimbra. (2010) 1-62.
- 8 - NAIK, S. H. - **Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little.** Immunol Cell Biol. (2008); Immunol Cell Biol. 86(5): 439-52.
- 9- SHORTMAN, K., Naik, S. H., **Steady-state and inflammatory dendritic- cell development.** Nat. Rev. Immunol. (2007). 7: 19-30.
- 10 - ITO, T. I. et al., **Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand.** Exp Med. (2007); 204(1):105-15.

- 11- MATZINGER, P. **Tolerance, danger, and the extended family.** Annu. Rev. Immunol. (1994) 12:991-1045.
- 12- PLATT, C, et al., **Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens.** Immunology. Proc Natl Acad Sci USA (2010). ;107(9):4287-92.
- 13- RIETHER, C. et al., **From “magic bullets” to specific cancer immunotherapy.** Swiss Medical Weekly, 143 (2013) 1-12.
- 14- Curtsinger, J. M. et al., **Signal 3 Determines Tolerance versus Full Activation of Naive CD8 T Cells.** J Exp Med. (2003); 197(9):1141-51.
- 15- Reiner, S. L. **Development in Motion: Helper T Cells at Work.** Cell. (2007); 129(1):33-6.
- 16- SAYURI Yamazaki, Steinman, R. M. **Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3⁺ regulatory T cells.** J Dermatol Sci. (2009); 54(2):69-75.
- 17- ALMOLDA, B. et al., **Antigen presentation in EAE: Role of microglia, macrophages and dendritic cells.** Front Biosci (2011); 16: 1157-1171.
- 18- LANDE, R. et al.; **Plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis: Intracerebral recruitment and impaired maturation in response to interferon-beta.** J Neuropathol Exp Neurol (2008); 67: 388-401.
- 19- PASHENKOV, M. et al.; **Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid.** Brain (2001); 124: 480-492.
- 20- Longhini AL. et al.; **Plasmacytoid dendritic cells are increased in cerebrospinal fluid of untreated patients during multiple sclerosis relapse.** J Neuroinflammation (2011); 8: 2.
- 21- KARNI, A. A. et al.; **Innate immunity in multiple sclerosis: Myeloid dendritic cells in secondary progressive multiple sclerosis are activated and drive a proinflammatory immune response.** J Immunol (2006); 177: 4196-4202.

- 22- KARNI, A. A. et al.; **Innate immunity in multiple sclerosis: Myeloid dendritic cells in secondary progressive multiple sclerosis are activated and drive a proinflammatory immune response.** J Immunol (2006); 177: 4196-4202.
- 23- LOPEZ, C. et al.; **Altered maturation of circulating dendritic cells in primary progressive MS patients.** J Neuroimmunol (2006); 175: 183-191.
- 24- PASHENKOV, M. et al.; **Elevated expression of CCR5 by myeloid (CD11c+) blood dendritic cells in multiple sclerosis and acute optic neuritis.** Clin Exp Immunol (2002); 127: 519-526.
- 25- BOVEN, L. A. et al.; **Macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and RANTES mRNA semiquantification and protein expression in active demyelinating multiple sclerosis (MS) lesions.** Clin Exp Immunol (2000); 122: 257-263.
- 26- VAKNIN-DEMBINSKY, A. et al.; **Increased IL-23 secretion and altered chemokine production by dendritic cells upon CD46 activation in patients with multiple sclerosis.** J Neuroimmunol (2008); 195: 140-145.
- 27- MURUGAIYAN, G. **Increased osteopontin expression in dendritic cells amplifies IL-17 production by CD4+ T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and in multiple sclerosis.** J Immunol (2008); 181: 7480-7488.
- 28- HIROTANI, M. et al.; **Decreased interferon-alpha production in response to CpG DNA dysregulates cytokine responses in patients with multiple sclerosis.** Clin Immunol (2012); 143: 145-151.
- 29- SCHWAB, N. et al.; **An imbalance of two functionally and phenotypically different subsets of plasmacytoid dendritic cells characterizes the dysfunctional immune regulation in multiple sclerosis.** J Immunol (2010); 184: 5368-5374.
- 30- STASIOLEK, M., Bayas, A. et al.; **Impaired maturation and altered regulatory function of plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis** Brain, (2006) vol. 129, no. 5, pp. 1293-1305.

- 31- NAVARRO J. et al., **Circulating dendritic cells subsets and regulatory T-cells at multiple sclerosis relapse: differential short-term changes on corticosteroids therapy.** Journal of Neuroimmunology (2006) vol. 176, no. 1-2, pp. 153-161.
- 32- KIM, D.S. **High-grade hydronephrosis predicts poor outcomes after radical cystectomy in patients with bladder cancer.** Journal of Korean Medical Science (2010), vol. 25, no. 3, pp. 369-373.
- 33- HUSSIEN, Y. et al.; **Glatiramer acetate and IFN-beta act on dendritic cells in multiple sclerosis.** Journal of Neuroimmunology (2001) vol. 121, no. 1-2, pp. 102-110.
- 34- BEGUM-HAQUE S. et al.; **Glatiramer acetate biases dendritic cells towards an anti-inflammatory phenotype by modulating OPN, IL-17, and ROR γ t responses and by increasing IL-10 production in experimental allergic encephalomyelitis.** Journal of Neuroimmunology (2013) vol. 254, no. 1-2, pp. 117-124.
- 35- NEUHAUS, O. et al.; **Multiple sclerosis: mitoxantrone promotes differential effects on immunocompetent cells in vitro.** Journal of Neuroimmunology (2005) vol. 168, no. 1-2, pp. 128-137.
- 36- ALDINUCCI, A. et al.; **Modulating dendritic cells (DC) from immunogenic to tolerogenic responses: A novel mechanism of AZA/6-MP.** Journal of Neuroimmunology, (2010) vol. 218, no. 1-2, pp. 28-35.
- 37- STEINMAN, R.M., POPE, M. **Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy.** J Clin Invest. (2002); 109(12):1519-26.
- 38- ZANONI, I., GRANUCCI, F. **Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation.** Front Cell Infect Microbiol. (2013); 3:32.
- 39- MELANIE, A. et al.; **Dendritic Cells Transduced to Express Interleukin 4 Reduce Diabetes Onset in Both Normoglycemic and Prediabetic Nonobese Diabetic Mice.** PLOS ONE. (2010); 5(7):e11848.

40- BRUSSEL, I. V. et al.; **Tolerogenic dendritic cell vaccines to treat autoimmune diseases: Can the 3 unattainable dream turn into reality?** Autoimmun Rev. (2014); 13(2):138-50.

41- GROSS, C.C. **Fulfilling the dream: tolerogenic dendritic cells to treat multiple sclerosis**). Eur J Immunol. (2012); 42(3):569-72.

42- DAVIS, L.G. - **Basic methods in molecular biology**, (2012).

43- MANSILLA, M.J. **Cryopreserved vitamin D3-tolerogenic dendritic cells pulsed with autoantigens as a potential therapy for multiple sclerosis patients**. J Neuroinflammation. (2016); 13(1):113.

44- RAÏCH-REGUÉ, D. **Stable antigen-specific T-cell hyporesponsiveness induced by tolerogenic dendritic cells from multiple sclerosis patients**. Eur. J. Immunol. (2012). 42: 772-783.

45- TERNESS, P. et al.; **Mitomycin C-treated dendritic cells inactivate autoreactive T cells: toward the development of a tolerogenic vaccine in autoimmune diseases**. ProcNatlAcadSci USA (2008); 105:18442-7.

46- KLEIST, C. et al.; **Autoantigen-specific immunosuppression with tolerogenic peripheral blood cells prevents relapses in a mouse model of relapsing-remitting multiple sclerosis**. J Transl Med. (2016); 14(1):99.

47- PUSIC, A.D. **IFN γ -stimulated Dendritic Cell Exosomes as a Potential Therapeutic for Remyelination**. J Neuroimmunol. (2014); 266(1-2):12-23.