



Sandra Margarida Bento Magro

## Vacinas Antitumorais baseadas em Células Dendríticas: Conhecimento Atual e Perspetivas Futuras

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

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Sandra Margarida Bento Magro

# Vacinas Antitumorais baseadas em Células Dendríticas: Conhecimento Atual e Perspetivas Futuras

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

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

O Tutor

---

Professor Doutor Bruno Miguel Rodrigues das Neves

A Aluna

---

Sandra Margarida Bento Magro

Eu, Sandra Margarida Bento Magro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o número 2007103049, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

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

Coimbra, 10 de Setembro de 2015.

Assinatura

---

Sandra Margarida Bento Magro

*A concretização deste trabalho só foi possível graças à colaboração de todos aqueles que de perto o acompanharam.*

**Assim desejo expressar os meus mais sinceros agradecimentos:**

*Ao Professor Doutor Bruno Neves, por todos os conhecimentos que me transmitiu, pela disponibilidade, pelo apoio, pelo incentivo demonstrados e pela paciência ao longo de todo este percurso. Muito Obrigado por me abrir horizontes neste mundo da investigação.*

*À Faculdade de Farmácia, por ter sido mais do que uma instituição de ensino. A Todos os Professores, Funcionários e Amigos, estou-vos eternamente grata.*

*Aos meus Pais, que estiveram sempre ao meu lado e por todo o apoio e carinho que sempre demonstraram. Muito Obrigado por serem o meu alicerce!*

**A todos vós, Obrigado ab imo corde. Bem Hajam!**

## LISTA DE ABREVIATURAS

**APCs** – Células apresentadoras de Antígenos

**cDCs** – Células Dendríticas Convencionais

**Células NK** – Células *Natural Killer*

**CLPs** – Progenitores Comuns Linfoides

**CMPs** – Progenitores Comuns Mieloides

**CTL** – Linfócitos T citotóxicos

**DAMPs** – Padrões Moleculares associados ao Dano Celular

**DCs** – Células Dendríticas

**FDA** – Food and Drug Administration

**Flt3<sup>+</sup>** – Citosina Fms semelhante à Tirosina Cinase 3 Ligando

**GM-CSF** – Fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos

**HLA** – Antígeno Leucocitário Humano

**HSCs** – Células Estaminais Hematopoiéticas

**id** – intradérmica

**in** – intranodal

**it** – intratumoral

**iv** – intravenosa

**IFN- $\alpha/\beta$**  – Interferão tipo I

**IL-6** – Interleucina 6

**LCs** – Células de Langerhans

**MDPs** – Percursos de macrófagos e DCs

**MHC** – Complexo *Major* de Histocompatibilidade

**pDCs** – Células Dendríticas Plasmocitóides

**PPRs** – recetores de reconhecimento de padrões

**pre-DCs** – pré-DCs

**sc** – via subcutânea

**TAP** – Transportador associado ao Processamento de Antígenos

**TCR** – Recetor dos linfócitos T

**TGF- $\beta$**  – Fator de transformação do crescimento  $\beta$

**Th** – Linfócitos T auxiliar

**TLR** – Recetores *Toll-like*

**TNF- $\alpha$**  – Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$

**Tregs** – Células T Reguladoras

**VEGF** – Fator de Crescimento Vascular Endotelial

## RESUMO

As Células Dendríticas (DCs) são células apresentadoras de antígenos com uma capacidade única de induzir e modular respostas imunitárias. Capturam e processam potenciais sinais de perigo, transferindo posteriormente a informação para as células do sistema imunitário adaptativo. As DCs, não são apenas críticas para a indução de respostas imunitárias, mas também são importantíssimas para a indução de tolerância imunológica. Estas características funcionais únicas tornam as DCs ferramentas de grande relevância no estabelecimento de imunoterapias, nomeadamente no desenvolvimento de vacinas antitumorais. A enorme evolução no conhecimento acerca da imunobiologia dos tumores e das DCs possibilitou nos últimos anos que se desenvolvessem vacinas antitumorais de uma forma muito mais racional. Deste modo a próxima geração de vacinas antitumorais baseadas em DCs, poderá estar na base da massificação da imunoterapia celular para tratamento de doentes oncológicos.

**Palavras-chave:** Células dendríticas; Cancro; Imunobiologia das células dendríticas; Vacinas antitumorais baseadas em células dendríticas.

## ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) are antigen presenting cells with an unique ability to induce and modulate primary immune responses. These cells sense and process potential danger signals and posteriorly transfer the information to the cells of the adaptive immune system. DCs are not only critical to induce immune response, but they are also very important to the maintenance of immune tolerance. These unique functional characteristics render DCs a very attractive tool to the design of cell immunotherapies, namely to the development of anti-tumor vaccines. Our substantial progress, in recent years, on the knowledge of the tumors and DCs immunobiology enabled the development of anti-tumor vaccines in a more rational way. Therefore, the next generation of anti-tumor DC-based vaccines can be the basis to the massification of cell immunotherapy to treat cancer patients.

**Key-words:** Dendritic cells; Cancer; Immunobiology of dendritic cells; anti-tumor dendritic cell-based Vaccines.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	II
RESUMO .....	IV
ABSTRACT .....	V
I. INTRODUÇÃO .....	1
2. IMUNOBIOLOGIA DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	2
2.1 Origem e classificação .....	2
2.2. Captação, processamento e apresentação de antígenos .....	3
2.3. Maturação .....	5
2.4. Interação das DCs com linfócitos.....	6
3. APLICAÇÕES DAS DCs EM VACINAS ANTITUMORAIS.....	7
4. MANIPULAÇÃO EX VIVO .....	9
4.1. Fontes das DCs.....	9
4.2. Tipo e processo de carregamento antigénico .....	10
4.3. Vias de administração .....	10
5. DIRECIONAMENTO IN VIVO.....	11
6. ATUAIS DESAFIOS E PERSPETIVAS FUTURAS.....	12
BIBLIOGRAFIA.....	14

## I. INTRODUÇÃO

Paul Langerhans, ao observar a camada epidérmica da pele, em meados de 1868, efetuou a primeira descrição daquelas que viriam a ser designadas em sua homenagem de Células de Langerhans (LCs). Observou que estas células apresentam forma irregular e longas extensões membranares, semelhantes a dendrites das células do tecido nervoso (daí o nome de células dendríticas)<sup>(1)</sup>. Sendo a sua função uma incógnita e devido à sua semelhança com as células do tecido nervoso, foram erroneamente consideradas como parte do sistema nervoso periférico até meados do séc. XX<sup>(2)</sup>. No início da década de 70, Ralph Steinman e Zanvil Cohn, identificaram uma população de células no baço com forma dendrítica, sendo descritas como uma nova forma de leucócitos com funções ativadoras do sistema imunitário<sup>(3)</sup>. Até hoje, todos os tipos de células dendríticas conhecidas caracterizam-se por uma enorme capacidade de apresentação antigénica e por uma habilidade única de induzir e modular respostas imunitárias primárias.

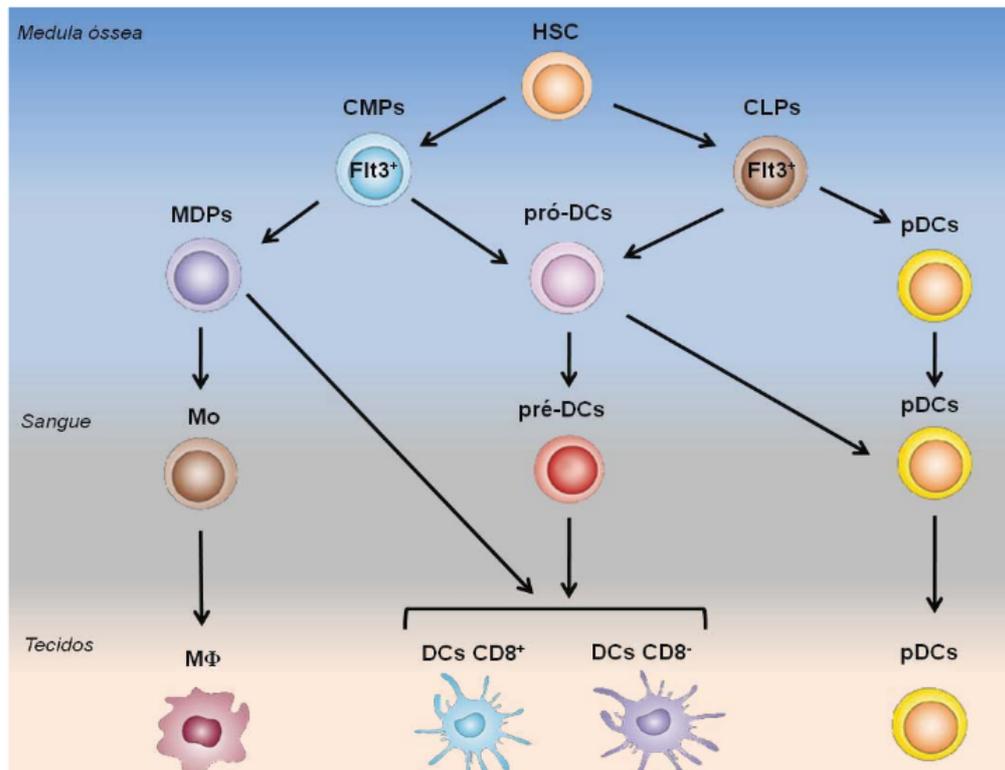
As DCs encontram-se nos tecidos periféricos não linfoides, tais como a pele, o trato respiratório e o sistema digestivo, frequentemente num estado imaturo, atuando como sentinelas. A maturação é desencadeada aquando da interação das DCs com estímulos patogénicos/pró-inflamatórios, envolvendo o processo grandes alterações fenotípicas, morfológicas e funcionais<sup>(2)</sup>. O processo de maturação é caracterizado pela perda da sua capacidade fagocítica, alterações na expressão de recetores de quimiocinas, pela produção de quimiocinas e citocinas e ainda pela expressão aumentada de moléculas co-estimuladoras e do complexo major de histocompatibilidade (MHC) que contém o antígeno que posteriormente irá ser reconhecido pelo recetor dos linfócitos T (TCR)<sup>(4)</sup>. A grande heterogeneidade das DCs, aliada à sua capacidade de atingirem diferentes estados de maturação, permite-lhes interagir com uma grande variedade de células efetoras, nomeadamente, linfócitos T, linfócitos B, e células NK (*natural killer*), conferindo-lhes assim um papel extremamente dinâmico e aliciante para o desenvolvimento de novas estratégias imunoterapêuticas<sup>(2)</sup>.

Vários ensaios clínicos têm demonstrado que a imunização de pacientes oncológicos com DCs carregadas com antígenos tumorais é uma abordagem segura e promissora. Neste sentido, o presente trabalho pretende rever o estado do conhecimento acerca da imunobiologia das DCs, as suas aplicações em vacinas antitumorais e concluir sobre os atuais desafios e perspetivas futuras.

## 2. IMUNOBIOLOGIA DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

### 2.1 Origem e classificação

A ontogenia precisa dos várias sub populações de DCs, ainda se encontra por esclarecer. No entanto, todos os tipos de DCs conhecidas, até última instância, têm origem nas células estaminais hematopoiéticas (HSCs) na medula óssea. As recém formadas HSCs, vão dar origem a inúmeros precursores que conseguem atingir o tecido alvo através da circulação sanguínea<sup>(5)</sup>. De entre os precursores, destaca-se os progenitores comuns mielóides (CMPs) e os progenitores comuns linfóides (CLPs), que originam posteriormente precursores intermediários como os precursores de macrófagos e DCs (MDPs). Os MDPs dão origem aos precursores comuns de DCs (CDPs) que estão restritos a originarem as duas grandes linhagens de DCs conhecidas: as DCs clássicas (cDCs) e as DCs plasmocitoides (pDCs)<sup>(6)</sup>. Independentemente da linhagem do precursor, o seu potencial para originar as diferentes subpopulações de DCs encontra-se relacionado com a capacidade de resposta e expressão à citosina Fms semelhante à tirosina cinase 3 ligando (Flt3<sup>+</sup>) (Figura 1). Segundo o



**Figura 1: Origem e diferenciação das células dendríticas.** Através de inúmeros estudos, principalmente em murganhos, foram isolados do baço pré-DCs (pre-DCs) que mostraram dar origem a DCs CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup>, onde também foram identificados precursores (MDPs) que podem dar origem a monócitos (Mo), macrófagos (MΦ) e ainda DCs CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup>. Os pré-DCs, mostraram dar origem a DCs plasmocitóides (pDCs). (Adaptado de Neves BMR.,2010 <sup>(2)</sup>).

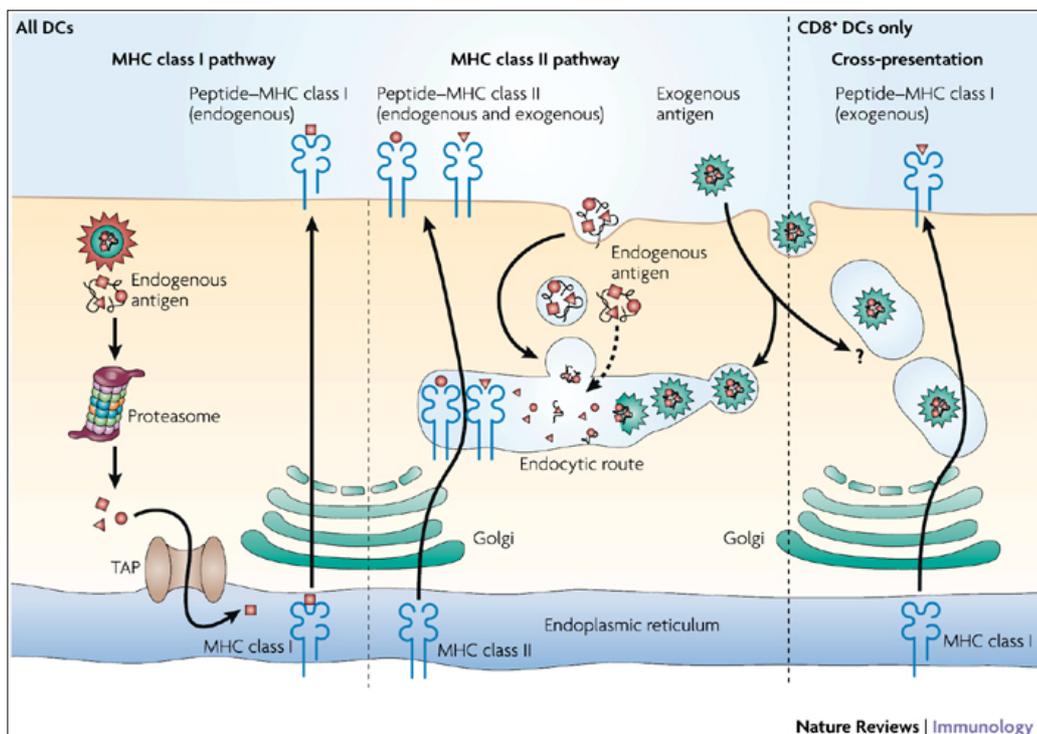
modelo de comprometimento gradual ou modelo de regulação plural de desenvolvimento, quanto mais próximo estiverem os precursores das HSCs, maior será a probabilidade de darem origem a todas as subpopulações de DCs<sup>(7)</sup>.

A enorme heterogeneidade, torna a classificação das DCs bastante complexa. No Homem, o conhecimento dos diferentes tipos de DCs, está muito limitado pela possibilidade de obtenção de amostras, sendo as mais estudadas as isoladas a partir do sangue e da pele. Tendo por base a ontogenia, marcadores de superfície e características funcionais, as DCs podem ser agrupadas em duas grandes populações: as pDCs e as cDCs. As primeiras encontram-se no sangue e nos órgãos linfóides, possuem uma enorme plasticidade funcional podendo induzir respostas T auxiliares do tipo Th1 e Th2 ou mesmo tolerância através de indução de células T reguladoras (Tregs). Após uma interação com agonistas dos recetores do tipo Toll (TLR) 7 e 9 na sequência de uma infeção viral, possuem uma enorme capacidade de produzir elevadas quantidades de interferão tipo I (IFN- $\alpha/\beta$ ). As segundas (cDCs), encontrando-se no sangue periférico e nos tecidos linfóides e não linfóides, possuindo uma elevada expressão de recetores TLR 1,2,3,4 e 8. Este tipo de DCs encontra-se normalmente envolvida no reconhecimento de estruturas bacterianas e na produção de citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente a interleucina 6 (IL-6) a IL-12p70, e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), conseguindo assim recrutar linfócitos T citotóxicos (CTL) resultantes da ativação das células Th1/Th17<sup>(2,8)</sup>. Por fim, as células de Langerhans representam uma subpopulação de células com muitas características fenotípicas e funcionais semelhantes às DCs mas foi recentemente evidenciado que apresentam uma ontogenia distinta. As LCs derivam de precursores embrionários e contrariamente às outras subpopulações de DCs, apresentam capacidade de se autorrenovarem localmente<sup>(9)</sup>.

## 2.2. Captação, processamento e apresentação de antígenos

Uma das mais relevantes características funcionais das DCs é a sua capacidade para captar, processar e apresentar antígenos. As DCs captam antígenos através de diferentes mecanismos, nomeadamente por macropinocitose, fagocitose e endocitose mediada por recetores<sup>(10)</sup>. Seguidamente, as DCs processam os antígenos e apresentam aos linfócitos T sob a forma de péptidos antigénicos acoplados a moléculas MHC<sup>(2)</sup>. Este processamento dos antígenos é diferenciado de acordo com a sua natureza molecular (lipídico ou proteico) e com a sua origem. Encontram-se, portanto, descritos na literatura três vias de processamento e apresentação: uma via endocítica (exógena) em que os antígenos são

apresentados a linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou via MHC classe II, uma via citosólica (endógena) ou em que os antígenos são apresentados a linfócitos T CD8<sup>+</sup> via MHC classe I; e ainda uma via de apresentação de antígenos lipídicos acoplados a moléculas da família CDI, sendo estes apresentados a células NK. Para além destas vias de apresentação clássicas, as DCs possuem ainda a capacidade única de apresentarem antígenos exógenos via MHC classe I, um processo designado de apresentação cruzada. A apresentação cruzada é fundamental no desenvolvimento de respostas imunológicas em infeções virais e também para a destruição de células tumorais <sup>(11)</sup>.



**Figura 2: Vias de apresentação de antígeno nas células dendríticas. Via MHC I classe I:** Ocorre a degradação proteossomal de proteínas endógenas, e os peptídeos gerados são dirigidos através do TAP (Transportador associado ao processamento de antígenos) para o retículo endoplasmático onde se vão ligar a moléculas MHC-I recém sintetizadas. Os complexos MHC-I-peptídeos são transportados para a membrana citoplasmática através da rede trans-Golgi. **Via MHC I classe II:** Antígenos exógenos são internalizados por endossomas (autofagia), que após um processo de maturação, fundem-se com lisossomas formando fagolisossomas, e ocorre a sua degradação em peptídeos antigênicos. Posteriormente, os peptídeos ligam-se a moléculas MHC-II, atravessando o citoplasma em direção à superfície celular através de vesículas exocíticas. **Apresentação cruzada:** Os antígenos exógenos são internalizados maioritariamente por macropinocitose ou fagocitose, sendo libertados no citosol por mecanismos ainda desconhecidos. São degradados pelo proteossoma e os peptídeos antigênicos resultantes migram para o retículo endoplasmático onde são acoplados a moléculas MHC-I e são posteriormente transportados para a membrana citoplasmática. Apesar de não estar ilustrada na figura relativamente à **apresentação de antígeno lipídicos acoplados a moléculas CDI**, o retículo endoplasmático sintetiza as proteínas CDI e estas são transportadas em vesículas até à superfície celular. Parte das moléculas sintetizadas associam-se a antígenos lipídicos de origem endógena ou exógena. (Adaptado de Villadangos, J. and Schnorrer, P., 2007 <sup>(12)</sup>)

### 2.3. Maturação

Após um “sinal de perigo”, as DCs migram dos tecidos periféricos, para os tecidos linfoides, e sofrem uma complexa e coordenada série de alterações fenotípicas, morfológicas e funcionais, conseguindo adquirir assim um grande potencial imunestimulador. O processo de maturação é um processo contínuo, sendo apenas concluído durante a interação da DC com o linfócito T. Este processo pode ser desencadeado nas DCs, através do reconhecimento de agentes patogénicos ou de padrões moleculares associados ao dano celular (DAMPs), pelos recetores de reconhecimento de padrões (PPRs), e indiretamente através da exposição de vários mediadores inflamatórios que são produzidos por outras células do sistema imunitário. O processo de maturação é assim caracterizado por: alterações na morfologia das células, em que há uma profunda reorganização do citoesqueleto das DCs, com grandes alterações na rede de microfilamentos de atina; diminuição da capacidade de internalização de antigénio, (apesar de estudos recentes terem demonstrado no entanto que DCs maduras são também capazes de internalizar eficientemente os antigénios)<sup>(13)</sup>; alteração das características dos compartimentos endocíticos, nomeadamente a diminuição do pH nas vesículas endossomais o que provoca um aumento da atividade das enzimas proteolíticas, aumentando assim a disponibilidade de moléculas MHC-II, e também facilitando o processamento dos antigénios internalizados; alterações na expressão de moléculas co-estimuladoras, sendo este passo crucial para a formação da sinapse imunológica e para a estimulação dos linfócitos T; alterações na expressão de quimiocinas e citoquinas, que irão conferir uma enorme plasticidade funcional, uma vez que diferentes perfis levam à polarização de diferentes subpopulações de linfócitos T, nomeadamente linfócitos Th1, Th2, Th17, Treg, e T citotóxicos<sup>(2,14)</sup>.

## 2.4. Interação das DCs com linfócitos

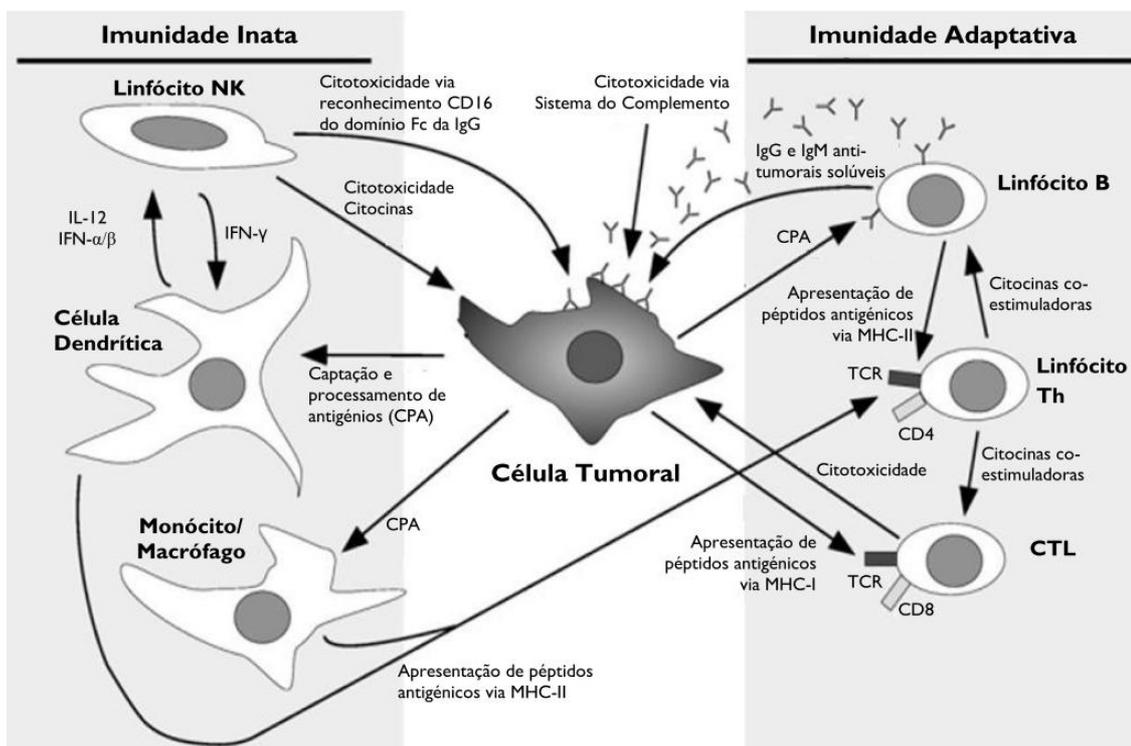
Após a maturação, as DCs expressam elevados níveis de moléculas co-estimuladoras, assim como moléculas MHC, tornando-se assim capazes de apresentar antígenos aos linfócitos T *naive* e aos Linfócitos B <sup>(8)</sup>. O tipo de resposta imunológica desencadeada pelas DCs irá depender do estímulo indutor de maturação, do perfil de maturação induzido (quimiocinas, citocinas, expressão de moléculas co-estimuladoras), da concentração de antígeno apresentado, da intensidade e duração da interação destas com os linfócitos e também de fatores inerentes aos próprios linfócitos<sup>(2)</sup>.

Classicamente, as DCs migram para os nódulos linfáticos e conseguem apresentar os antígenos aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> pela via MHC-II e aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> pela via MHC-I. Esta interação vai resultar na ativação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e na diferenciação dos linfócitos CD4<sup>+</sup>, nos seus diferentes tipos de células reguladoras e efetoras. Estes processos exigem por parte das DCs três sinais distintos: o primeiro trata-se do reconhecimento dos complexos MHC-antígeno pelos receptores TCR no linfócito; o segundo resulta da interação entre os sinais positivos e negativos que são originados pela interação das moléculas co-estimuladoras das DCs e os respetivos ligandos nas células T, podendo desencadear assim tolerância ou uma resposta imunogénica; a terceira resulta do microambiente de quimiocinas e citocinas que promovem a diferenciação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> em CTLs e a polarização dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> em células efetoras (Th1, Th2, Th17) ou reguladoras (Tregs adaptativas, 1 e 3)<sup>(11)</sup>. Relativamente aos linfócitos B, o papel das DCs é maioritariamente indireto. Resulta essencialmente da indução da expressão de CD40L e da IL-2 nos linfócitos T, o que por sua vez irá facilitar a ativação dos linfócitos B.

As DCs desempenham assim um papel central na modulação da imunidade, uma vez que estabelecem a ligação entre a imunidade inata e adaptativa, direcionando a resposta adaptativa ou promovendo a tolerância a antígenos ambientais e a auto-antígenos<sup>(2)</sup>.

### 3. APLICAÇÕES DAS DCs EM VACINAS ANTITUMORAIS

Foram até à data realizados mais de 300 ensaios clínicos, com recurso a DCs como estratégia imunoterapêutica para tratamento de inúmeros tipos de tumores sólidos e hematológicos. As DCs, dada a sua enorme capacidade de captação e apresentação de proteínas tumorais, conseguem desencadear fortes respostas imunogénicas, através da ativação e da expansão de células efetoras como as células NK, os linfócitos Th1 e os linfócitos CTL<sup>(15)</sup>. As DCs apresentam portanto diferentes mecanismos no que concerne à destruição de células malignas, nomeadamente através da ativação de efetores da Imunidade Inata (resposta primária) como por exemplo células NK ou da imunidade adaptativa (linfócitos Th1 e CTL). Através da apresentação de antígenos via MHC II e MHC I as DCs ativadas vão promover a diferenciação das células T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> em TH1, TH2, Th17, Tregs e CTL, respetivamente (Figura 3)<sup>(16,17)</sup>.

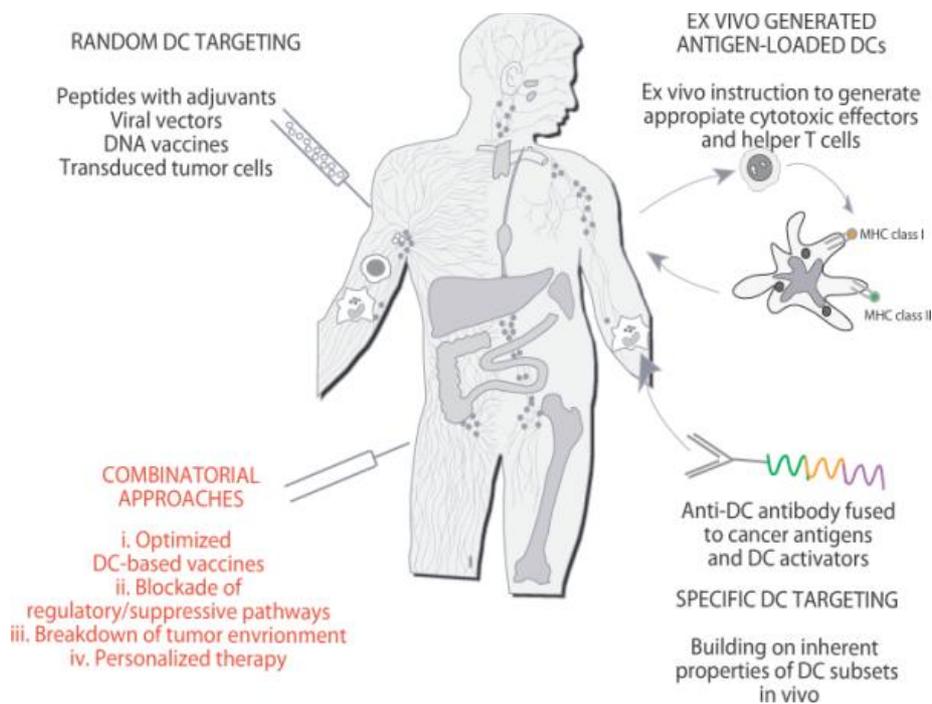


**Figura 3. Imunidade inata e adaptativa na resposta antitumoral.** As setas indicam o impacto das células do sistema imunitário sobre as células tumorais. (adaptado de Oliveira, et al.,<sup>(18)</sup>).

No que concerne à sua capacidade de desencadear respostas, as vacinas de DCs demonstraram ser bastante promissoras em inúmeros ensaios clínicos.<sup>(19)</sup> Os primeiros estudos datam de 1990, e começaram por utilizar DCs imaturas ou parcialmente imaturas, caracterizadas como vacinas de primeira geração<sup>(20)</sup>. A vacina de primeira geração sipuleucel-

T (Provenge<sup>®</sup>) é a primeira vacina aprovada pela FDA (Food and Drug Administration) para o tratamento do cancro da próstata resistente ao tratamento hormonal. A vacina consiste em DCs autólogas do sangue periférico incubadas *in vitro* com uma proteína recombinante constituída por GM-CSF e PA2024 (antigénio prostático fosfatase ácida). A eficácia da sipuleucel-T foi avaliada num ensaio clínico de fase III, envolvendo 512 pacientes com cancro da próstata avançado, tendo-se demonstrado um aumento da taxa de sobrevivência de cerca de 22 % <sup>(21)</sup>. Inúmeros outros estudos têm vindo a demonstrar que as vacinas de DCs representam uma opção terapêutica segura com inegável capacidade de indução de respostas imunológicas antitumorais efetivas<sup>(20,22)</sup>. Diversas vacinas antitumorais de DCs têm sido aprovadas sob regimes especiais nomeadamente como Medicamento Órfão e sob o regime de Exceção Hospitalar, afigurando-se deste modo como uma nova esperança na terapêutica contra o cancro.

As vacinas antitumorais baseadas em DCs têm sido desenvolvidas tendo por base duas abordagens distintas: a manipulação *ex vivo* e o direcionamento *in vivo* (Figura 4).

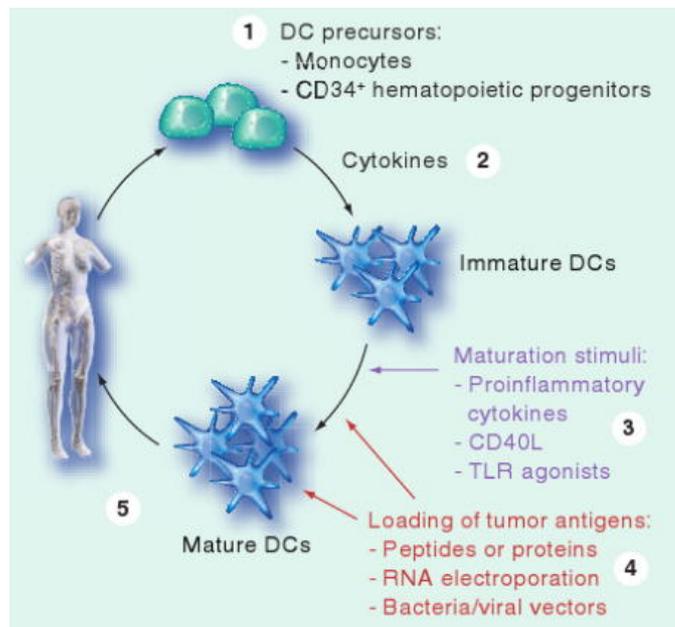


**Figura 4. Diferentes abordagens da imunoterapia tumoral baseada em Dcs.** (Adaptado de Palucka *et al.*, 2009 <sup>(23)</sup>).

## 4. MANIPULAÇÃO EX VIVO

### 4.1. Fontes das DCs

As DCs diferenciadas *ex vivo* podem ser obtidas a partir de monócitos do sangue periférico (CD14<sup>+</sup>) ou de precursores da medula óssea (HSCs CD34<sup>+</sup>), isolados a partir do sangue periférico<sup>(24)</sup>. Por questões de maior abundância os precursores monocíticos são os mais frequentemente utilizados. Dos vários métodos para obtenção de precursores CD14<sup>+</sup> sanguíneos, destacam-se os que apresentam maior grau de pureza e consequentemente maior rendimento, nomeadamente a elutriação (as células são separadas por densidade e tamanho, com um líquido corrente, sujeitas a centrifugações constantes) e a separação imunomagnética (microesferas magnéticas revestidas com anticorpo monoclonal anti-CD14, que se conseguem ligar especificamente às células-alvo). Dos dois métodos referidos anteriormente, o que tem maior rendimento é o primeiro uma vez que permite a obtenção de um número elevado de monócitos ( $87 \pm 7\%$ ), com um elevado grau de pureza ( $82 \pm 3\%$ ).<sup>(25)</sup> Posteriormente e tal como ilustrado na Figura 5 (2) os monócitos obtidos são sujeitos a um meio de cultura com GM-CSF (Fator estimulante de colónias de macrófagos e granulócitos) e IL-4 durante 5 a 7 dias, conseguindo assim obter-se uma grande quantidade



**Figura 5. Conceito de imunoterapia antitumoral por manipulação *Ex vivo*.** (1) Monócitos HSCs CD34<sup>+</sup> isolados do doente oncológico; (2) Diferenciação de monócitos em Dcs imaturas, por incubação com GM-CSF e IL-4; (3) Ocorre o processo de maturação pelas citocinas pró-inflamatórias CD40 L ou agonistas TLR; (4) Processo de carregamento antieénico que poderá ocorrer em simultâneo com maturação ou posteriormente. (adaptado de: Sabado RL, Bhardwai. 2010 <sup>(14)</sup>).

de DCs imaturas, com uma elevada capacidade de captação e processamento de antígenos (26,27).

#### 4.2. Tipo e processo de carregamento antigénico

Posteriormente à diferenciação, as DCs são carregadas com antígenos tumorais. Este carregamento pode ser efetuado através da transfeção com RNA ou DNA total do tumor ou mRNAs sintéticos codificando antígenos específicos, por transdução viral, exposição a lisado tumoral ou células tumorais apoptóticas, ou finalmente a proteínas ou péptidos tumorais recombinantes<sup>(28)</sup>.

A transfeção com mRNA é das abordagens mais utilizadas, tendo mostrado maior benefício na indução da respostas CTL e Th1 relativamente as outras estratégias. Adicionalmente a utilização do mRNA total isolado de células tumorais leva ao desenvolvimento de respostas imunológicas contra um grande número de antígenos tumorais (conhecidos ou não), facto que não acontece por exemplo com a utilização de péptidos ou proteínas tumorais recombinantes<sup>(18)</sup>. Ainda de referir o carregamento antigénico por recurso a células tumorais apoptóticas ou lisados tumorais. Esta abordagem é também ela bastante usada uma vez que cobre todo o proteoma do tumor. A principal limitação reside na necessidade de realização de biopsia tumoral e consequente isolamento de células tumorais em quantidade suficiente.

#### 4.3. Vias de administração

As DCs após sofrerem maturação e carregamento com os antígenos tumorais são posteriormente re-administradas no paciente. As vias de administração mais frequentes são as vias intravenosa (iv), subcutânea (sc) e intradérmica (id), no entanto também se encontram referenciadas na literatura as vias intratumoral (it) e intranodal (in).

Para o tratamento de tumores sólidos, mais de 50% das vacinas de DCs testadas até à data foram administradas por via sc ou id. Estas vias são tecnicamente menos exigentes e mostraram induzir efetivamente respostas Th1 e CTL. As DCs administradas sc e id migram para os tecidos linfoides e aqui desencadeiam a ativação das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> antígeno-específicas. No entanto a percentagem de DCs injetadas na pele que efetivamente migram para os nódulos linfáticos é relativamente baixa (apenas 1 a 4%), tendo este fator

sido apontado como uma importante limitação e fonte de variabilidade entre ensaio clínicos<sup>(29)</sup>. Por sua vez a administração de DCs iv mostrou levar a uma acumulação preferencial destas células nos pulmões, fígado e baço. Embora seja uma via de administração que induz respostas humorais mais robustas, as respostas celulares são relativamente limitadas.

Alternativamente, as vacinas de DCs também podem ser administradas diretamente nos nódulos linfáticos ou mesmo no tumor. No entanto, são procedimentos extremamente exigentes em termos técnicos, exigindo um radiologista experiente para a orientação ecográfica da agulha de injeção. Esta via de administração está como tal associada a uma grande variabilidade de resposta e a taxas elevadas de morbidade.

A via ideal de administração assim como a quantidade ideal de células a serem administradas está ainda por estabelecer. Recentemente, com o intuito de induzir uma resposta mais eficaz, estabeleceram-se protocolos de administração usando diversas vias em simultâneo (por exemplo iv + sc, sc + id)<sup>(14)</sup>. Quanto ao número de DCs a administrar por vacina, parece haver uma clara relação entre este e a efetividade da resposta induzida, tendo o valor mínimo sido teorizado em cerca de  $15 \times 10^6$  células. No entanto esta relação é também ela afetada pela via de administração escolhida. Foi recentemente demonstrado que para as vias sc ou id é preferível administrar um menor número de células em múltiplas administrações<sup>(30)</sup>.

## 5. DIRECIONAMENTO IN VIVO

O direcionamento de antígenos para as DCs *in vivo* representou um importantíssimo avanço no desenvolvimento de novas abordagens imunoterapêuticas, uma vez que veio solucionar alguns dos maiores problemas associados à manipulação *ex vivo*, nomeadamente a nível de custos e falta de viabilidade das células re-injetadas<sup>(31)</sup>. O direcionamento *in vivo* baseia-se na administração de antígenos tumorais acoplados a anticorpos específicos para algumas moléculas de superfície das DCs, de modo a direcioná-los seletivamente para estas<sup>(2)</sup>. Este procedimento mostrou ser capaz de desencadear respostas imunológicas T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicas de uma forma bastante eficiente<sup>(32)</sup>.

Entre os recetores de DCs mais frequentemente visados por esta estratégia encontram-se por exemplo os recetores DEC-205, CD40, DC-SIGN, DCIR, recetor de manose, receptor Cleac9A e recetor XCR1. De realçar que o direcionamento de antígenos para as DCs endógenas através de anticorpos monoclonais requer a administração simultânea de um

adjuvante (indutor de maturação), caso contrário as respostas induzidas serão fundamentalmente tolerogénicas<sup>(33)</sup>. Apesar da existência abundante de dados pré-clínicos gerados com esta abordagem os ensaios em humanos são ainda muito escassos. De realçar os ensaios clínicos NCT00948961, NCT01834248 e NCT02166905 que visam avaliar a segurança e eficácia da administração do antígeno tumoral NY-ESO-1 hibridizado com um anticorpo monoclonal para o recetor DEC-205 e os ensaios NCT00709462 e NCT00648102 em que o recetor visado é o recetor de manose e o antígeno tumoral a gonadotrofina coriónica  $\beta$ .

## 6. ATUAIS DESAFIOS E PERSPETIVAS FUTURAS

Apesar dos avanços promissores da imunoterapia com vacinas de DCs e dos inúmeros resultados clínicos positivos, torna-se fundamental, continuar a aprofundar os nossos conhecimentos acerca da biologia das DCs e dos próprios tumores em si<sup>(20)</sup>. Os atuais desafios para conduzir a uma resposta imune eficaz passam pela identificação de antígenos tumorais específicos para um determinado tipo de tumor, pela otimização do tipo e processamento de carregamento antigénico, pela procura de uma combinação adequada de estímulos de maturação capazes de induzir especificamente respostas imunes citotóxicas e pela minimização de reações indesejadas, maximizando assim o potencial das vacinas de DCs<sup>(25)</sup>.

Um facto que se tornou bem claro ao longo destes cerca de 20 anos de ensaios clínicos com vacinas antitumorais baseadas em DCs é que as células administradas para além de terem que estimular adequadamente respostas CTL e Th1 têm também de superar vários mecanismos tumorais imunossupressores. As células tumorais conseguem gerar frequentemente um micro-ambiente imunossupressor (estando associado à produção de IL-6, IL10, TGF- $\beta$ , VEGF e indução de Treg), o que impede uma efetiva ativação das DCs e consequentemente uma inadequada resposta antitumoral<sup>(2,34)</sup>. O estabelecimento de mecanismos imunossupressores gerados pelas células tumorais é considerado como um dos maiores obstáculos no sucesso da resposta imune citotóxica. Como tal, neste âmbito têm sido desenvolvidas inúmeras estratégias terapêuticas para o bloqueio da atividade imunossupressora<sup>(23,35)</sup>. Neste sentido, vacinas de DCs são cada vez mais usadas em regimes terapêuticos em combinação com outras terapias antitumorais. De entre estas combinações, são de destacar as associações de vacinas de DCs com anticorpos monoclonais ou inibidores que visam bloquear os mecanismos imunossupressores tumorais como por exemplo o

basiliximab, daclizumab, denileukin diftotox, bevacizumab e os anticorpos anti-CTLA4 e anti-PD-1, entre outros. Finalmente, também as associações de imunoterapia com DCs e terapias convencionais (como a quimioterapia e a radioterapia) têm vindo a ganhar algum destaque. A virtude destas associações prende-se com o aumento da apoptose de células tumorais induzida pela quimioterapia e radioterapia, o que vai posteriormente “alimentar” as DCs endógenas com os antígenos resultantes<sup>(20,23)</sup>.

Embora a primeira geração de vacinas antitumorais baseadas em DCs tenha suscitado alguma apreensão quanto ao real valor clínico da abordagem, podemos afirmar atualmente que se trata de um procedimento seguro e com capacidade para desencadear respostas imunológicas efetivas. O conhecimento adquirido ao longo destas duas décadas de experimentação acerca da biologia das DCs e das características ótimas de uma resposta antitumoral permitiu o desenvolvimento de abordagens muito mais racionais. É atualmente depositada uma enorme esperança nas novas gerações de vacinas de DCs, podendo estas vir a representar o futuro da imunoterapia celular para o tratamento de doentes oncológicos.

## BIBLIOGRAFIA

1. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. **Kuby Immunology**. 6ª Ed. New York: W. H. Freeman and Company. (2007) 38-40.
2. Neves BMR. **Modulação das células dendríticas por estímulos alérgicos e infecciosos**. Tese de Doutoramento em farmácia, na especialidade de biologia celular e molecular. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Coimbra: Universidade de Coimbra. (2010) 1-62.
3. Paczesny S, et al. **Dendritic cells as vectors for immunotherapy of cancer**. *Semin Cancer Biology*. (2003) 13:439-447.
4. Kalinski P. **Dendritic cells in immunotherapy of established cancer: roles of signals 1, 2, 3 and 4**. *Curr Opin Inv Drugs*. (2009) 10(6):526-535.
5. Mogensen TH. **Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate Immune defenses**. *Clin Microbiol Rev*. (2009) 22(2):240-273.
6. Poltorak MP, Schraml BU. **Fate mapping of dendritic cells**. *Front Immunol*. 2015; 6:199. doi:10.3389/fimmu.2015.00199.
7. Naik SH. **Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little**. *Immunol Cell Biol*. 2008; 86(5):439-452. doi:10.1038/icb.2008.28
8. Brussel IV, Berneman ZN, Cools N. **Optimizing dendritic cell-based immunotherapy: tackling the complexity of different arms of the immune system**. *Mediat Inflamm*. (2012) 1-14.
9. Malissen B, Tamoutounour S, Henri S. **The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin**. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(6):417-428. doi:10.1038/nri3683.

10. Banchereau J, et al. **Immunobiology of Dendritic Cells**. *Annu. Rev. Immunol.* (2000) 18:767-811.
11. Boudreau JE, et al. **Engineering dendritic cells to enhance cancer immunotherapy**. *Mol Therapy.* (2011) 19(5):841-853.
12. Villadangos, J.A., Schnorrer, P. **Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo**. *Nat. Rev. Immunol.* (2007) 7,543-555.
13. Platt C, et al. **Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens**. *Immunology.* (2010) 107(9): 4287-4292.
14. Sabado RL, Bhardwaj N. **Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment**. *Immunotherapy.* (2010) 2(1):37-56.
15. Koido S, et al. **Current Immunotherapeutic Approaches in Pancreatic Cancer**. *Clin Dev Immunol.* (2011)1-15.
16. Borghaei H, Smith MR, Campbell KS. **Immunotherapy of cancer**. *Eur J Pharmacol.* (2009) 625:41-54.
17. Zhu J, Paul WE. **Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors**. *Immunol Rev.* (2010) 238(1):247-262.
18. Oliveira T, et al. **Imunoterapia anti-tumoral com células dendríticas**. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, vol. 2 N°2. (2013) 45-60.
19. Zhang, C. e Engleman, E.G. **Mechanisms of action of dendritic cell vaccines for the treatment of cancer**. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms, Immunodisorders and autoimmunity*, 3(2), (2006) 213-218.
20. Kirkwood, J.M. et al. **Immunotherapy of Cancer in 2012**. *National Institutes of Health*, 62(5) (2012) 309-335.

21. Riether, C., Schürch, C. e Ochsenbein, A. **From “magic bullets” to specific cancer immunotherapy.** *Swiss Medical Weekly*, 143(January). (2013) 1-12.
22. Jähnisch H, et al. **Dendritic cell-based immunotherapy for prostate cancer.** *Clin Dev Immunol.* (2010) 1-8.
23. Palucka K, et al. **Dendritic cells: are they clinically relevant?.** *Cancer J.* (2010) 16(4):318-324.
24. Nguyen-Pham, T. et al. **Immunotherapy using Dendritic Cells against Multiple Myeloma: How to Improve?** *Clinical and Developmental Immunology*, (2012) 1-13.
25. Skalova, K. et al. **Human myeloid dendritic cells for cancer therapy: Does maturation matter?** *Vaccine.* (2010) 28: 5153-5160.
26. Hamdy, S. et al. **Targeting dendritic cells with nano-particulate PLGA cancer vaccine formulations.** *Advanced Drug Delivery Reviews.* (2011) 943-955.
27. Li, D. et al. **Maturation induction of human peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells.** *Experimental and Therapeutic Medicine.* (2012) 131-134.
28. Nicolette CA, et al. **Dendritic cells for active immunotherapy: optimizing design and manufacture in order to develop commercially and clinically viable products.** *Vaccine.* (2007) 25:47-60.
29. Verdijk P, Aarntzen EHJG, Lesterhuis WJ, et al. **Limited amounts of dendritic cells migrate into the T-cell area of lymph nodes but have high immune activating potential in melanoma patients.** *Clin Cancer Res.* 2009;15(7):2531-2540. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2729.

30. Aarntzen EHJG, Srinivas M, Bonetto F, et al. **Targeting of I111n-labeled dendritic cell human vaccines improved by reducing number of cells.** Clin Cancer Res. 2013;19(6):1525-1533. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1879.
31. Hamdy, S. et al. **Targeting dendritic cells with nano-particulate PLGA cancer vaccine formulations.** Advanced Drug Delivery Reviews, 63 (2011) 943–955.
32. Caminschi I, Maraskovsky E, Heath WR. **Targeting Dendritic Cells in vivo for Cancer Therapy.** Front Immunol. 2012;3:13. doi:10.3389/fimmu.2012.00013.
33. Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. **Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance.** J Exp Med. 2002;196(12):1627-1638.
34. Zhang, C. e Engleman, E.G. **Mechanisms of action of dendritic cell vaccines for the treatment of cancer.** Drug Discovery Today: Disease Mechanisms, Immunodisorders and autoimmunity, 3(2) (2006) 213-218.
35. Apetoh L, et al. **Harnessing dendritic cells in cancer.** Semin Immunol. (2011) 23:42-49.