

Ana Marina Seguro Carvalho e Sales

Associação de Vacinas Baseadas em Células Dendríticas com Quimioterapia: Uma Nova Estratégia Terapêutica Contra o Cancro

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

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Ana Marina Seguro Carvalho e Sales, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009009433, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Acompanhamento Farmacoterapêutico.

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, 15 de Julho de 2014

Ana Marina Seguro Carvalho e Sales

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
LISTA DE ACRÓNIMOS.....	2
RESUMO.....	4
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	6
2.1. Ciclo de Vida no Sistema Imune.....	6
2.1.1. Origem, Classificação e Funções Biológicas	6
2.1.2. Imunobiologia: Maturação e Apresentação de Antígenos	7
3. CANCRO	8
3.1. Células Dendríticas no Combate Antitumoral.....	8
3.2. Resistência Tumoral e Mecanismos de evasão imunitária	10
4. TERAPIAS ANTICANCERÍGENAS CONVENCIONAIS: A QUIMIOTERAPIA.....	13
5. IMUNOTERAPIAS ANTICANCERÍGENAS.....	14
5.1. Vacinação Terapêutica recorrendo a DCs.....	15
5.1.1. Tipos de Vacinas	16
6. COMBINAÇÃO QUIMIOIMUNOTERAPÊUTICA COMO NOVO TRATAMENTO ANTICANCERÍGENO.....	18
6.1. Melanoma metastático	20
6.2. Carcinoma Pulmonar.....	21
6.3. Carcinoma Pancreático.....	21
6.4. Carcinoma Prostático	21
6.5. Carcinoma da Mama.....	22
6.6. Glioblastoma Multiforme.....	22
7. OUTRAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS.....	23
8. CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

LISTA DE ACRÓNIMOS

APC – célula apresentadora de antígenos

ATP – adenosina trifosfato

B7-H1 – homólogo I da proteína B7

CAF – fibroblasto associado ao tumor

CCL – ligando C-C de quimiocinas

cDC – célula dendrítica mieloide

CI-MPR – recetor da manose-6-fosfato catiónico-dependente

CSC – célula estaminal cancerígena

CTLA-4 – antígeno 4 linfocitário citotóxico

CTL – linfócito T citotóxico

DAMP – padrão molecular associado a danos

DC – célula dendrítica

DNA – ácido desoxirribonucleico

EGFR – recetor do fator de crescimento epidérmico

Fas-L – ligando Fas

FDA – *Food and Drug Administration*

FU – fluorouracil

GM-SCF – fator estimulante de colónias de macrófagos e granulócitos

HLA – antígeno leucocitário humano

HMGB1 – proteína de alta mobilidade

IDO – indolamina-2,3-dioxigenase

IFN – interferão

IL – interleucina

IRAK – cinase associada ao recetor da interleucina-1

MDSC – célula supressora mieloide

MHC – molécula do complexo de histocompatibilidade

MIC – citocina inibidora de macrófagos

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

MTD – dose máxima tolerada

NK – célula *natural killer*

NLRP – *nucleotide-binding oligomerization domain*

NO – óxido nítrico

OX40L – ligando da molécula OX40

PAMP – padrão molecular associado a agentes patogénicos

PBMC – célula mononuclear do sangue periférico

pDC – célula dendrítica plasmocitoide

PD-L1 – ligando do recetor de morte celular programada I

PRR – recetor de reconhecimento de padrões

PSA – antigénio específico da próstata

ROS – espécie reativa de oxigénio

MICA – sequência A relacionada com o polipeptídeo MHC I

STAT3 – transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

TAA – antigénio associado a tumor

TAM – macrófago imunossupressor associado a tumor

TCR – recetor de linfócito T

TGF – fator de transformação do crescimento

Th – linfócito T auxiliar

TLR – recetor *Toll-like*

TNF – fator de necrose tumoral

TRAIL – ligando indutor de apoptose e relacionado com o fator de necrose tumoral

Treg – linfócito T regulador

TSLP – linfopoetina estromal tímica

VEGF – fator de crescimento vascular endotelial

RESUMO

As células dendríticas são consideradas as células apresentadoras de antígenos mais potentes e desempenham um papel crucial na programação e regulação de respostas imunes específicas antitumorais. Devido às suas características particulares, a sua utilização em vacinação anticancerígena tem crescido exponencialmente. A vacinação com DCs tem demonstrado elevado potencial em tratamentos anticancerígenos, e o seu importante papel imunomodulador tem sido comprovado pelos resultados de vários ensaios clínicos. No entanto, nenhuma modalidade imunoterapêutica usada em monoterapia é eficaz na regressão tumoral. Estudos recentes sugerem que a quimioterapia pode aumentar a imunidade antitumoral, causando ativação de DCs, acompanhada de uma maior apresentação antigénica, de redução dos linfócitos T imunossupressores, podendo atuar sinergicamente com a vacinação e com estratégias de *adoptive T cell transfer*. Adicionalmente, a ativação vigorosa das DCs por ligandos dos recetores *Toll-like* (TLR) ou agonistas CD40, gera respostas celulares antitumorais específicas. À luz destas observações é possível integrar a imunoterapia com a quimioterapia, em diversas combinações terapêuticas, com a finalidade de aumentar o benefício terapêutico antitumoral de cada uma destas modalidades de tratamento.

ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) are the most potent antigen-presenting cells known and play a pivotal role in the initiation, programming and regulation of tumor-specific immune responses. Due to their particular characteristics, their use as cancer vaccines is rapidly increasing. Cancer DCs-vaccines have been seen as a promising anticancer treatment and recent clinical trials have shown its immunomodulatory role and its beneficial clinical effects in cancer patients. However, no single immunotherapeutic modality is effective in established cancer. Recent work suggests that chemotherapy may augment anti-tumor immunity, causing DC activation, enhanced crosspresentation, and reduction of immunosuppressive leukocytes, acting synergistically with vaccines or adoptive T cell transfer. Furthermore the tumoricidal effector cells can be generated after vigorous DC activation by Toll-like receptor ligands or CD40 agonists. These findings open opportunities to integrate immunotherapy with chemotherapy with some expectations of benefit.

I. INTRODUÇÃO

As patologias cancerígenas constituem uma das principais causas de morte a nível mundial, e apesar dos avanços terapêuticos significativos nesta área, a sua incidência e mortalidade continuam a aumentar. ^[1]

O sucesso terapêutico contra o cancro encontra-se largamente dependente de uma resposta imunitária eficaz, capaz de detetar, combater e eliminar as células cancerígenas. ^[1]

Apesar dos progressos alcançados no desenvolvimento de novos fármacos quimioterapêuticos e na melhoria da radioterapia, estes tratamentos convencionais ficam muitas vezes aquém das metas necessárias ao controlo da progressão tumoral, encontrando-se associados a elevada toxicidade e complicações que se manifestam a curto e longo prazo. ^{[2][3][4]}

Os tratamentos anticancerígenos podem ser divididos em quatro categorias, das quais a imunoterapia tem vindo a adquirir uma enorme relevância. Esta modalidade terapêutica consiste na mobilização e fortificação da capacidade natural do organismo em combater os processos tumorais, por aumento da eficácia das células do sistema imune, direcionando-as para um ataque específico. ^{[5][6]}

As células dendríticas (DCs), as mais potentes células apresentadoras de antígenos (APCs), desempenham um papel fundamental na indução e manutenção de uma imunidade antitumoral e, após vários estudos clínicos, apresentam-se como uma solução promissora em várias terapêuticas oncológicas. ^[3] Devido às suas características peculiares, estas células são fortes candidatas à utilização na vacinação terapêutica anticancerígena, uma opção da imunoterapia. ^[7]

Vários estudos realizados ao longo da última década revelaram que baixas concentrações de agentes quimioterapêuticos, usados em tratamentos oncológicos convencionais, são capazes de modular a atividade das células dendríticas, num fenómeno denominado quimiomodulação. Este fenómeno poderá representar uma nova forma de ativação destas células apresentadoras no microambiente tumoral, bem como aumentar a eficácia clínica de diversos regimes terapêuticos. ^[3]

Esta monografia pretende ser uma revisão da combinação terapêutica de diversas estratégias, destacando a aplicação e atividade sinérgica da imunoterapia anticancerígena recorrendo a DCs, com tratamentos convencionais standardizados, como a quimioterapia. Neste contexto, as DCs serão abordadas no que se refere à sua atividade antitumoral, uso na imunoterapia e combinação com regimes quimioterapêuticos, através da exposição de resultados obtidos em ensaios clínicos.

2. CÉLULAS DENDRÍTICAS

2.1. Ciclo de Vida no Sistema Imune

2.1.1. Origem, Classificação e Funções Biológicas

O nosso sistema imune envolve um conjunto de estruturas e processos biológicos que possuem o objetivo comum de defender o organismo humano de ameaças externas. A defesa imunitária é um processo altamente regulado e resulta de uma interligação complexa entre dois sistemas: o sistema imunitário inato e o sistema imunitário adaptativo, cujos principais mensageiros são as células apresentadoras de antígenos (APCs), das quais fazem parte as células dendríticas (DCs).^{[8][9]}

As células dendríticas, descritas pela primeira vez em 1973 por Ralph Steinman, possuem uma capacidade única de apresentação de antígenos e de indução de respostas imunes.^[10] Estas células são produzidas continuamente na medula óssea, através de precursores hematopoiéticos (células estaminais hematopoiéticas CD34+), e encontram-se nos tecidos periféricos não linfoides e tecidos linfoides no seu estado imaturo.^[9]

Consoante os marcadores de superfície expressos, os progenitores, as funções biológicas específicas e a sua localização no organismo, as DCs podem ser divididas em duas linhagens distintas: a linhagem linfoide e a linhagem mieloide.^[11]

No ser humano, a linhagem mieloide, por intermédio de precursores mieloides CD34+ e na presença de determinados estímulos, origina as chamadas células dendríticas “clássicas” ou convencionais (cDC), localizadas no sangue e tecidos periféricos. A maturação deste tipo celular conduz à formação das células dendríticas intersticiais, capazes de ativar linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+ imaturos (imunidade celular), bem como diferenciar linfócitos B imaturos em células secretoras de anticorpos (imunidade humoral).^{[8][10]} A linhagem linfoide origina células dendríticas plasmocitoides (pDC), localizadas no sangue e órgãos linfoides, e que possuem a capacidade de produzir interferão do tipo I (IFN).^[8]

Para além das linhagens acima referidas, também os monócitos podem originar, por diferenciação, DCs, sob condições de *stress* e na presença do fator estimulante de colónias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e de interleucina (IL) -4.^{[8][12]}

Consideradas o centro do sistema imunitário, as DCs atuam como sentinelas do sistema imune inato, gerando citocinas protetoras, e como membros do sistema imune adaptativo, sendo responsáveis pela manutenção da tolerância central e periférica, e pelo reconhecimento, processamento e apresentação do material antigénico, com geração de diferentes respostas efetoras e de uma memória imunológica.^[13]

2.1.2. Imunobiologia: Maturação e Apresentação de Antígenos

Normalmente, as células dendríticas encontram-se localizadas nos tecidos periféricos no seu estado imaturo e por isso inativas, possuindo uma fraca capacidade para ativar linfócitos T. ^[14] Estas DCs imaturas caracterizam-se por apresentarem pouca ou nenhuma expressão de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86) e moléculas do complexo major de histocompatibilidade (MHC), além de não produzirem IL-12 suficiente para a proliferação dos linfócitos T. ^[15]

No entanto, são estas DCs imaturas as responsáveis pela captura e pelo processamento antigénicos segundo uma série de mecanismos complementares. ^{[8][15]} O reconhecimento destes antígenos é feito por intermédio de recetores de reconhecimento de padrões (PRR), como recetores *Toll-like* (TLR), recetores lectina tipo C, recetores *scavenger* e recetores para a porção Fc das imunoglobulinas (Fc γ), presentes na superfície das DCs e com afinidade para determinados padrões moleculares associados a agentes patogénicos denominados PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*), ou padrões moleculares associados a danos, denominados DAMPs (*damage associated molecular patterns*). ^{[7][16]}

Habitualmente, os antígenos captados do meio extracelular por endocitose são eficientemente acoplados a moléculas MHC classe II. Após ativação das DCs, por contacto com o antígeno, os complexos MHCII-antígeno migram para a superfície celular destas células, e são apresentados a linfócitos T CD4+. ^{[11][17]}

Por sua vez, os antígenos endógenos ligam-se a moléculas MHC classe I, migrando para a superfície celular das DCs, onde são apresentados a linfócitos T CD8+. ^{[8][10]}

Após contacto com o antígeno e sob determinados estímulos locais (quimiocinas, GM-CSF, IL-4 e TNF- α), as células dendríticas migram para os órgãos linfoides, sofrendo diversas mudanças fenotípicas e funcionais que as tornam imunocompetentes, num processo denominado maturação. ^[8]

Durante a maturação, as DCs sofrem um aumento de expressão das moléculas co-estimuladoras, importantes para a adesão e interação com os linfócitos T. ^[15]

O processo de maturação finaliza com a interação CD40-CD40L (CD 154), duas moléculas presentes na superfície das DCs e dos linfócitos T, respetivamente. ^{[9][14]}

No entanto, as adesões moleculares que se estabelecem entre estes dois tipos celulares não são suficientes, por si só, para a ativação dos linfócitos T. Este processo necessita também de uma co-estimulação, que assegura uma amplificação eficaz da sinalização. ^[11] Nesta estimulação intervêm diversas citocinas produzidas pelas DCs incluindo a IL-12, essencial no processo de apresentação antigénica e no desenvolvimento de respostas únicas e específicas.

^{[15][18]}

Nos nódulos linfáticos, ocorre a ativação dos linfócitos T CD4+ e T CD8+ *naive* mediante apresentação cruzada dos antígenos captados pelas DCs. Este processo de ativação ocorre por intermédio da ligação dos antígenos a receptores específicos presentes na superfície celular dos linfócitos (TCRs).^{[8][14]} Os linfócitos T CD4+ ativos originam linfócitos *Helper* (Th1, Th2 e Th17) e linfócitos T reguladores (T reg.).^{[8][15]} Os linfócitos Th1, produtores de IFN- γ , TNF- α e TNF- β , são capazes de ativar novas DCs, macrófagos e células *natural killer* (NK).^[8] Os linfócitos Th2 segregam IL-4 e IL-10, citocinas associadas à imunidade humoral.^[17] Adicionalmente, os linfócitos T CD4+ intervêm na diferenciação dos linfócitos T CD8+ em linfócitos T citotóxicos (CTLs) capazes de lisar diretamente as células tumorais e de segregar IFN- γ e TNF- α .^[14]

3. CANCRO

3.1. Células Dendríticas no Combate Antitumoral

Para se compreender como é que as quimioterapias citotóxicas e outras terapias anticancerígenas alteram as respostas imunes no seio de um tumor sólido, torna-se importante perceber em primeiro lugar como é que o sistema imune responde no caso de doença cancerígena.^[14]

Segundo Gavin e Allen, o sistema imune está concebido para conseguir reconhecer células que expressem antígenos *non-self*, respondendo mediante uma série de mecanismos num processo altamente regulado designado de imunovigilância.^{[7][5][19]} Deste modo, é possível que o processo de eliminação de um tumor compreenda tanto a imunidade inata quanto a adquirida, formando um sistema integrado no qual diversas células e moléculas funcionam mutuamente.^{[20][21]} Como parte integrante destes dois sistemas, as DCs desempenham um papel fundamental no desenrolar destas respostas antitumorais.^{[10][22]}

O processo dinâmico de imunovigilância contra o crescimento tumoral é acompanhado de mudanças na imunogenicidade dos tumores, um fenómeno denominado *cancer immunoediting*. (**Figura I**) Este é um fenómeno que envolve múltiplas etapas: uma etapa inicial de eliminação, uma segunda etapa de equilíbrio e uma terceira etapa de evasão imunitária.^[23]

A fase de eliminação, caracteriza-se por um crescimento da massa tumoral acompanhado de neovascularização, responsável pelo aumento do aporte sanguíneo a estas células malignas. Este crescimento invasivo causa disrupções nos tecidos peri-tumorais, gerando sinais inflamatórios que recrutam células do sistema inato, nomeadamente as DCs, responsáveis pela monitorização da progressão tumoral.^{[19][23]} Estas células inatas são estimuladas a produzir IFN- γ , que induz morte celular quer por mecanismos antiproliferativos,

envolvendo o bloqueio da neovascularização do tumor, quer por mecanismos apoptóticos, resultantes da ação de espécies reativas de oxigênio (ROS).^[19]

Por outro lado, os antígenos tumorais (TAAs – *tumor associated antigens*), expressos pelas células malignas ativas ou em apoptose, devem ser reconhecidos e captados pelas DCs imaturas presentes nas zonas peri-tumorais.^[8]

A apresentação antigénica mediada pelas DCs aos linfócitos T CD4+ e T CD8+ *naive*, localizados nos nódulos linfáticos, é responsável por desencadear uma resposta adaptativa, com ativação de linfócitos T.^[10] Os linfócitos T ativos devem abandonar os nódulos linfáticos, dirigindo-se ao seio da massa tumoral.^[14] Uma vez no tumor, devem ser capazes de ultrapassar o microambiente tumoral existente, caracterizado pela produção de citocinas imunossupressoras, como o fator de crescimento tumoral (TGF-β), IL-10 e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF).^{[8][14]}

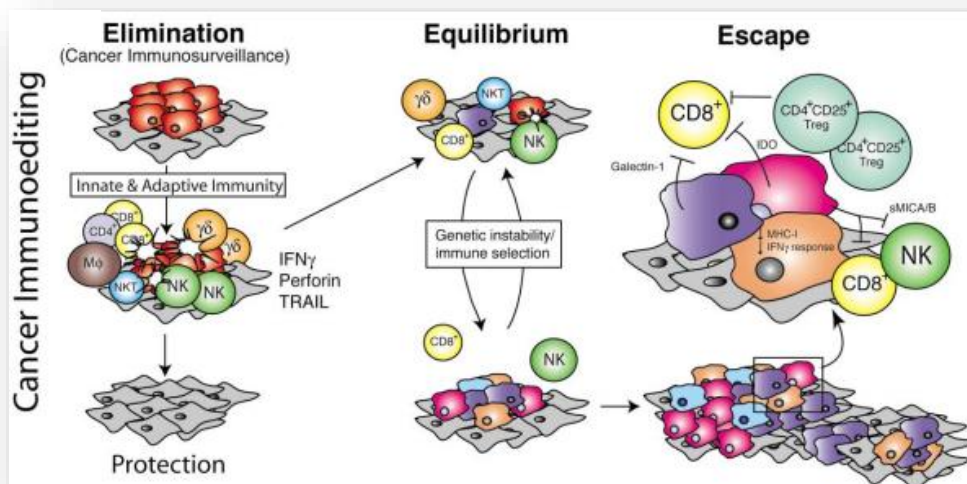


Figura 1- Etapas do processo de *Cancer Immunoediting* (retirado de DUNN et. al., 2004).^[23]

Nesta fase de eliminação, os linfócitos T CD8+ ativos diferenciam-se em linfócitos T citotóxicos (CTLs) específicos de antígenos, capazes de lisar diretamente as células tumorais, através da produção de granzima B e perforina.^{[7][8][14]} Os linfócitos T CD4+, preponderantes no combate contra a progressão tumoral, estimulam a proliferação das CTLs e de macrófagos fagocíticos, e induzem uma memória imunológica a longo prazo.^{[17][24]} Esta memória traduz-se na capacidade de responder de forma rápida e vigorosa aos TAAs, originando proteção contra recidivas e metastização. As células de memória persistem na ausência de antígenos pois são mantidas pela proliferação homeostática dos linfócitos T.^[5]

A qualidade e eficácia dos linfócitos T CD4+, juntamente com a qualidade dos linfócitos T CD8+, contribuem para a eficácia das respostas antitumorais geradas.^[24]

Após a fase de eliminação, os tumores entram num estágio de equilíbrio, que se pode estender por um longo período de tempo. Nesta fase, as variantes originais do tumor são adequadamente combatidas pela relação interativa entre citocinas e células do sistema imune.^[14]

No entanto, deste processo dependente da instabilidade genética dos tumores, surgem determinados fenótipos imunorresistentes, insensíveis aos mecanismos imunes de defesa produzidos na fase de equilíbrio.^{[14][19]}

Consequentemente, o tumor entra novamente numa fase de proliferação celular descontrolada originando metastização (Fase de evasão imunitária).^[25]

3.2. Resistência Tumoral e Mecanismos de evasão imunitária

O cancro é uma patologia complexa, no qual as células cancerígenas mutadas possuem várias características biológicas essenciais à manutenção do seu estado patológico, destacando-se o aumento da sinalização proliferativa, aumento da resistência à apoptose, imortalidade replicativa, aumento da angiogénese e crescimento invasivo com possibilidade de formação de metástases.^[1]

Nalguns casos, há sinais evidentes da ativação do sistema imune contra as células cancerígenas, porém, alguns tumores continuam o seu crescimento e proliferação.^[1] Estudos conduzidos na última década demonstraram que a imunossupressão desempenha um papel preponderante na progressão tumoral, podendo resultar da alteração ou falha em qualquer uma das etapas da imunovigilância.^{[10][25]}

A evasão tumoral é um processo que pode envolver tanto as células tumorais e os TAAs, como o sistema imune do hospedeiro.^[26]

Ao nível do tumor, a maioria dos TAAs possuem baixa imunogenicidade, por se tratarem de antigénios próprios e específicos do tumor. Uma diminuição da sua expressão favorece a evasão ao sistema imune.^[14] Assim, um aumento na vascularização tumoral, uma diminuição dos eventos apoptóticos (baixa expressão de Fas), uma diminuição da expressão de moléculas co-estimuladoras negativas (B7-H1 ou PD-L1), associadas a perdas de função do IFN- γ , de moléculas MHC classe I e de moléculas co-estimuladoras positivas, constituem outros mecanismos de escape tumorais.^[1]

Uma outra característica vantajosa dos tumores é a sua capacidade de formar um ambiente imunossupressor, constituído por diversas citocinas (IL-10, IL-6 e TGF- β) e por moléculas como o VEGF, o ligando Fas (Fas-L), o ligando de morte programada PD-L1 e a indolamina 2,3-dioxigenase (IDO).^{[17][22]} Se os tumores não conseguem produzir estes fatores inibitórios por eles próprios, recrutam outros tipos celulares que o façam, como os

fibroblastos associados a tumores (CAFs), DCs tolerogénicas, células supressoras mieloides (MDSCs), macrófagos tumorais (TAMs) e linfócitos T reg. **(Figura 2)** ^{[17][22][27]} Estas células impedem a imunização através de vários mecanismos, que incluem a depleção de arginina e a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e óxido nítrico (NO). ^[17]

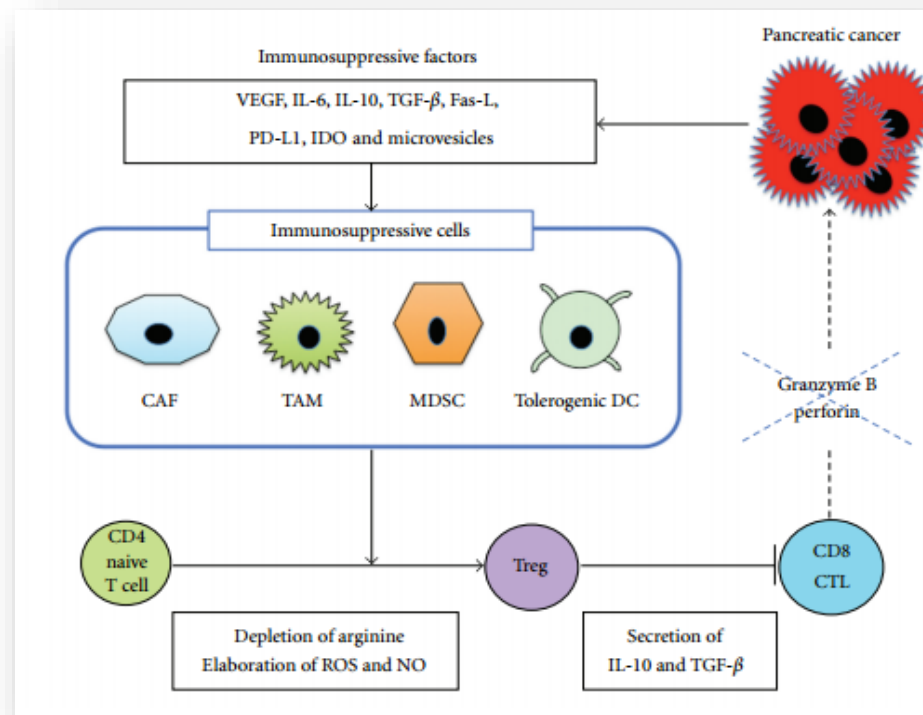


Figura 2 – Microambiente Imunossupressor desenvolvido pelos tumores (retirado de KOIDO et. al., 2011). ^[17]

Em primeira instância, os tumores, por ação da IL-6, inibem a diferenciação dos monócitos em DCs, direcionando a diferenciação para a produção de macrófagos. Seguidamente, a IL-10 inibe a maturação destas células apresentadoras, promovendo indiretamente o crescimento tumoral. ^[8] Por último, também a proteína TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*) estimula a expressão do ligando Ox40 (OX40L) nas DCs, desencadeando a criação de uma resposta Th2, não eficaz contra o tumor. ^{[1][8]}

Adicionalmente, a secreção de IL-4 e de IL-13 pelos linfócitos T CD4+ previne a apoptose celular, promovendo indiretamente o crescimento da massa tumoral. **(Figura 3)** ^[8]

Nestas circunstâncias imunossupressoras, a apresentação antigênica mediada pelas DCs pode ser inibida via STAT3. [27] Este fator de transcrição oncogénico recruta TAMs e MDSCs para o seio tumoral, impedindo a ativação e a polarização das DCs aí existentes. Esta supressão origina depleção de linfócitos T ou anergia destas células, como resultado da tolerância dos linfócitos T aos antígenos específicos do tumor. (Figura 4) [23][27]

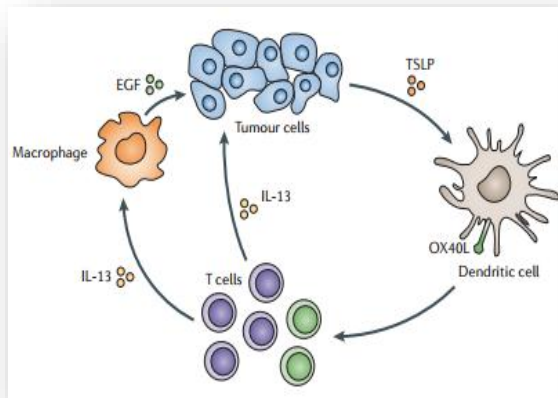


Figura 3 – Interação das DCs com as células tumorais (retirado de PALUCKA, et. al., 2012). [8]

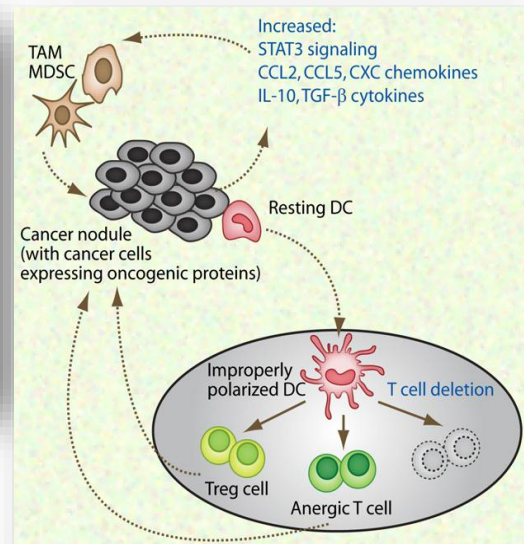


Figura 4 – Influência do crescimento tumoral na imunização mediada pelos linfócitos T (retirado de MELIEF, 2008). [27]

Para além dos tumores se desenvolverem por mecanismos resultantes de uma alteração ou deficiência na imunovigilância, podem induzir tolerância imunológica como resultado do microambiente tumoral. Esta tolerância tumoral pode ser desenvolvida por DCs tolerogénicas, com efeitos pró-tumorais, que promovem a diferenciação dos linfócitos T CD4+ em linfócitos T reg, produtores de IL-10 e inibidores da secreção de IFN- γ . [10][12][28]

A presença de níveis elevados de linfócitos T reg no seio tumoral encontra-se associada a uma baixa taxa de sobrevivência. [26]

Para além dos fatores supramencionados, pensa-se que a elevada taxa de mortalidade associada a estas patologias se deve à quantidade residual de células cancerígenas que permanece após cirurgia ou quimioterapia. Esta população remanescente, designada de células estaminais cancerígenas (CSCs), possui características comuns às células estaminais normais, incluindo a sua capacidade de autorrenovação, responsável pelas recidivas e metastização. [1]

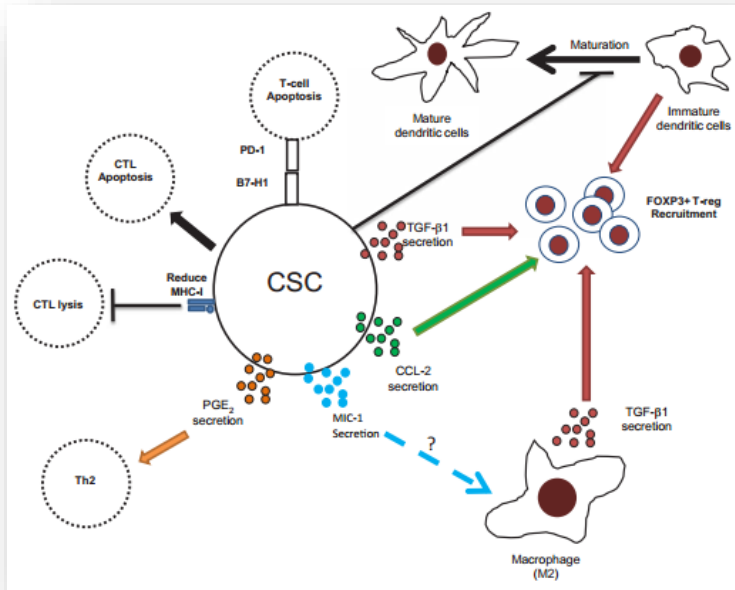


Figura 5 – Papel imunomodulatório das células estaminais cancerígenas (CSCs) (retirado de GHEBEN *et.al.*, 2013). [1]

Estudos recentes concluíram que estas CSCs intervêm na criação do ambiente imunossupressor tumoral, regulando a expressão de moléculas negativas (B7-H1) e influenciando o tipo de resposta gerado, com uma possível indução do fenótipo FoxP3+ de linfócitos T reg. [1] (**Figura 5**)

4. TERAPIAS ANTICANCERÍGENAS CONVENCIONAIS: A QUIMIOTERAPIA

Nas últimas décadas, as estratégias terapêuticas convencionais como a quimioterapia têm sido o tratamento de primeira linha usado em muitos doentes com quadros clínicos cancerígenos em estado avançado ou inoperável, e mais de metade dessas pessoas é sujeita a este tipo de tratamento. Devido aos seus efeitos terapêuticos demonstrados, a quimioterapia é habitualmente empregue como neo-adjuvante ou adjuvante em tratamentos pré ou pós-operatórios, respetivamente. [3]

A dose usada neste tipo de terapia é baseada no cálculo da dose máxima tolerada (MTD), isto é, a dose máxima possível para que um fármaco não cause efeitos secundários inaceitáveis. Esta estratégia da MTD, a qual determina a eficácia e a toxicidade do fármaco, tem demonstrado sucesso na cura e controlo da doença num número significativo de doentes. [3]

Estudos recentes mostraram que os fármacos citotóxicos, quando usados em baixas dosagens (10-33% do seu MTD) e administrados em intervalos de tempos mais frequentes, aumentam a eficácia das respostas antitumorais. [3][5]

Relativamente à sua atividade terapêutica antitumoral, são vários os mecanismos de atuação destes fármacos. Numa primeira fase, a quimioterapia pode aumentar a visibilidade, para o sistema imune, dos TAAs. [5] Este aumento de visibilidade deve-se fundamentalmente à morte celular por apoptose desencadeada pela quimioterapia. [27][29] Esta morte celular massiva encontra-se associada à libertação de grandes quantidades de TAAs, aumentando os níveis de

expressão de moléculas MHC I, moléculas co-estimulatórias e IL-12, responsáveis pela estimulação da captação e apresentação antigénicas. ^{[5][29]}

Adicionalmente, as baixas dosagens destes agentes terapêuticos, produzem uma diminuição dos linfócitos T reg, dos TAMs e das MDSCs, favorecendo a atividade imunogénica das DCs e dos linfócitos T citotóxicos. ^[27]

Um dos efeitos mais contestados destes fármacos é o nível de linfopenia produzido. Contudo, ensaios clínicos realizados neste campo concluíram que o grau de linfopenia produzido criava um estado favorável de proliferação homeostática de linfócitos T CD8+. ^[14]

Apesar dos níveis elevados de TAAs encontrados nos nódulos linfáticos, a quimioterapia por si só não induz uma resposta imune eficaz. Raros são os casos em que, a regressão tumoral, resultante da ação citotóxica destes agentes, é prosseguida por fenómenos imunológicos, uma vez terminada a quimioterapia. Esta é uma estratégia que se for usada isoladamente num regime terapêutico, raramente resulta em cura. ^[5]

No entanto, apesar dos avanços alcançados no desenvolvimento e melhoria destes fármacos quimioterapêuticos, a sua utilização terapêutica encontra-se associada a complicações a curto e longo prazo, incluindo mielosupressão, neutropenia, trombocitopenia, disfunções gastrointestinais, entre outros, falhando muitas vezes no controlo da progressão tumoral. ^{[3][4][14]} As complicações associadas à sua utilização são consequência da sua baixa especificidade, uma vez que qualquer célula com capacidade proliferativa, incluindo células tumorais e linfócitos T, é suscetível aos mecanismos de morte celular produzidos. ^{[5][29]}

O desenvolvimento de resistências a estes tratamentos convencionais juntamente com os seus efeitos secundários constituem dois dos fatores limitantes ao seu sucesso terapêutico, criando a necessidade de procura por opções mais promissoras. ^{[4][14]}

5. IMUNOTERAPIAS ANTICANCERÍGENAS

A imunologia, incluindo a imunidade mediada por linfócitos T, desempenha um papel fulcral no desenvolvimento de uma resposta contra determinadas doenças e no *design* de novos tratamentos terapêuticos. ^[28] Evidências clínicas enaltecendo o potencial do sistema imune no controlo de patologias cancerígenas, realçaram a importância da imunoterapia e da vacinação terapêutica como novas estratégias no combate ao cancro. ^[30]

As imunoterapias, que visam fortalecer a capacidade natural do nosso organismo no combate a tumores, aumentando a eficácia do sistema imune, têm como principal objetivo gerar e promover a migração de linfócitos efetores até ao seio tumoral, com o intuito de reconhecer e eliminar as células malignas. ^{[2][30]} Um dos alvos suscetíveis de aplicação em imunoterapia são os tumores resistentes a fármacos citotóxicos. ^[4]

Muitos esforços têm sido feitos no sentido de utilizar a capacidade imunoestimuladora das DCs ativas em estratégias imunoterapêuticas antitumorais. [27] O recurso a estas células, devido à sua poderosa atividade adjuvante na estimulação de respostas celulares específicas, tem sido considerado recentemente uma forte aposta no tratamento de doentes oncológicos em estado avançado e resistente a terapias convencionais. A capacidade de estimulação de respostas antitumorais fortes e eficazes pelas DCs, centrada nas suas ações de captação e apresentação antigénicas, pode ser manipulada e utilizada para fins terapêuticos, principalmente em estratégias de vacinação. [1][18]

5.1. Vacinação Terapêutica recorrendo a DCs

A área da imunoterapia pode ser dividida em três categorias principais: modificadores da resposta imune (citocinas, IL-12, interferões, TNF e CSF), anticorpos monoclonais e vacinas, com finalidade terapêutica ou preventiva. [30][31]

A vacinação terapêutica, “desenhada” como tratamento de erradicação dos agentes causadores de uma doença, constitui um meio de entrega dos TAAs para que estes possam ser reconhecidos, captados, processados e apresentados a linfócitos T efetores, pelas APCs. [14][31]

As DCs, células essenciais ao sistema imune, têm sido consideradas boas candidatas para utilização na vacinação devido às suas características peculiares já largamente referidas neste trabalho. Múltiplos estudos têm demonstrado que estas células são facilmente estimuladas e ativadas pelos TAAs expressos pelos tumores. [28] Por outro lado, encontram-se habilitadas a produzir uma resposta imunogénica potente, com ativação de linfócitos Th, CTLs e células NK, que atuam na eliminação do tumor. [22] Por último, as DCs geradas e ativadas *ex vivo* ou residentes nos nódulos linfáticos, são capazes de reter as suas capacidades imunizantes nos doentes oncológicos, confirmando a hipótese de que estas células induzem uma memória imunológica a longo prazo. [28]

Estas vacinas têm sido consideradas altamente experimentais quando em comparação com outras modalidades imunoterapêuticas, mas a sua capacidade para aumentar a resposta antitumoral em determinados quadros clínicos oncológicos, tem sido confirmada por resultados de vários estudos. [30] A vacinação anticancerígena oferece vantagens relativamente a outras terapias estandardizadas, devido à sua elevada especificidade, segurança, longo período de utilização e baixa toxicidade. [4][32]

Contudo, estudos desenvolvidos na última década revelaram alguns obstáculos no alcance da eficácia clínica desejada. [4] As limitações prendem-se com a sua utilização apenas em estados cancerígenos avançados e com quadros de imunossupressão associados, a possível

permanência das DCs no local da injeção, sendo que apenas um pequeno número migra para os nódulos linfáticos, e o ambiente imunossupressor existente associado à resistência tumoral. Este ambiente supressor pode inativar os linfócitos T ativos por vacinação, diminuindo a eficácia clínica deste tratamento. ^{[22][24][28]} Assim, para ultrapassar este problema são necessárias várias doses de vacinação por forma a manter os níveis elevados de linfócitos T durante o tempo suficiente para eliminar o tumor, e por forma a assegurar a criação de células de memória que atuem rapidamente em caso de uma recidiva tumoral. ^[22]

Idealmente, as vacinas deveriam ser capazes de responder a todas estas problemáticas, induzindo a migração das DCs para os nódulos linfáticos, apresentando longevidade (as DCs deveriam manter-se maduras nos nódulos durante o tempo suficiente para ativar e expandir as respostas imunes geradas) e devendo ser estáveis na apresentação dos TAAs. ^[22]

No decorrer dos últimos anos demonstrou-se que as vacinas usadas isoladamente como único meio terapêutico antitumoral não produzem benefícios clínicos relevantes. ^[24] De forma a aumentar a sua eficácia terapêutica, é necessário apostar na sua combinação com outras estratégias, convencionais ou emergentes, criando soluções com o intuito de ultrapassar o ambiente imunossupressor tumoral e quebrar a imunoresistência gerada. ^{[2][33]}

5.1.1. Tipos de Vacinas

A indução de uma imunidade mediada por DCs, via vacinação, constitui um desafio e alguns aspetos têm de ser ponderados no seu *design*, incluindo a fonte e a seleção dos TAAs, os métodos de preparação das vacinas, a diversidade fenotípica e distribuição tecidual das DCs. ^{[10][18]}

Várias estratégias e fontes de antígenos têm sido usadas na entrega dos TAAs às DCs. ^[10] A sua seleção deve ser feita com base na função biológica e nos recetores celulares expressos pelas diferentes DCs, dos quais depende o tipo e a especificidade da resposta gerada. ^[18] Tendo em conta estes critérios de escolha, os TAAs podem constituir péptidos de sequências conhecidas, lisados tumorais, vetores virais e retrovirais, plasmídeos de DNA, mRNA, lipossomas com ácidos nucleicos e células tumorais em apoptose. ^{[10][15]} As preparações com lisados tumorais produzem respostas mais fortes e prolongadas, com a vantagem de os TAAs serem apresentados quer a moléculas MHC I quer MHC II, diminuindo a possibilidade de escape tumoral. ^{[7][13]} Em contrapartida, a utilização de péptidos é limitada pelos haplotipos (HLA) do doente oncológico, os quais devem ser previamente conhecidos. ^[9]

Atualmente, as vacinas que recorrem a DCs com finalidade terapêutica antitumoral são de dois tipos: DCs manipuladas *ex vivo* e administração *in vivo* de antígenos tumorais. ^{[8][28]} Como é crucial manter a funcionalidade das vacinas terapêuticas anticancerígenas na presença

de tumores sólidos estabelecidos, incluindo na presença de MDSCs e de linfócitos T reg, o uso de DCs manipuladas *ex vivo*, comprovadamente resistentes a fatores inibitórios, tem-se tornado numa opção terapêutica auspiciosa. ^[34]

A manipulação *ex vivo* permite a seleção de características importantes das DCs, como o tipo de células efectoras induzidas e os tipos de resposta gerados. ^[34] Este é um tipo de vacinação que tira partido da capacidade migratória das DCs para áreas específicas, ricas em linfócitos T, reforçando o seu potencial como vetores imunoterapêuticos. ^{[10][28]}

Nestas preparações, as células são obtidas da cultura de progenitores hematopoiéticos ou monócitos autólogos (PBMCs, células CD34+ ou CD14+) na presença de GM-CSF, dos antigénios tumorais selecionados e de um “cocktail” de citocinas (IL-4, IL-15, TNF- α , IL-6, PGE-E2). ^{[13][22]} A combinação das citocinas usadas permite a diferenciação dos monócitos e a maturação das DCs, possuindo um papel crucial na qualidade das respostas celulares geradas. ^{[35][36]} Por exemplo, DCs geradas na presença de GM-CSF e IL-15, ao invés de GM-CSF e IL-4, originam um fenótipo com as características das células de Langerhans, estimulantes potentes de respostas T CD8+ *in vivo*. ^{[6][35]} A escolha de determinados “cocktails” de citocinas permite a seleção de características vantajosas das DCs, nomeadamente a capacidade de estas produzirem IL-12p70. Após maturação *in vitro* as DCs são reintroduzidas no organismo do doente oncológico. ^[36]

A administração *in vivo* de antigénios tumorais consiste na sua entrega diretamente às DCs, usando proteínas quiméricas constituídas por um anticorpo monoclonal conjugado com o antigénio específico selecionado. ^{[18][35]} Estes conjugados, depois de injetados, são internalizados e processados pelas DCs, e os antigénios são acoplados a moléculas MHC originando complexos, posteriormente apresentados aos linfócitos T. O anticorpo deve ser reconhecido pelos recetores celulares das DCs (receptores lectina, Fc γ e scavenger) intervenientes na sua captura e internalização. ^[31] Estudos pioneiros concluíram que este tipo de vacinação potencia respostas T CD4+ e T CD8+ específicas de antigénios. ^{[8][28][35]}

Esta estratégia, contrariamente à manipulação *ex vivo*, é detentora de uma metodologia simplificada, menos trabalhosa e mais económica, tendo a enorme vantagem de promover a maturação das DCs de uma forma mais fisiológica. ^{[22][31]} (**Figura 6**)

Qualquer uma destas vacinas pode ser administrada, durante períodos de tempo que variam de dias a meses, numa variedade de doses e de vias de administração: intradérmica, subcutânea, intramuscular, intravenosa e intratumoral. [9][22]

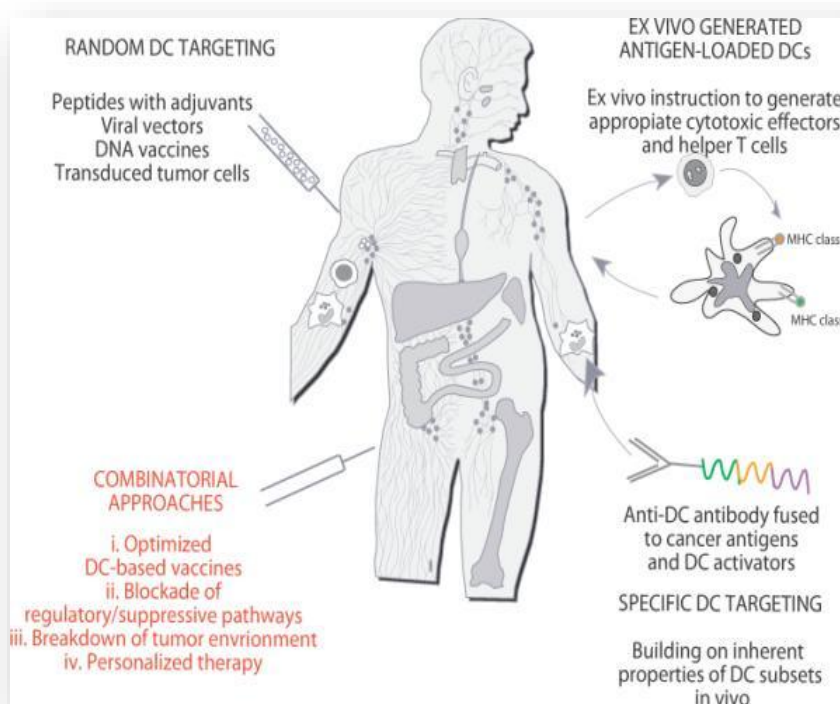


Figura 6 – Estratégias terapêuticas anticancerígenas baseadas em DCs (retirado de PALUCKA *et.al.*, 2011). [24]

6. COMBINAÇÃO QUIMIOIMUNOTERAPÊUTICA COMO NOVO TRATAMENTO ANTICANCERÍGENO

Resultados de ensaios clínicos recentes vieram demonstrar que as vacinas anticancerígenas continuam sem alcançar benefícios clínicos tangíveis quando administradas em monoterapia. Evidências crescentes sugerem que a imunoterapia apresenta maior potencial quando utilizada em combinação com a quimioterapia convencional. [37]

Embora possua grandes desvantagens e limitações, a quimioterapia pode ser inesperadamente vantajosa no aumento da eficácia de tratamentos imunoterapêuticos, permitindo o uso do próprio tumor como carregamento de vacinas terapêuticas, necessitando apenas de um forte ativador de DCs para alcançar os efeitos clínicos desejados. [5][27] Outrora, o uso desta modalidade convencional em combinação com vacinas anticancerígenas não era considerada uma estratégia terapêutica muito atrativa, devido ao potente efeito imunossupressor associado aos fármacos citotóxicos. [17]

A linfopenia, um dos efeitos secundários mais preocupantes da quimioterapia, tem sido a responsável pela visão antagônica em volta da combinação destas modalidades. Apesar da

sua ação depletiva sobre as células do sistema imune, a linfopenia tem vindo a revelar efeitos benéficos inesperados na geração de respostas antitumorais. ^[38] Em primeiro lugar, a depleção gerada inclui também depleção de linfócitos T CD4⁺ reguladores, responsáveis pela supressão das potenciais respostas anticancerígenas. Em segundo lugar, desencadeia uma fase de regeneração do sistema imune, caracterizada por um estado de proliferação homeostático de linfócitos T. Este estado de proliferação demonstrou ser mais suscetível, do que o normal, a antígenos tumorais. ^[5]

A administração de métodos imunoterapêuticos, durante esta fase de homeostasia, indicou incrementar as respostas antitumorais geradas, com um aumento dos resultados clínicos benéficos. ^[27]

Variados agentes quimioterapêuticos conseguem modular diretamente as vias de sinalização celulares, com produção de IL-12, IL-4 e TNF- α por DCs. Este fenómeno, denominado de quimiomodulação, consiste na regulação da maturação, processamento e apresentação antigénicos e da regulação da expressão de moléculas co-estimuladoras, processos nos quais participam as DCs. ^[3]

Múltiplas investigações usando DCs humanas, tratadas com diferentes agentes quimioterapêuticos em baixas concentrações, mostraram que estes agentes não induziam a apoptose destas células, estimulando a sua maturação e indução da proliferação de linfócitos T. ^[3] A título exemplificativo, estudos mostraram que as antraciclinas desencadeiam a libertação de sinais inflamatórios tumorais (proteína HMGB1 e ATP), iniciando uma cascata de imunização que culmina na ativação de recetores TLR4, presentes na superfície de DCs. ^[32] Adicionalmente, é responsável pela translocação da calreticulina para a superfície das células malignas, promovendo a sua fagocitose pelas DCs. ^[32]

Outros agentes utilizados mostraram possuir a capacidade de tornar os tumores mais permeáveis à granzima B produzida pelas CTLs, bem como aumentar a quantidade de TAAs disponíveis para apresentação cruzada. ^[7] (**Figura 7**)

Ao longo dos últimos anos, foram vários os tipos de carcinomas sujeitos a experimentações e ensaios clínicos usando vacinas de DCs e tratamentos de quimioterapia. No entanto, deve ser tido em consideração que diferentes fármacos possuem diferentes efeitos imunológicos, pelo que a otimização destas opções terapêuticas depende do agente citotóxico e do seu efeito no sistema imune. ^[38]

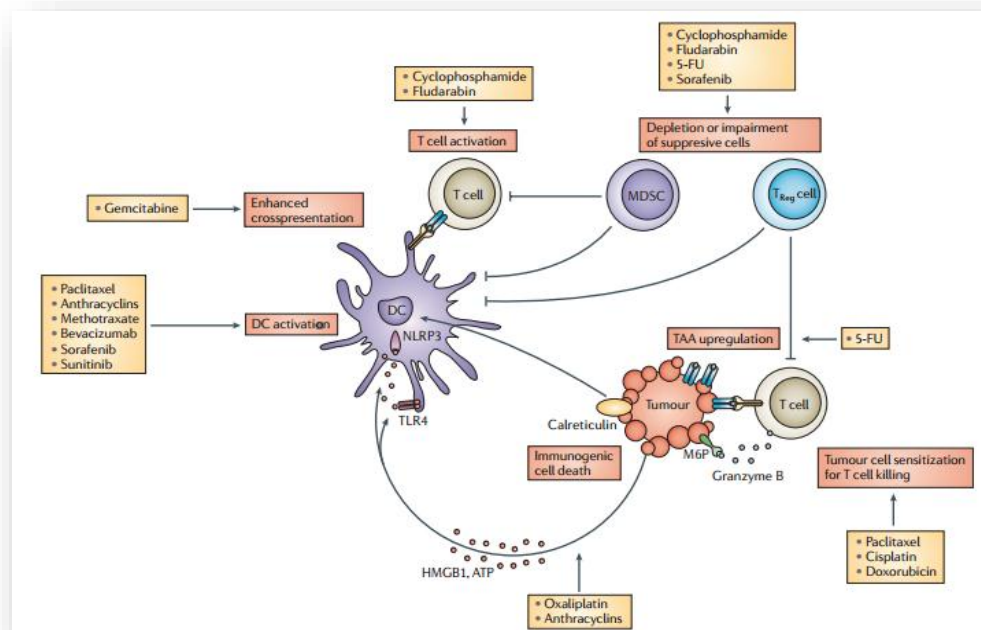


Figura 7 – Efeitos imunológicos positivos dos agentes quimioterapêuticos (retirado de LESTERHUIS *et.al.*, 2011).^[38]

6.1. Melanoma metastático

O melanoma metastático é a patologia que mais tem sido alvo de múltiplos ensaios clínicos devido à sua elevada resistência a diversas modalidades terapêuticas e ao seu mau prognóstico.^[39] Num dos primeiros ensaios clínicos de fase III realizados neste âmbito, avaliou-se o efeito clínico produzido, num grupo de doentes sujeitos a monoterapia com vacinação de DCs carregadas com peptídeos autólogos, em comparação com um grupo de doentes submetidos a uma monoterapia usando dacarbazida.^[40] Neste caso, os resultados obtidos mostraram não haver diferenças significativas entre os dois tratamentos, possivelmente devido ao grande impacto dos haplotipos HLA no sucesso da vacinação e à forma de administração usada (subcutânea).^[40] Outros ensaios clínicos usando diferentes fármacos quimioterapêuticos, incluindo a ciclofosfamida e a temozolomida, pretenderam avaliar a sinergia entre estes agentes e uma vacina de DCs, administrada posteriormente.^{[14][41]} A utilização combinada foi responsável pelo aumento das respostas antitumorais produzidas, nomeadamente por aumento da estimulação das DCs, via produção de ácido úrico e IFN, bem como pela diminuição e erradicação dos linfócitos T reg.^[14]

Em termos gerais, os ensaios clínicos realizados usando estas combinações terapêuticas, no tratamento do melanoma, concluíram que esta estratégia apresenta um benefício significativo, ocorrendo aumento da eficácia e sucesso da terapêutica antitumoral, assim como aumento das taxas de sobrevivência.^{[41][42]}

6.2. Carcinoma Pulmonar

Ensaio clínico realizado em doentes com cancro pulmonar combinaram vacinas de DCs carregadas com o gene p53 e tratamentos convencionais de quimioterapia, usando cisplatina e carboplatina. ^[43] Os resultados alcançados foram promissores, com um aumento significativo na imunização p53-específica, mediada pelos linfócitos T. Uma das hipóteses geradas para a explicação dos dados obtidos, foi a de que a quimioterapia provocava possivelmente um aumento da expressão de p53 nas células tumorais, tornando-as mais suscetíveis à ação das CTLs. Estas células efetoras eram igualmente estimuladas a produzir perforinas e granzimas, essenciais à apoptose das células cancerígenas. ^{[44][45]}

6.3. Carcinoma Pancreático

Doentes oncológicos com carcinomas pancreáticos também foram submetidos a investigação, sendo sujeitos à combinação de uma vacina de DCs (com o antígeno OVA) e o fármaco gemcitabina. ^{[17][46]} Os investigadores envolvidos neste estudo demonstraram que a gemcitabina não exercia apenas um efeito direto antitumoral, como também mediava efeitos imunológicos relevantes para a vacinação imunoterapêutica. Este fármaco é responsável pelo aumento da apresentação cruzada pelas DCs e pelo aumento da expressão do recetor cancerígeno da manose-6-fosfato catiónico-dependente (CI-MPR), que estimula a produção de granzima B pelas CTLs. ^{[14][17]} Apesar da influência negativa deste fármaco na proliferação dos linfócitos T induzida pela vacina, os resultados obtidos revelaram que a gemcitabina não afetou a migração das DCs para os nódulos, preservou as CTLs sensibilizando as células cancerígenas para a ação específica destas células efetoras, prevenindo o desenvolvimento da massa tumoral. ^{[33][46]}

6.4. Carcinoma Prostático

A primeira vacina terapêutica baseada em DCs aprovada pela FDA foi a sipuleucel-T usada no tratamento do cancro prostático resistente à terapêutica hormonal. ^[38] Consequentemente, variados estudos foram realizados com este tipo de carcinomas, incluindo estudos de combinações terapêuticas. Um ensaio clínico de fase II combinando o docetaxel e uma vacina de DCs carregada com o gene PSA, concluiu que o agente citotóxico aumentava a resposta antitumoral da vacinação, sem comprometimento do desenvolvimento de respostas T específicas do antígeno. Este estudo veio comprovar a teoria de que certos agentes quimioterapêuticos podem exercer atividades imunomoduladoras, por aumento da expressão celular de TAAs, de moléculas MHC e da molécula Fas, tornando as células malignas mais sensíveis à destruição pelo sistema imune. ^[47]

6.5. Carcinoma da Mama

Estudos envolvendo vacinas de DCs com o fármaco paclitaxel permitiram selecionar a dose ideal deste fármaco que causasse a apoptose de células malignas mamárias, numa extensão substancial, mas com inibição moderada dos linfócitos T. ^[48] Desta investigação, concluiu-se que o paclitaxel era responsável pelo aumento da atividade das DCs por mecanismos dependentes de IL-12 e pela estimulação da expressão das moléculas CD86, CD40 e CD80, com um aumento do processamento antigénico. ^{[29][49]} A combinação destas duas terapias induziu respostas específicas de antígenos, com um efeito anticancerígeno significativo se as DCs fossem injetadas diretamente no seio tumoral. ^[48]

6.6. Glioblastoma Multiforme

Um protocolo de terapia convencional radioterapêutica juntamente com temozolomida e vacinação com DCs foi avaliado em doentes oncológicos com glioblastoma. Este estudo demonstrou que os efeitos supressores celulares da temozolomida e da radioterapia predisuseram ao sucesso da imunoestimulação mediada pela vacinação. ^{[50][51]} Um aumento das respostas imunes específicas do tumor foi detetado em 63% dos doentes sujeitos a esta combinação terapêutica, com um aumento da taxa de sobrevivência, em comparação com o grupo controlo (sujeito apenas aos tratamentos convencionais). ^[50] Os casos em que foi observada uma regressão tumoral objetiva, extremamente rara nestes carcinomas, ocorreram também no grupo sujeito aos tratamentos combinados. Esta combinação demonstrou ser segura, viável e indutora de respostas específicas. ^[51]

Dos ensaios clínicos realizados ao longo das últimas décadas pode-se concluir que as doses baixas de quimioterapia, administradas em intervalos de tempo regulares e frequentes, constituem a opção ideal se forem combinadas com tratamentos de imunoterapia. ^[32] Outra conclusão geral retirada destes estudos foi de que a imunoterapia usando DCs não obtém benefícios significativos no aumento da sobrevivência quando administrada anteriormente à quimioterapia. Contudo, quando a imunoterapia era administrada posteriormente, 80% dos casos evoluíam para a cura. ^[5]

7. OUTRAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS

O conhecimento desenvolvido nos últimos tempos na área da imunoterapia e dos mecanismos que suportam a imunidade anticancerígena levaram à expansão de uma série de novos agentes terapêuticos para o tratamento de uma variedade de carcinomas. ^[34]

Um grupo destes novos candidatos são os anticorpos monoclonais, cujas regiões variáveis Fab de ligação aos antígenos, podem bloquear funções críticas das células cancerígenas. ^{[43][52]} Estas moléculas têm a capacidade de se ligar e neutralizar fatores produzidos pelo tumor, incluindo o VEGF, EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico), IL-10, IL-13 e TGF- β , impedindo, por exemplo, o processo de angiogênese. ^{[24][35]} Estas estratégias podem também ser usadas no bloqueio de sinais inibitórios da resposta imune ou dos seus ligandos, dos quais o bloqueio do CTLA-4 e o PD-L1 são os mais importantes. ^[35] Estas moléculas impedem a ativação das células do sistema imune e encontram-se associadas à atividade antiapoptótica tumoral. ^[34]

Também os ligandos OX40 (OX40L) são promissores à utilização em terapias anticancerígenas por promoverem a expansão de linfócitos T. ^{[9][34]}

Outra classe atrativa para uso em terapêuticas anticancerígenas é a dos agonistas dos receptores *Toll-like* (agonistas TLR), que revelaram possuir efeitos apoptóticos tumorais, sendo deste modo bons alvos para aplicação em vacinação. ^[16] É o caso da molécula RGCI00, agonista TLR3, que ativa mDCs com secreção de citocinas pró-inflamatórias que promovem a proliferação de linfócitos T. ^[16]

A *adoptive T cell therapy*, baseada na transfusão de linfócitos T específicos de tumores, permite que estas células sejam modificadas geneticamente de forma a aumentar a sua afinidade para os receptores celulares antitumorais, TCRs. ^{[35][38]} Nesta modalidade, os linfócitos T são extraídos dos doentes, modificados geneticamente *ex vivo* e reintroduzidos no organismo hospedeiro. ^[35]

Finalmente, também a população resistente de CSCs tumorais pode ser usada na imunização de doentes oncológicos, visando a ativação do sistema imune para um ataque às células malignas. Recentemente, uma equipa de investigadores conseguiu criar células híbridas, resultantes da fusão de DCs com CSCs, para ativação de respostas citotóxicas específicas das CSC. ^[17]

8. CONCLUSÃO

As DCs, assim denominadas pela primeira vez em 1973 por Steinman, são hoje em dia reconhecidas como um grupo de células importantes na indução de respostas imunes inatas e adaptativas. ^[53]

Atualmente, a utilização destas células em vacinação imunoterapêutica tem sido considerada bastante promissora no tratamento oncológico, devido à sua potente capacidade imunomoduladora, segurança e baixa toxicidade. Contudo, e apesar da crescente emergência desta modalidade, as respostas imunes antitumorais geradas não são sustentadas por um longo período de tempo quando a vacinação é administrada em monoterapia. ^[17]

Deste modo, a combinação de terapêuticas convencionais com vacinas anticancerígenas é vista como uma possível forma de ultrapassar os mecanismos imunossupressores e a resistência tumoral desenvolvida por fenótipos que escaparam à imunovigilância. Evidências recolhidas durante a última década demonstraram que esta combinação pode ser sinérgica, constituindo uma nova opção de tratamento para doentes oncológicos com um quadro clínico avançado. ^{[2][5]}

Um vasto número de ensaios clínicos encontra-se em desenvolvimento nesta área, com o objetivo de estabelecer os “*timings*” ótimos das terapias, programar os diversos regimes de quimioterapia e de imunoterapia, compreender se os efeitos sinérgicos verificados são limitados a um tipo específico de agentes quimioterapêuticos e se a imunoterapia também consegue aumentar os efeitos clínicos da quimioterapia. ^[17]

Outras alternativas terapêuticas também têm sido desenvolvidas no combate antitumoral, nomeadamente estratégias com anticorpos monoclonais, com agonistas TLR e com células híbridas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- GHEBEH, H., AL-ALWAN, M. **Do cancer stem cells have an immunomodulatory role different from the bulk of tumor cells?.** *Journal of Carcinogenesis and Mutagenesis*, S14 (2013).
- 2- RAMAKRISHNAN, R., ASSUDANI, D., NAGARAJ, S., HUNTER, T., CHO, H., ANTONIA, S., GABRILOVICH, D. I. **Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice.** *The Journal of Clinical Investigation*, 120., 4 (2010) 1111-1124.
- 3- KANENO, R., SHURIN, G. V, TOURKOVA, I. L., SHURIN, M. R. **Chemomodulation of human dendritic cell function by antineoplastic agents in low noncytotoxic concentrations.** *Journal of Translational Medicine*, (2009) 7-58.
- 4- RAMAKRISHNAN, R., ANTONIA, S., GABRILOVICH, D. **Combined modality immunotherapy and chemotherapy.** *Cancer Immunology: Immunotherapy*, 57., (2008) 1523-1529.
- 5- VAN DER MOST, R., ROBINSON, B., LAKE, R. **Combining immunotherapy with chemotherapy to treat cancer.** *Discovery Medicine*, 5., 27 (2009) 265-270.
- 6- ROMANI, N., THURNHER, M., IDOYAGA, J., STEINMAN, R. M. **Targeting of antigens to skin dendritic cells : possibilities to enhance vaccine efficacy.** *Immunobiology and Cell Biology*, 88., 4 (2010) 424-430.
- 7- SALAZAR-ONFRAY, F., PEREDA, C., REYES, D., LOPEZ, M. N. **TAPCells, the Chilean dendritic cell vaccine against melanoma and prostate cancer.** *Biological Research*, 46., 4 (2013) 431-40.
- 8- PALUCKA, K., BANCHEREAU, J. **Cancer immunotherapy via dendritic cells.** *Nature Reviews, Cancer*, 12., 4 (2012) 265-77.
- 9- SABADO, R., BHARDWAJ, N. **Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment.** *Immunotherapy*, 2., 1 (2010) 37-56.
- 10- BANCHEREAU, J., BRIERE, F., CAUX, C., DAVOUST, J., LEBECQUE, S., LIU, Y., PALUCKA, K. **Immunobiology of dendritic cells,** *Annual Review of Immunology*, (2000) 767-811.
- 11- LOPES, M.; CRUZ, M. – **Células dendríticas.** In: AROSA, F., CARDOSO, E., PACHECO, F., *Fundamentos da Imunologia*, Porto: Lidel, 2012, ISBN:978-972-757-856-6. 171-191.
- 12- WIEDER, E. **Dendritic cells : a basic review.** *International Society for Cellular Therapy*. (2003).

- 13- VAN BRUSSEL, I., BERNEMAN, Z. N., COOLS, N. **Optimizing dendritic cell-based immunotherapy: tackling the complexity of different arms of the immune system.** *Mediators of Inflammation*, (2012) 690643.
- 14- NOWAK, A. K., LAKE, R. a, ROBINSON, B. W. S. **Combined chemoimmunotherapy of solid tumours: improving vaccines?.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58., 8 (2006) 975-90.
- 15- BANCHEREAU, J., STEINMAN, R. M. **Dendritic cells and the control of immunity.** *Nature*, 392., 6673 (1998) 245-252.
- 16- NAUMANN, K., WEHNER, R., SCHWARZE, A., PETZOLD, C., SCHMITZ, M., ROHAYEM, J.. **Activation of dendritic cells by the novel Toll-like receptor 3 agonist RGC100.** *Clinical & Developmental Immunology*, (2013) 283649.
- 17- KOIDO, S., HOMMA, S., TAKAHARA, A., NAMIKI, Y., TSUKINAGA, S., MITOBE, J.,TAJIRI, H. **Current immunotherapeutic approaches in pancreatic cancer.** *Clinical & Developmental Immunology*, 2011., 1 (2011) 267539.
- 18- UENO, H., KLECHEVSKY, E., SCHMITT, N., Ni, L., FLAMAR, A-L., ZURAWSKI, S., ZURAWSKI, G., PALUCKA, K., BANCHEREAU, J., OH, S. **Targeting human dendritic cell subsets for improved vaccines.** *Seminars in Immunology*, 23., 1 (2011) 21-27.
- 19- DUNN, G. P., BRUCE, A. T., IKEDA, H., OLD, L. J., SCHERIBER, R. D. **Cancer immunoediting : from immuno- surveillance to tumor escape.** *Nature Immunology*, 3., 11 (2002) 991-998.
- 20- LEHRNBECHER, T., KOEHL, U., WITTEKINDT, B., BOCHENNEK, K., TAMSEN, L., KLINGEBIEL, T., CHANOCK, S. **Changes in host defense induced by malignancies and antineoplastic treatment: implication for immunotherapeutic strategies.** *The Lancet Oncology*, 9., 3 (2008) 269-278.
- 21- LOOSE, D.; VAN DE WIELE, C. **The immune system and cancer.** *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 24., 3 (2009) 369-376.
- 22- ROONEY, C., TURNIS, M. **Enhancement of dendritic cells as vaccines for cancer.** *Immunotherapy*, 2., 6 (2012) 847-862.
- 23- DUNN, G., OLD, L., SCHREIBER, D. **The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting.** *Immunity*, 21., 2 (2004) 137-148.
- 24- PALUCKA, K., UENO, H., Fay, J., BANCHEREAU, J. **Dendritic cells and immunity against cancer.** *Journal of Internal Medicine*, 269., 1 (2011) 64-73.
- 25- CHOI, G., LEE, M-H., KIM, S-K., KIM, C-S., LEE, H-S., IM M-W., KIL, H-Y., SEONG, D-H., LEE, J-R., KIM, W-C., LEE, M-G., SONG, S. **Combined treatment of an intratumoral**

- injection of dendritic cells and systemic chemotherapy (Paclitaxel) for murine fibrosarcoma.** *Yonsei Medical Journal*, 46., 6 (2005) 835-42.
- 26- VELTMAN, J. D., LAMBERS, M. E. H., VAN NIMWEGEN, M., JONG, S., HENDRIKS, R. W., HOOGSTEDEN, H. C., HEGMANS, J. P. J. J. **Low-dose cyclophosphamide synergizes with dendritic cell-based immunotherapy in antitumor activity.** *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010 (2010) 798467.
- 27- MELIEF, C. J. M. **Cancer immunotherapy by dendritic cells.** *Immunity*, 29., 3 (2008) 372-383.
- 28- STEINMAN, R., BANCHEREAU. **Taking dendritic cells into medicine.** *Nature Journal*, 449 (2007) 419-426.
- 29- SHURIN, G., TOURKOVA, I., KANENO, R., SHURIN, M. **Chemotherapeutic agents in noncytotoxic concentrations increase antigen presentation by dendritic cells via an IL-12-dependent mechanism.** *The Journal of Immunology*, 183., 1 (2009) 137-144.
- 30- PILLIS, L., GU, W., RADUNSKAYA, A. **Mixed immunotherapy and chemotherapy of tumors: modeling, applications and biological interpretations.** *Journal of Theoretical Biology*, 238., 4 (2005) 841-862.
- 31- COHN, L., DELAMARRE, L. **Dendritic cell-targeted vaccines.** *Frontiers in Immunology*, 5., 5 (2014) 255.
- 32- SOLIMAN, H. **Immunotherapy strategies in the treatment of breast cancer.** *Cancer Control : Journal of the Moffitt Cancer Center*, 20., 1 (2013) 17-21.
- 33- TANAKA, F., YAMAGUCHI, H., OHTA, M., MASHINO, K., SONODA, H., SADANAGA, N., MORI, M. **Intratumoral injection of dendritic cells after treatment of anticancer drugs induces tumor-specific antitumor effect in vivo.** *International Journal of Cancer*, 101., 3 (2002) 265-269.
- 34- KIRKWOOD, J., BUTTERFIELD, L., TARHINI, A., ZAROOR, H., KALINSKI, P., FERRONE, S. **Immunotherapy of cancer in 2012.** *American Cancer Society*, 62.,5 (2013) 309-335.
- 35- PALUCKA, K., UENO, H., ROBERTS, L., FAY, J. **Dendritic cells: are they clinically relevant?.** *Cancer Journal*, 16., 4 (2011) 318-324.
- 36- ZOBYWALSKI, A., JAVOROVIC, M., FRANKENBERGER, B., POHLA, H., KREMMER, E., BIGALKE, I., SCHENDEL, D. J. **Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70.** *Journal of Translational Medicine*, (2007) 5-18.

- 37- RAMAKRISHNAN, R., ANTONIA, S., GABRILOVICH, D. **Combined modality immunotherapy and chemotherapy: a new perspective.** *Cancer Immunology: Immunotherapy*, 57., 10 (2008) 1523-1529.
- 38- LESTERHUIS, J., HAANEN, J., PUNT, C. **Cancer immunotherapy-revisited.** *Nature Reviews. Drug Discovery*, 10., 8 (2011) 591-600.
- 39- OSHITA, C., TAKIKAWA, M., KUME, A., MIYATA, H., ASHIZAWA, T., IIZUKA, A., AKIYAMA, Y. **Dendritic cell-based vaccination in metastatic melanoma patients: phase II clinical trial.** *Oncology Reports*, 28., 4 (2012) 1131-1138.
- 40- SCHADENDORF, D., URUGEL, S., SCHULER-THURNER, B., NESTLE, O., ENK, A., BROCKER, E., GRABBE, S., RITTGEN, W., EDLER, L., SUCKER, A., ZIMPFER-RECHNER, C., BERGER, T., KAMARASHEV, J., BURG, G., JONULEIT, H., TUTTENBERG, A., BECKER, J., KEIKAVOUSSI, P., KAMPGEN, E., SCHULER, G. **Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG.** *Annals of Oncology*, 17 (2005) 563-570.
- 41- RIDOLFI, L., PETRINI, M., GRANATO, A. M., GENTILCORE, G., SIMEONE, E., ASCIERTO, P. A., RIDOLFI, R. **Low-dose temozolomide before dendritic-cell vaccination reduces (specifically) CD4+CD25++Foxp3+ regulatory T-cells in advanced melanoma patients.** *Journal of Translational Medicine*, 11., 1 (2013) 135.
- 42- RIDOLFI, L., PETRINI, M., FIAMMENGHI, L., GRANATO, A. M., ANCARANI, V., PANCISI, E., RIDOLFI, R. **Unexpected high response rate to traditional therapy after dendritic cell-based vaccine in advanced melanoma: update of clinical outcome and subgroup analysis.** *Clinical & Developmental Immunology*, 2010 (2010) 504979.
- 43- BAXEVANIS, C. N., PEREZ, S., PAPAMICHAIL, M. **Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy.** *Cancer Immunology: Immunotherapy*, 58., 3 (2009) 317-24.
- 44- ANTONIA, S. J., MIRZA, N., FRICKE, I., CHIAPPORI, A., THOMPSON, P., WILLIAMS, N., GABRILOVICH, D. I. **Combination of p53 cancer vaccine with chemotherapy in patients with extensive stage small cell lung cancer.** *Clinical Cancer Research*, 12., 3 (2006) 878-87.
- 45- ZHONG, R., TENG, J., HAN, B., ZHONG, H. **Dendritic cells combining with cytokine-induced killer cells synergize chemotherapy in patients with late-stage non-small cell lung cancer.** *Cancer Immunology: Immunotherapy*, 60., 10 (2011) 1497-1502.

- 46- BAUER, C., BAUERNFEIND, F., STERZIK, A., ORBAN, M., SCHNURR, M., LEHR, H., DAUER, M. **Dendritic cell-based vaccination combined with gemcitabine increases survival in a murine pancreatic carcinoma model.** *Gut Journal*. 56., 9 (2007) 1275-82.
- 47- ARLEN, P., GULLEY, J., PARKER, C., SKARUPA, L., PAZDUR, M., PANICALI, D., BEETHAM, P., TSANG, K., GROSENBACH, D., FELDMAN, J., STEINBERG, S., JONES, E., CHEN, C., MARTE, J., SCHLOM, J., DAHUT, W. **A randomized phase II study of concurrent docetaxel plus vaccine versus vaccine alone in metastatic androgen independent prostate cancer.** *Clinical Cancer Research*, 12., 4 (2006) 1260-1269.
- 48- YU, B., KUSMARTSEV, S., CHENG, F., PAOLINI, M., NEFEDOVA, Y. **Effective combination of chemotherapy and dendritic cell administration for the treatment of advanced-stage experimental breast cancer.** *Clinical Cancer Research*, 9 (2003) 285-294.
- 49- KOSKI, G., KOLDOVSKY, U., XU, S., MICK, R., SHARMA, A., FITZPATRICK, E., WEINSTEN, S., NISENBAUM, H., LEVINE, B., FOX, K., ZHANG, P., CZERNIECKI, B. **A novel dendritic cell-based immunization approach for the induction of durable Th1-polarized-HER2/neu responses in women with early breast cancer.** *Journal of Immunotherapy*, 35., 1 (2012) 54-65.
- 50- FADUL, C., FISHER, J., HAMPTON, T., LALLANA, E., GUI, Z., SZCZEPIORKOWSKI, Z., TOSTESON, T., RHODES, C., WISHART, H., LEWIS, L. **Immune response in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with intranodal autologous tumor lysate-dendritic cell vaccination after radiation chemotherapy.** *Journal of Immunotherapy*, 34., 4 (2011) 382-389.
- 51- WHEELER, C., DAS, A., LIU, G., YU, J., BLACK, K. **Clinical responsiveness of glioblastoma multiforme to chemotherapy after vaccination.** *Clinical Cancer Research*, 10 (2004) 5316-5326.
- 52- CORREALE, P., BOTTA, C., CUSI, M., DEL VECCHIO, M., DE SANTI, M., GORI, G., TAGLIAFERRI, P. **Cetuximab ± chemotherapy enhances dendritic cell-mediated phagocytosis of colon cancer cells and ignites a highly efficient colon cancer antigen-specific cytotoxic T-cell response in vitro.** *International Journal of Cancer*, 130., 7 (2012) 1577-89.
- 53- TRUMPFHELLER, C., LONGHI, M., CASKEY, M., IDOYAGA, J., BOZZACCO, L., KELER, T., STEINMAN, R. **Dendritic cell-targeted protein vaccines: a novel approach to induce T-cell immunity.** *Journal of Internal Medicine*, 271., 2 (2012) 183-92.