

## Imunoterapia anti-tumoral com células dendríticas Anti-tumor immunotherapy dendritic cells

Oliveira, T. G.<sup>1</sup>, Borges, O.<sup>2,3</sup> e Cruz, M.T.<sup>2,3</sup>

ARTIGO DE REVISÃO | REVIEW ARTICLE

### RESUMO

As células dendríticas (DCs) são células apresentadoras de antígeno dotadas de uma extraordinária capacidade de estimular e regular a resposta dos linfócitos T. Devido à sua capacidade imunomoduladora e ao reduzido número de DCs ativadas capazes de gerar uma eficiente resposta imunológica, as DCs têm sido muito utilizadas em ensaios clínicos com o intuito de obter ou amplificar uma resposta imune anti-tumoral. Apesar de estudos clínicos evidenciarem que as vacinas de DCs são seguras e induzem uma resposta imunológica na maioria dos doentes, o número de casos com remissões completas do tumor ainda é pequeno. Para aumentar a eficácia clínica é necessário melhorar e criar novas estratégias que incluam a amplificação da imunidade adaptativa anti-tumoral e o bloqueio da proliferação de linfócitos T reguladores e do micro-ambiente imunossupressor. A combinação de vacinas de DCs com os protocolos convencionais de quimio e radioterapia promovem a ativação de DCs, a apresentação cruzada de antígenos e a eliminação seletiva de células imunossupressoras, revertendo o estado de imunossupressão inerente ao tumor. Assim, esta associação de quimioimunoterapia poderá explorar positivamente a capacidade das DCs na obtenção de uma resposta imunológica mais eficaz.

**Palavras-Chaves:** Células dendríticas; Cancro; Imunoterapia; Vacina

### ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) are professional antigen-presenting cells, which display an extraordinary capacity to induce and regulate T-cell responses. Because of their immunoregulatory capacities and because very small numbers of activated DCs are highly efficient in generating immune responses against antigens, DCs have been extensively used in clinical trials in order to elicit or amplify immune responses against cancer. While clinical trials provide evidence that dendritic cells vaccines are safe and elicit immunological responses in most patients, few complete tumor remissions have been reported. To improve the clinical efficacy, it is mandatory to design novel and improved strategies that can boost adaptive immunity to cancer helping to overcome regulatory T cells and allowing the breakdown of the immunosuppressive tumor microenvironment. The association of DCs vaccines with conventional chemo-and radiotherapy protocols could enhance DCs activation and antigen cross-presentation, selectively eliminating immunosuppressive cells, thus reverting the immunosuppression state caused by cancer, suggesting that relevant chemoimmunotherapy associations could fully exploit DC capacity to trigger anticancer responses.

**Keywords:** Dendritic cells; Cancer; Immunotherapy; Vaccine.

<sup>1</sup>Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

<sup>2</sup>Grupo de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

<sup>3</sup>Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

*Endereço para correspondência:* Maria Teresa Cruz. Faculdade de Farmácia – Universidade de Coimbra – Pólo das Ciências da Saúde - Coimbra – Portugal *E-mail:* trosete@ff.uc.pt

Submetido/ Submitted: 4 de julho de 2013 | Aceite/Accepted: 30 de setembro de 2013

## INTRODUÇÃO

As células dendríticas (DCs) foram identificadas, pela primeira vez, por *Paul Langerhans*, em 1968, que durante um estudo anatômico da epiderme constatou a presença de uma rede de células irregulares com longas extensões membranares, semelhantes a dendrites das células do sistema nervoso (células de *Langerhans*, LCs)<sup>1</sup>. A sua incógnita função estendeu esta analogia até meados do século XX, erroneamente incluída como parte integrante do sistema nervoso periférico<sup>2</sup>. Posteriormente, em 1973, Ralph Steinman e Zanvil Cohn observaram uma população de células no baço com forma dendrítica, mostrando tratar-se de uma nova classe de leucócitos com funções imunomoduladoras do sistema imunitário<sup>3</sup>. Atualmente sabe-se que as DCs são células apresentadoras de antígeno (APCs) altamente eficientes, essenciais e com uma capacidade única de modulação da imunidade e tolerância<sup>2</sup>.

As DCs encontram-se normalmente num estado imaturo, sendo extremamente sensíveis a sinais de “perigo” resultantes de processos inflamatórios, infecciosos, ou de destruição celular<sup>4</sup>. Num processo tumoral, as DCs migram através da circulação sanguínea até ao tecido tumoral, sendo gerados estímulos que desencadeiam a sua maturação<sup>5</sup>. Durante este processo, as DCs perdem a sua capacidade fagocítica, ocorrendo a produção de citocinas e quimiocinas, alterações na expressão de recetores de quimiocinas e ainda a sobre-expressão de moléculas co-estimuladoras e moléculas do complexo *major* de histocompatibilidade (MHC) comtendo o antígeno que irá ser reconhecido pelo recetor dos linfócitos T (TCR)<sup>6</sup>.

A heterogeneidade das DCs, aliada à sua capacidade de atingirem diferentes estados de maturação confere-lhes um papel extremamente dinâmico, permitindo-lhes interagir com diversas células efetoras, incluindo linfócitos T, linfócitos B e linfócitos NK (*natural killer*). Esta modulação entre resposta imunogénica e tolerância periférica torna-as num alvo extremamente aliciante para o desenvolvimento de novas estratégias imunoterapêuticas, nomeadamente na potenciação da resposta anti-tumoral, no desenvolvimento de vacinas antimicrobianas e na indução de tolerância em transplantes, alergias ou autoimunidade<sup>7</sup>. Deste modo, o conhecimento dos mecanismos inerentes às alterações funcionais e fenotípicas desenca-

deadas durante o processo de maturação assume um papel preponderante na manipulação e compreensão de DCs, tendo em vista a otimização dos atuais protocolos imunoterapêuticos<sup>4</sup>. Este texto pretende ser uma revisão da aplicação das DCs na imunoterapia anti-tumoral, tendo por base os estudos recentes que demonstram segurança e viabilidade na indução de uma resposta imunológica e clínica em doentes oncológicos<sup>5</sup>. Neste contexto, as DCs serão abordadas no que respeita à sua imunobiologia, manipulação e imunoterapia, assim como será feita uma descrição de resultados de ensaios clínicos recentes.

## CÉLULAS DENDRÍTICAS

### Origem, diferenciação e classificação

As DCs têm origem a partir de células estaminais hematopoiéticas (HSCs) CD34<sup>+</sup> da medula óssea, onde as recém-formadas HSC dão origem a uma série de precursores que migram através da circulação sanguínea até ao tecido alvo<sup>8</sup>. Entre esses precursores encontram-se os progenitores comuns mielóides (CMPs) e os progenitores comuns linfóides (CLPs) cujo potencial de diferenciação está intimamente ligado à expressão e capacidade de resposta destes progenitores ao ligando Flt3L (*Fms-like tyrosine kinase 3 ligand*)<sup>2</sup>. Em condições de *stress* fisiológico, os monócitos diferenciam-se em DCs imaturas, entre uma variedade de outras citocinas, na presença do fator estimulante de colónias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF)<sup>8</sup>. Segundo o modelo de comprometimento gradual, os diferentes precursores não se encontram predestinados a dar origem a um tipo particular de DCs. No entanto, existe um gradiente de probabilidade que vai desde precursores que podem originar todos os tipos de DCs, precursores que só dão origem a DCs plasmacitóides (pDCs) e precursores que só dão origem a DCs CD8<sup>+</sup> e CD8<sup>-</sup>.

A enorme heterogeneidade apresentada pelas DCs torna a sua classificação bastante complexa; no entanto, genericamente, podem ser classificadas em pDCs e DCs convencionais (cDCs). As primeiras, de origem linfóide, encontram-se no sangue e órgãos linfóides, sendo caracterizadas pela sua extraordinária capacidade na produção de interferão tipo 1 (IFN- $\alpha/\beta$ ) após infeção viral ou após interação com agonistas dos recetores do tipo *Toll* (TLR) 7

e 9. Do ponto de vista funcional, apresentam enorme plasticidade podendo induzir respostas T auxiliares (Th) 1, Th2, ou tolerância, através da indução de células T reguladoras (Tregs). 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 pro-inflamatórias, designadamente o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6) e IL-12p70, ativando células Th1/Th17 e, consequentemente, recrutando linfócitos T citotóxicos (CTL). As cDCs apresentam ainda elevada expressão dos recetores TLR1, TLR2, TLR3, TLR4 e TLR8 e constituem os precursores de células de *Langerhans* ou de DCs intersticiais, consoante os estímulos recebidos e o microambiente a que são expostas<sup>3,9</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>10</sup>.

## IMUNOBIOLOGIA DE DCS

### Captação, processamento e apresentação de antígenos

Atuando como sentinelas nos tecidos periféricos não linfoides, as DCs imaturas são especializadas na captura e processamento de antígenos, reconhecendo, assim, os designados *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) ou padrões moleculares associados a agentes patogénicos. Estas estruturas, altamente conservadas, incluem lípidos microbianos, polissacarídeos, ácidos nucleicos e RNA viral, sendo reconhecidas via recetores de reconhecimento de padrões (PRRs). Estes recetores são diversificados, que por sua vez incluem TLR, recetores *nucleo-tide-binding oligomerization domain* (NOD-like), recetores da proteína cinase ativada (PKR) e helicases do tipo RIG-1<sup>8</sup>. Após efetuado o reconhecimento antigénico, a captação dos mesmos inclui mecanismos de macropinocitose, endocitose e fagocitose mediada por recetores. A sua internalização é mediada por um vasto número de recetores que, por processos de endocitose e fagocitose, inclui recetores para a porção FC das imunoglobulinas, recetores de complemento, recetores *scavenger*, recetores de lectina do tipo C e integrinas<sup>2</sup>.

As DCs processam antígenos endógenos e exógenos, apresentando-os aos linfócitos T sob

a forma de péptidos antigénicos acoplados a moléculas MHC. Este processamento é diferenciado, tendo em conta a origem e a natureza molecular do antígeno, encontrando-se descritos três mecanismos de apresentação: i) via MHC classe I ou citosólica (endógena); ii) via MHC classe II ou endocítica (exógena); iii) apresentação de antígenos lipídicos acoplados a moléculas CD1. As DCs possuem ainda a capacidade única de apresentar *in vivo* antígenos exógenos aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> pela via MHC-1, num processo designado por apresentação cruzada<sup>2,10</sup>.

### Maturação e estimulação da resposta imune

As DCs encontram-se normalmente nos tecidos periféricos num estado imaturo, sendo praticamente desprovidas de atividade imunoestimuladora. Contudo, após um estímulo de “perigo” (*danger signal*) as DCs migram para os tecidos linfoides, sofrendo uma complexa e coordenada série de alterações morfológicas, funcionais e fenotípicas, que culmina com aquisição de potencial imunoestimulador (maturação)<sup>2</sup>. Com efeito, DCs maturadas expressam altos níveis de moléculas co-estimuladoras, assim como moléculas MHC, tornando-se capazes de apresentar antígenos aos linfócitos B e T *naive*<sup>9</sup>. Este processo, contínuo e altamente regulado por vias de transdução de sinal, pode ser desencadeado de forma direta pelo reconhecimento de agentes patogénicos através de PRRs (caracterizado pelo aumento da produção de citocinas e quimiocinas por parte das DCs), ou de forma indireta através da exposição a mediadores inflamatórios produzidos por outras células do sistema imunitário, o que resulta num aumento da expressão membranar de moléculas co-estimuladoras<sup>2,9</sup>.

Nos nódulos linfáticos, as DCs apresentam os antígenos aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> via MHC-II e MHC-1, respetivamente. Esta interação resulta na ativação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e na diferenciação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos seus diferentes tipos de células efetoras e reguladoras, requerendo estes processos o fornecimento de três sinais distintos por parte das DCs. 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 co-estimuladoras 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 maturadas constitui o sinal 3, provocando a diferenciação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> em CTLs e a polarização dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> em células efetoras (Th1, Th2 e Th17) ou reguladoras (Tregs 1 e 3)<sup>10</sup>. Por outro lado, o papel das DCs na ativação de linfócitos B é maioritariamente indireto, através da indução da expressão de CD40L e de IL-2 nos linfócitos T (fatores preponderantes na ativação de linfócitos B). Um número crescente de evidências tem mostrado que as DCs também interagem com outras células da imunidade inata durante as fases iniciais da resposta imunológica. Estas interações são recíprocas, produzindo efeitos em ambas as células, ocorrendo fundamentalmente nos órgãos linfoides secundários e em locais de inflamação<sup>2</sup>.

A função desempenhada pelas DCs é, então, crucial na modulação da imunidade, ao estabelecer a ligação entre imunidade inata e adaptativa, direcionando a resposta imune ou promovendo tolerância antigénica. O tipo de resposta depende do estímulo indutor da maturação das DCs, do perfil de maturação induzido, da concentração do antígeno, da intensidade e duração da interação com os linfócitos e dos fatores inerentes a estes<sup>2</sup>.

## IMUNOTERAPIA ANTI-TUMORAL BASEADA EM DCs

### Imunoterapia baseada em DCs

O recurso a DCs como estratégia imunoterapêutica baseia-se na sua capacidade em captar e apresentar proteínas tumorais, desencadeando uma forte e efetiva resposta imunogénica, através da ativação e expansão de células efetoras como os linfócitos Th1, linfócitos CTL e células NK (Figura 1)<sup>11</sup>. A imunidade inata desencadeia uma primeira resposta através da libertação de citocinas que visam a lise de células anormais (via células NK), ou através da internalização de antígenos (monócitos, macrófagos ou DCs) para posterior apresentação às células T (Figura 2)<sup>12</sup>. O reconhecimento de complexos peptídicos de células tumorais via MHC-I, através do recetor TCR, promove a ativação de CTL e a libertação de citotoxinas (perforina e granzima), destruindo as células malignas<sup>11,13</sup>. A ativação de DCs via MHC-II promove a diferenciação das células T CD4<sup>+</sup> *naive* em, pelo menos, quatro grandes linhagens (Th1, Th2, Th17, Tregs) que participam em diversos tipos de resposta imune<sup>14</sup>. Contudo,

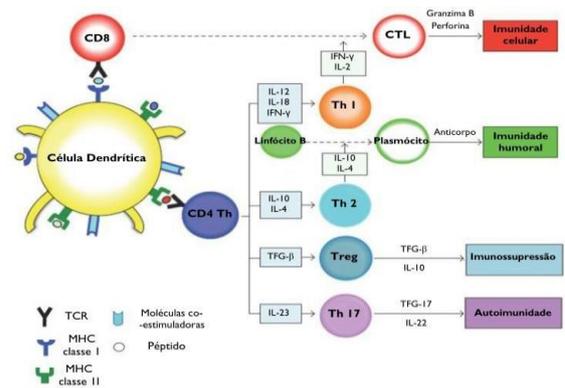


Figura 1. Homeostase do Sistema Imunológico. As células Th1 produzem IFN $\mu$  juntamente com citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ , que por sua vez ativam DCs que irão regular a permanência das CTLs CD8<sup>+</sup> como células de memória. A resposta Th2 promove a produção de IL-4 e IL-10 e está frequentemente relacionada com a imunidade humoral. Já as células Th17 segregam IL-17 e IL-22, provocando a inflamação dos tecidos implicados na autoimunidade. (adaptado de: Borghaei H *et al.*<sup>12</sup>)

as células tumorais geram frequentemente um microambiente imunossupressor que impede uma efetiva ativação das DCs e, conseqüentemente, uma inadequada resposta anti-tumoral. Este microambiente está associado à produção de IL-6, IL-10, fator de transformação do crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e indução de Treg<sup>2</sup>.

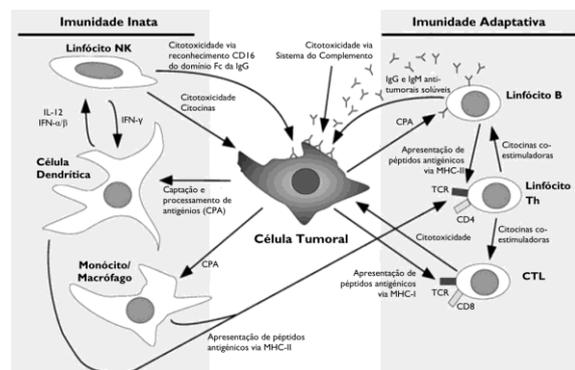


Figura 2. Imunidade inata e adaptativa na resposta anti-tumoral. As caixas cinzentas ilustram de um modo simplificado as respostas inata e adaptativa. As setas descrevem o impacto das células imunes sobre as tumorais. (adaptado de: Borghaei H. *et al.*<sup>12</sup>)

### Vacinas com DCs

A estratégia imunoterapêutica anti-tumoral com recurso a DCs baseia-se no desenvolvimento de vacinas que, partindo de precursores de DCs, são posteriormente diferenciadas e carregadas com antígenos tumorais autólogos, favorecendo uma resposta imune direcionada e efetiva<sup>15</sup>. Tal como ilustra a Figura 3, os precursores de DCs (monócitos ou HSCs CD34<sup>+</sup>) são isolados a partir do doente oncológico(1). A

incubação com GM-CSF e IL-4 promove a diferenciação dos monócitos em DCs imaturas, enquanto a incubação com Flt3L, GM-CSF e TNF- $\alpha$  diferencia as HSCs CD4<sup>+</sup> (2). A maturação das DCs é conseguida através da utilização de citocinas pró-inflamatórias, CD40L ou agonistas TLR (3). O carregamento com antígenos tumorais (proteínas ou ácidos nucleicos tumorais ou um simples antígeno alvo) pode ocorrer simultaneamente com a maturação ou numa fase posterior a este processo (4)<sup>15,16</sup>. Deste modo, DCs maturadas carregadas com o antígeno tumoral são injetadas no doente (5), migrando para os tecidos linfóides. Neste local, o organismo desencadeia uma resposta inata e desenvolve, ainda, a ativação das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (6). As células T ativas migram do tecido linfóide para o tecido tumoral (7) inibindo o seu crescimento (8)<sup>13</sup>.

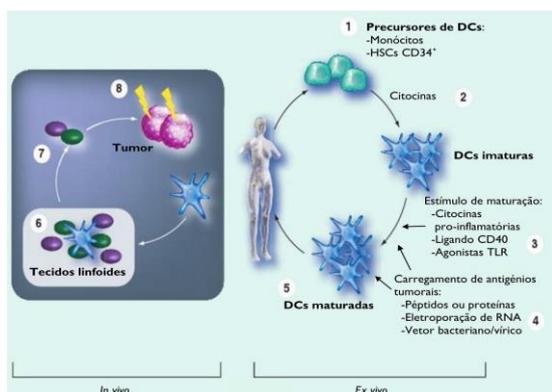


Figura 3. Imunoterapia com DCs. O recurso a vacinas como estratégia imunoterapêutica baseada em DCs para o tratamento e prevenção do cancro tem sido, nas duas últimas décadas, alvo de intensa investigação. A figura ilustra de um modo simplificado este conceito de imunoterapia anti-tumoral. (adaptado de: Sabado RL, Bhard-wajN.<sup>13</sup>)

### A vacina ideal

A vacina de DCs ideal deverá ser capaz de induzir DCs maturadas, com capacidade migratória, apresentar longevidade e estabilidade na apresentação do antígeno tumoral, de modo a iniciar e a manter uma efetiva e adaptativa resposta imune. O aumento da longevidade das DCs promove uma resposta dos linfócitos T mais efetiva e, portanto, aumenta a capacidade de eliminação do tecido tumoral<sup>17</sup>. Os principais e últimos parâmetros de avaliação de desempenho da vacina têm em conta a taxa de eliminação tumoral e o intervalo de sobrevivência livre de doença. Os primeiros resultados clínicos evidenciam segurança na administração deste tipo de vacinas, que, no entanto, conduzem por vezes a respostas imunes e clínicas limitadas<sup>3</sup>.

### Gerações e tipologia de vacinas

Os resultados dos primeiros ensaios com vacinas de DCs foram pouco conclusivos, uma vez que a regressão tumoral foi apenas observada esporadicamente. Parte do insucesso foi atribuído à reduzida carga antigénica apresentada pelas DCs, ao possível ambiente imunossupressor gerado, à fraca migração das DCs injetadas para os nódulos linfáticos e ainda ao facto dos ensaios terem sido realizados em doentes com tumores em fase terminal, cujo sistema imunitário se encontrava bastante debilitado. Estudos recentes referem que as DCs manipuladas *ex vivo* e posteriormente injetadas têm um papel limitado na estimulação direta dos linfócitos T *in vivo*. Pelo contrário, estas DCs ativam indiretamente os linfócitos T CD8<sup>+</sup> *naive* através da transferência dos antígenos de que são portadores para as DCs endógenas que, subsequentemente, os apresentam às células T CD8<sup>+</sup>. Desta forma a atividade imunogénica pode ser limitada e os benefícios da transferência de antígenos para as DCs endógenas podem ser anulados pela atividade imunossupressora da maioria dos tumores. As estratégias desenvolvidas no imediato aludem para o uso simultâneo de vacinas de DCs em combinação com o bloqueio da atividade imunossupressora tumoral através de anticorpos direcionados para determinadas moléculas<sup>2,18</sup>.

Como forma de ultrapassar algumas limitações da manipulação *ex vivo*, tem vindo a ser desenvolvida uma nova estratégia anti-tumoral baseada na administração *in vivo* de antígenos tumorais acoplados a anticorpos específicos para moléculas de superfície das DCs, de modo a direcioná-los seletivamente para estas. Esta abordagem tem mostrado resultados promissores em modelos animais, desencadeando respostas imunogénicas efetivas contra os alvos de tratamento tumorais<sup>2</sup>.

### Resistência Anti-tumoral

Um dos maiores obstáculos ao sucesso de vacinas com DCs é o desenvolvimento de mecanismos imunossupressores desencadeados pelas células tumorais (Figura 4)<sup>19</sup>. Com efeito, sob influência de um microambiente tumorigénico, as DCs podem adquirir um fenótipo tolerogénico. Deste modo, as DCs condicionadas podem produzir uma variedade de moléculas imunossupressoras e, assim, favorecer a resistência tumoral<sup>9</sup>. As células tumorais produzem

vários fatores imunossupressores como citocinas (TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-6) e moléculas de superfície que medeiam este tipo de resposta (VEGF, ligando Fas (Fas-L), ligando do recetor de morte celular pro- gramada 1 (PD-L1) e indolamina-2 e 3-dioxigenase (IDO)). Neste microambiente,

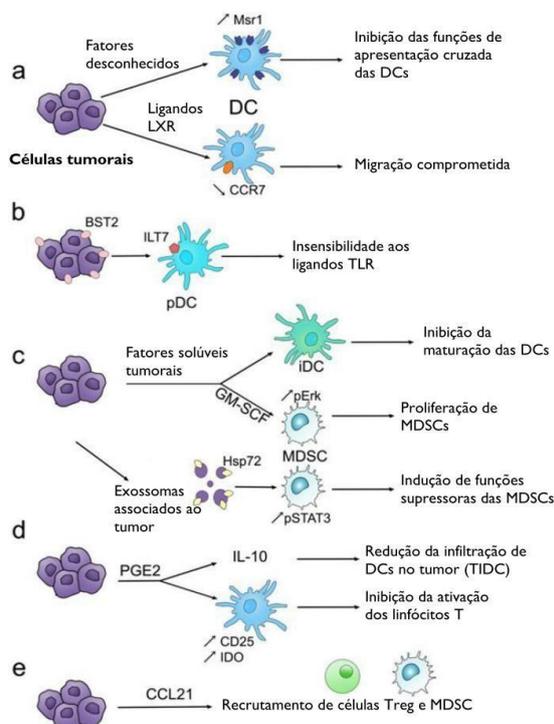


Figura 4. Mecanismos de resistência anti-tumorais desenvolvidos pelas células tumorais. (a) A acumulação de lípidos nas DCs devido à sobre-expressão de receptores scavenger de macrófagos 1 (Msr1) inibe a apresentação de antígenos solúveis pelas DCs. Ligandos do recetor X do fígado (LXR) inibem a expressão do recetor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7) impedindo a migração das DCs. (b) A interação do antígeno 2 do estroma da medula óssea (BST2) / imunoglobulin-like transcripts 7 (ILT7) suprime a capacidade de produção de IFN- $\alpha/\beta$  pelas pDCs após estimulação TLR7/9. (c) A sobre-expressão da proteína S100A9 por fatores solúveis tumorais inibe o processo de maturação das DCs e promove a acumulação de MDSCs, tal como acontece com a libertação de GM-CSF. Exossomas de origem tumoral potenciam ainda as funções supressoras das MDSCs através do transdutor do sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3) e da proteína de choque térmico 72 (HSP72). (d) Prostaglandinas E 2 (PGE2) reduzem a infiltração de DCs no tumor (TIDC) através da libertação de IL-10 que induz DCs tolerogénicas a expressarem CD25 e IDO. (e) O ligando 21 da quimiocina C-C pode ainda recrutar Tregs CD4+ e MDSCs. (adaptado de: Apetoh L. *et al.*19)

existem ainda, para além das células tumorais, outras células imunossupressoras como fibroblastos associados ao tumor (CAFs), DCs tolerogénicas, células supressoras de origem mieloide (MDSCs), macrófagos imunossupressores associados ao tumor (TAMs) e células Treg. Estas

células imunossupressoras inibem a imunidade anti-tumoral por vários mecanismos, incluindo a depleção de arginina e a produção de ROS e NO<sup>11</sup>. Atualmente, evidências emergentes sugerem que uma forma efetiva para melhorar a eficácia da imunoterapia com base em DCs reside na inibição da regulação imunossupressora<sup>9</sup>.

### Estratégias para melhorar a efetividade imunoterapêutica de vacinas

Para maximizar a efetividade anti-tumoral da vacinação com DCs, várias estratégias têm sido desenvolvidas neste sentido. Estas incluem a otimização na diferenciação de DCs, o aumento da imunogenicidade via modificação genética das DCs e a inclusão de adjuvantes, um carregamento de antígenos otimizado, o aumento da longevidade de DCs e a inibição dos mecanismos de imunossupressão.

Com o objetivo de melhorar a resposta imunológica dos linfócitos T, a diferenciação das DCs deve ser adaptada e específica ao processo tumoral em questão. A combinação de citocinas adicionadas ao processo de diferenciação de monócitos em DCs assume um papel crucial na qualidade de resposta dos linfócitos T. Por exemplo, DCs maturadas obtidas pela incubação com GM-CSF e IL-15 assumem um fenótipo característico de LCs. Em particular, são mais eficientes *in vitro* no tratamento do melanoma ao maximizar a resposta dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> *naive* e, conseqüente diferenciação em CTLs, em comparação com as DCs obtidas após diferenciação induzida por GM-CSF e IL-4<sup>20</sup>.

O aumento da eficácia e estabilidade da apresentação de antígenos pelas DCs inclui várias estratégias de otimização, entre as quais a administração *in vivo* de antígenos tumorais acoplados a anticorpos específicos para as DCs do doente, assim como uma variedade de processos de carregamento de DCs com antígenos *in vitro*. De facto, antígenos acoplados a anticorpos específicos para moléculas de superfície de DCs, como a 33DI (*anti-dendritic cell antibody*) ou DEC205 (*dendritic and epithelial cell receptor with a m.w. of 205 kDa*), estão a ser usadas em estudos pré-clínicos. Além disso, DCs geneticamente modificadas *ex vivo* com RNAm ou DNA tumoral, ou carregadas com péptidos tumorais, estão a ser testados *in vitro* e *in vivo* na indução de resposta imunológica<sup>9</sup>. O recurso a péptidos como fonte de antígenos tem várias

limitações quando utilizados em ensaios clínicos, principalmente na indução de imunogenicidade efetiva. Deste modo, a inclusão de DCs transfectadas com RNAm para o antigénio leucocitário humano (HLA) assim como para um número limitado de antigénios imunodominantes associados ao tumor, tem demonstrado maior benefício terapêutico relativamente a outras estratégias de carregamento de antigénios na indução da resposta imune. A transfecção de RNAm originará a apresentação de múltiplos epítomos antigénicos, possivelmente mais imunogénicos que os anteriormente caracterizados, independentemente do haplótipo HLA do doente. Adicionalmente, o RNAm do tumor autólogo pode ser isolado e amplificado, no sentido de obter antigénios de especificidade intrínseca ao próprio. Uma vez que o RNAm tem uma semivida curta e não se integra no genoma do hospedeiro, modificações genéticas nas DCs por eletroporação com RNAm são consideradas altamente seguras e uma ferramenta simples de aplicação clínica<sup>9,10,21</sup>.

O aumento da eficácia da imunoterapia anti-tumoral relaciona-se, intimamente, com a compreensão dos mecanismos complexos inerentes ao equilíbrio entre imunidade e tolerância e com as características exigidas pelas DCs para uma resposta efetiva. Com o objetivo de aumentar a eficácia das DCs, estão a ser desenvolvidas estratégias que incluem a sua modificação genética, de modo a aumentar a expressão de reguladores positivos imunogénicos e a inibir reguladores negativos<sup>17</sup>.

Como supramencionado, a interação CD40/CD40L é preponderante na expressão de citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimuladoras. Para mimetizar esta interação, as DCs podem ser modificadas por transdução via adenovírus ou por eletroporação de RNAm para expressão do ligando CD40L. A fim de controlar e melhorar a expressão via CD40, pode ser adicionado um indutor químico de dimerização (CID) AP1903. Esta estratégia induz uma resposta Th1 anti-tumoral mais eficaz, assim como uma migração melhorada tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>22</sup>. Outras moléculas co-estimuladoras com evidência positiva incluem a proteína relacionada com o TNFR induzida por glucocorticoides (GITR-L), 4-IBBL, CD70 e OX40L. A vacinação com DCs carregadas com o RNAm correspondente ao antigénio tumoral e que expressem o ligando GITR aumentam a res-

posta específica via linfócitos T, prolongando, ainda, a semivida das células T de memória. A expressão transgénica da molécula CD70 pelas DCs em murganhos mostrou quebrar a tolerância dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, aumentando assim a imunogenicidade anti-tumoral. A eletroporação com RNAm que codifique a combinação de CD70, CD40L, entre outras moléculas co-estimuladoras aumenta, deste modo, a capacidade de estimulação das células T<sup>17</sup>.

Modificações genéticas que visem a expressão aumentada de mediadores solúveis, como citocinas e quimiocinas, também aumentam a eficácia da vacinação com DCs. A produção local de citocinas pelas DCs, como a IL-12, evita a toxicidade associada à administração sistémica de citocinas inflamatórias. Esta sobre-expressão melhora a migração, maturação e a atividade anti-tumoral numa variedade de modelos pré-clínicos<sup>17</sup>. A expressão de receptores TRANCE (citocina induzida por ativação e relacionada com o TNF) para os ligandos RANK (receptor ativador do NF – B – fator nuclear de transcrição *kappa* B) dos linfócitos T promove uma sinalização autócrina nas DCs, aumentando a sua potência na expressão de moléculas co-estimuladoras e a secreção de citocinas que, por sua vez, aumentam a potência de resposta dos linfócitos T. Esta estratégia aumenta a taxa de eliminação das células tumorais em modelos pré-clínicos, sendo que, no entanto, aguarda ainda por resultados clínicos<sup>23</sup>.

A longevidade das DCs é crucial para a eficácia da vacina; assim, modificações genéticas que estimulem a regulação de sinais anti-apoptóticos ou reduzam os pro-apoptóticos estão sob investigação. O mecanismo PI3k (cinase responsável pela fosforilação da posição 3 do fosfatidilinositol) / Akt (proteína cinase B) regula múltiplas atividades celulares, críticas no processo de produção, sobrevivência e secreção de citocinas. Para aumentar a longevidade das DCs em modelos pré-clínicos, a modificação genética da Akt num sinal reforçado e constitutivo, regula a proteína Bcl-2 aumentando a longevidade das DCs. A inclusão de *small interfering RNA* (siRNA) direcionado para moléculas proapoptóticas Bax, Bak e Bim favorece, também, a longevidade de DCs em murganhos<sup>24</sup>.

Embora os reguladores positivos representem uma abordagem promissora no desenvolvimento de vacinas mais eficazes, as

DCs permanecem sensíveis a inibidores endógenos que, sob microambiente tumoral, auxiliam o processo de tolerância e evitam a autoimunidade. Uma vez que um dos principais objetivos é quebrar a auto-tolerância aos antígenos tumorais, estes reguladores negativos apresentam-se como um dos principais obstáculos à imunoterapia anti-tumoral. Os receptores inibitórios estão envolvidos no desenvolvimento de tolerância, na manutenção da homeostase e na regulação negativa da resposta imune. A inibição destes últimos é geralmente mediada por ITIMs (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*) nas regiões citoplasmáticas, que atuam por recrutamento de inibidores das proteínas tirosina-fosfatases, tais como SHP-1 e SHP-2. Estes receptores inibitórios podem ser úteis como alvos de intervenção terapêutica. Por exemplo, vários estudos clínicos estão a ser desenvolvidos para avaliar a segurança e a eficácia do bloqueio do receptor PD-1; alguns destes estudos combinam este bloqueio com anticorpos monoclonais<sup>17</sup>. O receptor de macrófagos com estrutura de colagénio (MARCO) é um receptor *scavenger* de classe A, expresso por alguns macrófagos e DCs, cuja deficiência melhora a migração de DCs. Assim, o silenciamento MARCO mostrou melhorar este parâmetro tanto *in vitro* como *in vivo*, sem alterar aparentemente a secreção de citocinas, além de controlar o crescimento de tumores B16 (atividade anti-melanoma)<sup>25</sup>. O recurso a inibidores citoplasmáticos apresenta-se como outro método de regulação inibitória de fatores negativos responsáveis pela maturação de DCs, aumentando a resposta imunológica dos linfócitos T. Assim, a proteína SOCS1 (supressor de sinalização de citocinas 1) atua como um regulador negativo da secreção de citocinas inibindo a via JAK (cinase de *Janus*) / STAT. O silenciamento do gene SOCS1 em células dendríticas derivadas da medula óssea de murganhão (BMDCs) aumentou a resposta imune dos linfócitos T e a regressão das células tumorais; esta resposta foi mediada pelo aumento da produção de IL-12. Resultados *in vitro* obtidos pelo silenciamento do gene SOCS1 em DCs humanas corroboram os resultados obtidos em células de murganhão ao aumentar a resposta das células T<sup>26</sup>. A proteína A20 (proteína 3 induzida pelo TNF- $\alpha$ , TNFAIP3) é uma ubiquitina modificada expressa em altos níveis nos órgãos linfoides, incluindo o timo e o baço. Esta proteí-

na atua como um regulador negativo a jusante do TLR e do receptor TNF, inibindo, portanto, a sinalização NF- $\kappa$ B. O direcionamento de siRNA para esta proteína em BMDCs provocou uma produção robusta de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , IL-12p40 e a IL-6, a inibição de Tregs, bem como o aumento da atividade anti-tumoral das células T. De modo similar, a inibição desta proteína em DCs derivadas de monócitos humanos aumentou os níveis de NF- $\kappa$ B e a potência de resposta dos linfócitos T<sup>27</sup>.

### Terapêutica de associação como estratégia anti-tumoral

Tendo em conta a diversidade de mecanismos imunossupressores inerentes ao cancro metastático, qualquer resultado clínico positivo que aumente a extensão de resposta de vacinas com DCs é considerado notável. No entanto, para melhorar os resultados, estas vacinas têm de ser combinadas com outras terapias que combatam o microambiente imunossupressor gerado pelo tumor. Tais regimes de combinação envolvem diversos fármacos que atuam em diferentes alvos terapêuticos (Figura 5)<sup>18</sup>.

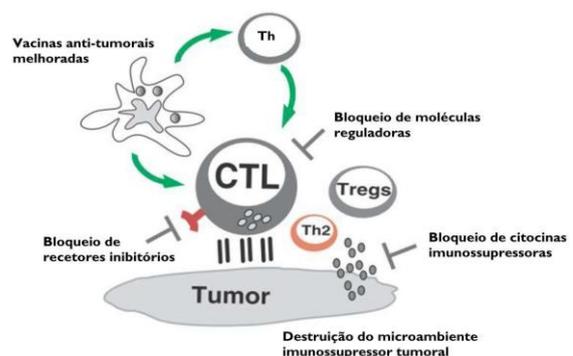


Figura 5. Vacinas de DCs em terapêutica combinada. Os ensaios clínicos em decurso evidenciam regressão tumoral considerável, em parte dos doentes estudados. No entanto, a eficácia clínica pode ser limitada pelo desenvolvimento de células supressoras mieloides, células inflamatórias Th2 e células Tregs. Torna-se essencial, portanto, desenvolver novas estratégias de modo a maximizar a resposta adaptativa, bloquear células Treg e eliminar o microambiente imunossupressor. A estratégia terapêutica atual consiste na combinação destes três componentes principais. (adaptado de: Palucka K. *et al.*<sup>28</sup>).

Recentemente, surgiram novos paradigmas no campo da pesquisa de vacinas contra o cancro. Em particular, tem sido discutido o potencial uso de associações terapêuticas que incorporem imunomoduladores com quimio e radioterapia antevendo-se sinergia com as vacinas anti-tumorais. A quimioterapia citotóxica é, ge-

ralmente, considerada imunossupressora, devido à sua toxicidade para as células em divisão na medula óssea e no tecido linfóide periférico. Deste modo, a combinação de vacinas anti-tumorais com quimioterapia foi, outrora, entendida como inadequada, atendendo a que o efeito imunossupressor anularia a eficácia destas vacinas. No entanto, têm surgido evidências que contrariam este conceito, verificando-se um perfil de maior eficácia quando a imunoterapia é combinada com a quimioterapia convencional. Por exemplo, o citotóxico gemcitabina, não só exerce ação anti-tumoral direta, como também medeia efeitos imunológicos relevantes em imunoterapia. Estudos clínicos desenvolvidos mostram que o tratamento combinado com este fármaco reforça a apresentação cruzada dos antígenos associados ao tumor (TAAs) pelas DCs, aumentando a expansão de CTL e a sua infiltração no tumor. Esta apresentação cruzada não conduziu a tolerância. Além disso, a gemcitabina reduziu o número de células supressoras mielóides, sem, no entanto, afetar os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, as células NK, os macrófagos ou os linfócitos B. Assim, este citotóxico parece não ser imunossupressor e, contrariamente ao inicialmente suposto, aumenta a resposta à imunoterapia administrada e ativa ou apoia a resposta imunológica dirigida às células tumorais<sup>11</sup>. Ramakrishnan *et al*<sup>29</sup> provaram que a quimioterapia conduz à sobre-expressão do recetor de manose-6-fosfato dependente de catiões (CIMPR) em células tumorais, aumentando o *uptake* de granzima B. Como resultado, as CTLs podem induzir apoptose num vasto número de células malignas, eventos que se manifestam num clínico e evidente efeito anti-tumoral<sup>29</sup>. Parte dos doentes com cancro avançado, que responde inicialmente aos tratamentos de quimioterapia, pode sofrer uma recidiva devido à sobrevivência de uma pequena população de CSCs (células estaminais cancerígenas). Esta subpopulação de células tumorais possui maior capacidade de proliferação, relativamente às restantes, podendo manter o crescimento tumoral ou, até, iniciar novos tumores. Embora a quimio e radioterapia eliminem a maioria das células tumorais, a sobrevivência de CSCs constitui um importante mecanismo de resistência, através da sobre-expressão de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), reparações de DNA e resistência à apoptose<sup>30</sup>. Deste modo, o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas

contra a população de CSCs é altamente desejável, cujo sucesso dependerá da eficácia da resposta imunológica, modulada por vacinas de DCs. Recentemente foram produzidos híbridos de DCs e CSCs para aumentarem o potencial de resposta das células CTL anti-CSCs. A fusão DC/ CSC induziu a proliferação de linfócitos T com elevados níveis de expressão de IFN- $\mu$ , matando as células CSCs *in vitro*. Assim, uma abordagem que combine a terapêutica convencional, como a quimio e radioterapia que elimina grande parte das células tumorais, com CTLs reativas a CSCs, poderá representar uma estratégia promissora no tratamento de estados tumorais avançados (Figura 6). Estes resultados inauguram um novo campo de investigação para o desenho de futuros ensaios clínicos<sup>11</sup>.

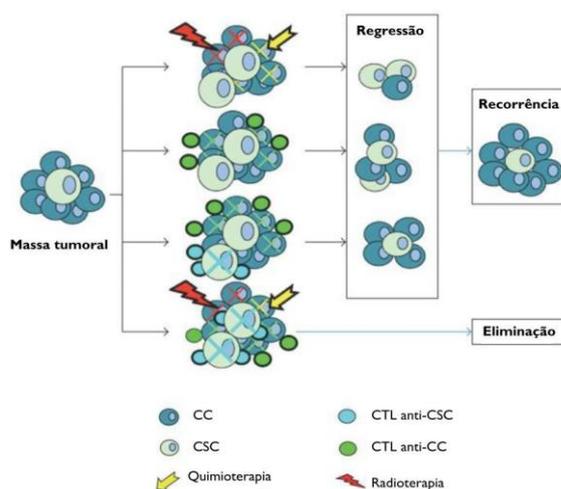


Figura 6. Terapêutica de associação: radio e quimioterapia em combinação imunoterapêutica. Atualmente, as terapêuticas convencionais, como a radio e a quimioterapia, eliminam grande parte das células tumorais (CC), que são menos resistentes que as CSCs. Apesar da regressão inicial da massa tumoral, esta pode voltar a desenvolver-se devido a CSCs residuais. A combinação da terapêutica convencional com a imunoterapia surge, assim, como uma nova abordagem que visa eliminar CSCs, promovendo a irradiação tumoral. (adaptado de: Koido S. *et al.*<sup>11</sup>).

Uma vez que a terapêutica anti-tumoral citostática e combinada varia de tumor para tumor, torna-se necessário desenvolver protocolos clínicos exclusivos que combinem DCs com a terapêutica convencional (Figura 7)<sup>18</sup>.

## ESTUDOS CLÍNICOS E APLICAÇÃO TERAPÊUTICA ANTI-TUMORAL

Apesar dos notáveis progressos na prevenção e na terapêutica anti-tumoral, assim como no atual decréscimo de mortes relacionadas, o cancro permanece uma das principais causas de

mortalidade. As estratégias que combinam a cirurgia com a radio- e quimioterapia são, geralmente, bem-sucedidas na eliminação de grande parte da massa tumoral, permanecendo, no entanto, células tumorais residuais como as CSCs, responsáveis por eventuais recidivas. Assim, as vacinas anti-tumorais de DCs surgem como uma nova esperança dentro do campo oncológico, ao oferecerem vantagens únicas que incluem baixa toxicidade e o direcionamento de uma resposta imunológica efetiva contra moléculas alvo<sup>6</sup>.

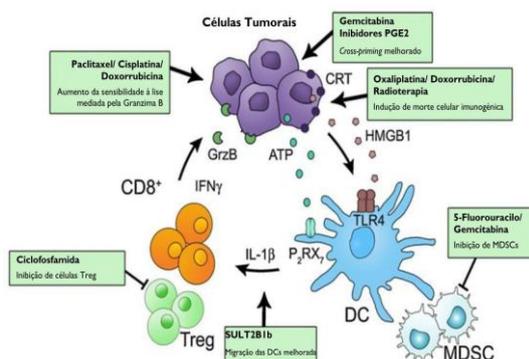


Figura 7: Intervenções terapêuticas para aumentar a eficácia de vacinas de DCs anti-tumorais. Terapêuticas anti-tumorais como a oxaliplatina, antraciclina ou radioterapia podem aumentar a fagocitose e a apresentação cruzada de antígenos tumorais pelas DCs, favorecendo a produção de IFN- $\mu$  pelas células T CD8<sup>+</sup> e, conseqüentemente, a imunidade anti-tumoral. Outros fármacos anti-tumorais como a ciclofosfamida e o 5-fluorouracilo eliminam seletivamente células Treg e MDSC, respectivamente. Já o paclitaxel e a cisplatina podem sensibilizar as células tumorais aos CTLs pelo aumento da permeabilidade à granzima B. Por fim, a migração das DCs pode ainda ser melhorada pela prevenção da acumulação lipídica, inibindo a acetil-CoA carboxilase ou a síntese de colesterol com SUL2B1b (ligando LXR responsável pela inativação da enzima sulfotransferase 2B1b). (adaptado de: Apetoh L. *et al.*<sup>19</sup>).

Atualmente existe um vasto número de ensaios clínicos em desenvolvimento, cujos resultados carecem, ainda, de ampla eficácia anti-tumoral. De um modo geral, apenas uma fração dos doentes envolvidos apresenta uma resposta imunológica potente, que se traduz numa moderada resposta clínica (aproximadamente 10-15%)<sup>9</sup>. No entanto, para alguns tipos de cancro, os resultados obtidos são deveras promissores, contando já com aprovação imunoterapêutica pela FDA<sup>31</sup>.

Seguidamente são apresentadas breves referências de tumores sólidos, para os quais a imunoterapia com DCs tem sido intensamente estudada e cujos resultados clínicos se afiguram promissores.

## Imunoterapia no cancro hepático

O cancro hepático (CH) constitui uma das principais causas de morte em todo o mundo. Este problema de saúde tem vindo a assumir contornos graves e preocupantes, ao registar-se um aumento da incidência tumoral e de esteatose hepática na população mundial. Tumores pequenos e localizados são potencialmente curáveis por excisão cirúrgica ou por transplantação; no entanto, a maior parte dos doentes apresenta um diagnóstico inicial de doença avançada<sup>31</sup>. Os resultados de diversos estudos clínicos demonstram que a imunoterapia pode melhorar o estado clínico destes doentes. Especificamente, um estudo clínico envolveu 31 doentes com CH, os quais receberam vacinas de DCs carregadas com antígenos de lisados autólogos tumorais. Foram registadas 14 respostas parciais e 17 conseguiram estabilizar o tumor. Os doentes obtiveram ainda uma taxa de sobrevivência melhorada em 1 ano de vida (63% vs 10%; P = .038)<sup>32</sup>.

A a-fetoproteína (AFP), principal proteína do soro fetal, encontra-se sobre-expressa na maior parte dos CHs, desempenhando um papel importante no seu diagnóstico e na sua monitorização terapêutica. A sobre-expressão desta proteína correlaciona-se com o aumento da proliferação tumoral e resistência à apoptose pelas CSCs. Foram desenvolvidos dois estudos clínicos que testaram vacinas peptídicas de DCs; em ambos verificou-se que os epítomos peptídicos de AFP foram imunogénicos *in vivo* e capazes de estimular os linfócitos T nestes doentes com elevados níveis plasmáticos desta proteína. O segundo estudo, que envolveu 10 doentes, demonstrou também que 6 destes aumentaram a produção de IFN- $\mu$ . Registou-se ainda uma diminuição transitória dos níveis plasmáticos de AFP em 2 doentes<sup>31</sup>. Uma vez que a ablação térmica por radiofrequência estimula a resposta dos linfócitos T aos antígenos tumorais, a combinação desta técnica com imunoterapia poderá ser uma abordagem mais eficaz para o tratamento do CH<sup>31,33</sup>.

## Imunoterapia no cancro da próstata

Diversos estudos clínicos de fase 2 e 3 evidenciam abordagens imunoterapêuticas promissoras em doentes com cancro da próstata<sup>31</sup>. Estas estratégias, baseadas em vacinas com DCs, representam um avanço científico seguro e

viável na indução de respostas imunológica e clínica anti-tumorais<sup>5</sup>.

Os primeiros estudos envolveram vacinas de DCs carregadas com péptidos derivados do antigénio de membrana específico da próstata (PSMA), obtendo-se respostas parciais em 26% dos envolvidos, cuja diminuição do antigénio específico da próstata (PSA) foi superior a 50%<sup>5</sup>.

Recentemente, um ensaio clínico de fase 3 que testou a administração da vacina *sipuleucel-T* em 512 doentes com cancro da próstata avançado, demonstrou prolongar a taxa média de sobrevivência nestes doentes (25,8 meses no grupo *sipuleucel-T* vs 21,7 meses no grupo placebo; P = .017), diminuindo em 22% o risco de morte devido ao tumor. Esta técnica recorre a células autólogas mononucleares do sangue periférico, que após incubação *in vitro* com PA2024 (proteína de fusão de fosfatase ácida prostática e GM-CSF), ativa APCs, como as DCs. O mecanismo de ação ainda não é completamente conhecido, mas poderá envolver a expressão da CD54, uma molécula de adesão crucial para a formação da sinapse imunológica e consequente estimulação dos linfócitos T. Esta vacina foi aprovada nos Estados Unidos da América em Abril de 2010, pela *Food and Drug Administration*, para o tratamento do cancro da próstata assintomático, minimamente sintomático ou metastático, dado os seus perfis de eficácia clínica, cujos efeitos adversos são similares aos do grupo placebo<sup>2,5,31,34</sup>.

Apesar destes resultados clínicos promissores, a eficácia das diversas estratégias de tratamento à base de DCs é ainda limitada para muitos doentes com cancro prostático. Deste modo, torna-se essencial melhorar estas abordagens, que podem ser conseguidas através da combinação com outras terapêuticas como a radio e quimioterapia, terapêutica antiangiogénica ou hormonal, ou ainda com recurso a anticorpos anti-tumorais<sup>5</sup>.

### Imunoterapia no cancro do ovário

Estudos recentes têm mostrado uma correlação positiva entre o aumento de sobrevivência e a presença de células T efectoras no seio das células tumorais. A ausência de células reguladoras no tumor (Tregs ou MDSCs) evidencia o papel crucial de vigilância imunológica na progressão do cancro do ovário, conseguida, potencialmente, através da imunoterapia<sup>31</sup>.

Vários grupos de mulheres com cancro no ovário iniciaram, recentemente, estudos de vacinação com células tumorais autólogas ou alogénicas, envolvendo DCs para direcionar uma resposta imunológica anti-tumoral, utilizando antigénios associados ao cancro do ovário (CA 125, HER-2/neu, recetor de folato, ou antigénio de mucina 1 – MUC1). Um ensaio clínico envolvendo DCs carregadas com Her-2/ neu–GM-CSF (vacina *lapuleucel-T* [APC8024]) demonstrou uma resposta clínica ligeira contra tumores HER-2/neu, como o cancro do ovário, permanecendo, ainda, em estudo se a vacina aumenta a taxa média de sobrevivência destas doentes, de forma análoga à vacina *sipuleucel-T*<sup>31</sup>.

### Imunoterapia no cancro do pâncreas

Cinco doentes com cancro pancreático avançado foram incluídos num estudo clínico que envolveu a combinação de gemcitabina (citotóxico padrão utilizado em quimioterapia no cancro pancreático) com vacinas de DCs. Foram ainda utilizados anticorpos monoclonais anti-CD3 para estimular células NK. Como resultado, 1 doente apresentou remissão parcial do tumor e 2 obtiveram uma estabilização tumoral de duração superior a 6 meses. Recentemente, imunoterapia baseada em vacinas de DCs combinada com gemcitabina/S-1 foi efetiva em doentes com cancro pancreático avançado resistentes à quimioterapia padrão. Os antigénios MUC1 e WT1 (gene tumoral de *Wilms 1*) encontram-se altamente expressos no cancro pancreático, constituindo excelentes TAAs para o direcionamento imunoterapêutico. Foi desenvolvido um estudo clínico com 49 doentes com cancro pancreático, dos quais 38 receberam vacinação de DCs carregadas com o péptido WT1. Alguns destes doentes receberam ainda outros péptidos como a MUC1, CEA (antigénio carcino-embrionário) e CA125 (antigénio tumoral 125). Previamente a esta terapêutica combinada, 46 dos 49 doentes tinham sido tratados com quimioterapia ou radioterapia mas sem qualquer efeito significativo. Apesar das condições deficitárias no que concerne à homogeneidade entre os grupos, surpreendentemente, 2 doentes registaram remissão completa do tumor, 5 remissão parcial e 10 estabilizaram o tumor, cujo tempo médio de sobrevivência aumentou 360 dias. O uso de vacinas de DCs em combinação direta com quimioterapia pode ser uma verdadeira opção para o tratamento de

doentes com cancro do pâncreas avançado<sup>11</sup>. De facto, a gemcitabina aumenta a expressão WT1 nestes doentes e sensibiliza as células tumorais pancreáticas WT1 para o aumento de resposta específica T imunogénica<sup>35</sup>.

### Imunoterapia no cancro do estomago

Kono *et al*<sup>36</sup> observaram que a vacinação anti-tumoral com DCs carregadas com o péptido HER-2/neu poderá ser uma opção terapêutica no tratamento de doentes com cancro gástrico. Segundo este estudo de fase 1, 33% dos doentes reduziram os marcadores tumorais após vacinação e 22% tiveram uma regressão do tumor em mais de 50%, sem efeitos adversos significativos<sup>36</sup>. Além disso, resultados recentes sobre o aumento da resposta imunológica anti-tumoral, com recurso a DCs geneticamente modificadas por siRNA para o recetor IL-10, demonstraram ocorrer bloqueio da imunossupressão tumoral, abrindo novas perspectivas para uma imunoterapia baseada em DCs eficaz no tratamento do cancro do estômago<sup>15</sup>.

### Imunoterapia noutros tipos de cancro

Encontram-se atualmente em desenvolvimento vários estudos clínicos e pré-clínicos que pretendem avaliar a eficácia da imunoterapia com DCs aplicada a outros órgãos em processo tumoral. Um estudo clínico de fase I envolveu 13 doentes com cancro da mama em fase inicial, os quais foram injetados com DCs ativadas com uma mistura constituída pela citocina IFN- $\mu$  e pelo LPS, para produzirem IL-12p70. As DCs foram carregadas com o péptido HER-2/neu, que se encontra sobre-expresso neste tipo de tumor. Czerniecki *et al*<sup>37</sup> detetaram uma resposta imunogénica robusta, como evidenciado *in vitro* pela indução de resposta das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, assim como *in vivo* pela infiltração na região tumoral de células B e T, traduzindo-se numa redução drástica do tumor. Os autores concluíram assim que esta estratégia pode apresentar-se vantajosa na prevenção e tratamento do cancro da mama de fase inicial<sup>37</sup>.

Dohnal *et al* também demonstraram segurança e viabilidade na utilização de vacinas de DCs ativadas com IFN- $\mu$ /LPS para o tratamento de cancros pediátricos. Não foram registados efeitos adversos relevantes, ocorrendo secreção de IL-12p70 com consequente ativação imunológica<sup>38</sup>.

O uso de DCs em doentes com melanoma

avançado mostrou também aumentar o potencial de indução e amplificação da resposta anti-tumoral nestes doentes. Esta técnica, designada por TriMix, consiste na eletroporação de DCs com RNAm codificante do ligando CD40, CD70 e TLR4, amplificando a produção de IL-12p70<sup>9</sup>.

### CONCLUSÃO

A década contemporânea representa, na história da imunologia, um período extremamente ambicioso no que concerne ao desenvolvimento de vacinas anti-tumorais. Os consideráveis progressos ao nível da compreensão da imunobiologia das DCs, assim como das células T efectoras, abriram novas estratégias para o desenvolvimento de protocolos clínicos vastamente melhorados<sup>28</sup>. As DCs são um elemento primordial do sistema imunitário pela conexão que estabelecem entre imunidade inata e adaptativa e pela capacidade única de modulação da resposta adaptativa, podendo induzir imunidade ou tolerância<sup>28</sup>. Tal papel primazia as DCs como recurso aliciante na potenciação de respostas anti-tumorais, ao amplificar e ativar a resposta dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CTL. Além disso, as DCs podem melhorar a imunomodulação e potencial citotóxico das células NK e, deste modo, dilatar a resposta anti-tumoral<sup>5</sup>.

Apesar da imunoterapia com DCs emergir como terapêutica promissora no tratamento oncológico, é necessário, no entanto, aprofundar o conhecimento relativo aos mecanismos moleculares responsáveis pelas alterações desencadeadas por diversos sinais de “perigo” durante o processo de maturação das DCs<sup>2,31</sup>. Não obstante, permanecem ainda mecanismos de imunossupressão mediados pelas células tumorais que culminam com a aquisição de um fenótipo tolerogénico por parte das DCs, bem como fenómenos de resistência anti-tumoral via CSCs, sendo necessárias estratégias terapêuticas que contornem esses eventos<sup>9,19</sup>.

Vários estudos clínicos têm sido desenvolvidos neste âmbito, tendo por base a administração de DCs carregadas com péptidos derivados de TAAs, proteínas ou RNA. Os resultados obtidos são deveras promissores, demonstrando segurança e viabilidade na indução de resposta imunológica, tendo sido recentemente aprovada pela FDA a vacina *si-puleucel-T* para o tratamento do cancro prostático<sup>5</sup>. Apesar destes resultados clínicos positivos, a eficácia da imunoterapia baseada em DCs permanece ainda

limitada para muitos doentes com os mais diversos tipos de cancro sólido avançado. Portanto, torna-se essencial melhorar as estratégias concebidas, passando pela combinação da vacinação imunoterapêutica com radio e quimioterapia, anticorpos ou terapêutica antiangiogénica<sup>18,31</sup>.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Kuby Immunology. 6ª Ed. New York: W. H. Freeman and Company. p. 38-40, 2007.
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. p.1-61, 2010.
3. Paczesny S, et al. Dendritic cells as vectors for immunotherapy of cancer. *Semin Cancer Biology*. 2003; 13:439-447
4. Schuler G. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Eur J Immunol*. 2010; 40:2123-2130.
5. Jähnisch H, et al. Dendritic cell-based immunotherapy for prostate cancer. *Clin Dev Immunol*. 2010; 2010:1-8.
6. 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.
7. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cell into medicine. *Nature*. 2007; 449:419-426.
8. Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22(2):240-273.
9. Brussel IV, Berneman ZN, Cools N. Optimizing dendritic cell-based immunotherapy: tackling the complexity of different arms of the immune system. *Mediat Inflamm*. 2012; 2012:1-14.
10. Boudreau JE, et al. Engineering dendritic cells to enhance cancer immunotherapy. *Mol Therapy*. 2011; 19(5):841-853.
11. Koido S, et al. Current Immunotherapeutic Approaches in Pancreatic Cancer. *Clin Dev Immunol*. 2011; 2011:1-15.
12. Borghaei H, Smith MR, Campbell KS. Immunotherapy of cancer. *Eur J Pharmacol*. 2009; 625:41-54.
13. Sabado RL, Bhardwaj N. Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment. *Immunotherapy*. 2010; 2(1):37-56.
14. Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev*. 2010; 238(1):247-262.
15. Amedei A, et al. Novel immunotherapeutic strategies of gastric cancer treatment. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011:1-17.
16. 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.
17. Turnis ME, Rooney CM. Enhancement of dendritic cells as vaccines for cancer. *Immunotherapy*. 2010; 2(6):847-862.
18. Palucka K, et al. Dendritic cells: are they clinically relevant?. *Cancer J*. 2010; 16(4):318-324.
19. Apetoh L, et al. Harnessing dendritic cells in cancer. *Semin Immunol*. 2011; 23:42-49.
20. Dubsky P, et al. IL-15-induced human DC efficiently prime melanoma-specific naive CD8+ T cells to differentiate into CTL. *Eur J Immunol*. 2007; 37:1678-1690.
21. Shurin MR, et al. Genetically modified dendritic cells in cancer immunotherapy: a better tomorrow?. *Exp Opin Biol Ther*. 2010; 10(11):1539-1553.
22. Lapteva N, et al. Enhanced activation of human dendritic cells by inducible CD40 and Toll-like receptor-4 ligation. *Cancer Res*. 2007; 67(21):10528-10537.
23. Wiethe C, et al. Enhanced effector and memory CTL responses generated by incorporation of receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK)/RANK ligand costimulatory molecules into dendritic cell immunogens expressing a human tumor – specific antigen. *J Immunol*. 2003; 171(8):4121-4130.
24. Park D, et al. An essential role for Akt1 in dendritic cell function and tumor immunotherapy. *Nat Biotechnol*. 2006; 24(12):1581-1590.
25. Matsushita N, et al. Targeting MARCO can lead to enhanced dendritic cell motility and anti-melanoma activity. *Cancer Immunol Immunother*. 2010; 59(6):875-884.
26. Hong B, et al. Human SOCS1 controls immunostimulatory activity of monocyte-derived dendritic cells. *Cancer Res*. 2009; 69(20):8076-8084.
27. Breckpot K, et al. Attenuated expression of A20 markedly increases the efficacy of double-stranded RNA-activated dendritic cells as an anti-cancer vaccine. *J Immunol*. 2009; 182(2):860-870.

28. Palucka K, et al. Dendritic cells and immunity against cancer. *J Internal Med.* 2010; 269:64-73.
29. Ramakrishnan R, et al. Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice. *J Clin Inv.* 2010; 120(4):1111-1124.
30. Wang Z, et al. Pancreatic cancer: understanding and overcoming chemoresistance. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011; 8(1):27-33.
31. Kirkwood JM, et al. Immunotherapy of cancer in 2012. *Cancer J Clin.* 2012; 62(5):309-335.
32. Lee WC, et al. Vaccination of advanced hepato-cellular carcinoma patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells: a clinical trial. *J Immunother.* 2005; 28(5):496-504.
33. Zerbini A, et al. Radiofrequency thermal ablation of hepatocellular carcinoma liver nodules can active and enhance tumor-specific T-cell responses. *Cancer Res.* 2006; 66(2):1139-1146.
34. Kantoff PW, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *J Med.* 2010; 363(5):411-422.
35. Takahara A, et al. Gemcitabine enhances Wilms' tumor gene WT1 expression and sensitizes human pancreatic cancer cells with WT1-specific T-cell-mediated antitumor immune response. *Cancer Immunol Immunother.* 2011; 60(9):1289-1297.
37. Kono K, et al. Dendritic cells pulsed with HER-2/neu-derived peptides can induce specific T-cell responses in patients with gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(11):3394-3400.
38. Czerniecki BJ, et al. Targeting HER-2/neu in early breast cancer development using dendritic cells with staged interleukin-12 burst secretion. *Cancer Res.* 2007; 67(4):1842-1852.
39. Dohnal AM, et al. Phase 1 study of tumor Ag-loaded IL-12 secreting semi-mature DC for treatment of pediatric cancer. *Cytotherapy.* 2007; 9(8):755-770.

#### LISTA DE ABREVIATURAS

- ABC – *ATP-binding cassette*
- AFP – a-Fetoproteína Akt – Proteína cinase B
- APCs – Células apresentadoras de antígeno
- BMDCs – Células dendríticas derivadas da medula óssea de murganho
- BST 2 – Antígeno 2 do estroma da medula óssea
- CAFs – Fibroblastos associados ao tumor CA125 – Antígeno tumoral 125
- CCR7 – Recetor de quimiocina C-C tipo 7 cDCs –

- Células dendríticas convencionais CEA – Antígeno carcino-embrionário
- CH – Cancro hepático
- CID – Indutor químico de dimerização
- CI-MPR – Recetor de manose-6-fosfato dependente de catiões
- CLPs – Progenitores comuns linfoides CMPs – Progenitores comuns mieloides CSCs – Células estaminais cancerígenas
- CTL – Linfócitos T citotóxicos DCs – Células dendríticas
- Fas-L – Ligando Fas
- FDA – *Food and Drug Administration* Flt3L – *Fms-like tyrosine kinase 3 ligand* HLA – Antígeno leucocitário humano HSCs – Células estaminais hematopoiéticas
- GITR – Proteína relacionada com o TNFR induzida por glucocorticoides
- GM-CSF – Fator estimulante de colónias de macrófagos e granulócitos
- IDO – Indolamina-2 e 3-dioxigenase IFN $\alpha$ / $\beta$  – Interferão tipo 1
- IL – Interleucina
- ILT7 – *Immunoglobulin-like transcripts 7*
- ITIMs – *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*
- HSP72 – Proteína de choque térmico 72 LCs – Células de *Langerhans*
- LPS – Lipopolissacarídeo LXR – Recetor X do fígado
- MARCO – Recetor de macrófagos com estrutura de colagénio
- MDSCs – Células supressoras de origem mielóide MHC – Complexo *major* de histocompatibilidade Msr 1 – Recetores *scavenger* de macrófagos 1 MUC1 – Antígeno de mucina 1
- NF-1B – Fator nuclear de transcrição *kappa B*
- NOD-like – *Nucleotide-binding oligomerization domain*
- PAMPs – Padrões moleculares associados a agentes patogénicos
- pDCs – Células dendríticas plasmacitóides
- PD-L1 – Ligando do recetor de morte celular pro-gramada 1
- PGE2 – Prostaglandina E 2
- PI3k – Cinase responsável pela fosforilação da posição 3 do fosfatidilinositol
- PRRs – Recetores de reconhecimento de padrões PSA – Antígeno específico da próstata
- PSMA – Antígeno de membrana específico da próstata
- RANK – Recetor ativador do NF- $\kappa$ B siRNA – *Small interfering RNA*

SOCS1 – Supressor de sinalização de citocinas 1  
STAT – Transdutor do sinal e ativador da transcrição

SULT2B1b – *Sulfotransferase family cytosolic 2b member 1*

TAA – Antígenos associados ao tumor

TAM – Macrófagos imunossupressores associados ao tumor

TCR – Recetor dos linfócitos T

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

Th – Linfócitos T auxiliar

TLR – Recetores *Toll-like* (TLR) TNF – Fator de necrose tumoral

TNFAIP3 – Proteína 3 induzida pelo fator de necrose tumoral a

TRANCE – Citocina induzida por ativação e relacionada com o TNF

Tregs – Linfócitos T reguladores

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

WT1 – Gene tumoral de *Wilms1*