

Marlise Barbosa Correia

# Vacinas baseadas em Células Dendríticas na Esclerose Múltipla

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

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Marlise Barbosa Correia, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009009817, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular 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 deste Relatório, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 11 de julho de 2014

---

(Marlise Barbosa Correia)

**A Tutora,**

---

*(Professora Doutora Maria Teresa Teixeira Cruz Rosete)*

**A Aluna,**

---

*(Marlise Barbosa Correia)*

## **AGRADECIMENTOS**

*À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pelo contributo fundamental para a minha formação profissional.*

*À Professora Doutora Maria Teresa Teixeira Cruz Rosete, pela sua valiosa orientação.*

*À minha família, por creditarem em mim e estarem sempre presentes.*

*Aos meus amigos, por todos os momentos partilhados.*

*A Coimbra, por tudo.*

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	2
ABREVIATURAS.....	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
I. INTRODUÇÃO.....	6
II. CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	7
2.1 Origem e diferenciação.....	7
2.2 Distribuição e classificação.....	7
2.3 Reconhecimento de antígenos.....	8
2.4 Processamento de antígenos.....	9
2.5 Maturação das DCs e apresentação de antígenos às células T.....	10
2.6 Indução de Imunidade e Tolerância.....	11
2.6.1 O papel das DCs em doenças autoimunes.....	12
III. ESCLEROSE MÚLTIPLA.....	12
3.1 Etiologia.....	13
3.2 Diagnóstico.....	14
3.3 Diferentes tipos de MS.....	14
3.3.1 Surto-Remissão ou Recorrente-Recidente (RRMS).....	14
3.3.2 Secundária Progressiva (SPMS).....	14
3.3.3 Primária Progressiva (PPMS).....	14
3.3.4 Benigna.....	15
3.4 Papel das DCs na patogênese da MS.....	15
3.5 A terapia ideal em MS.....	16
IV. VACINAS TOLEROGÉNICAS EM MS.....	17
4.1 O "mimetismo molecular".....	17
4.2 Mecanismo de ação proposto para as vacinas tolerogénicas.....	18
V. SITUAÇÃO ATUAL E ABORDAGENS MAIS PROMISSORAS.....	19
5.1 Origem e protocolos de diferenciação.....	19
5.2 Antígenos utilizados na indução de tolerância específica.....	20
5.3 Identificação do período propício para a vacinação.....	21
5.4 Número e frequência de administração.....	21
5.5 Via de administração.....	21
5.6 Adjuvantes.....	22
5.7 Avaliação e monitorização do efeito biológico terapêutico.....	22
VI. CONCLUSÃO.....	23
VII. BIBLIOGRAFIA.....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1   CÉLULAS DENDRÍTICAS .....	8
FIGURA 2   PROCESSAMENTO E APRESENTAÇÃO DE ANTIGÉNIOS POR MHCs .....	9
FIGURA 3   ESQUEMA REPRESENTATIVO DA APRESENTAÇÃO DE ANTIGÉNIOS .....	11
FIGURA 4   PAPEL POTENCIAL DAS DCs NA RESPOSTA DAS CÉLULAS T AUTO-REATIVAS.....	12
FIGURA 5   DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DA MS (DADOS DE 2013) .....	13
FIGURA 6   PROGRESSÃO DOS VÁRIOS TIPOS DA MS. ....	15
FIGURA 7   PAPEL DAS DCs NA PATOGÊNESE DA MS. ....	16
FIGURA 8   VACINAÇÃO COM TOLDCs.....	17
FIGURA 9   MODELO HIPOTÉTICO DE AÇÃO DAS VACINAS TOLEROGÉNICAS. ....	18

## ABREVIATURAS

- APCs** - Células apresentadoras de antígeno
- BBB** - Barreira endotelial hemato-encefálica
- cDCs** - Células dendríticas convencionais ou clássicas
- CTL** - Linfócitos T citotóxicos
- DAMPs** - Padrões moleculares associados a dano
- DCs** - Células dendríticas
- EAE** - Encefalomielite autoimune experimental
- EDC** - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodimida
- Flt3** - *Fms-like tyrosine kinase 3*
- HLA** - Antígeno leucocitário humano
- IFN- $\alpha/\beta$**  - Interferão tipo I
- IL** - Interleucina
- LCR** - Líquido cefalorraquidiano
- MBP** - Proteína básica de mielina
- MHC** - Complexo *major* de histocompatibilidade
- MOG** - Glicoproteína de mielina de oligodendrócitos
- MS** - Esclerose múltipla
- NK** - Linfócitos T *natural killer*
- PAMPs** - Padrões moleculares associados a agentes patogénicos
- PBMCs** - Células mononucleares do sangue periférico
- pDCs** - Células dendríticas plasmocitoides
- PGE2** - Prostaglandina E2
- PLP** - Proteína de proteólípido
- PPMS** - Esclerose múltipla primária progressiva
- PRRs** - Recetores de reconhecimento de padrões
- RRMS** - Esclerose múltipla surto-remissão ou remitente- recorrente
- SNC** - Sistema nervoso central
- SPMS** - Esclerose múltipla secundária progressiva
- TAP** - Transportador associado ao processamento de antígenos
- TGF- $\beta$**  - Fator de transformação do crescimento  $\beta$
- Th** - Linfócitos T auxiliares
- TLRs** - Recetores *Toll-like*
- TNF** - Fator de necrose tumoral
- toIDCs** - Células dendríticas tolerogénicas
- Treg** - Linfócitos T reguladores

## RESUMO

Doenças autoimunes, como a esclerose múltipla (MS), resultam de uma tolerância imunitária desequilibrada. As células dendríticas (DCs) são elementos fundamentais para iniciar a imunidade (DCs imunogénicas) e regular as respostas imunes (DCs tolerogénicas (tolDCs)). As terapias com tolDCs são altamente direcionadas e modificam apenas as respostas inflamatórias auto-reativas. As vacinas tolerogénicas representam, por isso, uma nova classe de vacinas concebidas para reestabelecer a tolerância imunológica e reverter doenças autoimunes. Esta terapia induz a longo prazo uma memória inibitória que bloqueia as respostas das células T auto-reativas através da perda de células T efectoras e ganho de células T reguladoras.

Foram realizados alguns avanços significativos na geração de vacinas tolerogénicas que inibem a encefalomielite autoimune experimental, o modelo animal da MS, em estudos pré-clínicos. No entanto, diversos procedimentos necessitam ainda de otimização e validação antes desta terapêutica ter aplicabilidade clínica.

**Palavras-chave:** doença autoimune, esclerose múltipla, células dendríticas, vacina, encefalomielite autoimune experimental.



## ABSTRACT

Autoimmune diseases, like multiple sclerosis (MS), are the result of an imbalanced immune tolerance. Dendritic cells (DCs) are key players in both initiating immunity (immunogenic DCs) and regulating immune responses (tolerogenic DCs (toIDCs)). Therapies with toIDCs are highly targeted and modify only the autoreactive inflammatory responses. Tolerogenic vaccines represent therefore a new class of vaccine designed to re-establish immunological tolerance and thereby reverse autoimmune disease. This therapy induces long-term, antigen specific, inhibitory memory that blocks auto-reactive T cell responses via loss of effector T cells and gain of regulatory T cell function.

Some substantial advances have been realized in the generation of tolerogenic vaccines that inhibit experimental autoimmune encephalomyelitis, the animal model of MS, in preclinical studies. However, many procedures require optimization and validation before this therapy have clinical applicability.

**Keywords:** autoimmune disease, multiple sclerosis, dendritic cells, vaccine, experimental autoimmune encephalomyelitis.

## I. INTRODUÇÃO

A resposta imune inata e a resposta imune adaptativa em doenças neurodegenerativas tornaram-se recentemente um foco de intensa investigação e discussão.<sup>(1)</sup>

Três décadas atrás, num estudo pioneiro, DCs transferidas de ratos portadores de uma inflamação neural induzida eram capazes de promover a patologia em ratos saudáveis, mostrando assim o seu potencial extraordinário como células apresentadoras de antígenos (APCs). Desde então, vários estudos têm demonstrado o envolvimento crucial das DCs em praticamente todos os aspetos da imunidade.<sup>(2)</sup>

Em 2011, Ralph Steinman foi premiado com o Prémio Nobel da Medicina e Fisiologia pelo seu contributo na descoberta das DCs e do papel que têm na iniciação da resposta imune adaptativa.<sup>(2)</sup> Por outro lado, as DCs são também componentes essenciais na regulação da resposta imune. Quando o antígeno é apresentado num contexto de sinais de perigo, ocorre ativação dos linfócitos e desencadeia-se a imunidade. Na ausência de um sinal de perigo, a apresentação de auto-antígenos pelas DCs aos linfócitos T pode inibir a ativação de linfócitos T auxiliares (Th) e induzir linfócitos T reguladores (Treg), o que se traduz em tolerância. A esclerose múltipla (MS), tal como outras doenças autoimunes, é o resultado de um desequilíbrio na tolerância imunológica.<sup>(2, 3)</sup>

A maioria dos fármacos usados atualmente para o tratamento da MS têm como alvo as respostas imunes, no entanto não são seletivos para as células T auto-reativas. Apesar de serem eficazes em alguns casos, não é a estratégia ideal para o tratamento da doença. O ideal seria restaurar seletivamente a tolerância dos auto-antígenos, deixando o sistema imunológico saudável intacto.<sup>(4)</sup> As tolDCs são, por isso, alvos ideais para o tratamento da MS, uma vez que modificam apenas as respostas inflamatórias auto-reativas.<sup>(5)</sup>

Alguns estudos pré-clínicos realizaram avanços significativos na produção de vacinas tolerogénicas que demonstraram inibir a encefalomielite autoimune experimental (EAE), o modelo animal de MS. Estes estudos podem vir a ser um prelúdio de vacinas tolerogénicas com benefícios terapêuticos na MS.<sup>(5)</sup>

Esta monografia incide sobre os conceitos atuais e perspetivas futuras da vacinação tolerogénica para a MS, assim como nos principais desafios para a sua aplicação clínica. Neste âmbito, fazemos também uma breve referência à imunobiologia das DCs e à fisiopatologia da MS.

## II. CÉLULAS DENDRÍTICAS

### 2.1 Origem e diferenciação

A origem das DCs ainda está pouco definida, no entanto sabe-se que são produzidas na medula óssea a partir de células estaminais hematopoiéticas. Inicialmente, pela sua distribuição, morfologia, fenótipo, atividade enzimática e capacidade fagocítica semelhantes a monócitos e macrófagos, as DCs foram consideradas como pertencentes à linhagem mieloide. No entanto, vários estudos em ratinhos e humanos demonstraram a existência de DCs com proveniência da linhagem linfoide. Recentemente, evidenciou-se que tanto os precursores linfoides como os mieloides que expressem *Fms-like tyrosine kinase 3* (Flt3) possuem a capacidade de se diferenciar em todos os tipos de DCs.<sup>(6, 7)</sup>

### 2.2 Distribuição e classificação

Os vários tipos de DCs estão classificados com base nas características específicas que apresentam, nomeadamente a expressão de marcadores de superfície, a localização no organismo, as funções específicas que desempenham e ainda a diversidade dos estímulos inflamatórios e infecciosos que induzem a diferenciação.<sup>(6)</sup>

A enorme heterogeneidade apresentada pelas DCs torna a sua classificação bastante complexa. No entanto, genericamente, as DCs, são agrupadas em duas populações principais designadas por:<sup>(2, 6, 7, 8)</sup>

- DC plasmocitoides (pDCs)
- DC convencionais ou clássicas (cDCs)

As pDCs localizam-se principalmente nos órgãos linfoides e no sangue, e desempenham um papel crucial na imunidade inata por terem a capacidade de produzir elevadas quantidades de interferão tipo I  $\alpha$  e  $\beta$  (INF- $\alpha/\beta$ ), após uma infeção viral ou ativação por meio de recetores *Toll-like* (TLRs), como o TLR7 e o TLR9. São também importantes na resposta imune adaptativa, uma vez que têm capacidade para induzir respostas Th1, Th2, assim como Treg. Além disso, são capazes de realizar apresentação cruzada (*cross-presentation*) de antígenos acoplados ao complexo *major* de histocompatibilidade classe I (MHC-I).<sup>(6, 7, 8, 9)</sup>

Por outro lado, as cDCs são de linhagem mieloide e encontram-se nos tecidos e sangue periférico, estando envolvidas no reconhecimento de estruturas bacterianas e na produção de citocinas pró-inflamatórias, tal como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ),

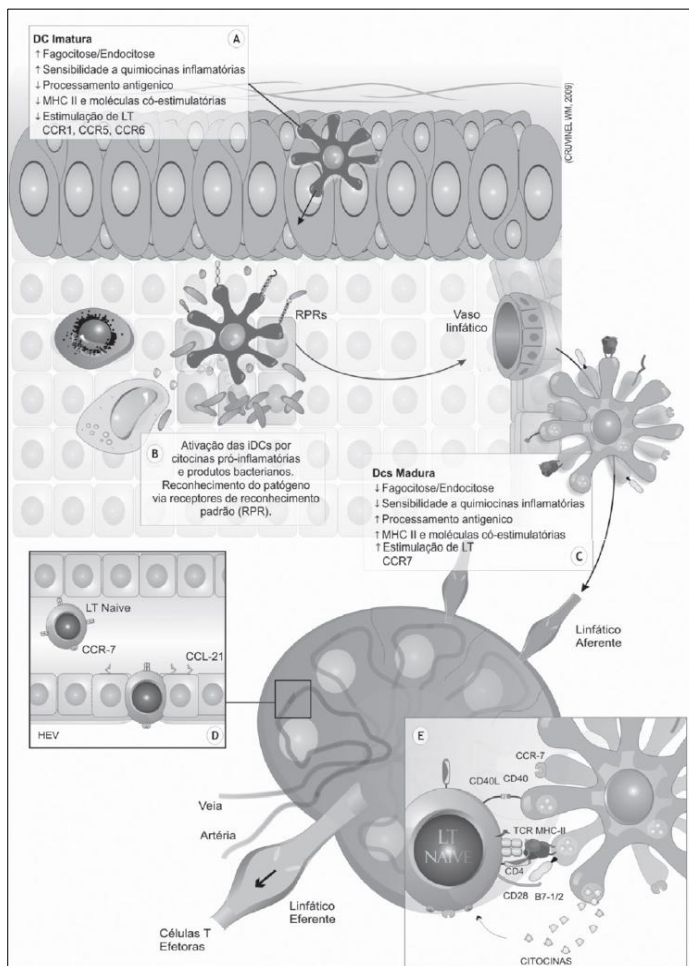
interleucina 6 (IL-6) e IL-12p70, promovendo resposta do tipo Th1/Th17 e, consequentemente, recrutando linfócitos T citotóxicos (CTL). As cDCs apresentam ainda uma elevada expressão dos recetores TLR1, TLR2, TLR3, TLR4 e TLR8 e constituem os precursores de células de *Langerhans*, DCs intersticiais ou da mucosa, ou DCs da derme, dependendo dos estímulos recebidos e do microambiente a que são expostas.<sup>(6, 7, 8, 10)</sup>

Tem sido demonstrado ainda que as pDCs aumentam a resposta imune por *cross-talking* com cDCs através da produção de IFN- $\alpha$  e pela expressão de CD40L, ativando a produção de IL-12p70.<sup>(2, 6, 7)</sup>

### 2.3 Reconhecimento de antígenos

As DCs são consideradas APCs profissionais e são capazes de captar e processar qualquer tipo de antígeno, reconhecendo, assim, os designados padrões moleculares associados a agentes patogénicos (PAMPs) ou os padrões moleculares associados a dano (DAMPs) presentes após o estímulo de “perigo”. Estes são reconhecidos por diferentes famílias de recetores do sistema imunológico, resumidas sob o nome de recetores de reconhecimento de padrões (PRRs), sendo os recetores *toll-like* (TLRs) os seus representantes mais proeminentes.<sup>(7, 8, 11)</sup> [VER FIGURA 1]

Encontrando-se em órgãos e tecidos periféricos, as DCs imaturas internalizam



antígenos endógenos e exógenos através de um vasto número de recetores e processam-nos, apresentando-os depois aos linfócitos T. Este processamento é diferenciado, tendo em conta a origem e a natureza molecular do antígeno.<sup>(7, 11)</sup> [VER FIGURA 1]

**Figura 1 |** Células dendríticas.

(Retirado de CRUVINEL, W. M. *et al*, 2011)<sup>(11)</sup>

(A) Características das DCs imaturas.

(B) Ativação e captura de patógenos por intermédio de citocinas do microambiente e da interação com os PRRs, com conseqüente migração das DCs.

(C) Maturação das DCs.

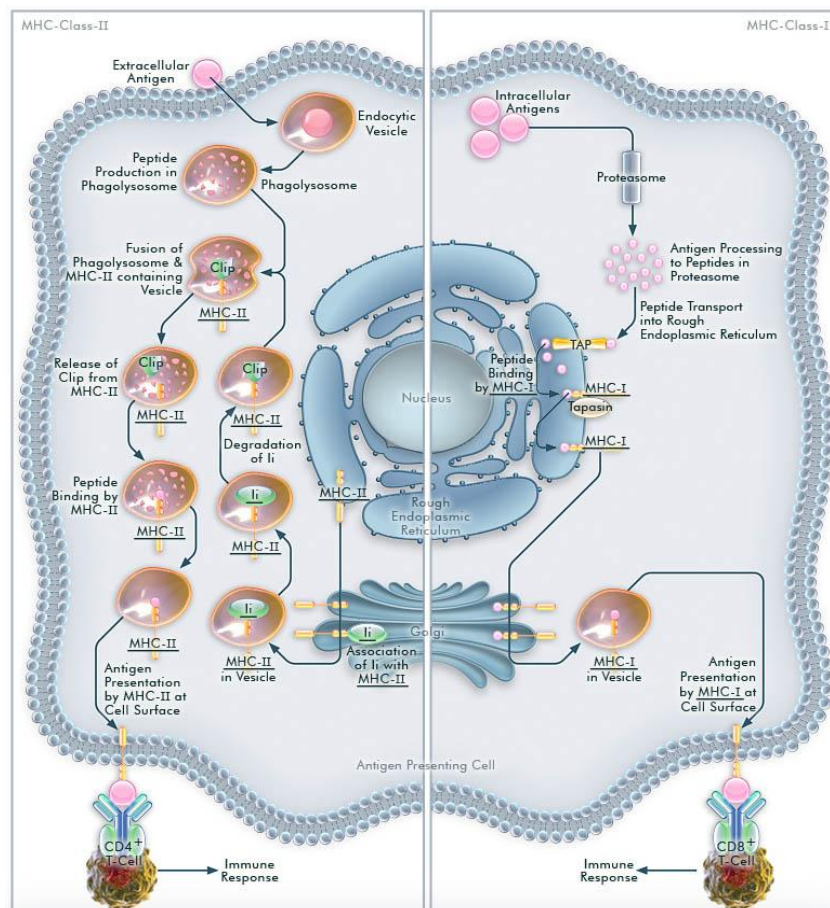
(D) Migração das células T *naive*.

(E) Apresentação dos antígenos processados aos linfócitos T.

## 2.4 Processamento de antígenos

O processamento de antígenos pelas DCs ocorre essencialmente através de três vias: via endocítica, em que os antígenos são acoplados a moléculas de MHC-II, via citosólica, em que os antígenos são acoplados a moléculas de MHC-I, e por fim, na apresentação de antígenos lipídicos, que são acoplados a moléculas CDI. <sup>(6, 7)</sup> [VER FIGURA 2]

Através da via endocítica os antígenos são captados do meio extracelular por endocitose, fagocitose e pinocitose, formando-se endossomas que, por sua vez, sofrem maturação e fusão com lisossomas. Nestes existem enzimas hidrolíticas que clivam o antígeno em moléculas mais pequenas, péptidos, que de seguida são acoplados a moléculas de MHC-II formando um complexo. O complexo MHC:péptido, durante o processo de maturação das células dendríticas, é transportado para a superfície celular para que possa ocorrer a apresentação antigénica aos linfócitos T  $CD4^+$  *naive*. <sup>(6)</sup> [VER FIGURA 2]



**Figura 2 |** Processamento e apresentação de antígenos por MHCs.

(Retirado de Affymetrix eBioscience, 2012)<sup>(12)</sup>

Através da via citosólica, os antígenos intracelulares (que podem ser proteínas próprias ou de origem patogénica – viral) são ubiquitinados e degradados em péptidos pelo proteossoma. Por intermédio do transportador associado ao processamento de antígenos (TAP), os péptidos dirigem-se para o retículo endoplasmático onde se ligam às moléculas de

MHC-I. O complexo MHC:péptido é posteriormente transportado para a superfície celular para que possa ocorrer a apresentação do antígeno aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> *naive*.<sup>(6)</sup> [VER FIGURA 2]

As DCs têm uma capacidade única de apresentar antígenos exógenos através de moléculas MHC-I, sendo esta função designada como apresentação cruzada (*cross-presentation*) de antígenos. Os antígenos exógenos são degradados pelo proteossoma e acoplados a moléculas de MHC-I para serem apresentados aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> *naive*. Este processo assegura que as DCs consigam ativar uma resposta imunológica citotóxica contra antígenos captados do meio exterior, nomeadamente células infetadas. No entanto, o processo de *cross-presentation* pode originar, por parte dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, tanto uma imunidade eficaz (*cross-priming*) como induzir tolerância (*cross-tolerance*).<sup>(6)</sup>

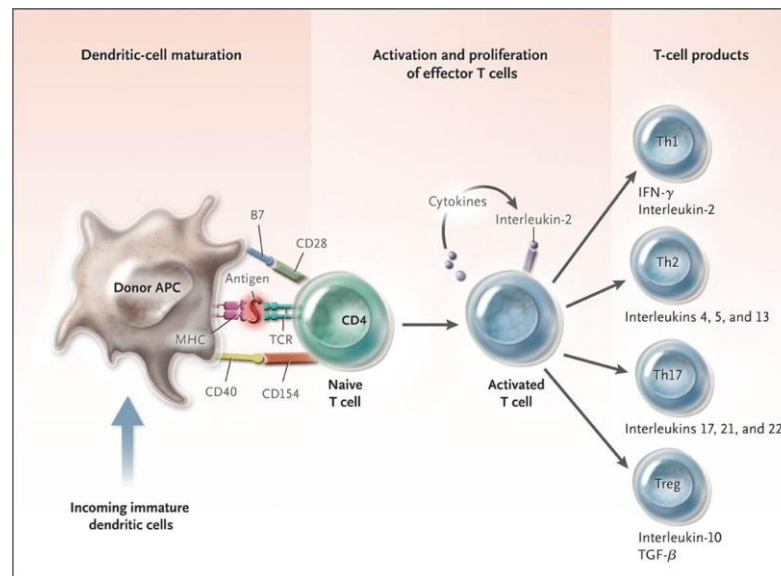
Os antígenos lipídicos, presentes em microrganismos ou em tecidos endógenos, são apresentados aos linfócitos pelas DCs através de moléculas CDI. Estas são essenciais na apresentação de glicolípidos específicos aos linfócitos T *natural killer* (NK); as pDCs não possuem moléculas CDI.<sup>(6)</sup>

## 2.5 Maturação das DCs e apresentação de antígenos às células T

O antígeno induz nas DCs imaturas diferentes características fenotípicas e funcionais. Ao iniciar o processo de maturação, as DCs aumentam a sua capacidade de migração dos tecidos periféricos para os órgãos linfoides secundários, onde apresentam partículas antigénicas aos linfócitos *naive*. As DCs maduras sintetizam altos níveis de IL-12 que induzem respostas inatas (células NK) e adaptativas (células B e T). Além disso, expressam moléculas essenciais para a sua migração para os órgãos linfáticos promovendo ainda uma interação com os recetores das células T. O aumento da expressão de moléculas MHC classe I e II e de moléculas coestimuladoras CD40, CD83, CD80 e CD86 durante a maturação é crucial para que se estabeleça a sinapse imunológica e consequente estimulação dos linfócitos.<sup>(6, 7)</sup>

Regra geral, os antígenos apresentados pelas DCs no contexto MHC-I, ativam linfócitos T CD8<sup>+</sup> enquanto os antígenos apresentados pelas DCs no contexto MHC-II, ativam a diferenciação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos seus diferentes tipos de células efetoras e reguladoras, sendo necessário a presença de 3 sinais. O primeiro sinal consiste no reconhecimento antigénico via MHC. O segundo é determinado pela interação entre sinais positivos e negativos originados pela interação de moléculas coestimuladoras das DCs e respetivos ligandos nas células T, desencadeando uma resposta imunogénica ou tolerância. Por fim, a secreção de citocinas e quimiocinas por parte das DCs maduras constitui o

terceiro sinal, provocando a diferenciação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> em CTLs e dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> em células efectoras (Th1, Th2 e Th17) ou reguladoras.<sup>(6, 7, 10)</sup> [VER FIGURA 3]



**Figura 3 |** Esquema representativo da apresentação de antígenos pelas DCs e diferenciação dos linfócitos T.

(Retirado de NANKIVELL, B. J. *et. al*, 2010)<sup>(13)</sup>

## 2.6 Indução de Imunidade e Tolerância

As DCs, quanto à capacidade de induzir respostas imunológicas, podem ser agrupadas em dois grupos: DCs imunogênicas e DCs tolerogênicas (tolDCs).

As DCs imunogênicas são caracterizadas por expressarem altos níveis de moléculas MHC-II e moléculas coestimuladoras CD80, CD86 e CD40, assim como produzirem elevadas quantidades de citocinas inflamatórias, após reconhecimento e captação de antígenos. Como resultado, possuem uma elevada capacidade de apresentação de antígenos e de ativação dos linfócitos T *naive*.<sup>(6)</sup>

Apesar de, dependendo do antígeno apresentado e do estado de ativação das DCs, tanto cDCs como pDCs poderem estimular respostas imunogênicas ou tolerogênicas, as DCs imunogênicas são majoritariamente cDCs.<sup>(3)</sup>

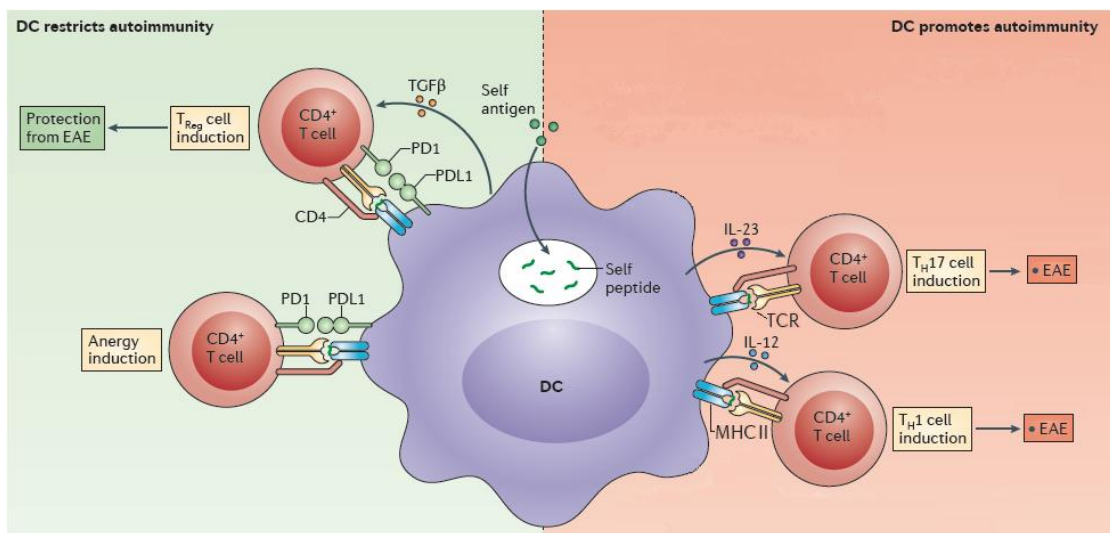
As tolDCs são caracterizadas por expressarem baixos níveis de moléculas MHC-II e de moléculas coestimuladoras CD80, CD86 e CD40 e pela produção de citocinas supressoras, como a IL-10 e o TNF- $\alpha$ . Como resultado, possuem fraca capacidade de induzir a ativação de células T *naive*, tendo um papel relevante na manutenção da tolerância imunológica.<sup>(6)</sup>

### 2.6.1 O papel das DCs em doenças autoimunes

O envolvimento das DCs em tolerância e imunidade é, como já referido, complexo e bidirecional.

Dependendo do contexto inflamatório e da expressão de reguladores intrínsecos, a apresentação de auto-antígenos pelas DCs pode promover ou inibir as respostas autoimunes. Por exemplo, a apresentação de auto-antígenos a células T na presença da proteína de morte celular programada I (PDI) e o ligando PDI (PDL1) e/ou o fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) pode conduzir à anergia de células T auto-reativas ou pode promover o desenvolvimento de células Treg.<sup>(2)</sup>

Por outro lado, se DCs apresentam auto-antígenos a células T na presença de mediadores pró-inflamatórios (tais como a IL-12 e IL-23), ocorre o desenvolvimento de células T CD4<sup>+</sup>. Estas células T auto-reativas podem contribuir para as respostas autoimunes presentes na MS.<sup>(2)</sup>



**Figura 4 |** Papel potencial das DCs na resposta das células T auto-reativas.

(Adaptado de GANGULY, D. *et al*, 2013)<sup>(2)</sup>

## III. ESCLEROSE MÚLTIPLA

A MS foi descrita, pela primeira vez, em 1868 por um neurologista francês, Jean Martin Charcot, após observar um acúmulo de células inflamatórias numa distribuição perivascular dentro do cérebro e da substância branca da medula espinhal de doentes com episódios de disfunção neurológica.<sup>(14)</sup>

Atualmente a MS é definida como uma doença desmielinizante com neurodegeneração progressiva causada por uma resposta autoimune a auto-antígenos num indivíduo geneticamente suscetível.



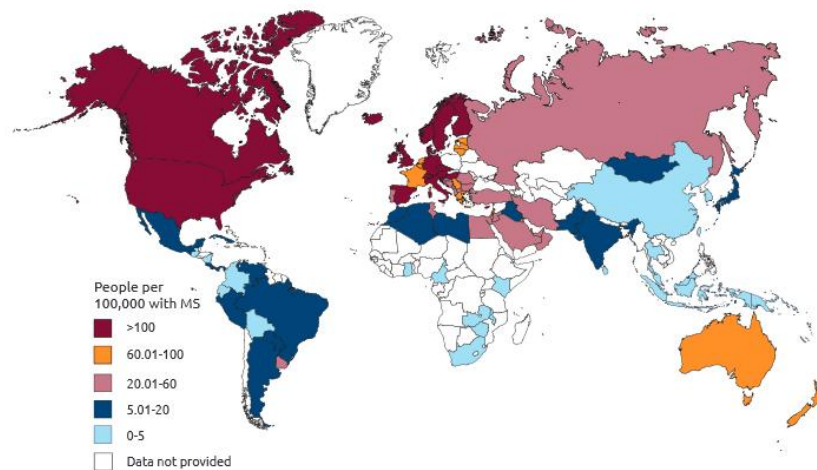
Os sintomas clínicos variam consoante o local das lesões neurológicas. Entre os mais frequentes, pode-se referir a fadiga, perda da força muscular nos braços e pernas, dor, problemas sexuais, alterações cognitivas, alterações de sensibilidade, alterações de equilíbrio/coordenação, alterações de humor e depressão.<sup>(1, 3, 15)</sup>

### 3.1 Etiologia

Segundo a Federação Internacional de MS, estima-se que o número de pessoas com MS aumentou de 2,1 milhões, em 2008, para 2,3 milhões, em 2013.<sup>(16)</sup> [VER FIGURA 5]

A MS afeta com maior incidência mulheres e surge frequentemente entre os 20 e os 40 anos de idade.<sup>(14, 17, 18)</sup> Apesar de já terem sido efetuados diversos e numerosos estudos científicos, ainda não se sabe quais são as causas da MS. Pensa-se que seja causada por uma combinação de fatores, sendo o sistema imunológico o principal.

A MS afeta especialmente indivíduos de raça branca, na Europa, América do Norte e Austrália. As diferenças não são tão acentuadas como se pensava anteriormente, mas sabe-se atualmente que a MS é tanto mais frequente quanto mais afastado do equador está o país. Por isso, pensa-se que o meio ambiente em que as pessoas vivem e a exposição ao sol pode ter influência no desenvolvimento da MS.<sup>(17, 18)</sup>



**Figura 5** | Distribuição global da MS.

(Retirado de *Multiple Sclerosis International Federation*, 2013)<sup>(16)</sup>

Resultados de estudos efetuados com gémeos homozigóticos comprovaram que a MS é parcialmente hereditária, uma vez que existe 25% a 30% de probabilidade da MS afetar dois gémeos. Relativamente aos restantes membros da família, estes também têm um risco maior de contrair a doença do que um indivíduo sem antecedentes de MS.<sup>(14, 17, 18)</sup>

Inicialmente pensava-se que a MS poderia estar associada ao contacto com algum vírus. No entanto, apesar de intensas investigações, até ao momento não foram encontradas provas seguras de qualquer associação entre MS e toda a espécie de vírus.<sup>(18)</sup>

### **3.2 Diagnóstico**

A MS pode produzir sintomas idênticos aos de outras patologias do sistema nervoso central (SNC), pelo que o diagnóstico poderá demorar algum tempo a acontecer. Uma vez que não há um ensaio imunológico específico, o diagnóstico da MS é baseado na história clínica do doente e em exames complementares de diagnóstico (ressonância magnética nuclear, estudo de potenciais evocados e punção lombar).<sup>(14, 18)</sup>

### **3.3 Diferentes tipos de MS**

A divisão da MS em tipos clínicos de acordo com a progressão da doença é muitas vezes baseada na avaliação retrospectiva da história clínica do doente. O facto de um doente apresentar, num determinado momento, uma forma específica de MS, não significa que se possa prever com segurança a evolução da patologia.

Atualmente são descritos vários tipos de MS.<sup>(18, 19)</sup> [VER FIGURA 6]

#### **3.3.1 Surto-Remissão ou Recorrente-Recidente (RRMS)**

Este tipo de MS caracteriza-se por surtos, seguidos por períodos de remissão com recuperação total ou parcial dos efeitos sentidos. Observa-se em 85-90% dos doentes.<sup>(18, 19)</sup>

[VER FIGURA 6]

#### **3.3.2 Secundária Progressiva (SPMS)**

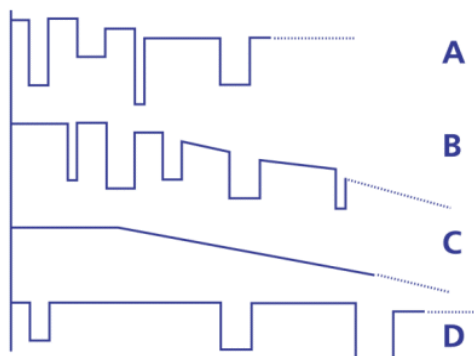
Dos doentes com RRMS, cerca de dois terços progride para SPMS. Este tipo de MS inicia-se com a forma clínica de surtos, e à medida que o tempo passa instala-se uma perda gradual das funções, sendo as recuperações frequentemente incompletas.<sup>(18, 19)</sup> [VER FIGURA 6]

#### **3.3.3 Primária Progressiva (PPMS)**

Este tipo de MS não apresenta surtos, mas num período de anos vai-se instalando uma perda gradual e insidiosa das funções do organismo. Presente entre 10% -15% dos doentes com MS.<sup>(18, 19)</sup> [VER FIGURA 6]

### 3.3.4 Benigna

Este tipo inicialmente caracteriza-se por MS por Surto-Remissão, mas ao longo do tempo a incapacidade é praticamente inexistente ou muito reduzida.<sup>(18, 19)</sup> [VER FIGURA 6]



**Figura 6** | Progressão dos vários tipos da MS.

(Retirado de Esclerose Múltipla, 2014)<sup>(18)</sup>

- a) RRMS
- b) SPMS
- c) PPMS
- d) MS Benigna

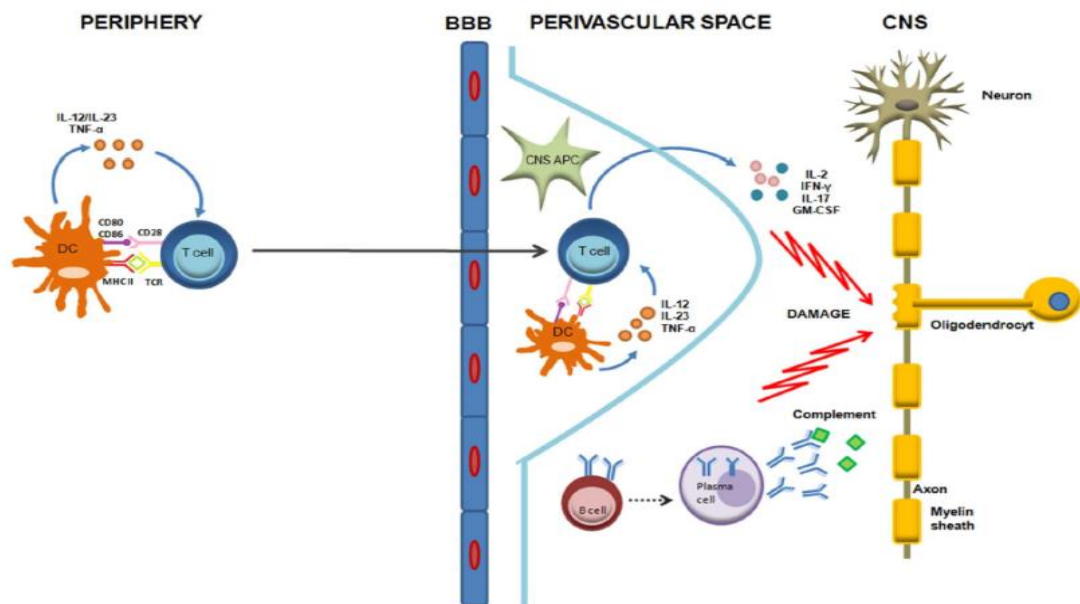
### 3.4 Papel das DCs na patogénese da MS

A presença abundante de DCs nas lesões do SNC e no líquido cefalorraquidiano (LCR) de doentes com MS tem sido demonstrado em vários estudos. Tanto as cDCs como as pDCs acumulam-se nas leptomeninges e lesões da substância branca destes doentes. Tendo em conta o papel importante das DCs na manutenção do equilíbrio entre a imunidade e a tolerância das células T, alterações na quantidade ou no estado de ativação das DCs afetam significativamente este equilíbrio.<sup>(20)</sup>

O uso da EAE como o modelo protótipo da MS tem permitido esclarecer alguns mecanismos fisiopatológicos associados à MS, incluindo o pressuposto de que a MS é uma doença inflamatória autoimune mediada por células patogénicas T CD4<sup>+</sup> específicas para proteínas da mielina do SNC. Células T CD4<sup>+</sup> específicas das proteínas da mielina também podem recrutar outras células efetoras com reatividade anti-proteínas da mielina, tais como as células B e células T CD8<sup>+</sup>, que participam ativamente na destruição autoimune do tecido alvo do SNC.<sup>(5, 15, 21)</sup>

Após a ativação patológica de células T mielina-reativas por DCs na periferia, as células T auto-reativas podem secretar citocinas pró-inflamatórias, que facilitam a sua entrada através da barreira endotelial hemato-encefálica (BBB). Uma vez no SNC, as células T mielina-reativas são reativadas após encontrar novas APCs, tais como DCs. Subsequentemente, estas células T perivasculares secretam citocinas pró-inflamatórias que

permitem o recrutamento de outras células inflamatórias. Esta cascata inflamatória conduzirá a desmielinização dos axônios, causando assim os sintomas sensoriais e motores característicos da MS. (2, 22) [VER FIGURA 7]



**Figura 7** | Papel das DCs na patogênese da MS.

(Retirado de NUYTS, A. H. *et al*, 2013)<sup>(22)</sup>

### 3.5 A terapia ideal em MS

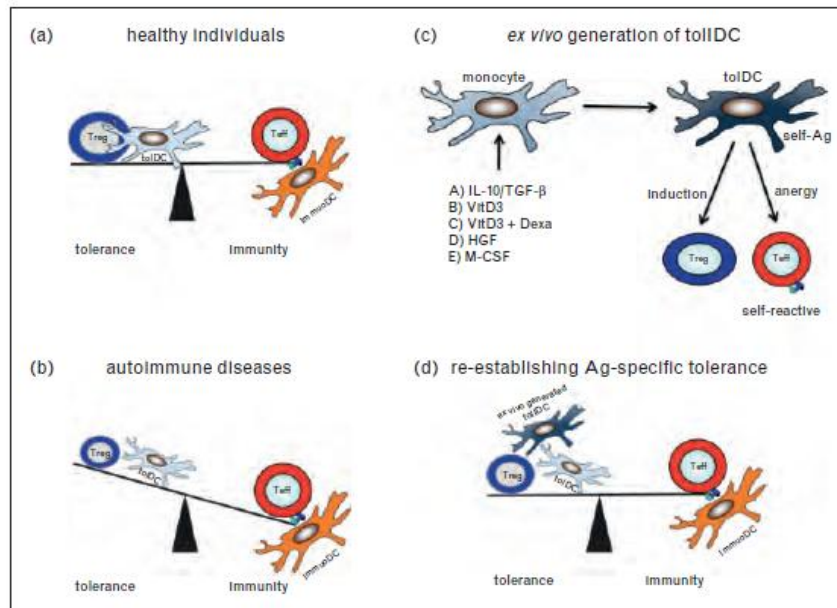
Uma característica fundamental do sistema imunológico é a distinção entre antígenos estranhos e auto-antígenos.

Em indivíduos saudáveis, as células T auto-reativas são geralmente mantidas sob controle por diferentes tipos de células reguladoras naturais e induzidas [VER FIGURA 8a]. Atualmente sabe-se que as doenças autoimunes são o resultado de um desequilíbrio do sistema imunitário, devido à hiperativação das DCs imunogênicas e/ou redução dos efeitos das tolDCs [VER FIGURA 8b]. Por isso, as estratégias terapêuticas que usam DCs para o tratamento de doenças autoimunes têm como objetivo diminuir o potencial imunogênico das DCs ou promover as suas características tolerogênicas.<sup>(23)</sup>

Tendo em conta que a terapia ideal para uma doença autoimune será restaurar a tolerância [VER FIGURA 8d] e sendo as tolDCs fundamentais na criação e manutenção de tolerância, várias estratégias têm sido desenvolvidas para produzir *ex vivo* tolDCs [VER FIGURA 8c].

A observação de benefícios terapêuticos no decurso da doença em modelos animais, após injeção destas *ex-vivo* tolDCs, abriu novas perspetivas na potencial utilização destas células como vacinas em doenças autoimunes e, no caso em estudo, na MS.<sup>(3, 23)</sup>

As tolDCs têm a grande vantagem de restabelecer a tolerância antígeno-específica sem promover a imunossupressão geral, porque induzem as células Treg e promovem anergia das células T auto-reativas.<sup>(3, 23)</sup>



**Figura 8 |** Vacinação com tolDCs.

(Retirado de GROSS, C. C. *et al*, 2013)<sup>(23)</sup>

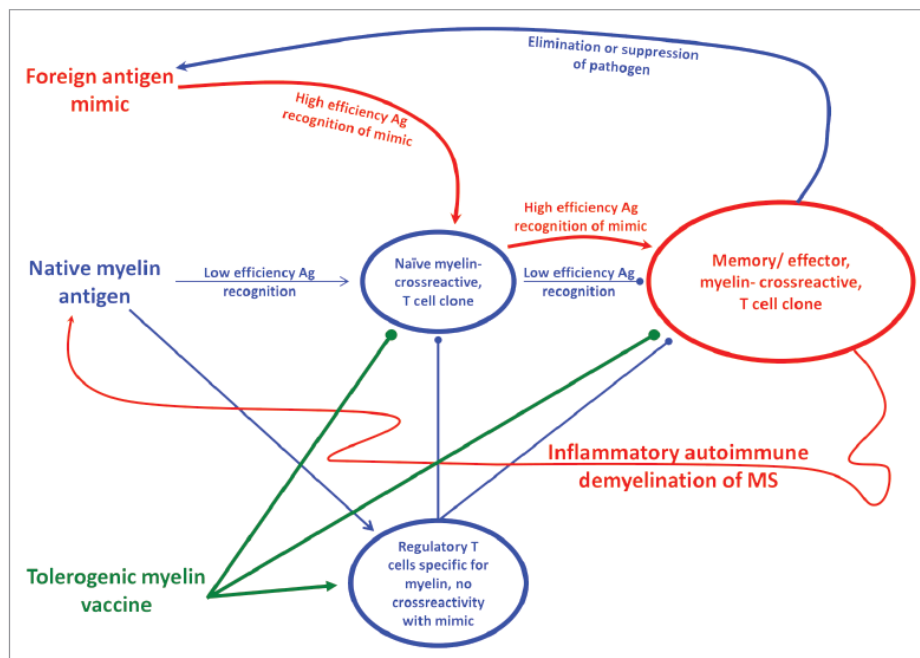
- (a) tolDCs e Tregs são responsáveis por induzir e manter a tolerância.
- (b) Devido à hiperativação imunogénica das DCs e/ou redução dos efeitos das tolDCs, a tolerância antígeno-específica está desequilibrada em doenças autoimunes.
- (c) Diferentes estratégias têm sido desenvolvidas *ex vivo* para diferenciar monócitos humanos em tolDCs, para induzir Treg e/ou anergia das células T auto-reativas *in vitro*.
- (d) Administração de tolDCs geradas *ex vivo* restauram, *in vivo*, a tolerância específica para o antígeno.

## IV. VACINAS TOLEROGÉNICAS EM MS

### 4.1 O "mimetismo molecular"

O "mimetismo molecular" é o modelo atualmente aceite que justifica a etiologia da MS. Este modelo baseia-se no pressuposto que os agentes infecciosos crónicos ou recorrentes são os instigadores etiológicos da MS. A suposição é que esses agentes etiológicos têm epítopos antigénicos que se sobrepõem parcialmente e são partilhados com as principais proteínas da mielina. Estes antígenos promovem a diferenciação de células T em células de memória/efetoras. A potencial consequência é a iniciação de uma resposta autoimune contra as proteínas da mielina e indução de MS.<sup>(5)</sup> [VER FIGURA 9]

Um assunto que ainda gera bastante controvérsia na comunidade científica e médica assenta na identificação das proteínas derivadas da mielina que intervêm na patogénese da MS. No entanto, estudos indicam que a proteína de proteolípido (PLP), uma glicoproteína de mielina de oligodendrócitos (MOG) e a proteína básica de mielina (MBP) participam na desregulação imunitária da MS.<sup>(4)</sup> A PLP, a proteína mais abundante na mielina no SNC, é essencial para a manutenção estrutural da bainha de mielina e é considerada o principal alvo de células T auto-reativas. A MBP é a segunda proteína mais abundante na mielina, pode ser encontrada na superfície intracelular da membrana e a sua função é manter a adesão das superfícies citoplasmáticas e permitir a transferência eficiente do sinal. Como a MOG encontra-se na superfície externa da membrana dos oligodendrócitos no SNC, é muito acessível aos anticorpos, por isso pensa-se que pode ser um alvo da resposta imune na MS.<sup>(24)</sup>



**Figura 9 |** Modelo hipotético de ação das vacinas tolerogénicas.  
(Retirado de MANNIE, M. D. et al, 2013)<sup>(5)</sup>

Setas representam interações estimulantes.

Linhas com extremidades esféricas representam ações inibitórias.

Mecanismos homeostáticos naturais de auto tolerância estão a azul.

○ mecanismo de ação proposto para as vacinas tolerogénicas está representado a verde.

○ "mimetismo molecular" está representado a vermelho.

## 4.2 Mecanismo de ação proposto para as vacinas tolerogénicas

Vacinas tolerogénicas representam uma nova classe de vacinas concebidas para reestabelecer a tolerância imunológica, restaurar a homeostasia do sistema imune, e, assim,

reverter a patologia autoimune. Vacinas tolerogénicas são específicas para um (ou mais que um) antígeno e induzem a longo prazo uma memória inibitória que bloqueia as respostas das células T patogénicas através de perda de células T efectoras e ganho de função de células T reguladoras.<sup>(5, 25)</sup> [VER FIGURA 9]

As vacinas tolerogénicas diferem das imunogénicas em alguns aspetos. As vacinas tolerogénicas são concebidas para ter uma mínima atividade adjuvante, para que os antígenos da vacina sejam reconhecidos num ambiente não-inflamatório para favorecer a auto tolerância. Contrariamente ao conceito clássico de vacina que visa prevenir o desenvolvimento de infeções, estas vacinas têm aplicabilidade na terapia de doenças crónicas, uma vez que atuam contrariando a memória imunológica do patogénico em causa, tendo sido referidas como vacinas inversas.<sup>(5)</sup>

Diversas vacinas tolerogénicas estão atualmente a ser desenvolvidas em contextos pré-clínicos ou em ensaios clínicos de fase inicial.

## V. SITUAÇÃO ATUAL E ABORDAGENS MAIS PROMISSORAS

Apesar da vacinação baseada em DCs ser uma terapia muito promissora para o tratamento da MS, os estudos nesta área, assim como o conhecimento da patologia, ainda são bastante escassos. Infelizmente, existem vários obstáculos que têm dificultado o desenvolvimento e aplicação de vacinas baseadas em tolDCs na prática clínica da MS.

De seguida, abordaremos os principais estudos já realizados e os desafios centrais desta terapêutica.<sup>(23)</sup>

### 5.1 Origem e protocolos de diferenciação

Dependendo da origem e do protocolo de diferenciação utilizado, tolDCs geradas *ex vivo* podem migrar para diferentes tecidos e induzir tolerância *in vivo* através de diferentes mecanismos de ação.<sup>(23)</sup>

As tolDCs podem ser geradas *ex vivo* utilizando vários precursores (células pluripotentes estaminais, células precursoras de medula óssea, monócitos do sangue periférico) e vários métodos de diferenciação que envolvem a utilização de citocinas anti-inflamatórias (por exemplo: IL-10 e TGF- $\beta$ ), fármacos imunossupressores (por exemplo:

1 $\alpha$ ,25-di-hidroxivitamina D3 VitD3, desoxiespergualina) e/ou modificações genéticas.<sup>(23)</sup> [VER

FIGURA 8c]

De acordo com um estudo que comparava diferentes protocolos de produção de tolDCs *ex vivo*, a combinação das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 e prostaglandina E2 (PGE2) demonstrou maior potencial.<sup>(23)</sup>

Nestes estudos torna-se crucial evidenciar que a estabilidade e o fenótipo das DCs derivadas de monócitos de doentes com MS deverão ser asseguradas não podendo diferir dos controlos saudáveis. Neste contexto, Huang e os seus colaboradores demonstraram que apesar das DCs derivadas de monócitos de doentes com MS (geradas *in vitro*) diferem dos controlos saudáveis, estas diferenças não eram significativas quando o processo de diferenciação *in vitro* se processava na presença de IL-10 e IFN- $\beta$ .<sup>(3, 22)</sup>

Outros estudos demonstraram que após tratamento com 1 $\alpha$ ,25-di-hidroxivitamina-D3 as DCs derivadas de monócitos carregadas com proteínas de mielina de doentes com RRMS induziram uma menor resposta das células T mielina-reativas, do mesmo modo que os controlos saudáveis.<sup>(3, 22)</sup>

Um aspeto que também deve ser valorizado é a utilização de tolDCs autólogas ou alogénicas no tratamento da MS. Um estudo recente mostrou que, *in vitro*, tolDCs derivadas de doentes com MS assim como de indivíduos saudáveis, foram capazes de induzir tolerância em células T CD4<sup>+</sup> específicas para o antígeno de maneira comparável, o que indica que teoricamente poderão ser usadas tolDCs autólogas *in vivo*.<sup>(3, 23)</sup>

## 5.2 Antígenos utilizados na indução de tolerância específica

Tendo em conta que os auto-antígenos relevantes para a patogénese da MS não estão completamente identificados, um grande obstáculo no desenvolvimento de vacinas tolerogénicas é a escolha dos antígenos que deverão ser utilizados para carregar as DCs.<sup>(23)</sup>

Além disso, assume particular relevância esclarecer se a vacinação tolerogénica é eficaz quando as DCs são carregadas apenas com um número limitado de epítomos de mielina ou se o benefício terapêutico é superior quando se usa uma grande diversidade de alvos antígenicos. Para além disso, é fundamental esclarecer se ocorre variabilidade de doente para doente no que refere ao tipo de antígeno indutor da MS.

Num estudo clínico de Fase IIa, a MS foi exacerbada em doentes tratados com um antígeno leucocitário humano (HLA) de MBP. Este estudo evidenciou a fragilidade dos métodos utilizados para induzir tolerância antígeno-específica, através dos quais a tentativa de induzir tolerância resultou no efeito oposto.<sup>(3)</sup>



Contrariamente, outro estudo demonstrou, *in vitro*, que tolDCs derivadas de monócitos carregadas com PLP<sub>139-154</sub> e cultivadas com VitD3, induziram anergia em células T CD4<sup>+</sup> derivadas de doentes com MS.<sup>(3, 23)</sup>

Foi realizado um estudo clínico de fase I de segurança em doentes com MS (sete doentes com RRMS e dois com SPMS). Os doentes foram tratados com uma única infusão de PBMCs autólogas quimicamente combinadas com sete péptidos de mielina (MOG<sub>120</sub>, MOG<sub>35-55</sub>, MBP<sub>13-32</sub>, MBP<sub>83-99</sub>, MBP<sub>111-129</sub>, MBP<sub>146-170</sub> e PLP<sub>139-154</sub>), usando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodimida (EDC). O EDC catalisa a formação de ligações peptídicas entre os grupos amino e carboxilo livres, produzindo, assim, PBMCs revestidas com os péptidos da mielina (MOG, MBP e PLP) que foram identificados como alvos das células T auto-reativas relevantes na MS. A administração destas células foi viável, segura e bem tolerada, e doses elevadas de péptidos de mielina acoplados a PBMCs resultaram numa diminuição das respostas das células T específicas para estes antígenos.<sup>(23, 26)</sup> Estes resultados são bastante promissores e encorajam o desenvolvimento desta terapia.

### **5.3 Identificação do período propício para a vacinação**

O momento da vacinação também pode determinar a seleção de auto-antígenos usados para carregar as tolDCs. Diferentes auto-antígenos podem desempenhar um papel diferente na autoimunidade, dependendo da fase da patologia.<sup>(23)</sup>

### **5.4 Número e frequência de administração**

A capacidade de regular a resposta autoimune deverá ser duradoura ou, pelo menos, manter-se durante anos após a intervenção o que poderá obrigar a uma série de injeções repetitivas com tolDCs. Nesse caso, seria necessário gerar um grande número de DCs. A produção de grandes números de DCs, não só melhoraria a viabilidade, mas também reduziria as variações de lote para lote. Um método de conservação destas DCs poderá ser a criopreservação, uma vez que vários estudos têm demonstrado que DCs imaturas e maduras criopreservadas apresentam maior similaridade na função e fenótipo, relativamente a DCs recém-preparadas de diferentes lotes.<sup>(21)</sup>

No entanto, são necessários mais estudos que permitam clarificar os procedimentos ideais para o congelamento/descongelamento das tolDCs.<sup>(21)</sup>

### **5.5 Via de administração**

Na MS, as DCs parecem influenciar o destino das células T auto-reativas em muitos locais, tais como o timo, tecidos linfoides, a barreira hemato-encefálica e o espaço perivascular, dificultando a seleção do local de administração.<sup>(3)</sup>

Como as várias estratégias para gerar tolDCs originam diferentes fenótipos migradores, a via de administração vai depender da origem e do protocolo utilizado.<sup>(23)</sup>

No entanto, embora as vacinas tolDC possam ser administradas por via intravenosa ou subcutânea, na maioria dos casos, a probabilidade das DCs alcançarem eficazmente o seu destino final é muito baixa. Por isso, idealmente, as tolDCs deverão ser administradas diretamente no local alvo.<sup>(23)</sup> No caso de não ser possível, as tolDCs deverão ser capazes de migrar para tecidos específicos, onde ocorre a autoimunidade.

## 5.6 Adjuvantes

Uma das principais preocupações atuais associadas a esta terapêutica é a possibilidade da vacina poder ser imunogénica e, deste modo, precipitar a progressão da doença.

O conhecimento atual do estado da arte permite inferir que as vacinas tolerogénicas induzem tolerância porque são administradas sem adjuvantes e, portanto, os peptídeos são apresentadas ao sistema imunológico num ambiente não ativado.<sup>(5)</sup> Neste sentido, a apresentação do antigénio na ausência de moléculas coestimuladoras e de citocinas pró-inflamatórias é um passo crítico para a atividade tolerogénica da vacina. No entanto, será difícil o controlo total da ausência de inflamação na prática clínica, uma vez que alguns doentes poderão ter, quer localmente quer sistemicamente, infeções inaparentes ou estarem expostos a outros estímulos pró-inflamatórios. Nestes casos a administração da vacina tolerogénica poderá não apresentar qualquer benefício terapêutico ou, pelo contrário, agravar a patologia.<sup>(5)</sup>

No entanto algumas evidências experimentais refutam, este conceito, uma vez que em indivíduos normais, as células T auto-reativas circulam no organismo sem causar autoimunidade, mesmo quando o indivíduo é exposto a algum processo inflamatório. Por estas razões não é evidente que a atividade inibidora de uma vacina tolerogénica será contrariada num ambiente pró-inflamatório.<sup>(5)</sup>

## 5.7 Avaliação e monitorização do efeito biológico terapêutico

Outra questão relevante no estudo da indução de tolerância imunológica é a avaliação qualitativa e quantitativa da imunossupressão em doentes. Neste sentido, na avaliação da resposta ao tratamento em ensaios clínicos, torna-se crucial identificar *end-points* nos ensaios de indução de tolerância, bem como selecionar criteriosamente os doentes e tipos de MS.<sup>(21)</sup>

## VI. CONCLUSÃO

Embora a investigação em imunoterapia no século passado tenha incidido maioritariamente no potencial imunogénico das DCs e a sua aplicação no tratamento de infeções e cancro, neste século, as características tolerogénicas destas células têm sido exploradas na indução de tolerância em transplantes e doenças autoimunes.

Os dados atualmente disponíveis sugerem que as DCs são fundamentais na regulação da imunidade em condições de homeostasia, estando também envolvidas no desenvolvimento de doenças autoimunes resultantes de uma desregulação da tolerância imunitária. A imunoterapia com DCs apresenta um potencial extremamente promissor na reversão desta desregulação.

Apesar da vacinação baseada em DCs emergir como uma estratégia terapêutica viável na MS, os estudos nesta área são bastante recentes e escassos, sendo imperativo esclarecer os mecanismos celulares e moleculares subjacentes a esta patologia, bem como otimizar vários aspetos da vacinação. No entanto, os escassos estudos desenvolvidos neste âmbito apresentam resultados deveras promissores no que refere à segurança e viabilidade na indução da homeostasia imunológica.

O farmacêutico tem e terá um papel preponderante no desenvolvimento, comercialização e tratamento da vacinação baseada em DCs, tendo responsabilidades acrescidas e uma necessidade de atualização científica cada vez mais acentuada. Em todo o processo, apesar de ser necessário a rentabilidade económica do produto e da profissão, este deverá ter como objetivo prioritário o doente, fazendo justiça ao seu dever ético e social.

## VII. BIBLIOGRAFIA

1. KOUTSILIERI, E., LUTZ, M. B., SCHELLER, C. - **Autoimmunity, dendritic cells and relevance for Parkinson's disease**. *Journal of Neural Transmission*. 120 (2013) 75-81.
2. GANGULY, D., HAAK, S., SISIRAK, V., REIZIS, B. - **The role of dendritic cells in autoimmunity**. *Nature Reviews Immunology*. 2013.
3. GROSS, C. C., JONULEIT, H., WIENDL, H. - **Fulfilling the dream: tolerogenic dendritic cells to treat multiple sclerosis**. *European Journal Immunology*. 42 (2012) 569-572.
4. FISSOLO, N., MONTALBAN, X., COMABELLA, M. - **DNA based vaccines for multiple sclerosis: Current status and future directions**. *Clinical Immunology*. 142 (2012) 76–83.
5. MANNIE, M. D., CURTIS, A. D. - **Tolerogenic vaccines for Multiple Sclerosis**. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 9:5 (2013) 1032-1038.
6. SILVA, P. R. L. - **Imunoterapia Tumoral com Células Dendríticas**. Porto: Universidade Fernando Pessoa. (2013) 1-20.
7. OLIVEIRA, T. E. G. - **Imunoterapia anti-tumoral com Células dendríticas**. Coimbra: Universidade de Coimbra. (2013) 1-14.
8. BAYAS, A., STASIOLEK, M., KRUSE, N., TOYKA, K. V., SELMAJ, K., GOLD, R. - **Altered innate immune response of plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis**. *Clinical and Experimental Immunology*. 157 (2009) 332–342.
9. GLEHN, F., SANTOS, L. M, BALASHOV, K. - **Plasmacytoid dendritic cells and immunotherapy in multiple Sclerosis**. *Immunotherapy*. 4:10 (2012) 1053-1061.
10. WU, G. F., LAUFER, T. M. - **The Role of Dendritic Cells in Multiple Sclerosis**. *Neurology and Neuroscience Reports*. 7 (2007) 245-252.
11. CRUVINEL, W. M., MESQUITA, D., ARAÚJO, J. A. P., CATELAN, T. T. T., SOUZA, A. W. S., SILVA, N. P., ANDRADE, L. E. C. - **Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória**. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 50:4 (2010) 434-61.
12. Affymetrix eBioscience - **Antigen Processing and Presentation by MHCs**. (2012). [Acedido a 22 de Maio de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.ebioscience.com/resources/pathways/antigen-processing-and-presentation-by-mhc.htm>.
13. NANKIVELL, B. J., ALEXANDER, S. I. - **Rejection of the Kidney Allograft**. *The New England Journal of Medicine*. 363 (2010) 1451-1462.
14. HAFLER, D. A. - **Multiple sclerosis**. *The Journal of Clinical Investigation*. 113:6 (2004).

15. NYLANDER, A., HAFLER, D. A. - **Multiple sclerosis**. The Journal of Clinical Investigation. 122:4 (2012).
16. Multiple Sclerosis International Federation - **Atlas of MS 2013 – Mapping Multiple Sclerosis around the world**. United Kingdom (2013).
17. MOHAMMAD, G., HASSANPOUR, M., TSAI, V. W. W., LI, H., RUITENBERG, M. J., BOOTH, D. R., SERRATS, J., HART, P. H., SYMONDS, G. P., SAWCHENKO, P. E., BREIT, S. N., BROWN, D. A. - **Dendritic Cells and Multiple Sclerosis: Disease, Tolerance and Therapy**. International Journal of Molecular Sciences. 14 (2013) 547-562.
18. Esclerose Múltipla - **Sociedade Portuguesa De Esclerose Múltipla**. (2014). [Acedido a 22 de Maio de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.spem.org/esclerose-multipla>.
19. GANDHI, R., LARONI, A., WEINER, H. L. - **Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis**. Journal Neuroimmunology. 221:1-2 (2010) 7-14.
20. ZOZULYA, A. L., CLARKSON, B. D., ORTLER, S., FABRY, Z., WIENDL, H. - **The role of dendritic cells in CNS autoimmunity**. Journal of Molecular Medicine. 88:6 (2010) 535–544.
21. BRUSSEL, I., LEE, W. P., ROMBOUTS, M., NUYTS, A. H., HEYLEN, M., DEWINTER, B. Y., COOLS, N., SCHRIJVERS, D. M. - **Tolerogenic dendritic cell vaccines to treat autoimmune diseases: Can the unattainable dream turn into reality?** Autoimmunity Reviews (2013).
22. NUYTS, A. H., LEE, W. P., BASHIR-DAR, R., BERNEMAN, Z. N., COOLS, N. - **Dendritic cells in multiple sclerosis: key players in the immunopathogenesis, key players for new cellular immunotherapies?** Multiple Sclerosis Journal. 19 (2013) 995-1002.
23. GROSS, C. C., WIENDL, H. - **Dendritic cell vaccination in autoimmune disease**. Current Opinion in Rheumatology. 25:2 (2013) 268-274.
24. SOSPEDRA, M., MARTIN, R. – **Immunology of Multiple Sclerosis**. Annual Review Immunology. 23 (2005) 683-747.
25. PALUCKA, K., BANCHEREAU, J. - **Human dendritic cell subsets in vaccination**. Current Opinion in Immunology. 25 (2013) 396-402.
26. LUTTEROTTI, A., YOUSEF, S., SPUTTEK, A., STÜRNER, K. H., STELLMANN, J., BREIDEN, P., REINHARDT, S., SCHULZE, C., BESTER, M., HEESSEN, C., SCHIPPLING, S., MILLER, S. D., SOSPEDRA, M., MARTIN, R. - **Antigen-Specific Tolerance by Autologous Myelin Peptide-Coupled Cells: A Phase I Trial in Multiple Sclerosis**. Science Translational Medicine. 5:188 (2013).