

Daniela Martins Dias

# Imunoterapia baseada em células dendríticas no cancro pancreático

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

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Daniela Martins Dias

# Imunoterapia baseada em células dendríticas no cancro pancreático

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

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**Imagem de capa:**

**Adaptado de:** <http://www.nanotechmag.com/nanoparticle-cancer-therapy-company-engineic-ltd-receive-fda-approval/>

**Editado por:** Beatriz Ribeiro

**A Tutora,**

---

(Professora Doutora Maria Teresa Teixeira Cruz  
Rosete)

**A aluna,**

---

(Daniela Martins Dias)

Eu, Daniela Martins Dias, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2011157377, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 13 de julho de 2016.

---

Daniela Martins Dias

## **Agradecimentos**

Chega agora ao fim mais uma etapa, uma das mais importantes da minha vida, traduzida num *cocktail* de emoções que, tal como Fernando Pessoa, tenho pena de sentir que não consigo exprimir totalmente. Foram 5 anos de trabalho, esforço e dedicação que passaram como um pestanejar.

Embora a tese seja, dado a sua finalidade, um trabalho de cariz técnico e científico, não posso esquecer de todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram para concretizar este sonho. Assim sendo, aqui ficam algumas palavras de sentido e profundo agradecimento.

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus, ao Dr. Sousa Martins, à Irmã Sãozinha e a Santa Paula Frassinetti pela força, coragem e por me acompanharem sempre.

À minha família agradeço o apoio incondicional, por serem o pilar da minha vida. Agradeço em especial aos meus pais, pelas raízes, por acreditarem sempre em mim, por todos os ensinamentos de vida. A eles dedico esta vitória.

Às Irmãs Doroteias por serem um porto de abrigo, pela coragem e pela ajuda nos momentos de maior aflição. À Margarida Oliveira pelo apoio constante e pela amizade verdadeira.

À minha orientadora da monografia, Professora Doutora Maria Teresa Rosete, que considero uma referência, pela competência científica, orientação, disponibilidade, atenção e apoio durante a realização da monografia. A sua postura humana e o seu percurso académico e científico são de minha imensa admiração e respeito.

À minha grande amiga e madrinha de curso, Dra. Ana Bajouco, por me ter acompanhado sempre, ao longo destes cinco anos.

Aos meus orientadores de estágio, Dr. Paulo Santos e Dra. Clementina Varelas, agradeço a oportunidade e o privilégio da realização dos respetivos estágios, pela maneira como me acolheram, pelos conhecimentos transmitidos, pela confiança que depositaram em mim desde o início e pelas responsabilidades que me inculcaram.

Ao Dr. Victor Rodrigues, pela disponibilidade sempre demonstrada e pelos conhecimentos partilhados que elevaram os meus conhecimentos científicos e que me despertaram o desejo de querer sempre saber mais, e a vontade de querer fazer melhor.

Às colegas de casa, com quem tive a oportunidade de partilhar bons momentos. Em especial à Beatriz Ribeiro pelo companheirismo, amizade, pela energia nos momentos de desânimo e pela edição da imagem de capa.

À Rita Lança pela simplicidade, genuinidade, amizade e por ter sempre uma palavra certa para o momento certo.

À Dora Ferreira, pelo incansável apoio moral, pela sincera amizade e pela sua disponibilidade. O seu apoio foi fundamental.

Quero também aqui agradecer a todo o corpo docente e não docente da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra que me permitiram adquirir uma bagagem técnico-científica necessárias para o exercício da profissão farmacêutica, e por me terem ajudado a desenvolver capacidades pessoais, como responsabilidade, autonomia e espírito crítico. Agradeço em especial à Professora Doutora Maria da Graça Campos, com quem tive o orgulho e privilégio de colaborar no Observatório de Interações Planta-Medicamento.

Aos meus colegas de curso pelo companheirismo, momentos de diversão e entreajuda. Em especial à Rosário Carvalho pela grande amizade, pelos desabaços e pela partilha de conhecimentos. Agradeço também à Rita Fernandes pela sua autenticidade, pelo afeto e pelos bons momentos partilhados.

A Coimbra, um enorme obrigada por estes 5 anos fantásticos da minha vida! Guardarei, nas gavetas do coração, todos os segredos daquela que será, para sempre, a cidade dos doutores.

Agora é hora de voar!

A todos aqueles aqui mencionados o meu grande e sincero obrigada!

**“Pela via do coração e do amor tudo se consegue, mas um pouco de cada vez”**

Sta. Paula Frassinetti

**“Cada sonho que você deixa para trás, é um pedaço do seu futuro que deixa de existir”**

Steve Jobs

## **Abreviaturas**

**ABC** - *ATP-binding cassette*

**$\alpha$ GT** -  $\alpha$  (1,3)- galactosiltransferase

**$\alpha$ Gal** -  $\alpha$  galactosil

**Akt** - Proteína cinase B

**APCs** - Células apresentadoras de antígeno

**ASCO** - *American Society of Clinical Oncology*

**Bad** - *BCL2 Associated Agonist of Cell Death*

**BCL-6** - *B-Cell CLL/Lymphoma 6*

**CA** - Antígeno carboidrato

**CAFs** - Fibroblastos associados ao tumor

**CALR** - Calreticulina

**CDK** - Proteínas cinase dependentes de ciclinas

**CD40L** - Ligando do CD40

**CEA** - Antígeno carcinoembrionário

**cDCs** - Células dendríticas convencionais

**CI-MPR** - Recetor de manose-6-fosfato dependente de catiões

**CLR** - Recetores de lectina do tipo C

**CSCs** - Células estaminais cancerígenas

**CTL** - Linfócitos T citotóxicos

**CTLA-4** - *Cytotoxic T-lymphocyte associates protein-4*

**CXCL12** - *C-X-C motif chemokine ligand 12*

**DCs** - Células dendríticas

**Dex** - Exossomas derivados de DCs

**DFS** - Sobrevida livre de doença

**DPC4** - *Deleted in pancreatic carcinoma locus 4*

**DTH** - Reação de hipersensibilidade retardada

**EGF** - Fator de crescimento epidérmico

**EGFR** - Recetor do fator de crescimento epidérmico

**FAP- $\alpha$**  - Proteína ativadora de fibroblastos alfa

**Fas-L** - Ligando Fas

**FCs** - Fusão de células

**FDA** - *Food and Drug Administration*

**Flt3L** - *Fms-like tyrosine kinase 3 ligand*

**Gal** - Galectina

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

**GTP** - Guanosina trifosfato

**GVAX** - Vacinas baseadas em células GM-CSF

**HER2** - Recetor do fator de crescimento epidérmico humano do tipo 2

**HLA** - Antígeno leucocitário humano

**HMGBl** - *High-mobility group box 1*

**HSCs** - Células estaminais hematopoiéticas

**HSPs** - Proteínas de choque térmico

**hTERT** - Transcriptase reversa da telomerase humana

**IAP** - Proteína inibidora da apoptose

**IDO** - Indolamina-2 e 3-dioxigenase

**IGF** - Fator de crescimento semelhante à insulina

**IFN- $\alpha$**  - Interferão-alfa

**IFN- $\beta$**  - Interferão-beta

**IFN- $\gamma$**  - Interferão-gama

**KIF20A** - *Kinesin Family Member 20A*

**KLH** - *Keyhole limpet hemocyanin*

**KRAS** - *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

**LAG-3** - *Soluble lymphocyte activation gene-3*

**LAK** - *Lymphokine-activated killer cells*

**LPS** - Lipopolissacarídeo

**mAbs** - Anticorpos monoclonais

**MAPK** - Proteínas cinase ativadas por agentes mitogénicos

**mDC** - Célula dendrítica mieloide

**MDSCs** - Células supressoras de origem mieloide

**MHC** - Complexo *major* de histocompatibilidade

**MoDCs** - Células dendríticas derivadas de monócitos

**MST** - Tempo médio de sobrevivência

**MUC1** - Antígeno de mucina I

**Myb** - *Myeloblastosis*

**NF- $\kappa$ B** - Fator nuclear de transcrição *kappa* B

**NK** - Células *Natural Killer*

**NKG2D** - *Natural Killer Group 2D*

**NO** - Óxido nítrico

**NOD-like** - *Nucleotide-binding oligomerization domain*

**OS** - Sobrevivência global

**P-Akt** - Akt fosforilada

**PAMPs** - Padrões moleculares associados a agentes patogénicos

**PBMCs** - Células sanguíneas mononucleares periféricas

**PC** - Cancro pancreático

**PDA** - Adenocarcinoma pancreático ductal

**pDCs** - Células dendríticas plasmocitoides

**PDGF** - Fator de crescimento derivado das plaquetas

**PD-1** - Recetor de morte celular programada

**PD-L1** - Ligando do recetor de morte celular programada I

**PFS** - Sobrevivência livre de progressão

**PI3K** - Cinase responsável pela fosforilação da posição 3 do fosfatidilinositol

**PPVs** - Parvovírus

**PRRs** - Recetores de reconhecimento de padrões

**PTME** - Microambiente tumoral pancreático

**PTX3** - *Pentraxin-3*

**RE** - Retículo endoplasmático

**ROS** - Espécies reativas de oxigénio

**SI** - Sistema imunitário

**Src** - *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase*

**STAT** - Transdutor do sinal e ativador da transcrição

**TAA**s - Antígenos associados ao tumor

**TAM**s - Macrófagos imunossupressores associados ao tumor

**TCR** - Recetor dos linfócitos T

**TGF- $\alpha$**  - Fator de crescimento transformante alfa

**TGF- $\beta$**  - Fator de crescimento transformante beta

**TIL**s - Linfócitos infiltrantes de tumor

**TIM-3** - *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing molecule 3*

**TLR** - Recetores *toll-like*

**TNF** - Fator de necrose tumoral

**Tregs** - Linfócitos T reguladores

**TSLP** - *Thymic stromal lymphopietin*

**VEGF** - Fator de crescimento vascular endotelial

**VVP** - Partículas *virus-like*

**WT1** - Gene tumoral *de Wilms 1*

## Índice de Figuras e Tabelas

<b>Figura 1</b> - As maiores vias de sinalização envolvidas na patogénese de PC.	3
<b>Figura 2</b> - Imunobiologia anti-tumoral em PC.	6
<b>Figura 3</b> - Indução de resposta imune pelas DCs.	8
<b>Figura 4</b> - Maturação de DCs e diferentes tipos de respostas imunitárias induzidas.	9
<b>Figura 5</b> - Desenvolvimento de vacinas anti-tumorais baseadas em DCs manipuladas <i>ex vivo</i> .	12
<b>Figura 6</b> - Indução de resposta imune por DC-tumor FCs.	14
<b>Figura 7</b> - Representações de diferentes sistemas de entrega de antigénios.	16
<b>Figura 8</b> - Pontos-chave para melhorar a vacinação com DCs em doentes com cancro.	17
<b>Tabela 1</b> - Ensaio clínico a decorrer utilizando vacinas anti-tumorais baseadas em DCs para doentes com PC.	21

## Resumo

O cancro pancreático (PC) representa um dos tumores sólidos mais agressivos e devastadores, caracterizado por apresentar uma elevada incidência e um mau prognóstico. As estratégias terapêuticas atuais são, muitas vezes, insatisfatórias uma vez que a maioria dos doentes, após o diagnóstico, não sobrevive mais do que um ano, pelo que são necessárias novas abordagens terapêuticas. Nos últimos anos, a imunoterapia tem oferecido resultados clínicos encorajadores. As células dendríticas (DCs) são as células apresentadoras de antígeno (APCs) mais potentes com a capacidade única de estimular a imunidade inata e adaptativa ou, em oposição, de induzir tolerância pelas células T. As vacinas baseadas nestas células têm apresentado resultados promissores em alguns tipos de cancro, pelo que vários estudos têm explorado o efeito terapêutico destas vacinas em doentes com PC.

**Palavras-chave:** Células dendríticas, Cancro pancreático, Imunoterapia, Vacinas anti-tumorais.

## **Abstract**

Pancreatic cancer (PC) represents one of the most aggressive and devastating solid tumors, characterized by having a high incidence and an poor prognosis. The current therapeutic strategies are often unsatisfactory since the majority of patients do not survive more than a year after the diagnosis, therefore it is of utmost importance the development of new therapeutic approaches. In recent years, immunotherapy has provided encouraging clinical results. Dendritic cells (DCs) are the most potent antigen-presenting cells (APCs), performing a dual role in the induction of innate and adaptive immunity, as well as in the induction of tolerance by T cells. DCs-based vaccines have shown promising results in some types of cancer and several studies have explored the therapeutic benefit of these vaccines in patients with PC.

**Key-words:** Dendritic cells, Pancreatic cancer, Immunotherapy, Antitumor vaccines.

# Índice

<b>Introdução</b> .....	1
<b>1. Fisiopatologia</b> .....	2
<b>2. Imunologia tumoral</b> .....	4
<b>3. Imunobiologia das DCs</b> .....	7
3.1 Origem e classificação de DCs .....	7
3.2 Processamento e apresentação de antígenos.....	7
3.3 Maturação e estimulação da resposta imune.....	8
<b>4. Imunoterapia anti-tumoral baseada em DCs</b> .....	11
4.1 Vacinas <i>ex vivo</i> baseadas em DCs.....	11
4.2 Vacinas baseadas na fusão DCs - células tumorais.....	13
4.3 Vacinas <i>in vivo</i> baseadas em DCs.....	15
4.4 Outras estratégias de vacinas baseadas em DCs.....	16
<b>5. Ensaios clínicos</b> .....	18
5.1 Vacina baseada em DCs para doentes com PC no Japão (“Vacell”).....	18
5.2 Imunoterapia com algenpantucel-L em doentes com PDA.....	19
5.3 Outros ensaios clínicos .....	20
5.4 Ensaios clínicos a decorrer .....	21
<b>6. Papel do farmacêutico</b> .....	23
<b>Conclusão</b> .....	24
<b>Bibliografia</b> .....	26
<b>Anexos</b> .....	34

## **Índice de Figuras e Tabelas**

**Figura 1** - As maiores vias de sinalização envolvidas na patogénese de PC.

**Figura 2** - Imunobiologia anti-tumoral em PC.

**Figura 3** - Indução de resposta imune pelas DCs.

**Figura 4** - Maturação de DCs e diferentes tipos de respostas imunitárias induzidas.

**Figura 5** - Desenvolvimento de vacinas anti-tumorais baseadas em DCs manipuladas *ex vivo*.

**Figura 6** - Indução de resposta imune por DC-tumor FCs.

**Figura 7** - Representações de diferentes sistemas de entrega de antigénios.

**Figura 8** - Pontos-chave para melhorar a vacinação com DCs em doentes com cancro.

**Tabela 1** - Ensaio clínico a decorrer utilizando vacinas anti-tumorais baseadas em DCs para doentes com PC.

## Introdução

O Cancro Pancreático (PC) define-se como um problema atual e incidência crescente a nível mundial, representando atualmente o sétimo tipo de cancro mais diagnosticado na Europa e a quinta principal causa de morte por cancro no mundo (Kourie *et al.*, 2016). De acordo com estimativas realizadas pela *American Cancer Society*, durante o ano de 2016, irão ocorrer 53 mil novos casos de PC que serão responsáveis por cerca de 42 mil mortes, o que reflete as limitações dos regimes terapêuticos atuais (Cancer.Net, 2015).

O adenocarcinoma pancreático ductal (PDA) é responsável pela grande maioria de PC, representando um dos tipos de cancro mais mortais devido a uma propensão para a progressão metastática (Kajihara *et al.*, 2016).

A cirurgia surge como opção terapêutica apenas para um grupo restrito de doentes dado que, no momento do diagnóstico, mais de 80% dos PCs estão localmente avançados ou metastizados. Por outro lado, apesar de a quimioterapia apresentar algum benefício terapêutico, a maioria dos doentes não sobrevive mais de um ano. Com efeito, apesar do arsenal terapêutico atualmente oferecido, os doentes com PC têm uma sobrevida global (OS) de 5 anos de apenas 5%, o que pode ser explicado pela ocorrência de recorrências locais e metástases. Deste modo é imperativo o desenvolvimento de abordagens terapêuticas alternativas eficazes (Kajihara *et al.*, 2016; Kourie *et al.*, 2016).

Várias abordagens de imunoterapia para PC têm demonstrado resultados promissores em ensaios clínicos, incluindo a utilização de *checkpoint inhibitors*/imunomoduladores, transferência de células adotivas, anticorpos monoclonais, imunoterapias adjuvantes, citocinas, vírus oncolíticos e vacinas terapêuticas (Cancer Research Institute, 2016; Constantino *et al.*, 2015, Kotteas, Saif e Syrigos, 2016).

As DCs são as APCs mais potentes, desempenhando um papel crucial na iniciação, programação e regulação das respostas imunitárias anti-tumorais (Kajihara *et al.*, 2016). O recurso a vacinas como estratégia imunoterapêutica baseada em DCs, para o tratamento e prevenção do cancro, tem sido alvo de intensa investigação (Constantino *et al.*, 2015; Oliveira, Borges e Cruz, 2013). Durante as últimas décadas vários estudos têm explorado o uso de vacinas como uma abordagem terapêutica promissora no tratamento de PC (Kajihara *et al.*, 2016).

## I. Fisiopatologia

Com o intuito de desenvolver novas estratégias preventivas e/ou terapêuticas contra PC, torna-se crucial compreender a sua patogénese a nível molecular (Sarkar, Banerjee e Li, 2007).

O PC impõe-se como um cancro heterogéneo, geneticamente complexo, podendo abrigar mais de sessenta alterações genéticas que afetam mais de vinte vias de sinalização (Kourie *et al.*, 2016). Verificou-se que vários conjuntos de genes sofrem alterações, quer de ativação ou desativação, ao longo do desenvolvimento e progressão de PC. É sabido que o desenvolvimento e progressão de PC é causado pela ativação de oncogenes, inativação de genes supressores tumorais e desregulação de diferentes vias de sinalização, em que as vias EGFR, Akt e NF- $\kappa$ B surgem como relevantes na patogénese molecular de PC (Sarkar, Banerjee e Li, 2007).

O gene *Notch* é, também, considerado um oncogene envolvido na patogénese de PC. Após ativação, a proteína *Notch* é clivada, libertando Notch intracelular que, posteriormente, migra até ao núcleo. Foi descoberto que a sinalização de Notch é frequentemente desregulada em PCs humanos sendo que a alta expressão deste gene é responsável pela inibição da apoptose, desempenhando, deste modo, um papel importante na carcinogénese pancreática. Por outro lado, Notch1 induz fortemente a ativação de NF- $\kappa$ B, que é detetada na maioria dos PCs (Figura 1), (Sarkar, Banerjee e Li, 2007).

Além disso, a ciclooxigenase (COX) promove a formação de prostaglandinas, o que conduz à proliferação celular. A COX-2 não está normalmente presente nos tecidos normais, sendo a sua síntese estimulada em processos inflamatórios e carcinogénicos. Tem-se verificado um aumento desta enzima numa variedade de cancros, incluindo PC (Figura 1), (Sarkar, Banerjee e Li, 2007).

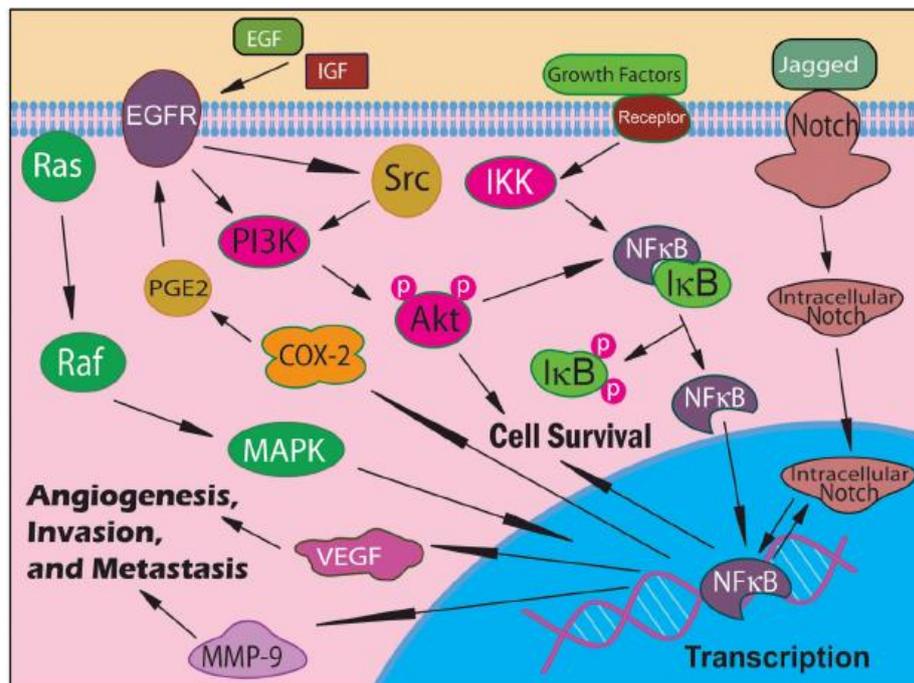
A desregulação da sinalização de EGFR está também na base do desenvolvimento de PC. Este recetor é composto por um domínio extracelular de ligação ao ligando, de uma região transmembrar hidrofóbica e de um domínio de tirosina cinase intracelular. Faz parte da família de recetores tirosina cinase ErbB, onde estão incluídos ErbB-1 (EGFR), ErbB-2 (HER2), ErbB-3 e ErbB-4. A ligação de um ligando ao EGFR, como por exemplo EGF, conduz à sua fosforilação culminando na ativação de diversas vias de sinalização incluindo PI3K, Src, MAPK e STAT (Figura 1). A sobre-expressão de EGF e EGFR é comumente verificada em doentes com PC, desempenhando um papel importante na proliferação, inibição da apoptose, angiogénese, metástase, resistência à quimio- e radioterapia, estando

associada a uma menor OS do doente (Karandish e Mallik, 2016; Sarkar, Banerjee e Li, 2007).

Por outro lado, a desregulação da via Akt contribui, também, para o desenvolvimento de PC. Sabe-se que a ligação de EGF, com consequente ativação de EGFR, ras ou Src, conduz à ativação de PI3K. A PI3K ativada leva à fosforilação, e consequente ativação, de Akt. Esta, por sua vez, inibe a apoptose determinada pela sua capacidade em fosforilar e inativar diferentes moléculas envolvidas na via apoptótica, incluindo fatores de transcrição, Bad e caspase-9 (Figura 1). Verificou-se que uma parte significativa de doentes com PC apresenta níveis elevados de Akt fosforilada (Sarkar, Banerjee e Li, 2007).

É de ressaltar, ainda, a importância da desregulação da via de sinalização NF-κB. Em células humanas, na ausência de estimulação, o NF-κB encontra-se sequestrado no citoplasma. A sua ativação resulta na sua translocação para o núcleo onde se liga à região promotora dos seus genes alvo, participando na regulação da transcrição de muitos genes, como a survivina e VEGF, que estão envolvidos na sobrevivência celular, apoptose, invasão, metástase e angiogénese (Figura 1), (Sarkar, Banerjee e Li, 2007).

Com efeito, as células cancerígenas sofrem um conjunto de alterações genéticas e epigenéticas, demonstrando o seu fenótipo maligno através da expressão de antígenos associados a tumor (TAAs), isto é, proteínas que não são geralmente expressas por células não tumorais (Anexo I), (Amedei, Nicolai e Prisco, 2014).



**Figura 1** - As maiores vias de sinalização envolvidas na patogénese de PC (Fonte: Sarkar, Banerjee e Li, 2007).

## 2. Imunologia tumoral

O processo de imunovigilância depende de uma série de eventos necessários para orquestrar uma resposta anti-tumoral eficaz (Paniccia *et al.*, 2015). O PC é único do ponto de vista imunológico (Figura 2), (Kunk *et al.*, 2016). Diferentes tipos de respostas imunes inata e específica promovem o desenvolvimento de PC, ao induzirem um ambiente imunossupressor e anti-inflamatório que constitui um dos maiores obstáculos ao sucesso de vacinas com DCs (Amedei, Nicolai e Prisco, 2014). Referem-se, de seguida, as células do sistema imunitário (SI) envolvidas na fisiopatologia de PC.

As células *Natural Killer* (NK) são cruciais na defesa contra agentes patogénicos e células tumorais. Por outro lado, contribuem indiretamente para a eliminação de tumores ao modular as funções de outras células do SI. No entanto, tem-se verificado a existência de um número limitado destas células em PC encontrando-se, muitas vezes, na forma desativada devido à falta do recetor NKG2D, necessário para a sua ativação (Amedei, Nicolai e Prisco, 2014; Constantino *et al.*, 2015; Kunk *et al.*, 2016).

A presença de DCs é fundamental para gerar uma resposta imune anti-tumoral e, tal como os linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), estão associadas a um melhor prognóstico em PC. No entanto, encontram-se em baixos níveis, muitas vezes numa forma imatura, limitando assim a sua capacidade de apresentação de antígenos aos linfócitos T e consequente indução de uma resposta imunitária anti-tumoral eficaz. Por outro lado, sob influência de um microambiente tumorogénico, as DCs podem adquirir um fenótipo tolerogénico podendo produzir várias moléculas imunossupressoras, favorecendo assim a resistência tumoral. De fato, as células tumorais podem inibir a maturação das DCs através da secreção de IL-10 ou através da produção de fatores derivados do tumor, produzindo as designadas DCs “pró-tumoral” que, indiretamente, promovem o crescimento tumoral. Pode ainda ocorrer a produção de citocinas que previnem a apoptose de células tumorais e, indiretamente, promovem a sua proliferação (Anexo II), (Palucka e Banchereau, 2012).

Os TILs desempenham um papel importante na imunidade adaptativa celular específica de tumor. Os seus principais constituintes são as células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> (TCD8<sup>+</sup>), células T *helper* CD4<sup>+</sup> (Th) e T reguladoras (Tregs). A ligação da molécula de MHC, nas DCs, com o recetor TCR, nos linfócitos T, não é suficiente para iniciar a ativação de células T. As células dendríticas expressam CD40, uma molécula co-estimuladora, que se liga a CD40L nas células T, desencadeando a ativação destas células. Vários estudos demonstram que a expressão de CD40 em PC correlaciona-se com um aumento de OS e da sobrevivência livre de progressão (PFS) (Amedei, Nicolai e Prisco, 2014; Kunk *et al.*, 2016).

Um grupo de TILs, as células TCD8<sup>+</sup> de memória, parecem ser as principais células efetoras anti-tumorais, apesar de se encontrarem em baixa quantidade em PC. Por outro lado, o papel das células TCD4<sup>+</sup> é mais complexo. As células Th1 produzem IFN- $\gamma$  e citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ , que ativam DCs e podem regular a sobrevivência e persistência de células TCD8<sup>+</sup> como células de memória. Por sua vez, as células Th2, produzem IL-4 e IL-10, que estão muitas vezes associadas a tolerância imunológica (Kunk et al., 2016; Paniccia et al., 2015).

No entanto, as células de PC induzem uma disfunção imune local e sistêmica ao modularem a resposta imune. Com efeito, as células tumorais são responsáveis pela geração de um microambiente imunossupressor, PTME, que conduz a uma resposta anti-tumoral inadequada (Kunk et al., 2016; Oliveira, Borges e Cruz, 2013).

O desenvolvimento de PC é caracterizado por uma forte reação estromal desmoplásica densa, também conhecida como fibrose, que desempenha um papel fundamental na promoção da angiogênese. A existência de elevadas quantidades de PDGF, fibronectina, proteoglicanos e ácido hialurônico, conduz a uma distorção ao nível da arquitetura pancreática normal. Por outro lado, este estroma não funciona apenas como uma barreira, de certa forma impenetrável, para as células do SI, participando também na progressão e invasão de PC, baseado na comunicação entre fibroblastos e células cancerígenas, bem como na hipóxia e expressão de citocinas inflamatórias. Com efeito, a entrega de fármacos pode ficar comprometida, o que pode estar na base de fenômenos de resistência (Kunk et al., 2016; Paniccia et al., 2015).

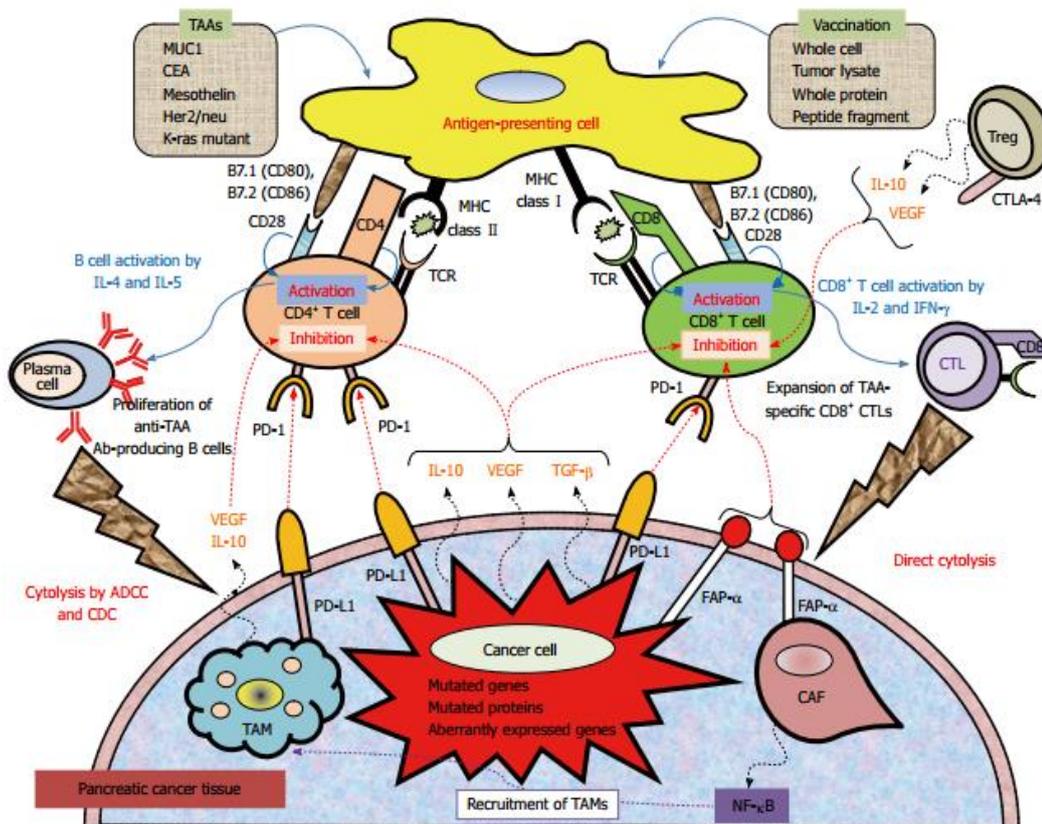
São várias as células imunes supressoras que têm um papel fundamental em PC, ao impedir uma resposta eficaz por parte do SI (Kunk et al., 2016). Assim referem-se os macrófagos associados ao tumor (TAMs) que modulam o SI através de vários mecanismos, como a secreção de citocinas imunossupressoras, nomeadamente a IL-10 e TGF- $\beta$ , e de ligandos imunes inibidores, como PD-L1. A expressão deste ligando está envolvido em processos de supressão imune e apoptose de células T. Os TAMs alternam a sua diferenciação de M1, com papel anticancerígeno, para M2, com papel pró-tumoral. A sua presença é normalmente associada a resultados clínicos negativos, à existência de metástases e à promoção de angiogênese (Amedei, Niccolai e Prisco, 2014; Kunk et al., 2016; Tanemura et al., 2015).

Outras células imunossupressoras são os linfócitos T reguladores (Tregs) que constituem subconjuntos de TIL. São conhecidas pela sua capacidade imunossupressora devido à secreção de TGF- $\beta$ , IL-10 e expressão de moléculas co-inibidoras CTLA-4. Estas últimas ligam-se ao seu ligando CD80/CD86 nas DCs, desativando os linfócitos e induzindo a

sua apoptose. Este mecanismo de *feedback* negativo, numa situação fisiológica normal, evita o excesso de estimulação das células T e possíveis danos em células saudáveis. No entanto, as células de PC expressam quantidades abundantes desta molécula, criando assim um PTME que promove o crescimento das células tumorais (Kunk *et al.*, 2016; Tanemura *et al.*, 2015).

As células mieloides imaturas (MDSCs) têm um papel direto na supressão imune e crescimento de células cancerígenas. Estas células promovem o sequestro de cisteína, conduzem à expressão de elevados níveis de arginase e produzem TGF- $\beta$ . Estes fatores promovem a inibição das funções das células T efetoras e NK, bem como o desenvolvimento de Tregs (Amedei, Niccolai e Prisco, 2014; Kunk *et al.*, 2016; Tanemura *et al.*, 2015).

Os fibroblastos associados a cancro (CAFs) produzem uma proteína de ativação de fibroblastos, FAP- $\alpha$ , que vai suprimir as células T efetoras. Os fibroblastos, ou células estreladas pancreáticas, respondem a moléculas como o CXCL12 e produzem VEGF, conduzindo à estimulação da angiogénese em resposta a situações de hipóxia ou inflamação. Estas células, estimuladas por TGF- $\beta$  e PDGF, iniciam um processo de síntese e produção de proteínas da matriz extracelular que pode levar à fibrose verificada em PC (Kunk *et al.*, 2016; Tanemura *et al.*, 2015).



**Figura 2** - Imunologia anti-tumoral em PC (Fonte: Tanemura *et al.*, 2015).

### **3.Imunobiologia das DCs**

#### **3.1 Origem e classificação de DCs**

As DCs, inicialmente descritas por Steinman e Cohn, são produzidas na medula óssea, a partir de células estaminais hematopoiéticas (HSCs), e desempenham um papel crítico na interface entre o SI inato e adaptativo (Steinman e Cohn, 1973, Constantino *et al.*, 2015; Oliveira, Borges e Cruz, 2013). Quando comparadas com outras APCs, como os macrófagos, as DCs são altamente eficientes e possuem uma capacidade única de modulação da imunidade e tolerância (Palucka e Banchereau, 2012).

A classificação destas células é bastante complexa, tendo em conta a elevada heterogeneidade que apresentam, e tem sido objeto de intenso debate e evolução constante. Com base nas características específicas que apresentam, podem ser classificadas em células dendríticas plasmocitoides (pDCs) e convencionais (mDCs) (Constantino *et al.*, 2015; Oliveira, Borges e Cruz, 2013). As pDCs têm origem linfóide e localizam-se essencialmente no sangue e órgãos linfóides. Possuem a capacidade de produzir elevadas quantidades INF- $\alpha$  e  $\beta$ , que lhes confere propriedades anti-virais (Silva, 2013). Apresentam elevada plasticidade do ponto de vista funcional, podendo induzir respostas Th1, Th2 ou de tolerância, ao induzirem Tregs (Oliveira, Borges e Cruz, 2013; Constantino *et al.*, 2015). Por outro lado, as mDCs têm origem mielóide e localizam-se nos tecidos e sangue periférico. Também são designadas por DCs inflamatórias, uma vez que produzem TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-12p70, levando à ativação de células Th1/Th17 recrutando, conseqüentemente, CTLs (Oliveira, Borges e Cruz, 2013).

#### **3.2 Processamento e apresentação de antígenos**

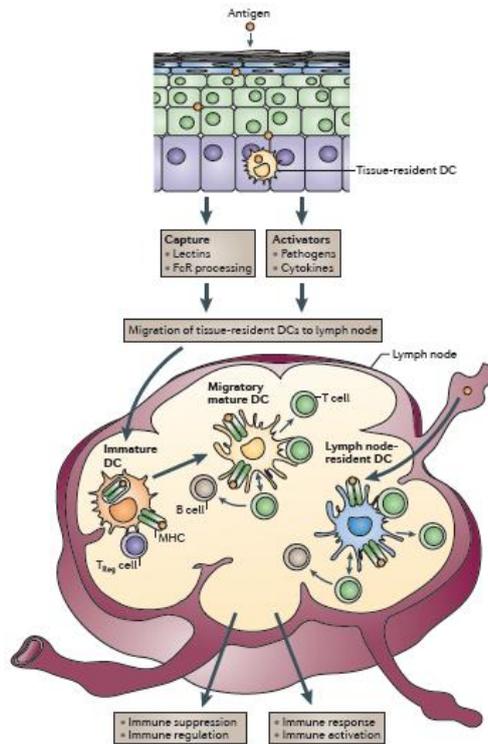
As células tumorais, devido à sua instabilidade genética, expressam epítomos específicos na superfície das suas células, os TAAs, que não são expressos ou que tem uma expressão limitada em células normais. Nos tecidos periféricos, existem DCs imaturas que atuam como sentinelas e que são especializadas na captura e processamento de antígenos (Paniccia *et al.*, 2015; Schuster *et al.*, 2006).

O processo de internalização é mediado por recetores para a porção FC das imunoglobulinas, recetores do complemento, recetores de manose e PRRs. Estes últimos englobam recetores NOD-like, CLR e TLR (Oliveira, Borges e Cruz, 2013;Silva, 2013). O processo de captura de antígenos engloba vários mecanismos como macropinocitose, endocitose e fagocitose mediada por recetores (Constantino *et al.*, 2015; Palucka e Banchereau, 2012).

Os mecanismos de processamento de antígenos dependem da sua origem e da sua natureza molecular, tendo sido caracterizados três mecanismos: i) via MHC classe I ou citosólica (endógena); ii) via MHC classe II ou endocítica (exógena); iii) apresentação de antígenos lipídicos acoplados a moléculas CDI. É de sublinhar a capacidade das DCs apresentarem antígenos exógenos aos linfócitos TCD8<sup>+</sup> pela via MHC-I, processo designado por apresentação cruzada (Constantino *et al.*, 2015 ; Oliveira, Borges e Cruz, 2013).

### 3.3 Maturação e estimulação da resposta imune

Após um “sinal de perigo”, que pode advir de um processo inflamatório, infeccioso ou de destruição celular, as DCs ativadas migram para os gânglios linfáticos. Por outro lado, os antígenos podem também contactar diretamente as DCs residentes nos nódulos linfáticos, através da linfa (Figura 3), (Palucka e Banchereau, 2012).

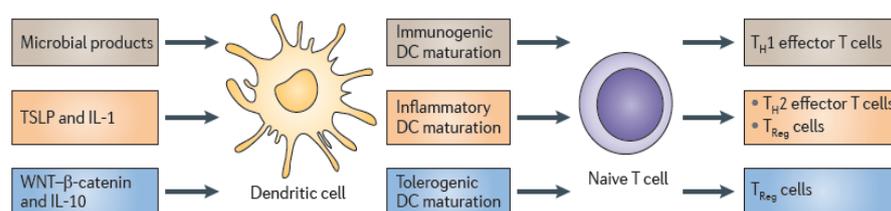


**Figura 3** - Indução de resposta imune pelas DCs (Fonte: Palucka e Banchereau, 2012).

Posteriormente, as DCs passam por um processo de maturação que envolve modificações morfológicas, fenotípicas e funcionais, que conduzem à perda da sua capacidade fagocítica e que culminam na aquisição de potencial imunestimulador (Oliveira, Borges e Cruz, 2013; Palucka e Banchereau, 2012).

Vários estímulos demonstram capacidade para desencadear a maturação de DCs, incluindo citocinas pró-inflamatórias como  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$  e PAMPs tais como lipopolissacarídeos, DNA bacteriano e dupla cadeia de RNA viral (Constantino *et al.*, 2015).

No entanto, a maturação, por si só, não resulta num único tipo de fenótipo. Os diferentes sinais de alarme poderão induzir DCs com fenótipos distintos que, eventualmente, contribuem para diferentes respostas imunes (Palucka e Banchereau, 2012). O tipo de resposta desencadeado pelas DCs depende de vários fatores, como o estímulo indutor da maturação das DCs, o perfil de maturação induzido, a concentração do antígeno e a intensidade e duração da interação com os linfócitos (Figura 4), (Oliveira, Borges e Cruz, 2013).



**Figura 4** - Maturação de DCs e diferentes tipos respostas imunitárias induzidas (Fonte: Palucka e Banchereau, 2012).

As DCs imaturas expressam uma grande variedade de recetores de quimiocinas incluindo  $CCR1$ ,  $CCR5$  E  $CCR6$ . Durante a maturação, a expressão destes recetores diminui, e aumenta a expressão de  $CCR7$ , que direciona as DCs para os órgãos linfóides (Silva, 2013).

As DCs maduras sintetizam elevados níveis de  $IL-12$ , que induzem respostas imunes inatas e adaptativas. Por outro lado, as DCs para além de expressarem elevados níveis de moléculas co-estimuladoras, também expressam moléculas MHC, tornando-se aptas a apresentar antígenos aos linfócitos B e T *naive* (Oliveira, Borges e Cruz, 2013; Palucka e Banchereau, 2012; Silva, 2013).

A ativação de células T inicia-se com o reconhecimento, por parte do complexo TCR/CD3, de peptídeos antigénicos expostos na superfície de APCs, que se encontram acoplados a moléculas MHC. Com efeito, nos nódulos e gânglios linfáticos, as DCs apresentam os antígenos aos linfócitos  $CD4^+$  e  $CD8^+$  via MHC-II e MHC-I, respetivamente. Durante esta interação, as DCs fornecem três sinais cruciais para a indução de uma resposta imune eficaz (Constantino *et al.*, 2015; Koido *et al.*, 2011; Oliveira, Borges e Cruz, 2013).

O primeiro sinal está relacionado com o reconhecimento antigénico via MHC. O segundo resulta da interação de moléculas co-estimuladoras, expressas pelas DCs, e os respetivos ligandos, na superfície das células T, desencadeando uma resposta imunogénica ou de tolerância. As DCs maduras produzem fatores solúveis como citocinas e quimiocinas, o terceiro sinal, que são cruciais para a diferenciação dos linfócitos TCD8<sup>+</sup> em CTLs e a polarização dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> em células efetoras ou reguladoras (Constantino *et al.*, 2015; Oliveira, Borges e Cruz, 2013).

Durante a apresentação dos complexos MHC-I aos linfócitos TCD8<sup>+</sup> a presença de IL-12p70, IL-15 e IFN- $\alpha/\beta$ , aumenta a sua expansão, promove a diferenciação de CTL e regula a formação de células T de memória. As células T ativadas podem deixar os gânglios linfáticos e infiltrarem-se no local do tumor, onde executam a sua atividade citotóxica através da libertação de enzimas citolíticas, como a granzima B e a perforina (Constantino *et al.*, 2015; Paniccia *et al.*, 2015).

Por outro lado, a diferenciação em células Th1 é caracterizada pela produção de IFN- $\gamma$ , com funções de amplificação da resposta imunológica, bem como de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ . Estas últimas, por sua vez, promovem a infiltração de macrófagos no tumor e contribuem para a expansão e diferenciação de CTLs. Por outro lado, ativam DCs que irão regular a permanência de CTLs como células de memória (Oliveira, Borges e Cruz, 2013; Silva, 2013).

A resposta Th2 promove a produção de IL-4 e IL-10, que está relacionada com a indução de respostas imunes humorais. Por outro lado, as DCs atuam de forma indireta na ativação de linfócitos B, através da indução da expressão de CD40L e IL-2 nos linfócitos T. No entanto, através da secreção de IL-4, as células Th2 limitam a atividade citolítica das CTLs, através da diminuição da expressão de perforinas e granzimas (Constantino *et al.*, 2015; Oliveira, Borges e Cruz, 2013; Palucka e Banchereau, 2012).

A diferenciação Th17 depende, principalmente, de TGF- $\beta$  e IL-6. Estas células segregam IL-17 e IL-22, provocando a inflamação dos tecidos implicados na autoimunidade (Constantino *et al.*, 2015; Oliveira, Borges e Cruz, 2013).

A polarização de Tregs depende, essencialmente, da ontogenia das DCs, da capacidade de produção de IL-2, IL-10 e TGF- $\beta$  assim como do equilíbrio entre sinais co-estimuladores positivos e negativos. Estas células podem diminuir a expansão das células TCD8<sup>+</sup> por competirem com estas para a IL-2 (Constantino *et al.*, 2015; Oliveira, Borges e Cruz, 2013).

## 4. Imunoterapia anti-tumoral baseada em DCs

As DCs representam uma estratégia terapêutica promissora devido à sua habilidade única para apresentar antígenos e ainda pela capacidade de estimular outras células do SI (Anexo III e IV-A), (Constantino *et al.*, 2015).

A estratégia imunoterapêutica anti-tumoral com recurso a DCs baseia-se na entrega de TAAs a estas células (Chen *et al.*, 2015; Koido, 2016).

As vacinas de DCs representam um método pelo qual estas células são utilizadas como APCs profissionais, estimulando células TCD8<sup>+</sup> específicas para os antígenos tumorais, que sejam suficientemente robustas e de longa duração de ação, gerando a regressão do tumor resistente e/ou a sua irradicação (Anexo IV-B), (Palucka e Banchereau, 2012).

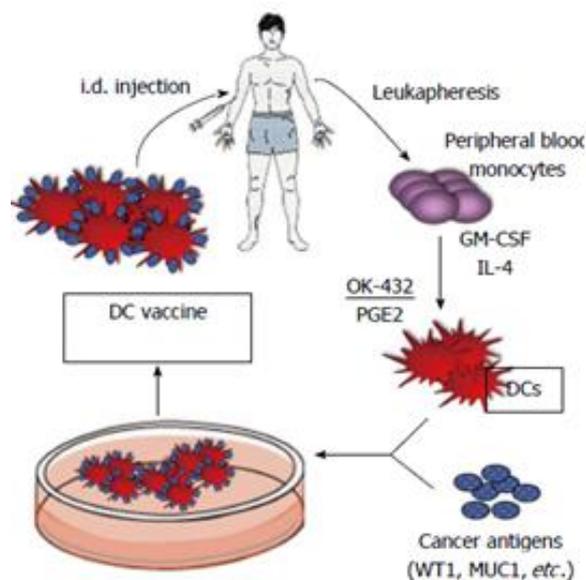
### 4.1 Vacinas *ex vivo* baseadas em DCs

A manipulação de DCs *ex vivo* é a estratégia mais explorada e mais usada na maior parte dos ensaios clínicos iniciados até à data (Anexo V-A), (Constantino *et al.*, 2015; Silva, 2013).

Esta estratégia requer o isolamento de monócitos ou precursores da medula óssea do doente, uma vez que as DCs circulantes representam menos de 1% das células mononucleares do sangue periférico (PBMC). A diferenciação de monócitos CD14<sup>+</sup> envolve a cultura de células, entre 5-7 dias, na presença de GM-CSF e IL-4, produzindo DCs com um fenótipo imaturo denominadas MoDCs. Por outro lado, a diferenciação de HSCs CD34<sup>+</sup> ocorre após incubação com FLt3L, GM-CSF e TNF- $\alpha$  (Figura 5), (Constantino *et al.*, 2015; Oliveira, Borges e Cruz, 2013).

Numa fase seguinte, utilizam-se citocinas pró-inflamatórias, CD40L ou agonistas TLR, que induzem a maturação das DCs. Posteriormente, as DCs são carregadas com antígenos tumorais autólogos, desencadeando uma resposta imune efetiva. O processo de carregamento pode ocorrer por absorção ativa, eletroporação e mediação por adenovírus (Chen *et al.*, 2015).

Por fim, as DCs, maturadas e carregadas com o antígeno tumoral, são administradas no doente, migrando para os tecidos linfóides onde é desencadeada uma resposta inata e adaptativa após ativação de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>. Estas células ativas migram posteriormente do tecido linfóide para o tecido tumoral, inibindo o seu crescimento (Oliveira, Borges e Cruz, 2013; Silva, 2013).



**Figura 5** - Desenvolvimento de vacinas anti-tumorais baseadas em DCs manipuladas *ex vivo* (Adaptado de Okamoto *et al.*, 2016).

As DCs, utilizadas em abordagens de imunoterapia-anti tumoral, podem ser autólogas ou alogénicas, de acordo com a sua fonte. As vacinas de DCs autólogas tem sido a abordagem mais utilizada (Anexo V-B). Neste caso, as DCs do doente são isoladas e carregadas com o antigénio antes de serem reinfundidas (Constantino *et al.*, 2015; Kunk *et al.*, 2016). Por outro lado, as DCs alogénicas são normalmente obtidas por diferenciação de células mononucleares do sangue periférico de dadores saudáveis. Neste método de vacinação, as DCs são incubadas com uma linha tumoral de PC, em que as células são previamente estimuladas, normalmente com GM-CSF, de forma a elicitar uma resposta imune, quando administradas em doentes com PC (Constantino *et al.*, 2015; Kunk *et al.*, 2016).

A escolha de antigénios tumorais e os procedimentos de carregamento são parâmetros importantes para a produção de vacinas *ex vivo* baseadas em DCs. Uma fração limitada, aproximadamente 10% dos TAAs, parecem ser imunogénicos e, entre estes, apenas alguns são eficazmente associados com a rejeição tumoral. Neste sentido, as DCs podem ser carregadas com TAAs recombinantes ou isolados, pequenos peptídeos, proteínas tumorais, células tumorais apoptóticas ou com lisados de células tumorais. Podem, ainda, ser transfetadas com mRNA tumoral ou transduzidas com genes codificadores de TAAs (Anexo V-C), (Constantino *et al.*, 2015).

A via e frequência de administração e o número de células administradas são outros fatores que podem induzir respostas imunes anti-tumorais específicas, com características e eficiências diferentes. Nas últimas duas décadas, as vacinas de DC foram administradas por

diversas vias: intravenosa (iv), intradérmica (id), subcutânea (sc), intranodal (in) e intratumoral (it). O facto de as DCs não conseguirem migrar para os órgãos linfoides secundários, pode ser, em parte, a razão pela qual as vacinas baseadas em DCs tenham tido um sucesso clínico limitado (ANEXO V-D), (Constantino *et al.*, 2015; Odegard, 2015).

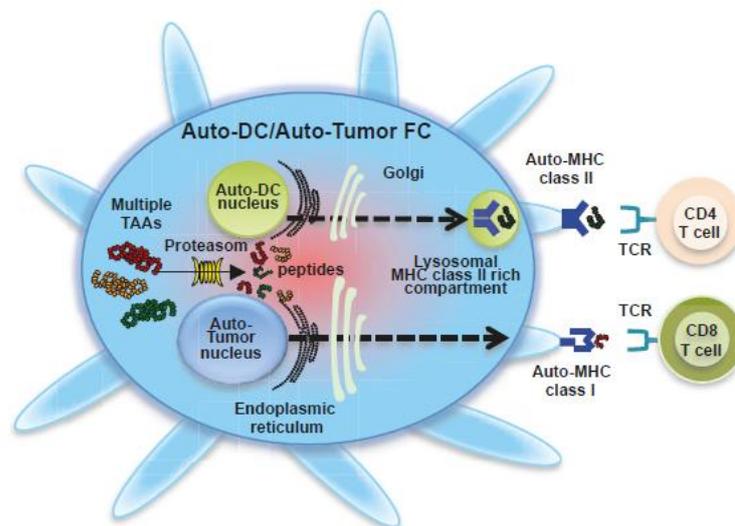
Um outro fator que deve ser tido em consideração é o tipo de estímulos, bem como a sua duração para indução da maturação de DCs. O contacto das DCs com “sinais de perigo” *in vivo* é transitório, dado que as células migram dos tecidos periféricos e atingem os gânglios linfáticos em 2 a 4h. No entanto, a maioria das estratégias utilizam tempos de exposição de 48h que podem ser muito longos, esgotando a capacidade das DCs de produzirem IL-12-p-70, traduzindo-se numa diminuição da sua capacidade para induzir respostas Th1 e CTL (Constantino *et al.*, 2015; Odegard, 2015).

A estratégia da manipulação de DCs *ex vivo* demonstrou ser segura, bem tolerada e capaz de induzir respostas anti-tumorais. O maior obstáculo deriva da ineficiente migração das DCs do local de administração para os gânglios linfáticos. Por outro lado, esta estratégia terapêutica acarreta custos elevados e é morosa, pelo que as DCs são normalmente produzidas e criopreservadas no início do tratamento (Constantino *et al.*, 2015; Silva, 2013).

Além disso, a inexistência de protocolos estandardizados traduz-se na existência de vacinas com qualidades diferentes, produzidas por diferentes laboratórios, o que dificulta a reprodutibilidade desta abordagem imunoterapêutica (Constantino *et al.*, 2015; Silva, 2013).

#### **4.2 Vacinas baseadas na fusão DCs - células tumorais**

Por outro lado, a fusão de DCs com células tumorais intatas para gerar células de fusão DC-tumor (*DC-tumor FCs*), também designadas por “dendritomas”, é uma estratégia terapêutica alternativa em oncologia, que permite que as DCs sejam expostas à vasta gama de TAAs originalmente expressos por células tumorais intatas e que demonstraram induzir respostas imunes tumorais *in vivo* (Figura 6) (Constantino *et al.*, 2015; Koido, 2016).



**Figura 6** - Indução de resposta imune por DC-tumor FCs (Fonte: Koido, 2016).

Em DC-tumor FCs, o citoplasma de ambas as células é integrado, não se verificando, no entanto, a fusão nuclear, permitindo a retenção das funções originais dos dois tipos de células, incluindo a co-expressão de TAAs inteiros derivados de tumor, tanto conhecidos como não identificados, e de moléculas MHC classe I e II derivadas de DCs (Koido, 2016).

De um modo geral, múltiplos TAAs de células tumorais intatas são degradados no proteossoma. Os antígenos são posteriormente acoplados a moléculas MHC classe I ao nível do reticulo endoplasmático (RE), são expressos na superfície destas células e são subsequentemente apresentados às células TCD8<sup>+</sup> específicas de antígeno (Koido, 2016).

DC-tumor FCs também podem sintetizar peptídeos antigénicos restritos MHC-classe II de células tumorais intatas no RE. As moléculas MHC classe II, derivadas de DCs, e os peptídeos antigénicos, derivados de tumor, são transportados para o citoplasma onde irão ser gerados complexos peptídeo-MHC classe II. Estes complexos são, posteriormente, expressos na superfície destas células e são apresentados às células TCD4<sup>+</sup> específicas de antígeno (Koido, 2016).

Com efeito, esta abordagem terapêutica apresenta inúmeras vantagens na indução de respostas imunes anti-tumorais. Por um lado, evita a necessidade da identificação de antígenos para cada doente, por outro lado, podem ser processados vários TAAs, conhecidos e desconhecidos, que serão apresentados num contexto de co-estimulação, impedindo a indução de tolerância. Além disso DC-tumor FCs migram para os nódulos linfáticos e formam aglomerados com células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> (Koido, 2016).

A principal desvantagem desta abordagem terapêutica prende-se na disponibilidade limitada de células tumorais autólogas. De modo a ultrapassar esta desvantagem, podem ser usadas linhas celulares tumorais alogénicas (Koido, 2016).

Por outro lado, devido ao microambiente tumoral imunossupressor, as DCs derivadas de doentes com cancro são fracas APCs. Como tal, a utilização alogénica de DCs de dadores saudáveis, constitui uma alternativa promissora (Koido, 2016).

### **4.3 Vacinas *in vivo* baseadas em DCs**

Uma alternativa, que representa um enorme avanço na imunoterapia anti-tumoral, consiste em carregar as DCs *in vivo*, permitindo ultrapassar a maior parte das limitações das vacinas geradas *ex vivo* (Anexo VI). Esta abordagem permite a eliminação da obtenção de DCs autólogas, que apenas poderiam ser usadas no próprio indivíduo (Constantino *et al.*, 2015; Odegard, 2015; Silva, 2013).

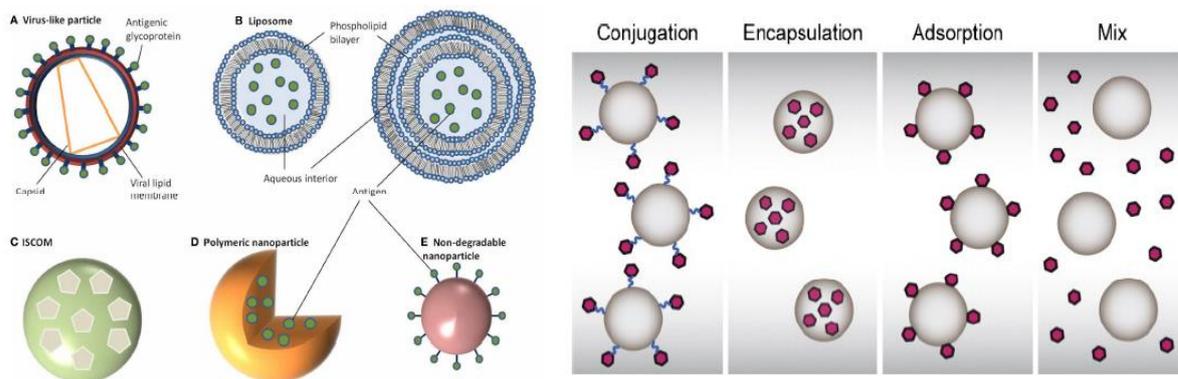
De modo a garantir uma resposta imunológica dirigida e eficaz numa vacina de DC *in vivo*, o antígeno escolhido deve ser administrado e direcionado (Odegard, 2015).

Uma das abordagens para atingir esse objetivo, envolve a utilização de proteínas mediadoras solúveis, como por exemplo as proteínas de choque térmico (HSPs), que podem transportar TAAs. Ao interagir com recetores de superfície de DCs, as HSPs induzem a sua maturação, promovendo a consequente apresentação de antígenos via MHC-I (Odegard, 2015, Kim *et al.*, 2014).

Outro método de administração de antígeno envolve a utilização de vacinas de partículas como forma de entrega de antígenos *in vivo* para as APCs, nomeadamente as DCs. Estes métodos apresentam algumas vantagens, das quais se pode destacar a proteção do antígeno da degradação, o aumento da sua captação bem como o prolongar do tempo de apresentação (Figura 7), (Chen e Zhang, 2015; Odegard, 2015).

Diferentes tipos de partículas podem ser usados nas vacinas, tais como *virus-like particles* (VLPs) e parvovirus (PPVs). Estes vírus têm a capacidade de se rearranjarem em partículas que podem encapsular antígenos. A exposição a VLP induzirá a maturação das DCs com libertação de citocinas inflamatórias, que poderão estimular as células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> *in vivo* (Odegard, 2015).

Por outro lado, nano e micro partículas sintéticas constituem outros tipos de partículas que podem ser usadas para entregar antígenos a DCs *in vivo*. Nesta abordagem, os antígenos podem ser conjugados ou encapsulados em partículas criadas sinteticamente, que podem ser captadas pelas DCs (Odegard, 2015).



**Figura 7-** Representações de diferentes sistemas de entrega de antígenos (Fonte: Odegard, 2015).

A entrega de antígenos para receptores específicos de DCs, constitui outra abordagem de entrega de antígenos a DCs *in vivo*. O procedimento envolve o acoplamento de antígenos a anticorpos monoclonais (mAbs) que são específicos para as moléculas de superfície das DC, tais como os receptores Fc, CRLs, receptores de manose (Constantino *et al.*, 2015; Odegard, 2015).

#### 4.4 Outras estratégias de vacinas baseadas em DCs

Outras abordagens, para além da manipulação *ex vivo* e do carregamento *in vivo*, exploram o potencial imunogénico das DCs na terapia do cancro (Anexo X), (Constantino *et al.*, 2015).

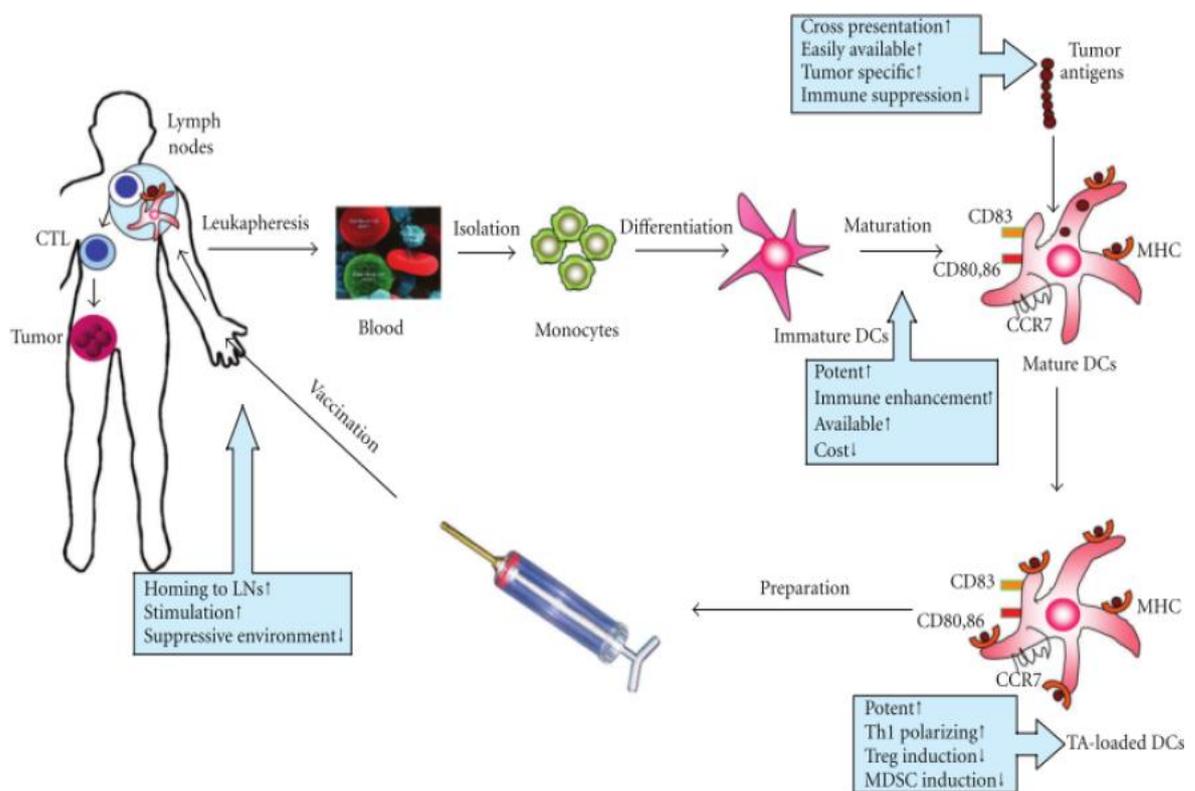
Por exemplo, foram testadas vacinas baseadas na administração de péptidos, proteínas ou ácidos nucleicos tumorais. Quando injetados, estes antígenos são capturados e processados por DCs, ativando uma resposta imunitária específica. No entanto, o sucesso clínico desta estratégia foi limitado (Constantino *et al.*, 2015; Palucka e Banchereau, 2013).

Para além disso, as DCs estão envolvidas na resposta a vacinas baseadas em células tumorais. Nas vacinas GVAX, duas linhas tumorais alogénicas (PANC 6,03 e PANC 10,05) foram irradiadas e geneticamente modificadas para expressar GM-CSF, que ativa e atrai DCs. Estas vacinas demonstraram ativar a resposta imune e clínica em PC e outros tipos de tumores sólidos (Palucka e Banchereau, 2013; Paniccia *et al.*, 2015).

Os exossomas derivados de DCs (Dex), por outro lado, também têm despertado algum interesse clínico devido aos estudos pioneiros de Zitvogel *et al.* que demonstraram ocorrer inibição do crescimento tumoral devido à ativação de respostas TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> (Constantino *et al.*, 2015 *apud* Zitvogel *et al.*, 1998).

Em suma, a vacina ideal de DCs deverá induzir a maturação destas células, apresentar estabilidade na apresentação de TAAs, promovendo, deste modo, uma resposta imunogénica duradoura e eficaz. A taxa de eliminação tumoral e o intervalo de PFS constituem parâmetros importantes de avaliação da eficácia da vacina (Oliveira, Borges e Cruz, 2013).

O aumento da eficácia da imunoterapia anti-tumoral relaciona-se com a compreensão dos mecanismos inerentes ao equilíbrio entre a imunidade e tolerância. Com o objetivo de aumentar a eficácia das DCs, estão a ser desenvolvidas estratégias que incluem a modificação genética destas, com o objetivo de aumentar a expressão de reguladores positivos imunogénicos e inibir os negativos (Figura 8), (Oliveira, Borges e Cruz, 2013).



**Figura 8-** Pontos-chave para melhorar a vacinação baseada em DCs para doentes com cancro (Fonte: Nguyen-Pahm *et al.*, 2012).

## 5. Ensaio clínicos

Atualmente, não existem imunoterapias aprovadas para o tratamento de PC. Nos últimos anos, têm sido utilizadas várias estratégias baseadas em DCs, de forma a induzir respostas imunes anti-tumorais eficientes. De fato, a imunoterapia para o tratamento do cancro pancreático encontra-se, atualmente, num estado de intensa investigação clínica (Pancreatic Cancer Action Network, 2016; Kajihara *et al.*, 2016).

### 5.1 Vacina baseada em DCs para doentes com PC no Japão (“Vaccell”)

No Japão foi desenvolvida uma vacina anti-tumoral baseada em DCs, intitulada de “Vaccell”, para o tratamento de PC (Okamoto *et al.*, 2016).

Tentou-se demonstrar que as DCs quando estimuladas com adjuvante imune estreptocócico (OK-432) produzem IL-12, induzem um estado de Th1 dominante e desencadeiam respostas anti-tumorais mais potentes, comparativamente com outros fatores de maturação de DCs conhecidos (Okamoto *et al.*, 2016).

Neste ensaio clínico multicêntrico foram analisados 255 doentes com PC inoperável, que receberam quimioterapia padrão combinada com vacinas de DC carregadas com antígenos específicos de PC, como o WTI e MUC1 (Okamoto *et al.*, 2016).

Os resultados sugerem que a vacina de DC poderá apresentar algum benefício terapêutico em doentes com PC avançado. O tempo médio de sobrevivência (MST) dos doentes com reações positivas de hipersensibilidade retardada (DTH) foi significativamente prolongado quando comparado com doentes com DTH negativas (Okamoto *et al.*, 2016).

Com base nos resultados obtidos no ensaio anteriormente descrito, foram realizados dois ensaios clínicos prospetivos em doentes com PC avançado (Okamoto *et al.*, 2016).

Num dos ensaios, os doentes receberam terapia com gemcitabina combinada com uma vacina de DCs, para PC, carregadas com o WTI específico do MHC-I (DC/WTI-I). No outro ensaio, os doentes receberam terapia com gemcitabina combinada com uma vacina de DCs, para PC, carregadas com o WTI específico do MHC-I e do MHC-II (DC/WTI-I/II) (Okamoto *et al.*, 2016).

No primeiro ensaio, o controlo da doença foi associado com uma baixa razão de neutrófilos/linfócitos (N/L), que foi observada nos 3 doentes com DTH positivas. No segundo ensaio a sobrevivência de 7 doentes que receberam estas vacinas foi significativamente maior comparado com os 3 doentes que receberam vacinas DC/WTI-I (Okamoto *et al.*, 2016).

Os doentes com uma resposta DTH positiva demonstraram um significativo aumento de OS e de PFS, quando comparado com o OS dos doentes DTH negativos (Okamoto *et al.*, 2016).

Os resultados sugerem assim a viabilidade e possível benefício clínico da adição de uma vacina DC em doentes com PC avançado, em combinação com a quimioterapia. Atualmente estão a ser feitos estudos de fase II/III de “Vaccell” recorrendo a protocolos apropriados (Okamoto *et al.*, 2016).

## **5.2 Imunoterapia com algenpantucel-L em doentes com PDA**

Algenpantucel-L é uma das vacinas mais avançadas em estudos clínicos de PC. Esta vacina combina duas linhas celulares de PC alogénicas irradiadas (HAPa-1 e HAPa-2). Estas foram geneticamente modificadas para expressar a enzima  $\alpha(1,3)$ -galactosiltransferase ( $\alpha$ GT), responsável pela síntese de  $\alpha$ -galactosil ( $\alpha$ Gal), que não é expresso nas células humanas contrariamente ao anticorpo anti- $\alpha$ Gal (Coveler *et al.*, 2016; Milland, Christiansen e Sandrin, 2005).

Este tipo de vacina foi testada em diversos tipos de cancro, incluindo PC. A sua ação baseia-se na indução uma resposta imune inata contra PC, com início numa rejeição hiperaguda e fagocitose dos epítomos  $\alpha$ Gal das linhas tumorais (Coveler *et al.*, 2016).

As linhas tumorais são injetadas sendo posteriormente destruídas por lise mediada pelo complemento, o que resulta na apresentação cruzada de antígenos tumorais às DCs, sendo geradas células TCD8<sup>+</sup> específicas (Anexo VII-A), (Coveler *et al.*, 2016; Paniccia *et al.*, 2015).

Um estudo multicêntrico de fase II, *open-label*, denominado NLG-0205, envolveu cerca de 70 doentes cujo objetivo principal era aumentar em 1 ano a sobrevida livre de doença (DFS) de  $\leq 50$  para  $\geq 56\%$  (Coveler *et al.*, 2016).

Os doentes receberam a vacina de algenpantucel-L, que foi doseada com 100 ou 300 milhões de células, administrada por via intradérmica (Coveler *et al.*, 2016).

De uma forma geral, algenpantucel-L foi bem tolerada. Após uma média de acompanhamento de cerca de 21 meses, o objetivo principal foi alcançado em 62% dos 69 doentes avaliados (Coveler *et al.*, 2016).

Dos doentes que receberam vacinas com 300 milhões de células/dose, (n=26), 81% tiveram um ano de DFS enquanto que os doentes tratados com 100 milhões de células/dose, (n=43), apenas 51% tiveram 1 ano de DFS. Por outro lado, a percentagem de doentes que tiveram um ano de OS foi de 96% para o subgrupo que recebeu 300 milhões de células/dose e de 79% para o subgrupo que recebeu 100 milhões de células/dose (Coveler *et al.*, 2016).

O estudo NLG-0205 avaliou os biomarcadores imunológicos farmacodinâmicos durante o tratamento, comparando a linha de base com o fim do tratamento. As linhas tumorais utilizadas expressam calreticulina (CALR). Verificou-se que, após o tratamento, os títulos de anticorpos anti-CALR aumentaram, estando este resultado correlacionado com uma melhoria de OS. Por outro lado o aumento de anticorpos anti-mesotelina, anti-antigénio carcinoembrionário (CEA) e anti- $\alpha$ Gal, também foram correlacionados com uma melhoria de OS (Coveler *et al.*, 2016).

O OS de três anos e a mediana de OS para doentes que não tiveram resposta imunológica, (n=27), foi de 19% e 17 meses, respetivamente, enquanto os doentes que tiveram um título de anticorpos aumentado, (n=26), foi de 42% e 26 meses, e para os doentes com vários títulos de anticorpos aumentados, (n=13), foi de 69% e mais de 36 meses, respetivamente. Conclui-se que a resposta imune humoral montada para TAA pode ser associada com um aumento da sobrevida (Anexo VII-B), (Coveler *et al.*, 2016).

### **5.3 Outros ensaios clínicos**

Têm sido conduzidos vários ensaios clínicos recorrendo a vacinas anti-tumorais baseadas em DCs carregadas com MUC1. Num ensaio de fase I/II, após ressecção cirúrgica, 12 doentes com PC ou cancro biliar foram vacinados e acompanhados durante mais de quatro anos após a vacinação, sendo que nesse ponto quatro doentes estavam vivos e sem recidivas. Noutro ensaio clínico de fase I, que envolveu 7 doentes com PDA, estes apresentaram reações imunes específicas de MUC1, apesar de não ter sido detetado nenhum benefício clínico evidente, pelo que é necessário realizar mais ensaios clínicos (Anexo VIII), (Kajihara *et al.*, 2016).

Num ensaio clínico de fase I, foi administrada uma vacina de DC transfectada com mRNA de hTERT (DCs/ mRNA hTERT) a um doente que teve uma recaída de PC, tendo sido demonstrado que as respostas imunes específicas anti-hTERT são seguras. Estes resultados explicam-se pelo fato da unidade catalítica da telomerase, hTERT, ser um promissor candidato de diagnóstico de PC. Como a perda da atividade da telomerase pode inibir a progressão das células de PC, o hTERT constitui um alvo aliciante para desencadear respostas CTL específicas (Anexo VIII), (Hashimoto, Murakami e Uemura, 2008; Okamoto *et al.*, 2016).

As células de PC expressam, por outro lado, elevados níveis de antigénio CEA. Nesse sentido, foi realizado um ensaio clínico onde 3 doentes com PDA sujeitos a ressecção clínica receberam vacinação com DCs/CEA mRNA durante um período de 6 meses. Verificou-se

que todos os doentes envolvidos desenvolveram uma reação no local de injeção e permaneceram vivos e sem recidiva de PC (Anexo VIII), (Okamoto et al., 2016).

Além disso, o gene *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS) encontra-se mutado em cerca de 75-95% dos doentes com PDA, pelo que as respostas imunes específicas de KRAS mutante podem influenciar os benefícios clínicos do tratamento de doentes com PDA. Foi, por isso, realizado um ensaio clínico em que 9 doentes foram vacinados com DCs carregadas com este TAA. Apenas 1 dos 9 doentes demonstrou uma resposta imune celular positiva, com uma média de OS de 60 dias (Anexo VIII), (Okamoto et al., 2016).

#### 5.4 Ensaios clínicos a decorrer

Atualmente, a área das vacinas contra PDA encontra-se num estado ativo de investigação clínica, em particular as vacinas baseadas em DCs (Tabela I).

**Tabela I** - Ensaios clínicos a decorrer utilizando vacinas anti-tumorais baseadas em DCs para doentes com PC.

Ensaios clínicos a decorrer							
Nome	ID	Fase	Intervenções	Outcome primário	Outcome secundário	Participantes	Referências
Ensaio clínico de vacina de células dendríticas carregada com WT1 e MUC1 para doentes pós-operatório com cancro pancreático ou cancro das vias biliares	JPRN-UMIN000010388	I/II, open-label, não randomizado	Administração da vacina a cada 2 semanas num total de 7 vezes	Eventos adversos	PFS e resposta imune anti tumoral	10, com idades compreendidas entre os 20 e 80 anos	Nagasaki University Hospital, 2013
Ensaio clínico que avalia a vacinação de células dendríticas como uma imunoterapia adjuvante em doentes com cancro pancreático	JPRN-UMIN000009994	open-label, não randomizado	Administração de DCs carregadas com células de tumores ressecados ou com péptido MUC-I	Respostas imunes específicas de tumor	PFS, OS, marcador tumoral, qualidade de vida	20, com idade mínima de 20 anos	Yokohama City University, 2012
Estudo clínico de vacina de células dendríticas em doentes com cancro gastroenterológico e cancro pancreático-hepato-biliar	JPRN-UMIN000005820	I/II, open-label, não randomizado	Administração de vacinas de DCs carregadas com lisados tumorais em doentes com avançado cancro GI e HBP. Administração de vacinas de DCs carregadas com o péptido MUC-I em doentes com cancro GI avançado e HBP. Administração, pós operatória, de vacinas de DCs carregadas com lisado tumoral em doentes com ICC e HCC	Resposta clínica, PFS e OS	Resposta imunológica	100, com idades compreendidas entre os 20 e os 80 anos	Department of Gastroenterological Surgery, 2001

## Ensaio clínico a decorrer (continuação)

Nome	ID	Fase	Intervenções	Outcome primário	Outcome secundário	Participantes	Referências
<b>Estudo clínico de imunoterapia para cancro pancreático avançado irressecável</b>	JPRN-UMIN000001135	VII, open-label, não randomizado	Administração de DCs intratumoral combinado com gemcitabina	Respostas clínicas e segurança	Resposta imune	20, com idades compreendidas entre os 20 e os 75 anos	Tokyo Medical University Hospital, 2008
<b>Ensaio de segurança de fase I de vacina de células dendríticas e quimioterapia para doentes com cancro pancreático</b>	NCT02548169	I, open-label, não randomizado	Vacina de DC em combinação com quimioterapia padrão	Segurança clínica e viabilidade	Eficácia clínica	20, com idade mínima de 18 anos	Baylor Research Institute, 2015
<b>Estudo de fase II da indução de apoptose direta através da injeção tumoral direta de TNFerade ou radiação sozinha seguida de células dendríticas autólogas pulsadas com KLH em doentes com cancro pancreático irressecável</b>	NCT00868114	II, open-label, não randomizado	3 injeções semanais de TNFerade intratumoral mais radiação e 3 injeções intratumorais semanais de vacina de DCs. Radiação com 3 injeções intratumorais semanais de vacina de DCs	Sobrevida global	-----	35, com idade mínima de 18 anos	Jenkins e Moffitt, 2009
<b>Ensaio clínico de fase I/II que avalia a DCVax-Direct, células dendríticas autólogas ativadas para injeção intratumoral em doentes com tumores sólidos</b>	NCT01882946	I/II, open-label	Administração intratumoral de DCVax-Direct : DCs autólogas ativadas	Número de doentes com eventos adversos (durante 6 meses)	Número de doentes com resposta tumoral (durante 18 meses)	60, com idade compreendida entre os 18 e os 75 anos e que tenham tumores localmente avançados, tumores de tecidos sólidos metastáticos, melanoma, cancro do fígado, coloretal ou pancreático	Northwest Biotherapeutics, 2014
<b>Terapia de vacinação com células dendríticas carregadas com HSP105 para doentes com cancro recorrente/avançado</b>	JPRN-UMIN000006730	open-label, não randomizado	Administração de vacinas de DCs carregadas com péptido HSP são injetadas no dia	Segurança	Respostas imunológicas, efeito anti tumoral, OS, PFS	19, com idade mínima de 20 anos que tenham cancro pancreático, cólon, vias biliares, esófago, faringe ou mama recorrente/avançado	The University of Tokyo Hospital, 2011
<b>Estudo piloto de fase I de vacinação com células dendríticas carregadas com péptido WT1 do gene Wilms' tumor combinado com gemcitabina em doente com cancro pancreático avançado</b>	JPRN-UMIN000004855	I	Administração de vacinas de DCs carregadas com péptido WT1 combinado com gemcitabina	Eventos adversos	Taxa de resposta, PFS, OS, DTH para péptido WT1	10, com idades compreendidas entre os 20 e os 75 anos	School of Medicine, 2011

## 6. Papel do farmacêutico

Na área de oncologia e integrado numa equipa multidisciplinar, o farmacêutico destaca-se pelos seus conhecimentos que deverão ser usados em benefício do doente, assegurando um tratamento clínico adequado, suportado por evidências científicas e pela prestação de um serviço personalizado e humano de elevada qualidade, com vista à melhoria da qualidade de vida do doente (IPO Porto, 2016).

Enquanto especialista do medicamento, o farmacêutico deve eleger, juntamente com o médico, a melhor terapêutica a instituir para cada doente, ao disponibilizar informações sobre as diferentes alternativas terapêuticas disponíveis e ao acompanhar as visitas médicas. A manipulação de agentes quimioterapêuticos, em regime isolado ou em associação com outras estratégias terapêuticas, como a imunoterapia, também é da responsabilidade do farmacêutico, sendo fundamental para diminuir os riscos associados à manipulação destes. Devido à estreita margem terapêutica dos medicamentos usados em regime de quimioterapia, o acompanhamento farmacoterapêutico é de extrema importância, ao garantir a monitorização e promoção da adesão à terapêutica instituída e ao propor medidas de intervenção face a efeitos secundários decorrentes dos tratamentos.

Em virtude dos avanços tecnológicos e da descoberta de novas terapias, é provável que, num futuro próximo, seja disponibilizado ao doente oncológico em Portugal um amplo espectro de tratamentos inovadores. A imunoterapia envolve um vasto arsenal de abordagens terapêuticas, que diferem ao nível dos mecanismos de ação e de efeitos secundários, desafiando o farmacêutico a manter-se informado sobre a existência de novas terapias no combate ao cancro.

Por outro lado, para que estas novas terapêuticas cheguem ao mercado, são necessários vários anos de estudos pré-clínicos e clínicos, de modo a garantir a segurança e a eficácia das mesmas. Dado o seu vasto conhecimento técnico e científico dos mecanismos celulares e moleculares que poderão constituir alvos farmacológicos em diversas patologias, a participação do farmacêutico na área da investigação é essencial na descoberta de novas estratégias terapêuticas para combater o cancro, garantindo a veracidade, confidencialidade e qualidade dos resultados clínicos obtidos.

## Conclusão

O desenvolvimento de PC é caracterizado pela instabilidade genética inerente das células cancerígenas do pâncreas, pelo microambiente imunossupressor e por uma notável reação desmoplásica envolvida nos mecanismos de resistência à quimioterapia convencional, comprometendo a eficácia destas terapêuticas (Brunet *et al.*, 2016; Karandish e Mallik, 2016).

A imunoterapia é uma das inovações mais recentes e fascinantes, constituindo um tratamento promissor para o PC, tendo em conta os resultados clínicos positivos obtidos bem como o facto de ser altamente específico para as células cancerígenas e, por conseguinte, sem os efeitos secundários associados à quimioterapia tradicional, traduzindo-se numa melhor qualidade de vida do doente oncológico (Amedei, Niccolai e Prisco, 2014; Oliveira, Borges e Cruz, 2013; Sinn *et al.*, 2016).

As vacinas anti-tumorais, testadas em ensaios clínicos em doentes com PC, demonstraram ser seguras, bem toleradas e induzirem uma resposta imunológica em grande parte dos doentes. Os ensaios evidenciam ainda que estas abordagens induzem fortes respostas imunes anti-tumorais específicas de antigénio. No que respeita a efeitos secundários, demonstraram induzir uma toxicidade mínima, sendo as manifestações mais comuns as reações locais nos locais de injeção, como erupções cutâneas e prurido, podendo ocorrer, ocasionalmente, febre e mal-estar (Constantino *et al.*, 2015; Silva, 2013).

No entanto, a maioria destes estudos não conseguiram, ainda, demonstrar uma resposta clínica sustentada e uma melhoria significativa na sobrevida do doente (Amedei, Niccolai e Prisco, 2014; Silva, 2013). Para aumentar a eficácia clínica, será essencial melhorar estratégias que incluam a amplificação da imunidade adaptativa anti-tumoral e ainda o bloqueio da proliferação de linfócitos Treg e do microambiente imunossupressor (Anexo IX), (Oliveira, Borges e Cruz, 2013). Por outro lado, são necessários mais ensaios clínicos de fase III baseados em imunoterapia, que visem demonstrar o benefício em PC (Chen *et al.*, 2015; Silva, 2013).

Um dos principais obstáculos ao desenvolvimento de novas terapias para o PC é a falta de expressão de marcadores específicos de células tumorais pancreáticas. Por outro lado, é necessário otimizar e standardizar protocolos para a produção de vacinas, de modo a que o resultado clínico seja o mais eficaz possível ao nível das taxas de mortalidade (Amedei, Niccolai e Prisco, 2014; Silva, 2013).

É, também, de extrema importância desenvolver protocolos clínicos que combinem DCs com a terapêutica convencional promovendo, desta forma, ativação de DCs, apresentação cruzada de antigénios e eliminação seletiva de células imunossupressoras,

revertendo o estado de imunossupressão inerente ao tumor (Koido, 2016 ; Oliveira, Borges e Cruz, 2013). Por exemplo, a combinação de vacinas de DCs com bloqueadores dos *immune checkpoint*, como o PD-1 e CTL-4, poderá potenciar a função efetora das células T (Paniccia et al., 2015).

A participação do farmacêutico em oncologia com visão e experiência em diversas estratégias terapêuticas torna-se fundamental, de modo a que sejam realizadas as melhores escolhas e para que se possa recorrer a tecnologias com melhor benefício custo-eficácia em prol de um aumento da esperança e qualidade de vida do doente. Outro dos grandes desafios advém da questão económica, uma vez que estes tratamentos são muito dispendiosos, podendo não ser suportados por todos os doentes (Isabel Correia Tavares, 2014).

A imunoterapia foi a grande protagonista do maior encontro, a nível mundial, na área de oncologia (congresso da ASCO que decorreu em Chicago de 3 a 7 de Junho de 2016). Muitos investigadores e clínicos acreditam que a imunoterapia poderá ser a solução chave para travar, com maior eficácia e com menos efeitos secundários, a progressão de vários tipos de cancro (Bettencourt e Passos, 2016).

## Bibliografia

AMEDEI, Amedeo; NICCOLAI, Elena; PRISCO, Domenico - Pancreatic cancer: Role of the immune system in cancer progression and vaccine-based immunotherapy. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**. 10:11 (2014) 3354–3368.

ANGUILLE, Sébastien *et al.* - Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. **Lancet Oncol**. 15:7 (2014) 257–267.

AUBERT, Muriel *et al.* - Relationship Between  $\alpha$ Gal Epitope Expression and Decrease of Tumorigenicity in Pancreatic Adenocarcinoma Model. **Molecular Carcinogenesis**. 42:1 (2005) 202–212.

BALABAN, Edward P. *et al.* - Locally Advanced, Unresectable Pancreatic Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. **Journal of Clinical Oncology**. 34:19 (2016) 1–15.

BAYLOR RESEARCH INSTITUTE - **Dendritic Cell Vaccine and Chemotherapy for Patients With Pancreatic Cancer (PancVax)** [Em linha], [Acedido a 22 de junho de 2016]. Disponível em <https://clinicaltrials.gov/show/NCT02548169>.

BETTENCOURT, Bárbara; PASSOS, Maria José - **Imunoterapia é a nova esperança contra o cancro** [Em linha], [Acedido a 17 de março de 2016]. Disponível em <http://lifestyle.sapo.pt/saude/saude-e-medicina/artigos/imunoterapia-e-a-nova-esperanca-contra-o-cancro>

BRUNET, Laura Rosa *et al.* - Have lessons from past failures brought us closer to the success of immunotherapy in metastatic pancreatic cancer? **Oncolimmunology**. 5:4 (2016) e11129421 – e1112942–10.

CANCER.NET - **Pancreatic Cancer-Statistics** [Em linha], [Acedido a 17 de fevereiro de 2016]. Disponível em <http://www.cancer.net/cancer-types/pancreatic-cancer/statistics>

CANCER RESEARCH INSTITUTE - **Pancreatic Cancer** [Em linha], [Acedido a 21 de março de 2016]. Disponível em <http://www.cancerresearch.org/cancer-immunotherapy/impacting-all-cancers/pancreatic-cancer>

CARRINGTON, Christine; WEIR, Janet; SMITH, Peter - The development of a competency framework for pharmacists providing cancer services. **Journal of Oncology Pharmacy Practice**. 17:3 (2010) 168–178.

CHEN, Fang; WANG, Wenge; EL-DEIRY, Wafik S. - Current strategies to target p53 in cancer. **Biochemical Pharmacology**. 80:5 (2010) 724–730.

CHEN, Linghua; ZHANG, Xiaoyan - Primary analysis for clinical efficacy of immunotherapy in patients with pancreatic cancer. **Immunotherapy**. 8:2 (2015) 223–234.

CHEN, Pengfei *et al.* - Dendritic cell targeted vaccines: recent progresses and challenges. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**. 11:9 (2015) 1–28.

COLÁS, Navarro - Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento de la insuficiencia pancreática exocrina en el paciente con pancreatitis crónica. **Gastroenterología y Hepatología**. 28:Supl.2 (2005) 33–38.

COLLIGNON, Aurélie *et al.* - A pancreatic tumor-specific biomarker characterized in humans and mice as an immunogenic onco-glycoprotein is efficient in dendritic cell vaccination Aurélie. **Oncotarget**. 6:27 (2015) 23462–23479.

CONSTANTINO, João *et al.* - Antitumor dendritic cell-based vaccines: lessons from 20 years of clinical trials and future perspectives. **Translational Research**. 168 (2015) 74–95.

NEVES, Mafalda Costa *et al.* - Extended Survival after Complete Pathological Response in Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Following Induction Chemotherapy, Chemoradiotherapy, and a Novel Immunotherapy Agent, IMM-101. **Curēus**. 7:12 (2015) 1–8.

COVELER, Andrew L. *et al.* - Algenpantucel-L immunotherapy in pancreatic adenocarcinoma. **Immunotherapy**. 8:2 (2016) 117–125.

CRUZ, Maria Teresa; LOPES, Maria Celeste - **Células dendríticas**. In: Fundamentos de Imunologia. Lisboa: LIDEL, Edições Técnicas Lda., 2012. p. 171-194.

DEPARTMENT OF GASTROENTEROLOGICAL SURGERY, Tokyo Women's Medical University - **Clinical study of Dendritic Cell Vaccine in patients with Gastroenterological Cancer and Hepato-Biliary-Pancreatic Cancer**. [Em linha], [Acedido a 21 de junho de 2016]. Disponível em <http://apps.who.int/trialsearch/Trial2.aspx?TrialID=JPRN-UMIN000005820>

GABRILOVICH, Dmitry - **Immunotherapy of Cancer** [Em linha], [Acedido a 5 de maio de 2016]. Disponível em <http://www.merckmanuals.com/professional/hematology-and-oncology/tumor-immunology/immunotherapy-of-cancer>

MAGLIANO, Marina Pasca DI; LOGSDON, Craig D. - Roles for KRAS in pancreatic tumor development and progression. **Gastroenterology**. 144:6 (2013) 1220–1229.

HASHIMOTO, Yasushi; MURAKAMI, Yoshiaki; UEMURA, Kenichiro - Detection of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in tissue and pancreatic juice from pancreatic cancer. **Surgery**. 143:1 (2008) 113–125.

HERDRICH, Klaus; WEINBERGER, Heinz – **Selected Schedules in the Therapy of Malignant Tumors**. 16<sup>a</sup> Ed. [S.P.]: Baxter Oncology, 2011.

HUANG, Emina H.; KAUFMAN, Howard L. - CEA-based vaccines. **Expert Review of Vaccines**. 1:1 (2002) 49–63.

IPO PORTO - **Serviço de Oncologia Cirúrgica** [Em linha], [Acedido a 2 de junho de 2016]. Disponível em <http://www.ipoport.pt/servico/oncologia-cirurgica/>

ISABEL CORREIA TAVARES - **Células Dendríticas, a Esperança que está em nós** [Em linha], [Acedido a 25 janeiro de 2016]. Disponível em <http://revistafrontal.com/investigacao/opiniao-celulas-dendriticas-a-esperanca-que-esta-em-nos/>

ITAKURA, J. *et al.* - Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer correlates with local disease progression. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**. 3:8 (1997) 1309–1316.

JENKINS, Leo; MOFFITT, H. Le. - **Direct Tumor Injection KLV-4 Pulsed Dendritic Cells in Unresectable Pancreatic Cancer** [Em linha], [Acedido a 22 de junho de 2016]. Disponível em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT00868114>.

KAJIHARA, Mikio *et al.* - Advances in inducing adaptive immunity using cell-based cancer vaccines: Clinical applications in pancreatic cancer. **World Journal of Gastroenterology**. 22:18 (2016) 4446–4458.

KANG, Tae Heung *et al.* - Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor serves as adjuvant by activating dendritic cells through stimulation of TLR4. **Oncotarget**. 6:29 (2015) 27751–27762.

KARANDISH, Fataneh; MALLIK, Sanku - Biomarkers and Targeted Therapy in Pancreatic Cancer. **Biomarkers in cancer**. 8:SI (2016) 27–35.

KHORANA, Alok A. - **Improving the Care of Patients With Pancreatic Cancer: New Comprehensive Guidelines From ASCO** [Em linha], [Acedido a 28 de maio de 2016]. Disponível em <http://am.asco.org/improving-care-patients-pancreatic-cancer-new-comprehensive-guidelines-asco>

KIM, Han-Soo *et al.* - Identification of Pancreatic Cancer-Associated Tumor Antigen from HSP-Enriched Tumor Lysate-Pulsed Human Dendritic Cells. **Yonsei Med J** [http](http://www.ymj.org). 55:4 (2014) 1014–1026.

KIMURA, Kenjiro *et al.* - Antitumor effect of trastuzumab for pancreatic cancer with high HER-2 expression and enhancement of effect by combined therapy with gemcitabine. **Clinical Cancer Research**. 12:16 (2006) 4925–4932.

KOIDO, Shigeo - Dendritic-Tumor Fusion Cell-Based Cancer Vaccines. **International Journal of Molecular Sciences**. 17:6 (2016) 1–16.

KOIDO, Shigeo *et al.* - Current immunotherapeutic approaches in pancreatic cancer. **Clinical and Developmental Immunology**. 2011 (2011) 1–15.

KOIDO, Shigeo *et al.* - Immunotherapy for colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**. 19:46 (2013) 8531–8542.

KOTTEAS, Elias; SAIF, Muhammad Wasif; SYRIGOS, Konstantinos - Immunotherapy for pancreatic cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. 142:2 (2016) 1–11.

KOURIE, Hampig Raphael *et al.* - Is metastatic pancreatic cancer an untargetable malignancy? **World Journal of Gastrointestinal Oncology**. 8:3 (2016) 297–304.

KRŠKA, Zdeněk *et al.* - Pancreatic Cancer Diagnostics and Treatment – Current State. **Prague Medical Report**. 116:4 (2015) 253–267.

KUNK, Paul R. *et al.* - From bench to bedside a comprehensive review of pancreatic cancer immunotherapy. **Journal for immunotherapy of cancer**. 4:14 (2016) 1–12.

LEE, Hee Seung; PARK, Seung Woo - Systemic Chemotherapy in Advanced Pancreatic Cancer. **Gut and liver**. 10:3 (2016) 340–347.

LI, Min *et al.* - Pancreatic cancer. **Mol Cancer Ther**. 7:2 (2008) 286–296.

MAIA, Sara; CARDOSO, Ângelo A.- **Imunologia tumoral**. In: Fundamentos de Imunologia. Lisboa: LIDEL, Edições Técnicas Lda., 2012. ISBN: 978-972-757-856-6, p. 363–390.

MELO, Itamar - **Tratamento do câncer por imunoterapia ainda gera diversas incertezas - Vida - Zero Hora - Vida: Vida e Estilo - Zero Hora** [Em linha], [Acedido a 18 de junho de 2016]. Disponível em <http://zh.clicrbs.com.br/rs/vida-e-estilo/vida/noticia/2015/04/tratamento-do-cancer-por-imunoterapia-ainda-gera-diversas-incertezas-4732444.html>

NAGASAKI UNIVERSITY HOSPITAL - **Clinical trial of WTI and MUC1 peptide-pulsed dendritic cell vaccine for post-operative patients with pancreatic cancer or biliary cancer** [Em linha], [Acedido a 22 de junho de 2016]. Disponível em <http://apps.who.int/trialsearch/Trial2.aspx?TrialID=JPRN-UMIN000010388>

NATIONAL CANCER INSTITUTE - **Combination of Nab-Paclitaxel and Gemcitabine Improves Survival in Patients with Metastatic Pancreatic Cancer** [Em linha], [Acedido a 18 de maio de 2016]. Disponível em <http://www.cancer.gov/types/pancreatic/research/nab-paclitaxel-gemcitabine>

NERY, Isabel - **Cancro chega às redes sociais** [Em linha], [Acedido a 28 de janeiro de 2016]. Disponível em <http://visao.sapo.pt/iniciativas/visaosolidaria/2016-01-21-Cancro-chega-as-redes-sociais-l>

NGUYEN-PAHM, Thanh-Nhan *et al.* - Immunotherapy Using Dendritic Cells against Multiple Myeloma: How to Improve? **Journal of Immunology Research**. 2012 (2012) 1–14.

NICCOLAI, Elena *et al.* - What Is Recent in Pancreatic Cancer Immunotherapy? **BioMed Research International**. 2013 (2013) 1–14.

NORTHWEST BIOTHERAPEUTICS - **Safety and Efficacy Study of DCVax-Direct in Solid Tumors** [Em linha], [Acedido a 22 de junho de 2016]. Disponível em <https://clinicaltrials.gov/show/NCT01882946>

ODEGARD, Elin H. - **Dendritic Cell-Targeted Vaccinations: A Promising Immunotherapeutic Approach to Cancer Treatment**. [S.l.] : University Honors Theses, 2015. p.1–64.

OKAMOTO, Masato *et al.* - Dendritic cell-based vaccine for pancreatic cancer in Japan. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**. 7:1 (2016) 133–138.

OLIVEIRA, Tiago G.; BORGES, Olga; CRUZ, Maria T. - Imunoterapia anti-tumoral com células dendríticas. **Acta Farmacêutica Portuguesa**. 2:2 (2013) 45–60.

OWEN, Judy *et al.* - **Kuby IMMUNOLOGY**. 7<sup>a</sup> ed. New York: N.H. Freeman & Company, 2012. ISBN 9781429219198. p. 832.

PALUCKA, Karolina; BANCHEREAU, Jacques - Review Dendritic-Cell-Based Therapeutic Cancer Vaccines. **Immunity**. 39:1 (2013) 38–48.

PALUCKA, Karolina; BANCHEREAU, Jacques - Cancer immunotherapy via dendritic cells. **Nature reviews. Cancer**. 12:4 (2012) 265–277.

PAN, Sheng *et al.* - Quantitative proteomics investigation of pancreatic intraepithelial neoplasia. **Electrophoresis**. 30:7 (2009) 1132–1144.

PANCREATIC CANCER ACTION NETWORK - **Immunotherapy** [Em linha], [Acedido a 22 de junho de 2016]. Disponível em <https://www.pancan.org/facing-pancreatic-cancer/treatment/immunotherapy/>

PANICCIA, Alessandro *et al.* - Immunotherapy for pancreatic ductal adenocarcinoma: an overview of clinical trials. **Chinese Journal of Cancer Research**. 27:4 (2015) 376–391.

RAMAKRISHNAN, Rupal *et al.* - Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice. **Journal of Clinical Investigation**. 120:4 (2010) 1111–1124.

RODRIGUES, Márcia G. - **Vacina universal pode ser a cura para o cancro** [Em linha], [Acedido a 16 de junho de 2016]. Disponível em <http://visao.sapo.pt/actualidade/sociedade/2016-06-06-Vacina-universal-pode-ser-a-cura-para-o-cancro>

- RYAN, Bríd M.; DONOVAN, Norma O.; DUFFY, Michael J. - Survivin: A new target for anti-cancer therapy. **Cancer Treatment Reviews**. 35:7 (2009) 553–562.
- SALMAN, Bulent *et al.* - Vaccine therapy for pancreatic cancer. **Oncoimmunology**. 2:12 (2013) e26662–1 – e26662–8.
- SARKAR, Fazlul; BANERJEE, Sanjeev; LI, Yiwei - Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Prevention and Treatment. **Toxicol Appl Pharmacol**. 224:3 (2007) 326–336.
- SAYLOR, Matthew S. *et al.* - Initiation and preliminary evaluation of an oncology pharmacy training course for staff pharmacists. **Journal of Oncology Pharmacy Practice**. 22:4 (2015) 1–7.
- SCHOOL OF MEDICINE, Keio University - **Phase I pilot study of Wilms' tumor gene WTI peptide pulsed dendritic cell vaccination combined with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer** [Em linha], [Acedido a 22 de junho de 2016]. Disponível em <http://apps.who.int/trialsearch/Trial2.aspx?TrialID=JPRN-UMIN000004855>
- SCHUSTER, Manfred *et al.* - Cancer immunotherapy. **Biotechnology Journal**. 1:2 (2006) 138–147.
- SEICEAN, Andrada; PETRUSEL, Livia; SEICEAN, Radu - New targeted therapies in pancreatic cancer. **World Journal of Gastroenterology**. 21:20 (2015) 6127–6145.
- SILVA, Patrícia Raquel Lima - **Imunoterapia Tumoral com Células Dendríticas**. Porto: Universidade Fernando Pessoa, 2013.
- SINN, Marianne *et al.* - Perioperative treatment options in resectable pancreatic cancer - how to improve long-term survival. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**. 8:3 (2016) 248.
- SPADI, Rosella *et al.* - Current therapeutic strategies for advanced pancreatic cancer: A review for clinicians. **World journal of clinical oncology**. 7:1 (2016) 27–43.
- STEINMAN, Ralph M.; COHN, Zanvil A. - Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. Morphology, quantitations, tissue distribution. **J Exp Med**. 137:5 (1973) 1142–62.

SUZUKI, Shinya *et al.* - Chemotherapy regimen checks performed by pharmacists contribute to safe administration of chemotherapy. **Journal of Onco.** (2015) 1–8.

TAKAKURA, Kazuki; KOIDO, Shigeo - Direct therapeutic intervention for advanced pancreatic cancer. **World Journal of Clinical Oncology.** 6:6 (2015) 216–219.

TANEMURA, Masahiro *et al.* - Cancer immunotherapy for pancreatic cancer utilizing  $\alpha$ -gal epitope/natural anti-Gal antibody reaction. **World Journal of Gastroenterology.** 21:40 (2015) 11396–11410.

THE UNIVERSITY OF TOKYO HOSPITAL - **Heat Shock Protein 105 (HSP105) peptide-pulsed dendritic cell vaccination therapy for patients with advanced/recurrent cancer.** [Em linha], [Acedido a 22 de junho de 2016]. Disponível em <http://apps.who.int/trialsearch/Trial2.aspx?TrialID=JPRN-UMIN000006730>

TIMMERMAN, John M.; LEVY, Ronald - DENDRITIC CELL VACCINES FOR. **Annual Review of Medicine.** 50:1 (1999) 507–529.

TOKYO MEDICAL UNIVERSITY HOSPITAL - **Clinical study of immunotherapy for unresectable advanced pancreatic cancer.** [Em linha], [Acedido a 22 de junho de 2016]. Disponível em <http://apps.who.int/trialsearch/Trial2.aspx?TrialID=JPRN-UMIN000001135>

TORRES, Maria P. *et al.* - Mucin-based targeted pancreatic cancer therapy. **Current pharmaceutical design.** 18:17 (2012) 2472–2481

YOKOHAMA CITY UNIVERSITY, Gastroenterological Surgery - **Clinical trial evaluating dendritic cell vaccination as an adjuvant immunotherapy in patients with pancreatic cancer** [Em linha], [Acedido a 22 de junho de 2016]. Disponível em <http://apps.who.int/trialsearch/Trial2.aspx?TrialID=JPRN-UMIN000009994>

ZHANG, Lihong *et al.* - Clinical outcome of immunotherapy with dendritic cell vaccine and cytokine-induced killer cell therapy in hepatobiliary and pancreatic cancer. **Molecular and Clinical Oncology.** 4:1 (2015) 129–133.

ZISUH, Anutebeh Verdo; HAN, Tian-quan; ZHAN, Shen-dao - Expression of telomerase & its significance in the diagnosis of pancreatic cancer. **Indian J Med Res.** 135:1 (2012) 26–30.

ZITVOGEL, L. *et al.* - Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. **Nature Medicine.** 4:5 (1998) 594–600.

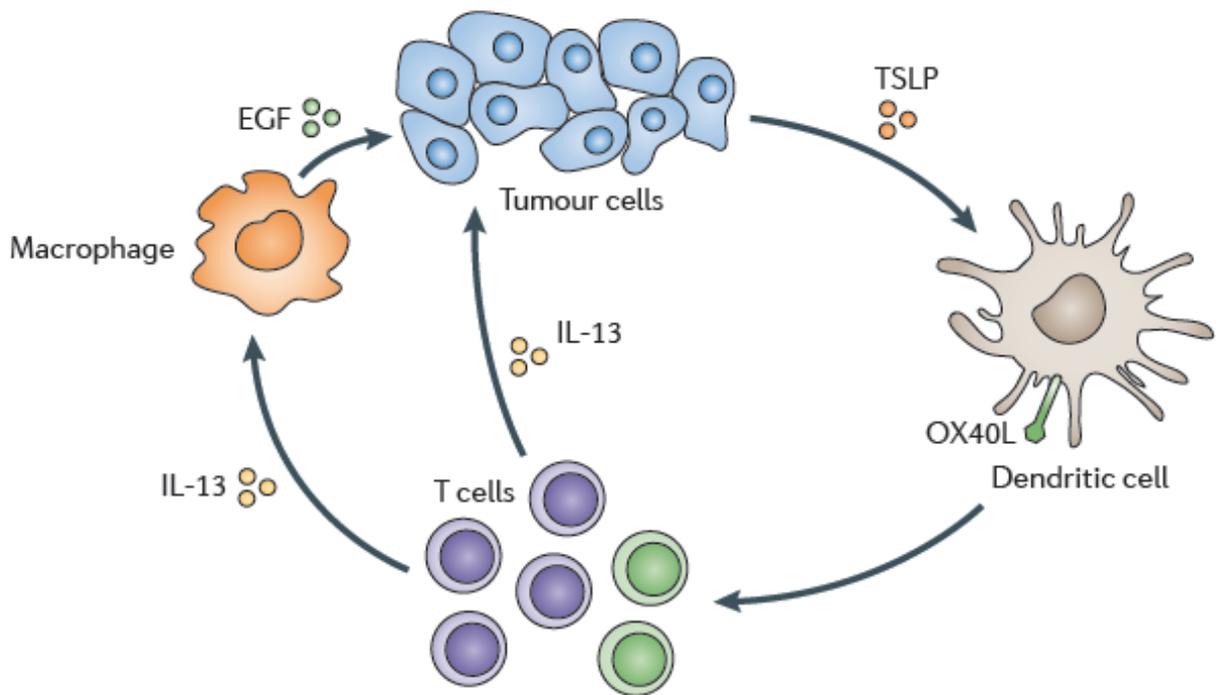
## Anexos

### Anexo I - Antígenos associados a PC e potenciais alvos para o desenvolvimento de vacinas anti-tumorais baseadas em DCs.

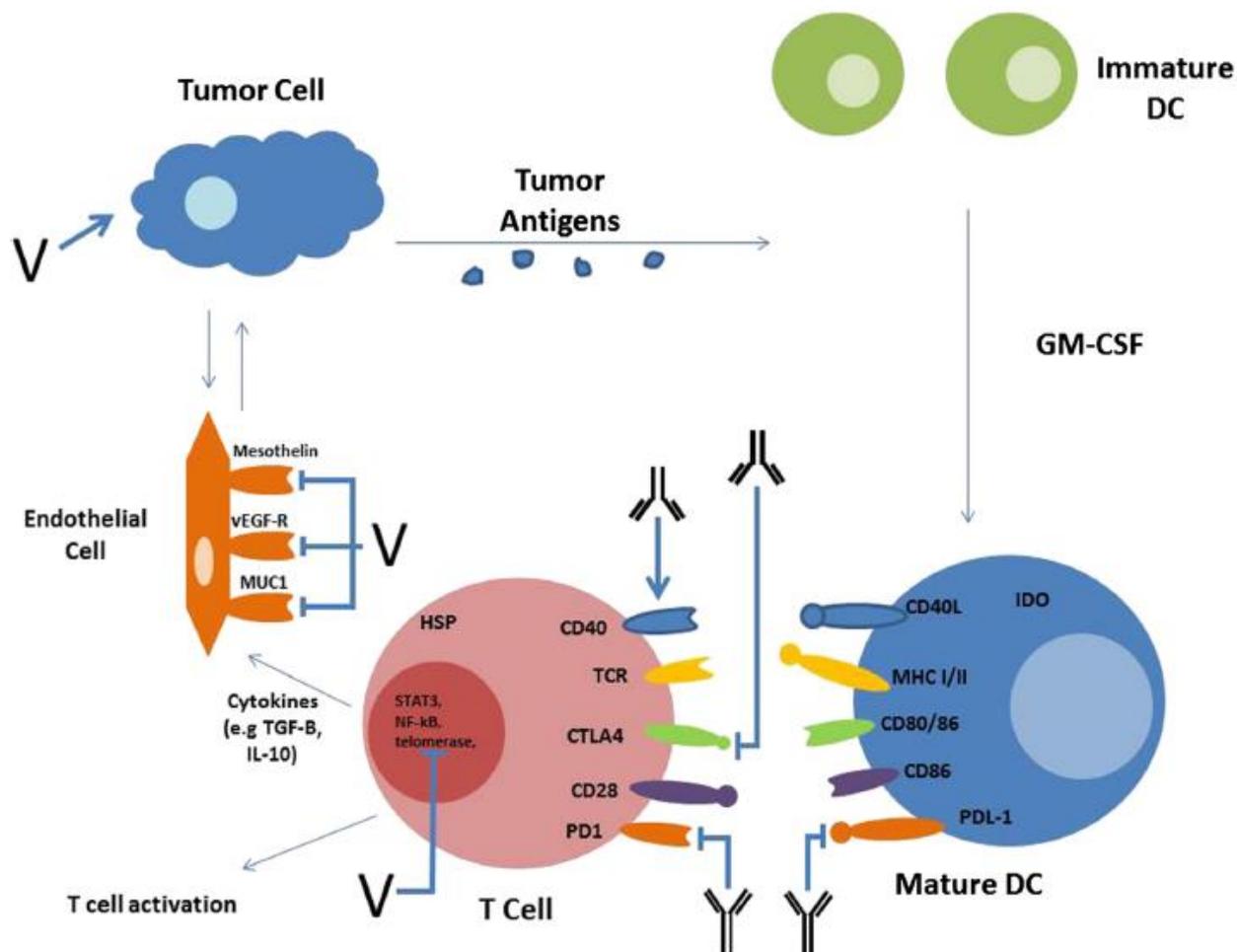
Antígeno	Localização	Expressão tumoral	Características/Funções	Referências
<b>CEA</b>	Superfície celular	Sobre-expressão	Glicoproteína, expressa fisiologicamente nas células mucosas. Funciona como molécula de adesão. Foi o primeiro antígeno tumoral a ser descrito.	Huang e Kaufman, 2002, Amedei, Niccolai e Prisco, 2014
<b>Her2-neu</b>	Transmembranar	Sobre-expressão	Codifica um recetor transmembranar de glicoproteína com atividade de tirosina cinase, encontra-se envolvido no crescimento e diferenciação celular.	Kimura et al, 2006, Amedei, Niccolai e Prisco, 2014
<b>MUC-1</b>	Transmembranar; superfície apical celular	Sobre-expressão	Proteína do tipo I glicosilada e polimórfica. Inibe as interações célula-célula e célula-estroma. Funciona como transdutor de sinal na progressão do cancro.	Torres et al, 2012, Amedei, Niccolai e Prisco, 2014
<b>WT1</b>	Superfície celular	Sobre-expressão	Altamente imunogénico, desencadeando respostas imunes humorais e celulares.	Paniccia et al, 2015
<b>P53</b>	Intracelular	Forma mutada	Supressor tumoral que regula o ciclo celular. Tem a capacidade de desencadear fenómenos de apoptose no caso de um dano no DNA ser irreparável.	Chen, Wang e El-deiry, 2010, Amedei, Niccolai e Prisco, 2014
<b>Survivina</b>	Intracelular	Sobre-expressão	Proteína membro da família IAP. Inibe a ativação da caspase e é encontrada na maior parte dos tumores humanos e tecido fetal. Encontra-se ausente nas células humanas normais.	Ryan, Donovan e Duffy, 2009, Amedei, Niccolai e Prisco, 2014
<b>K-Ras</b>	Intracelular	Forma mutada	GTPase importante para a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. Presente na maioria dos PCs. Foi associada ao PC à cerca de 24 anos.	Magliano, Di e Logsdon, 2013, Amedei, Niccolai e Prisco, 2014
<b>Telomerase</b>	Intracelular	Sobre-expressão	Ribonucleoproteína que catalisa a síntese de DNA telomérico. Necessária para a estabilidade genómica. hTERT é a subunidade catalítica. Protege a célula da apoptose.	Paniccia et al, 2015, Zisuh, Han e Zhan, 2012, Amedei, Niccolai e Prisco, 2014
<b>VEGFR-2</b>	Transmembranar	Sobre-expressão	Tirosina cinase e membro da família do fator de crescimento derivado de plaquetas. Altamente expresso nos tecidos submetidos a um processo de neovascularização induzida por tumor. Encontra-se ausente nos vasos sanguíneos normais.	Paniccia et al, 2015, Itakura et al, 1997, Amedei, Niccolai e Prisco, 2014
<b>Mesotelina</b>	Superfície celular	Sobre-expressão	Glicoproteína existente na mucosa da pleura, peritoneu e pericárdio a baixos níveis. Participa na adesão celular e tem um papel importante na progressão metastática.	Li et al, 2008, Paniccia et al, 2015, Amedei, Niccolai e Prisco, 2014
<b><math>\alpha</math>-enolase</b>	Superfície celular; intracelular	Sobre-expressão	Enzima glicolítica que atua como recetor de plasminogénio. Foi sugerido ter um papel na progressão tumoral e metastática.	Amedei, Niccolai e Prisco, 2014
<b><math>\alpha</math>-gal</b>	Superfície celular	Expressão	A células humanas não apresentam este epítipo e, em contraste, apresentam anticorpo anti-Gal no soro. A expressão deste epítipo pode modificar a tumorigenicidade das células.	Aubert et al, 2005, Paniccia et al, 2015
<b>EGFR</b>	Transmembranar	Sobre-expressão	Recetor de glicoproteína que tem a capacidade de induzir a proliferação e neovascularização tumoral.	Amedei, Niccolai e Prisco, 2014
<b>KIF20A (RAB6KIFL)</b>	Intracelular	Sobre-expressão	Proteína motora da superfamília das cinesinas que tem um papel importante intracelular no tráfego de moléculas e organelos durante o crescimento de PC.	Paniccia et al, 2015

## Anexo II - Interação de DCs com células tumorais: modulação da maturação de DCs.

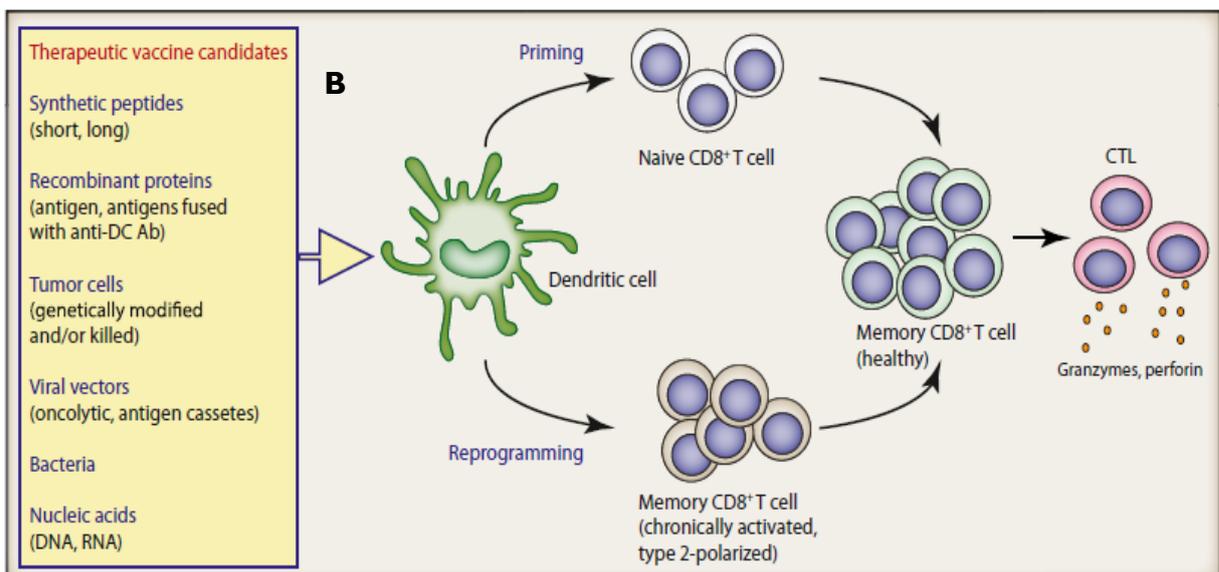
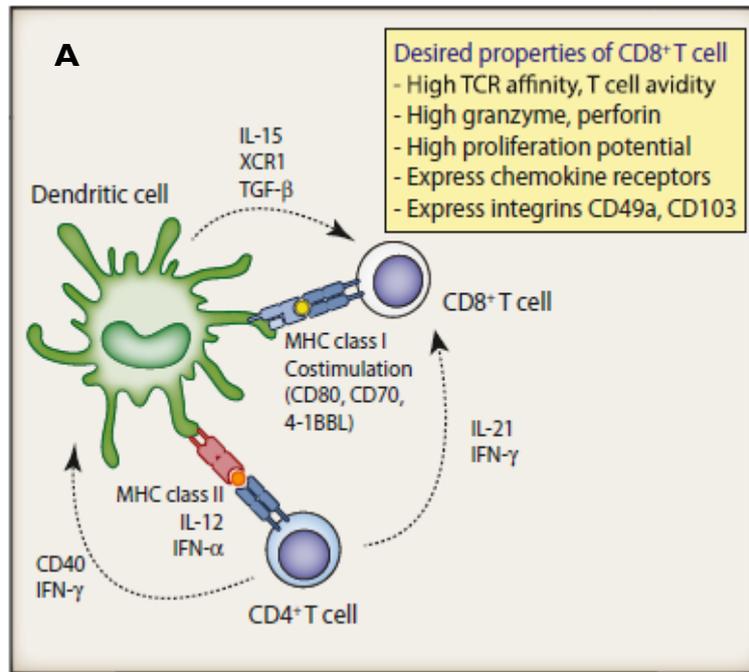
As células cancerosas atraem células dendríticas imaturas, através de quimiocinas como CCL20 e CXCL12. As DCs podem ser expostas a fatores derivados do cancro como a linfopietina do estroma do timo (TSLP), que distorce o seu amadurecimento na direção de Th2 do tipo inflamatório. Estas, por sua vez, promovem o desenvolvimento do tumor diretamente ou através de macrófagos (Fonte: Palucka e Banchereau, 2012).



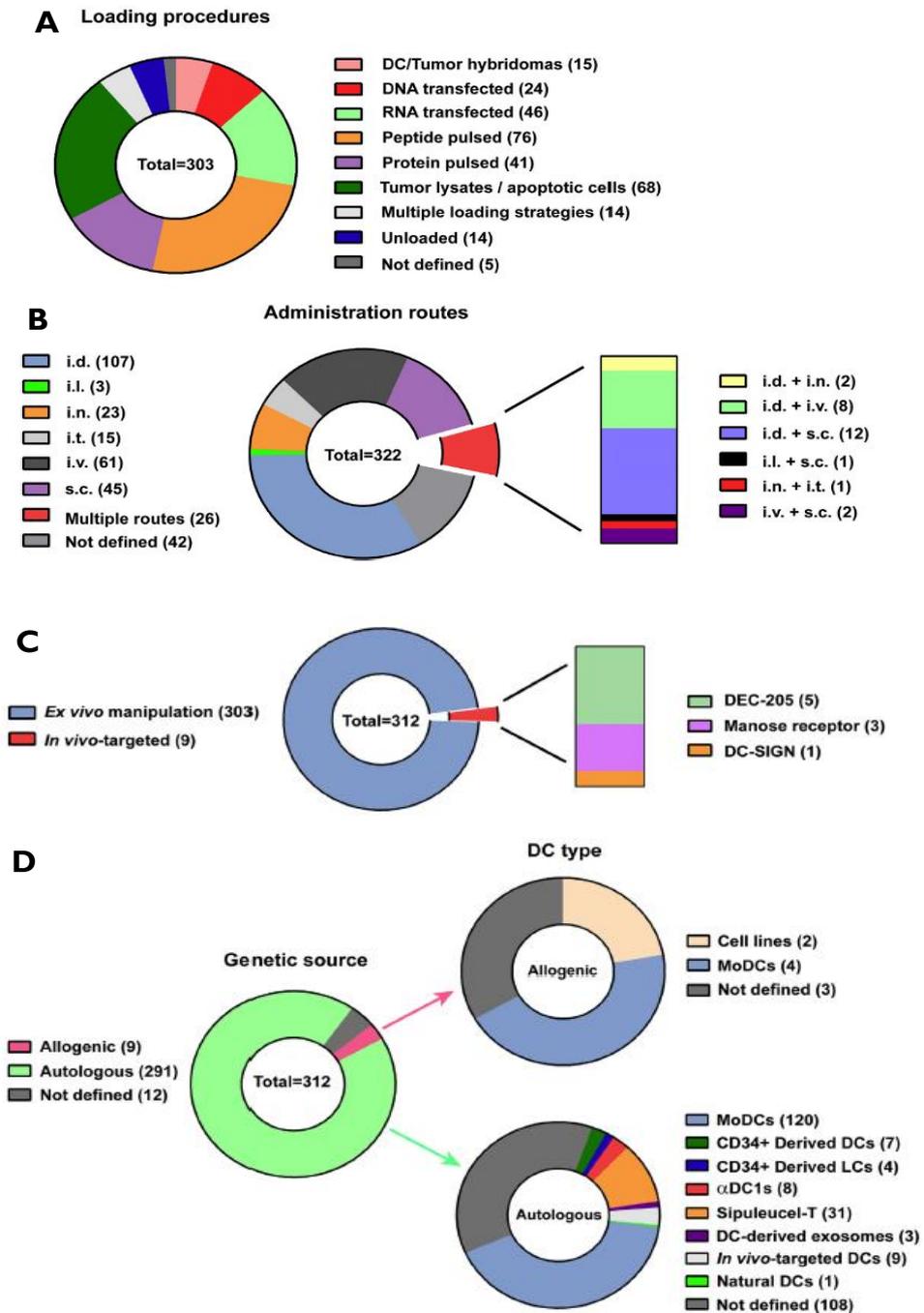
**Anexo III - Imunoterapia anti-tumoral baseada em DCs (Fonte:Koido, 2016).**



**Anexo IV - A:** O papel central desempenhado pelas DCs na vacinação; **B:** Atuação de vacinas terapêuticas de modo a gerar imunidade protetora de células  $TC8^+$  (Adaptado de: Palucka e Banchereau, 2013).



**Anexo V - A:** Ensaios clínicos com abordagens que exploram diretamente DCs: manipulação *ex vivo*, seguida de reinfusão, e *in vivo DC targeting*; **B:** Distribuição de frequências de ensaios clínicos por fonte genética de DC (autólogas ou alogênicas) e tipo de DC; **C:** Distribuição de frequências de ensaios clínicos por estratégias de carregamento de antígenos; **D:** Vias de administração para DCs manipuladas *ex vivo* (Adaptado de: Constantino *et al.*, 2015)).



**Anexo VI - Vantagens e desvantagens de diferentes metodologias usadas na produção de vacinas anti-tumorais baseadas em DCs (Fonte: Constantino *et al.*, 2015).**

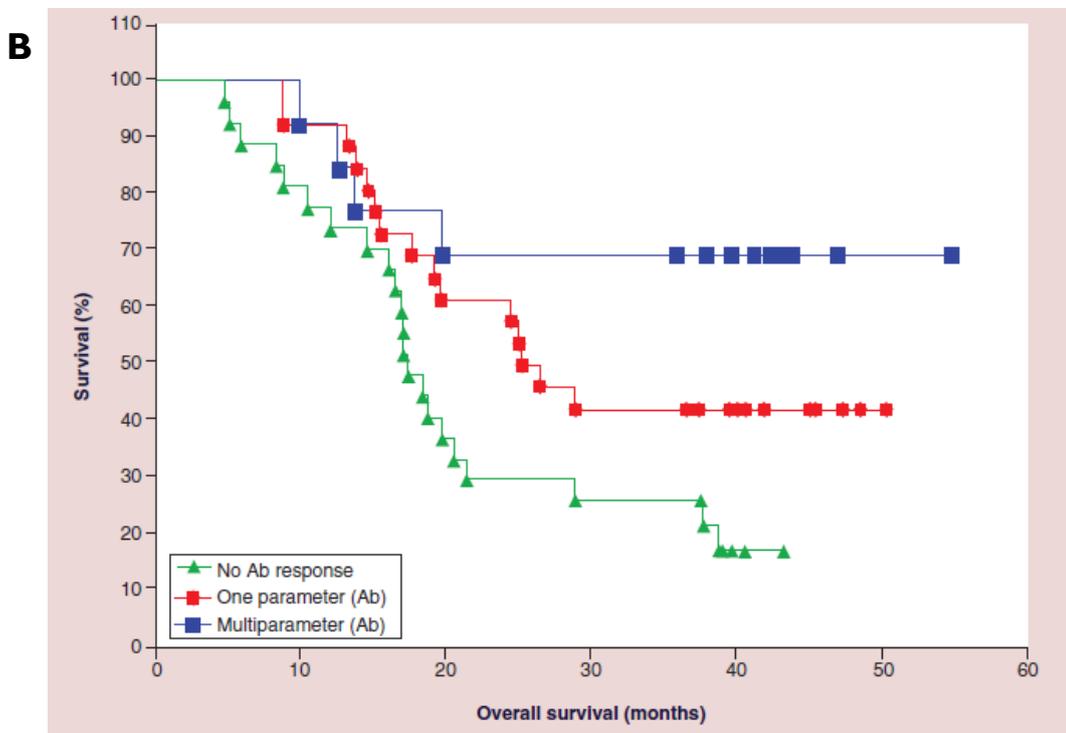
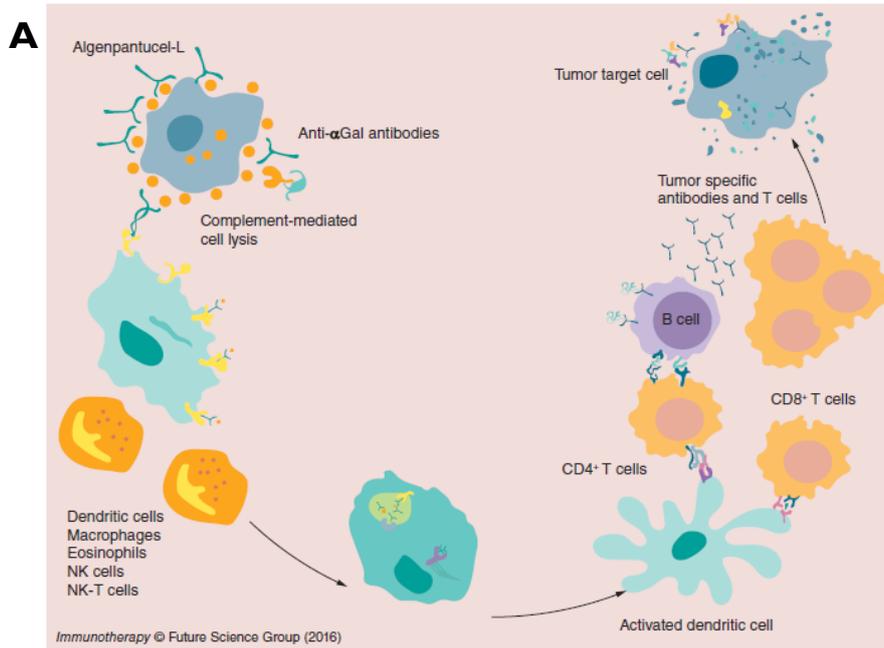
	<b>Advantages</b>	<b>Drawbacks</b>
<b>Ex vivo DC manipulation</b>		
<i>Genetic source</i>		
Autologous	- No risk of graft-vs-host disease	- DCs from cancer-bearing patients are frequently dysfunctional <sup>69-74</sup>
Allogenic	- Allogenic HLA molecules represent potent immunogenic signals <sup>67,68</sup>	- Survival of injected DCs may be shortened by T-cell-mediated rejection
<i>DC source</i>		
CD14 <sup>+</sup> monocytes	- Abundant source: CD14 <sup>+</sup> monocytes represent 10% of PBMCs	- CD14 <sup>+</sup> -derived DCs (MoDCs) are not as efficient as other DC subsets in eliciting CTL responses
CD34 <sup>+</sup> hematopoietic progenitors	- CD34 <sup>+</sup> -derived DCs stimulate more effective CTL responses than MoDCs <sup>75,76</sup>	- Limited number: represent 0.1% of PBMCs
Natural occurring DCs	- Low doses of plasmacytoid DCs effectively induce CD4 <sup>+</sup> and CD8 <sup>+</sup> T-cell responses <sup>77</sup>	- Limited number: circulating DCs represent less than 1% of PBMCs
iPSC-derived DCs	- iPSCs may be continuously expanded in vitro <sup>153</sup> - DCs can be tailored to a desired phenotype (eg, CD11c <sup>+</sup> CD141 <sup>+</sup> XCR1 <sup>+</sup> DCs) <sup>154</sup>	- Laborious and expensive - Production according to GMP requirements is technically challenging
<i>Antigens and loading procedures</i>		
Peptide pulsing	- Peptides are synthesized and purified at low cost - Enables direct monitoring of T-cell responses - Short peptides are directly loaded into MHC molecules - Synthetic peptides allow for modifications	- Limited number of known immunogenic TAAs - HLA restriction - Peptides with low affinity for MHC may be poorly immunogenic
Protein pulsing	- Full-length proteins may present more epitopes for immune recognition - Prolonged antigen presentation	- Limited number of known immunogenic TAAs - Propensity of proteins to be targeted for MHC-II
Tumor lysates	- Encompasses multiple TAAs (even those not yet characterized)	- Dependence on the availability of tumor cells - Immunologic responses more complex to monitor
Tumor apoptotic bodies	- Encompasses multiple TAAs (even those not yet characterized)	- Dependence on the availability of tumor cells - Immunologic responses more complex to monitor
RNA transfection	- Tumor mRNA may be amplified as needed - Possibility to introduce mRNAs coding for immunostimulatory proteins	- Reagents and procedures to transfect DCs may affect their viability - Limited stability and short lifespan of mRNA
Viral transduction	- The vector may intrinsically activate DCs <sup>95</sup> - Possibility to introduce genes coding for cytokines and costimulatory molecules <sup>94</sup>	- Immune responses to vector antigens may overwhelm those for tumor antigens <sup>95</sup> - Viral vectors may perturb DC functions <sup>96</sup>
DC-tumor cell hybrids	- Encompasses multiple TAAs - Antigen presentation is maintained for days	- Low expression of IL-12p70 and costimulatory molecules <sup>97</sup>
<i>DC maturation protocols</i>		
TNF- $\alpha$ + IL-1 $\beta$ + IL-6 + PGE2	- PGE2 enhances CCR7 expression and DC migratory capacities <sup>106</sup>	- PGE2 may reduce the capacity of DCs to produce IL-12p70 <sup>107</sup>
TNF- $\alpha$ + IL-1 $\beta$ + IFN- $\alpha$ + IFN- $\gamma$ + polyinosinic: polycytidylic acid	- Efficiently induces IL-12p70 - $\alpha$ DC1s elicit potent CTL responses <sup>102,109-111</sup>	- $\alpha$ DC1s may have reduced migratory capacities compared with standard matured DCs
<i>Routes of administration</i>		
Intravenous	- Induces antigen-specific humoral responses more efficiently than i.d. and i.n. routes <sup>117</sup>	- Injected DCs preferentially accumulate in the spleen and liver
Intradermal/subcutaneous	- Elicit strong specific antitumor Th1 and CTL responses	- Just 1%-5% of injected DCs reach the peripheral lymph nodes <sup>117,118</sup>

(Continued)

	Advantages	Drawbacks
Intranodal	- Substantially more DCs reach the T-cell areas in lymph nodes <sup>118,120</sup>	- Technically exigent
Intratumoral	- May delay and reverse the tolerization of tumor-infiltrating effector T cells <sup>124</sup>	- Great variability between patients
<b>In vivo DC targeting</b>		- Technically exigent
Cancer antigens fused to monoclonal antibodies targeting DC surface receptors	- Bypasses the expensive and laborious ex vivo DC generation process	- Associated with high morbidity
	- Allows targeting specific DC subsets <sup>128-130</sup>	- Limited to known TAAs
		- It requires the coadministration of adjuvants <sup>130</sup>
		- Targeted receptor must be unambiguously expressed
<b>Other strategies directly/indirectly involving DCs</b>		
Nontargeted antigen-based vaccines	- Easier to produce	- Limited to known TAAs
	- Stable in many storage conditions	- Immune responses may be transient and/or of low magnitude
	- Induce CD4 <sup>+</sup> and CD8 <sup>+</sup> T-cell responses	- Prolonged GM-CSF production by tumor cells may cause immune tolerance <sup>140</sup>
GM-CSF-secreting tumor cells	- Potentiates TAAs presentation by endogenous DCs <sup>138</sup>	- Dependence on the availability of tumor cells
	- Consistent induction of cellular and humoral antitumor immune responses <sup>137-139</sup>	- Immunologic responses more complex to monitor
Implantable DC-recruiting scaffolds	- Bypasses the expensive and laborious ex vivo DC generation process	- The design of biocompatible polymeric scaffolds incorporating functional proteins (chemokines) is technically challenging
	- The approach takes advantage of endogenous DCs	- Until present the results are only from preclinical studies
	- Preclinical studies show induction of specific and effective antitumor immunity <sup>141-143</sup>	- Existing clinical data indicate that T-cell responses elicited by Dex are limited <sup>149,150</sup>
Dex	- Dex are able to elicit CD4 <sup>+</sup> and CD8 <sup>+</sup> T-cell responses <sup>144-147</sup>	- Requires large quantities of ex vivo generated DCs for exosome production
	- Exosomes may carry additional mRNAs and miRNAs to enhance immune responses	
	- Production under GMP conditions is well defined	

Abbreviations: CTL, cytotoxic T cell; DC, dendritic cell; Dex, dendritic cell-derived exosomes; GMP, good manufacturing procedures; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; HLA, human leukocyte antigen; IFN, interferon; IL, interleukin; iPSC, induced pluripotent stem cell; MHC, major histocompatibility complex; MoDC, monocyte-derived dendritic cells; mRNA, messenger RNA; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PGE2, prostaglandin E2; TAA, tumor-associated antigen; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ .

**Anexo VII - A:** Mecanismo de ação proposto para a imunoterapia de algenpantucel-L; **B:** Aumento de anticorpos após algenpantucel-L correlacionado com o aumento da sobrevida (Adaptado de: Coveler et al 2016).



**Anexo VIII - Ensaios clínicos de vacinas anti-tumorais à base de DCs em doentes com PC (Adaptado de: Kajihara *et al.*, 2016).**

Cell-based cancer vaccines	Targets	Vaccines	Phase	Patients	Results
Dendritic cells (DCs)	MUC1	DCs loaded with MUC1 peptide	Phase I / II	12 pancreatic or biliary cancer patients following surgical resection	These patients have been followed for more than 4 yr after vaccination, and 4 of them were alive without recurrence.
			Phase I	16 patients with pancreatic cancer	2 of 15 patients with resected PDA were alive and disease free at 32 and 61 mo.
			Phase I	7 patients with pancreatic cancer	These patients showed MUC1-specific immune responses; however, there was no significant clinical benefit.
	WT1	DCs transfected with MUC1 cDNA	Phase I / II	10 patients with pancreatic cancer	MUC1 specific immune responses were observed in 4 of 10 patients.
			Retrospective analysis	49 patients with pancreatic cancer refractory to standard treatment	The median survival time from vaccines was 360 d. Erythema reaction at the vaccination site was a prognostic factor for a significant survival benefit.
		DCs loaded with MHC class I restricted WT1 peptides	Retrospective analysis	255 patients with pancreatic cancer refractory to standard treatment	The median survival time from diagnosis was 16.5 mo. Erythema reaction at the vaccination site was a prognostic factor for a significant survival benefit.
			Phase I	10 patients with pancreatic cancer	The therapy was feasible, tolerable and effective in PDA patients without liver metastases.
	hTERT	DCs transfected with hTERT mRNA	Phase I	7 patients with pancreatic cancer	WT1 peptide-specific delayed-type hypersensitivity (DTH) was detected in 4 of 7 patients with PDA vaccinated with DC/WT1-I/ II and in 0 of 3 patients with PDA vaccinated with DC/WT1-I or DC/WT1-II.
			Phase I	3 patients with resected pancreatic cancer following neoadjuvant vaccine therapy	All 3 PDA patients with strong WT1-specific DTH reactions had a median OS of 717 d. A patient with multiple liver metastases has remained alive for over 1000 d and received more than 71 vaccinations.
			Phase I	3 patients with pancreatic cancer	Vaccination was associated with induction of strong immune responses to multiple hTERT epitopes. The patient had been vaccinated with DC/hTERT mRNA alone for 3 yr and resulted in no evidence of active disease.
CEA	DCs transfected with an adenovirus encoding IL-12	Phase I	3 patients with pancreatic cancer	All 3 PDA patients showed injection site reactivity and remained alive without recurrence at more than 2.5 yr from the original diagnosis	
		Phase I	3 patients with pancreatic cancer	Intratumoral DC injections were guided by ultrasound. Vaccines induced a significantly increased infiltration of CD8+ T cells in some patients. A partial response was observed in 1 of 3 patients.	
Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)	K-ras	penicillin-killed and lyophilized preparations of a low virulence strain (Su) of <i>Streptococcus pyogenes</i> (OK-432)-activated DCs and CD3-stimulated LAK cells irradiated PBMCs were used as antigen-presenting cells and loaded with K-ras peptide	Phase I	5 patients with pancreatic cancer	Intratumoral injection of OK432-activated DCs, followed by intravenous infusion of CD3-stimulated LAK cells. One patient had a partial response and 2 had stable disease for over 6 mo. The median OS was 478 d.
			Phase I	9 patients with pancreatic cancer	Only one patient showed a positive cellular immune response. The worse prognosis of PDA patients on this immunization protocol using PBMCs as APCs may be associated with impaired induction of an antitumor immune responses.

**Anexo IX** - Estratégias de combinação para maximizar a eficácia da imunoterapia à base de DCs e o seu subsequente mecanismo de ação. As terapias anti-tumorais baseadas em DCs procuram explorar a capacidade intrínseca das DCs para: **(A)** estimular as células efetoras imunes anti-tumorais, como os linfócitos T citotóxicos específicos de TAAs e células NK, **(B)** inverter a imunossupressão associada ao tumor, **(C)** para reduzir a carga tumoral e aumentar a suscetibilidade imune das células tumorais (Adaptado de: Palucka e Banchereau, 2013).

