



UNICAMP

---

MAURÍCIO WESLEY PERROUD JUNIOR

AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE, TOLERÂNCIA E  
SEGURANÇA DA VACINA COM CÉLULAS  
DENDRÍTICAS AUTOLOGAS MADURAS EM  
PACIENTES COM CARCINOMA DE PULMÃO NÃO  
PEQUENAS CÉLULAS AVANÇADO

*ASSESSMENT OF FEASIBILITY, SAFETY AND  
TOLERANCE OF MATURE AUTOLOGOUS DENDRITIC  
CELLS VACCINE IN PATIENTS WITH ADVANCED NON-  
SMALL CELL LUNG CARCINOMA*

Campinas  
2012





UNICAMP

---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Médicas

**MAURÍCIO WESLEY PERROUD JUNIOR**

**AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE, TOLERÂNCIA E SEGURANÇA DA  
VACINA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS AUTOLÓGAS MADURAS EM  
PACIENTES COM CARCINOMA DE PULMÃO NÃO PEQUENAS  
CÉLULAS AVANÇADO**

**Orientador: Prof. Dr. Lair Zambon**

***ASSESSMENT OF FEASIBILITY, SAFETY AND TOLERANCE OF  
MATURE AUTOLOGOUS DENDRITIC CELLS VACCINE IN PATIENTS  
WITH ADVANCED NON-SMALL CELL LUNG CARCINOMA***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Doutor em Ciências, área de concentração Clínica Médica.

*Doctorate Thesis presented to Clinical Medicine Postgraduation Programm of the School of Medical Sciences of the University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Medical Sciences.*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO  
MAURÍCIO WESLEY PERROUD JÚNIOR E  
ORIENTADO PELO PROF. DR. LAIR ZAMBON.

Assinatura do Orientador

-----

Campinas  
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

P429a Perroud Junior, Maurício Wesley, 1971 -  
Avaliação de viabilidade, tolerância e segurança da  
vacina com células dendríticas autólogas maduras em  
pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas  
células avançado / Maurício Wesley Perroud Junior. –  
Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Lair Zambon.  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasias pulmonares. 2. Imunoterapia. 3.  
Carcinoma pulmonar de células não pequenas. 4.  
Tolerância imunológica. 5. Vigilância imunológica. I.  
Zambon, Lair. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Assessment of feasibility, safety and tolerance of mature autologous dendritic cells vaccine in patients with advanced non-small cell lung carcinoma.

**Palavras-chave em inglês:**

Lung neoplasms

Immunotherapy

Carcinoma, non-small-cell lung

Immune tolerance

Immunologic surveillance

**Área de concentração:** Clínica Médica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:**

Lair Zambon [Orientador]

Teresa Yae Takagaki

Ilka Lopes Santoro

Ivan Felizardo Contrera Toro

Fernando Ferreira Costa

**Data da defesa:** 27-06-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Médica

# Banca examinadora da tese de Doutorado

Maurício Wesley Perroud Junior

Orientador: Prof. Dr. Lair Zambon

## Membros:

1. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Teresa Yae Takagaki

2. Prof. Dr. Ivan Felizardo Contrera Toro

3. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ilka Lopes Santoro

4. Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

5. Prof. Dr. Lair Zambon

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27/06/2012



**Projeto Financiado pelo CAPES - Processo: 401327/05-1**  
**Registro no Comitê de Ética Médica – FCM/UNICAMP: 452/2005**  
**Registro de Estudo Clínico: ISRCTN45563569**



## DEDICATÓRIA



À Ana Paula,

Minha esposa, meu Amor. Mais da metade dos meus anos foram compartilhados com você; anos de paz, alegria, conquistas e, principalmente, história da nossa Família tão abençoada por Deus. Te amo e admiro, dia a dia e cada vez mais, feliz por poder sonhar e vivenciar.

Aos meus filhos, Vinícius e Marina.

Filhos maravilhosos que nos trazem, com um simples sorriso, incontáveis alegrias e força imensurável para recomeçarmos a cada dia.

Vocês três são a maior dádiva de Deus. Minha família, meu porto seguro.

Aos meus pais, Maurício e Regina.

Com quem aprendi o que é amor, respeito e família. O que sou, devo a vocês.

Aos meus avós, Pedro, Orisea, Neno e Cida.

Pessoas simples e sábias que muito me ensinaram. Para mim, onde tudo começou.



## AGRADECIMENTOS



Aos Prof. Drs. Reynaldo Quagliato Junior, Ilma Aparecida Paschoal, Eduardo Mello de Capitani, Silvio de Moraes Resende e aos médicos da Disciplina de Pneumologia da FCM/UNICAMP, pela minha formação como pneumologista.

Ao Prof. Dr. Lair Zambon. Orientador, não de uma ou duas teses, mas da minha carreira médica, profissional e, não raro, em projetos de vida. Agradeço a confiança, sinceridade e respeito ao longo destes anos.

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa pelo apoio e orientação, desde os primeiros passos, ao grupo de pesquisa do Serviço de Oncopneumologia-UNICAMP e que foram essenciais para o desenvolvimento de vários projetos.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Sara T. O. Saad pela oportunidade de participar deste projeto pioneiro que, pela sua magnitude, nos deixa lisonjeados pela confiança depositada no nosso trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Simone Gilli pelo apoio, envolvimento, disposição em ensinar e, principalmente, pelo incentivo incansável durante todas as etapas do projeto.

À Maria Teresa Almeida pelo árduo e complexo trabalho de desenvolver todas as técnicas de laboratório, tudo com muito primor.

Ao Prof. Dr. José Vassallo pelo trabalho desenvolvido na avaliação de imunoistoquímica.

Ao Prof. Dr. Ivan Toro, em nome de toda disciplina de Cirurgia Torácica, pelo apoio e parceria na realização dos projetos ao longo destes anos.

À Helen Naemi Honma cujo trabalho e dedicação foram essenciais para implementação do laboratório da Disciplina de Pneumologia e para todos os projetos conduzidos nos últimos 12 anos. É uma tranquilidade imensa, enfrentar os desafios de cada projeto tendo você por perto.

Ao Dr. Aristóteles Barbeiro pela amizade e colaboração na discussão e condução dos casos clínicos.



## RESUMO

Os resultados terapêuticos globais do carcinoma de pulmão não pequenas células em estadio avançado são bem limitados. A imunoterapia com células dendríticas foi desenvolvida como uma nova estratégia para o tratamento de câncer de pulmão. O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade, segurança e respostas imunológicas em pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células tratados com vacina autóloga de células dendríticas maduras pulsadas com antígenos.

Cinco pacientes HLA-A2 com carcinoma de pulmão não pequenas células inoperável (estadio III ou IV) foram selecionados para receber duas doses de  $5 \times 10^7$  de células dendríticas administradas por vias subcutânea e intravenosa, duas vezes em intervalos de duas semanas. A segurança, tolerabilidade e respostas imunológica e tumoral à vacina foram avaliadas pela evolução clínica e laboratorial, ensaio de linfoproliferação e critérios de RECIST, respectivamente.

A dose utilizada para a imunoterapia demonstrou ser segura e bem tolerada. O ensaio de linfoproliferação mostrou uma melhora na resposta imune específica após a imunização, com uma resposta significativa após a segunda dose ( $p = 0,001$ ). Esta resposta não foi persistente e houve uma tendência à redução após duas semanas da segunda dose da vacina. Dois pacientes apresentaram uma sobrevida quase duas vezes maior que a média esperada e foram os únicos que expressaram os antígenos tumorais HER-2 e CEA.

Apesar do pequeno tamanho da amostra, os resultados sobre o tempo de sobrevida, resposta imune, segurança e tolerabilidade, combinado com os resultados de outros estudos, são animadores para a condução de um estudo clínico com doses múltiplas em pacientes com câncer de pulmão que foram submetidos a tratamento cirúrgico, seguindo as diretrizes do *Cancer Vaccine Clinical Trial Working Group*.

## ABSTRACT

Overall therapeutic outcomes of advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) are poor. The dendritic cell (DC) immunotherapy has been developed as a new strategy for the treatment of lung cancer. The purpose of this study was to evaluate the feasibility, safety and immunologic responses in use in mature, antigen-pulsed autologous DC vaccine in NSCLC patients.

Five HLA-A2 patients with inoperable stage III or IV NSCLC were selected to receive two doses of  $5 \times 10^7$  DC cells administered subcutaneous and intravenously two times at two week intervals. The safety, tolerability and immunologic and tumor responses to the vaccine were evaluated by the clinical and laboratorial evolution, lymphoproliferation assay and RECIST's criteria, respectively.

The dose of the vaccine has shown to be safe and well tolerated. The lymphoproliferation assay showed an improvement in the specific immune response after the immunization, with a significant response after the second dose ( $p = 0.001$ ). This response was not long lasting and a tendency to reduction two weeks after the second dose of the vaccine was observed. Two patients had a survival almost twice greater than the expected average and were the only ones that expressed HER-2 and CEA together.

Despite the small sample size, the results on the survival time, immune response, and safety and tolerability, combined with the results of other studies, are encouraging to the conduction of a large clinical trial with multiples doses in

patients with early lung cancer who underwent surgical treatment, following the guidelines of the Cancer Vaccine Clinical Trial Working Group.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição percentual dos antígenos tumorais entre os 48 indivíduos pré-selecionados de acordo com sexo, idade, tipo histológico, estadió e tratamento. ....	87
Tabela 2 - Evolução radiológica do Paciente 1. ....	99
Tabela 3 - Evolução radiológica do Paciente 2. ....	99
Tabela 4 - Evolução radiológica do Paciente 3. ....	99
Tabela 5 - Evolução radiológica do Paciente 5. ....	100
Tabela 6 - Características e resultados dos pacientes elegíveis para imunoterapia. ....	101

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Datas da quimioterapia; paciente #1. ....	89
Quadro 2 - Datas da imunoterapia; paciente #1. ....	89
Quadro 3 - Datas da quimioterapia; paciente #2. ....	91
Quadro 4 - Datas da radioterapia; paciente #2. ....	91
Quadro 5 - Datas da radioterapia; paciente #2. ....	91
Quadro 6 - Datas da imunoterapia; paciente #2. ....	91
Quadro 7 - Datas da quimioterapia; paciente #3. ....	93
Quadro 8 - Datas da radioterapia; paciente #3. ....	94
Quadro 9 - Datas da imunoterapia; paciente #3. ....	94
Quadro 10 - Datas da quimioterapia; paciente #4. ....	95
Quadro 11 - Datas da imunoterapia; paciente #4. ....	95
Quadro 12 - Datas da quimioterapia; paciente #5. ....	97
Quadro 13 - Datas da radioterapia; paciente #5. ....	97
Quadro 14 - Datas da imunoterapia; paciente #5. ....	97
Quadro 15 - Critérios para a Resposta da Doença. ....	149
Quadro 16 - Resposta integrada do indivíduo. ....	150
Quadro 17 - Resposta Integrada Sequencial. ....	151

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mortalidade por câncer de pulmão em fumantes, ex-fumantes e não fumantes. ....	36
Figura 2 - Desenvolvimento das células dendríticas a partir de precursores hematopoiéticos. ....	50
Figura 3 - Diferenciação das células tronco hematopoiéticas em células dendríticas. ....	51
Figura 4 - Modelo para a retenção do potencial de macrófagos e células dendríticas de células durante a hematopoiese. ....	54
Figura 5 - Etapas da carcionogênese: interação entre o tumor e o sistema imunológico . ....	60
Figura 6 - As três fases da imunoedição no câncer. ....	63
Figura 7 - Etapas do protocolo. ....	73
Figura 8 - Intensidade de expressão dos antígenos tumorais em lâminas controles. ....	77
Figura 9 - Índice de linfoproliferação do Paciente #1. ....	103
Figura 10 - Índice de linfoproliferação do Paciente #2. ....	104
Figura 11 - Índice de linfoproliferação do Paciente #3. ....	104
Figura 12 - Índice de linfoproliferação do Paciente #4. ....	105
Figura 13 - Índice de linfoproliferação do Paciente #5. ....	105

Figura 14 - Comparação das respostas imunológicas de todos os pacientes e todos os antígenos. .....	106
Figura 15 - Intervenções terapêuticas para melhorar a eficácia das vacinas de células dendríticas. .....	122

## ABREVIATURAS E SIGLAS

5FU:	5-Fluorouracil
ALK:	Quinase do linfoma anaplásico
APC:	Células apresentadoras de antígenos
ASA:	Auto antígeno anormal
BSLD:	Soma do maior diâmetro na avaliação basal
CAMP:	Ciclofosfamida, doxorrubicina, metotrexato e procarbazina
CDP:	Progenitor comum de células dendríticas
CEA:	Antígeno carcinoembrionário
CLP:	Células progenitoras linfoides comuns
CMP:	Célula mieloide comum
CTCAEv3:	<i>Common Terminology Criteria for Adverse Events</i>
CTEP:	<i>Cancer Therapy Evaluation Program</i>
CTL:	Linfócitos T Citotóxicos Tumor Antígeno Específico
CTLA-4:	Linfócito T Citotóxico Associado à Proteína-4
DC:	Célula dendrítica
DE:	Doença estável
DEX:	Exossomos de células dendríticas
DNA:	Ácido Desoxirribonucleíco
DN1:	Dupla 1 Negativo
EBV:	<i>Vírus Epstein Barr</i>
EGFR:	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
EP:	Etoposídeo e cisplatina
EUA:	Estados Unidos da América
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i>
GMP:	<i>Good Manufacturing Practice</i>

HCV:	Vírus da Hepatite C
HER-2:	Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2
HLA:	Antígeno Leucocitário Humano
HPV16:	Vírus do Papiloma Humano 16
ICH:	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IDO:	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN:	Interferon
IL:	Interleucina
INCA:	Instituto Nacional do Câncer
IT:	Imunoterapia
MAGE1:	Antígeno Melanoma 1
MDP:	Célula Progenitora de Macrófagos-DC
MDSC:	Célula Supressora Mieloide Derivada
MHC:	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MVP:	Mitomicina, vimblastina e cisplatina
NELSON:	<i>Nederlands-Leuvens Longkanker Screenings Onderzoek</i>
NK:	<i>Natural Killer</i>
NKG2D:	NK Grupo 2, Membro D
NLST:	<i>The North American National Lung Screening Trial</i>
PD:	Doença Progressiva
PD-L1:	Ligante 1 da Morte Celular Programada
PSA:	Antígeno Prostático Específico
QT:	Quimioterapia
Rb:	Gene Retinoblastoma
RC:	Resposta Completa

RECIST:	<i>Response Evaluation Criteria In Solid Tumors</i>
RP:	Resposta Parcial
RT:	Radioterapia
SSLD:	Menor Soma dos Maiores Diâmetros
TAA:	Antígenos Associados a Tumor
TAP:	Moléculas Transportadoras para Apresentação de Antígenos
TC:	Tomografia Computadorizada
TCR:	Receptor de Célula T
TGF:	Fator Transformador de Crescimento
TIC:	Células Imunes Infiltrantes Tumorais
TNF:	Fator de Necrose Tumoral
TRAIL:	Ligante Indutor de Apoptose Relacionada ao Fator de Necrose Tumoral
Treg:	Célula T Regulatória
TSA:	Antígeno Tumoral Específico
VEGF:	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
WT1:	Proteína do tumor de Wilms

## SUMÁRIO

RESUMO .....	xvii
ABSTRACT .....	xx
ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xxv
INTRODUÇÃO .....	32
Imunologia tumoral – visão geral .....	41
Antígenos tumorais .....	44
Células Dendríticas .....	48
Imunovigilância .....	57
Imunoterapia .....	64
OBJETIVOS .....	69
MATERIAL E MÉTODO .....	71
Características dos pacientes .....	72
Delineamento experimental.....	73
Monitoramento da Resposta Clínica .....	74
Avaliação basal.....	74
Critérios de resposta .....	75
Imunoistoquímica .....	75
Leucaférese .....	78
Monitoramento microbiológico .....	79
Geração de células dendríticas.....	79
Citometria de fluxo.....	80
Marcação de CFSE .....	81
Protocolo de imunização .....	81
Avaliação clínica .....	82
Avaliação imunológica .....	82
A. Caracterização fenotípica de células imunes do sangue periférico dos pacientes. ....	82
B. Análise da resposta imune específica <i>in vitro</i> por citometria de fluxo.....	83
C. Coleta de linfócitos T. ....	83
D. Ensaio de linfoproliferação .....	84
Aplicativos utilizados .....	85
Descrição dos pacientes elegíveis para imunoterapia .....	88
Paciente 1: .....	88
Paciente 2: .....	90

Paciente 3: .....	92
Paciente 4: .....	94
Paciente 5: .....	96
Sumário dos resultados clínicos .....	98
Segurança .....	102
Respostas imunológicas à imunoterapia .....	102
DISCUSSÃO .....	107
CONCLUSÕES .....	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	129
ANEXO 1 - QUADROS DE ANTÍGENOS TUMORAIS .....	143
ANEXO 2 – AVALIAÇÃO DE RESPOSTA (RECIST) .....	148
ANEXO 3 - TOMOGRAFIAS COMPUTADORIZADAS.....	153
ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO.....	185
ACESSO AO ARTIGO PUBLICADO .....	197

## INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão era considerado uma doença rara no início do século XX. Em 1912, Adler conseguiu reunir 374 casos relatados na literatura médica e considerou o carcinoma de pulmão como uma das formas mais raras de câncer (apud SAMET *et al.*, 2009). Entretanto, nos últimos cem anos houve um aumento progressivo da incidência e mortalidade por carcinoma brônquico devido principalmente à expansão do tabagismo após a Primeira Guerra Mundial, entre os homens, e após a Segunda Guerra Mundial, entre as mulheres.

Atualmente, o carcinoma de pulmão é a principal causa de morbidade e mortalidade relacionada ao câncer no mundo, com mais de 1,6 milhões de casos novos e 1,4 milhões de óbitos por ano (RAMALINGAM *et al.*, 2011). Para 2012, o número estimado de casos novos na população norte americana é de 226.160 (116.470 homens e 109.690 mulheres), representando cerca de 15% de todos os diagnósticos de câncer em ambos os sexos. Em relação aos óbitos, o número estimado é de 160.340 casos, sendo 87.750 óbitos entre os homens e 72.590 entre as mulheres. Estes números correspondem a 29% e 26% de todos os óbitos por câncer entre os homens e mulheres, respectivamente (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

No Brasil, as estimativas atuais de incidência são 18/100.000 e 10/100.000 para homens e mulheres, respectivamente (INCA, 2011), e constitui a primeira causa de óbito por neoplasia entre homens e a segunda entre as mulheres.

O tabagismo é responsável por cerca de 90% dos casos de carcinoma brônquico (SHAFEY *et al.*, 2002). Esta relação de causa e efeito entre o tabagismo e o câncer de pulmão foi primeiramente demonstrada pelos trabalhos de Doll & Hill que constituem um marco na literatura médica (DOLL; HILL, 1950, 1956). Entretanto, ela pode ser observada cerca de 50 anos antes da publicação destes estudos, infelizmente, através de dados históricos. No Reino Unido, a disseminação do tabagismo começou antes dos Estados Unidos porque os oficiais aprenderam a fumar cigarros enrolados à mão na guerra da Criméia (1854-1856) (DOLL, 1998). Por sua vez, o câncer de pulmão que representava apenas dois décimos de 1% (0,0002) de todas as internações por câncer no *Royal Manchester Infirmary* durante o período 1868-1885, teve um aumento de dez vezes entre os homens no período de 1901 a 1905 (DUGUID, 1927).

A ampla disseminação do hábito de fumar camuflou o tabaco como agente etiológico do câncer de pulmão, pois quando um fator de risco de uma doença torna-se altamente predominante em uma população, ele paradoxalmente começa a desaparecer em meio a ruídos (MUKHERJEE, 2012).

O período de latência entre o início do tabagismo e o aparecimento da neoplasia constituiu outro fator que dificultou o estabelecimento da relação de causa e efeito. Este período é explicado pelo processo de carcinogênese, onde concomitante a mudanças morfológicas do epitélio normal para lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, ocorre acúmulo de alterações genéticas em várias etapas (10 a 20) que levam à iniciação, desenvolvimento e manutenção do câncer de pulmão. Estas alterações correspondem a mutações, exclusões, modificações

epigenéticas ou polissomia, e afetam toda árvore brônquica (LANTUÉJOUL *et al.*, 2009).

Fatores genéticos têm papel importante no mecanismo de aparecimento desta neoplasia, seja por alterações de genes relacionados com a biometabolização de carcinógenos ou genes relacionados com a diferenciação celular e a supressão de tumores (HONMA *et al.*, 2008). Por outro lado, fatores ambientais e/ou determinantes genéticos podem explicar o fato de “apenas” 11 a 15% dos tabagistas desenvolvem a doença (BORCZUK *et al.*, 2009; LANTUÉJOUL *et al.*, 2009).

Na população em geral, e até mesmo entre alguns epidemiologistas, há um conceito errôneo de que a taxa de incidência de câncer de pulmão diminui em ex-fumantes. Na verdade, quando deixa de fumar, a taxa para de aumentar fortemente e permanece quase constante (Figura 1) (HALPERN *et al.*, 1993). Presumivelmente, este equívoco surgiu porque o risco relativo cai rapidamente em ex-fumantes, pois é calculado dividindo-se a taxa aparentemente constante em ex-fumantes pela taxa crescente em não fumantes (PETO, 2011).

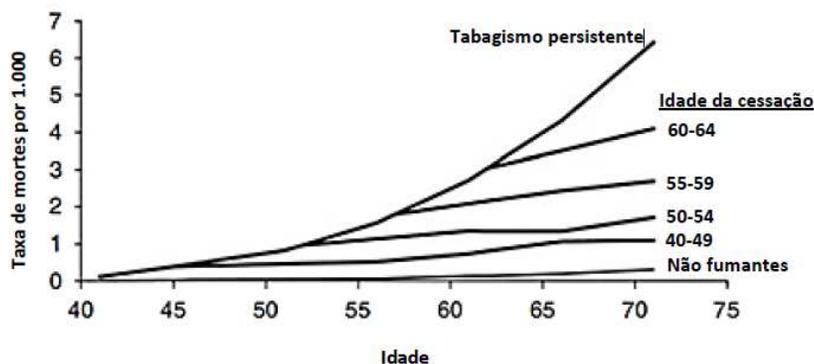


FIGURA 1 - Mortalidade por câncer de pulmão em fumantes, ex-fumantes e não fumantes.

(Adaptado de Halpern et al 1993).

Estes dados permitem a conclusão de que mais importante do que cessar o hábito, é não começar a fumar. Porém, além de existir outros agentes com potencial carcinogênico (asbestos, poluição atmosférica, entre outros), 10 a 15% dos casos de câncer de pulmão ocorrem em não fumantes (BORCZUK *et al.*, 2009; SAMET *et al.*, 2009). A taxa de morte por câncer de pulmão entre não fumantes, embora "rara" por definições convencionais (<40 mil mortes nos EUA por ano), é semelhante às taxas de mortalidade por leucemia e câncer de endométrio em mulheres e por câncer de esôfago, rim e fígado em homens nos EUA (SAMET *et al.*, 2009).

Em qualquer neoplasia quanto mais precoce for o diagnóstico melhor é o prognóstico. A detecção precoce em indivíduos em risco poderia impedir, interromper, ou retardar a progressão do câncer de pulmão (MOLINA *et al.*, 2008). Infelizmente, em relação ao carcinoma brônquico o diagnóstico precoce não é a regra, e sim uma exceção.

Os trabalhos realizados na tentativa de diagnóstico precoce na população de risco para neoplasia de pulmão, através de radiograma de tórax e citologia de escarro, não melhoraram a sobrevida dos pacientes (MAO *et al.*, 1994; SZABO *et al.*, 1993a).

Os estudos mais recentes utilizando a tomografia computadorizada com baixa dose de radiação ainda estão em andamento, mas já há alguns resultados parciais. A análise interina do estudo *The North American National Lung Screening Trial* (NLST), realizada em outubro de 2010, revelou 356 mortes no braço da tomografia em comparação com 443 no braço do raio X convencional que corresponde a uma taxa de mortalidade cumulativa por câncer de pulmão de 247 e 309 por 100.000 pessoas-ano, respectivamente. Esta redução de 20,3% na mortalidade específica por câncer de pulmão foi estatisticamente significativa e muito superior que o esperado por acaso. No entanto, a taxa de falsos-positivos variou entre 95% e 98% no grupo da tomografia comparado com 93 a 96% no grupo do raio X (ABERLE *et al.*, 2011). Os resultados iniciais do estudo *Nederlands-Leuvens Longkanker Screenings Onderzoek* (NELSON) demonstraram, na avaliação inicial, que as taxas de exames negativos e positivos entre os 7.557 participantes foram de 79,2% e 1,6%, respectivamente, e 19,2% dos participantes apresentaram resultado indeterminado. A estratégia de acompanhamento e reclassificação desses nódulos indeterminados, através da avaliação volumétrica após três meses, aumentou significativamente as taxas de exames negativos e positivos para 97,4% e 2,6%, respectivamente. Vinte cânceres de pulmão foram detectados entre os 7.361 indivíduos com exames

negativos com mais de 2 anos de seguimento. Por outro lado, 70 cânceres de pulmão foram detectados em 196 participantes com estudo positivo. Estes resultados corresponderam a um valor preditivo negativo e positivo de 99,7% e 35,7%, respectivamente (NAIR; HANSELL, 2011).

O sobrediagnóstico (“*overdiagnosis*”) é uma preocupação no rastreamento de neoplasia (SOX, 2011). Primeiro, porque pode levar a um número grande e inaceitável de ressecção de lesões benignas (NAIR; HANSELL, 2011). Segundo, como é impossível predizer qual câncer não irá progredir quando diagnosticado em estadio precoce, esta situação faz com que alguns pacientes sejam submetidos a procedimentos terapêuticos desnecessários (SOX, 2011).

Atualmente, cerca de 70% a 80% dos pacientes com câncer de pulmão apresentam doença localmente avançada ou metastática no momento do diagnóstico porque não existe nenhum método eficaz para o diagnóstico precoce (MCWILLIAMS et al., 2009; MOLINA et al., 2008; YASUMOTO et al., 2009). Este fato tem um enorme impacto sobre os resultados do tratamento. Apesar do tratamento agressivo com cirurgia, quimioterapia e radioterapia, a sobrevida em longo prazo para pacientes com câncer de pulmão ainda é reduzida (BALEEIRO et al., 2008; YASUMOTO et al., 2009). Em países desenvolvidos, a sobrevida em cinco anos é em média de 15% (MCWILLIAMS et al., 2009), variando de 73% nos pacientes com estadio IA cirúrgico a 2% nos pacientes com estadio clínico IV (DETTERBECK et al., 2009), (CETIN et al., 2011). Para o mesmo período de tempo, as taxas de sobrevida em cinco anos no nosso meio são inferiores às

obtidas nestes países (ANDERSON; SPANDIDOS, 1993; FUJINO *et al.*, 1995; KERN *et al.*, 1994; MORA, 2004; SZABO *et al.*, 1993b; ZAMBON, L, 1994).

Desde a histórica cirurgia realizada com sucesso por Evarts Graham (GRAHAM; SINGER, 1933) em 1932, uma pneumectomia por um carcinoma epidermoide, esta modalidade terapêutica ainda continua a ser o único método potencial de “cura”. O avanço das técnicas cirúrgicas, que inclui a cirurgia minimamente invasiva, levou as reduções da morbidade e mortalidade associada à cirurgia curativa para o câncer de pulmão (MCKENNA JR, 1994, 2005; SCOTT, W. *et al.*, 2010), mas cerca de 40% dos pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células em estadio precoce não podem ser submetidos ao tratamento cirúrgico por apresentarem comorbidades (RAMALINGAM *et al.*, 2011). Além disso, existe um consenso, de que o tratamento cirúrgico alcançou o limite de sua competência como procedimento isolado, restando a perspectiva da associação com outras formas de tratamento (ZAMBON, L, 1994).

O uso de radioterapia após a cirurgia mostrou ser um procedimento com impacto negativo na sobrevida em meta-análises realizadas com estudos conduzidos nos últimos 30 anos (PORT META-ANALYSIS TRIALISTS GROUP, 1998, 2005). Pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células localmente avançado também, frequentemente, morrem após a radioterapia “curativa” por recorrência da neoplasia (PEREZ, C. *et al.*, 1980).

Os dados acima reforçam a necessidade do desenvolvimento de modalidades terapêuticas sistêmicas.

Antes de 1990, poucos medicamentos tinham apresentado uma eficácia consistente contra o carcinoma de pulmão não pequenas células, incluindo cisplatina, mitomicina C, vimblastina, ifosfamida e vindesina (IHDE, 1992). Até meados dos anos 1990, nenhuma vantagem clara a um esquema quimioterápico havia sido demonstrada. Estudos randomizados não demonstraram benefício significativo da ciclofosfamida, doxorrubicina, metotrexato e procarbazina (CAMP) *versus* mitomicina, vimblastina e cisplatina (MVP); etoposídeo e cisplatina (EP); ou vindesina e cisplatina (SCHILLER, 2000) e as taxas de respostas gerais eram, em média, de 20%. Em um estudo de meta-análise, apenas a cisplatina foi associada com melhora da sobrevida quando comparada ao cuidado paliativo (NON-SMALL CELL LUNG CANCER COLLABORATIVE GROUP, 1995). As taxas de sobrevida com os esquemas terapêuticos de primeira geração (e.g. mitomicina, ifosfamida e cisplatina) variavam entre 10 a 15% no primeiro ano, enquanto que os esquemas de segunda geração (e.g. cisplatina e etoposídeo) propiciavam uma sobrevida média de 20 a 25%. No final da década de 1990, os esquemas de terceira geração (e.g. paclitaxel + carboplatina; docetaxel, paclitaxel ou gemcitabina associados à cisplatina) mantinham uma taxa de resposta em torno de 20%, mas com uma sobrevida média no primeiro ano de 33% (SCHILLER *et al.*, 2002).

Frequentemente, até mesmo pacientes com doença em estadió precoce sucumbem ao câncer de pulmão devido ao desenvolvimento de metástases, indicando a necessidade de abordagens eficazes para a terapia sistêmica desta condição (BALEEIRO *et al.*, 2008). Uma das explicações é que o uso combinado de cirurgia, radioterapia e quimioterapia é muitas vezes altamente ativo na

eliminação da massa tumoral, mas é menos eficaz na eliminação de células neoplásicas residuais e na prevenção da recorrência da doença (KALINSKI *et al.*, 2009).

A identificação de mutações no gene do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) em pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células proporcionou um dos primeiros exemplos de terapia alvo nesta doença (COSTA, D., 2008). Os resultados promissores para o EGFR e ALK em subgrupos moleculares selecionados de pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células são prenúncios de uma nova era no desenvolvimento de drogas e estudos clínicos para pacientes portadores desta doença (GAUGHAN; COSTA, D., 2011).

As limitações dos tratamentos atuais fornece a justificativa para a utilização do sistema imunológico com o objetivo de identificar e destruir células cancerosas (KALINSKI *et al.*, 2009).

Portanto, a melhora na sobrevida dos pacientes com neoplasia de pulmão depende essencialmente de estratégias de prevenção e tratamento do tabagismo, do desenvolvimento de técnicas viáveis de diagnóstico precoce e, por último, do aprimoramento e desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes.

## IMUNOLOGIA TUMORAL – VISÃO GERAL

O câncer é uma doença resultante de um prolongado período de instabilidade genética que aumenta o tempo de vida de uma célula normal. O evento que marca o início deste período é variável entre os diferentes tipos celulares, mas frequentemente decorre do aparecimento de uma mutação em um

gene supressor de tumor (e.g. p53 ou Rb), por uma mutação em um proto-oncogene (e.g. KRAS ou myc) ou após a infecção celular por um vírus oncogênico (e.g. HPV16 ou EBV). Independente da origem, essas mutações permitem que a célula escape do controle de crescimento normal ou de morte celular, tornando-a mais propensa a adquirir mutações adicionais e deixar de responder aos sinais intrínsecos ou extrínsecos responsáveis por frear o crescimento ou desencadear a apoptose (SCHREIBER, T. *et al.*, 2010).

Em humanos, a evidência do papel do sistema imunológico em limitar o crescimento e progressão de neoplasias está ligada às observações que indicam uma correlação positiva entre a presença de células T CD8<sup>+</sup> infiltrando o tumor e o prognóstico favorável em vários tipos de câncer (PAGÈS *et al.*, 2010; PALENA; SCHLUM, 2010). Em câncer colorretal, por exemplo, níveis significativamente mais elevados de células T CD8<sup>+</sup> de memória precoce e memória efetora infiltrando o tumor foram relacionados com boa evolução clínica, definida como ausência de invasão metastática, estadiamento menos avançado e aumento da sobrevida (GALON *et al.*, 2006; PAGÈS *et al.*, 2005). Da mesma forma, a presença de infiltrado intraepitelial de células T CD8<sup>+</sup> foi associado com a ausência de metástases nos linfonodos de drenagem em pacientes com câncer do colo uterino (PIERSMA *et al.*, 2007). Em pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células, o aumento no número de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> infiltrando a neoplasia teve uma relação positiva com a sobrevida (AL-SHIBLI *et al.*, 2008).

O sistema imunológico é inicialmente tolerante em relação às células tumorais porque estas tem origem no próprio organismo. A aquisição de mutações capazes de induzir a gênese tumoral pode levar, ou não, à produção de uma proteína mutante contendo um epítopo que seja suficientemente não próprio (*non-self*) para tornar-se imunogênica, ou seja, reconhecida e passível de destruição pelo sistema imunológico. Este processo é conhecido como imunovigilância (*immunosurveillance*) (SMYTH *et al.*, 2006).

Recentemente, tornou-se claro que o sistema imune não só protege o hospedeiro contra o desenvolvimento do tumor, mas também esculpe o fenótipo imunogênico de um tumor em desenvolvimento e pode favorecer o aparecimento de variantes resistentes de células tumorais (HAMAÏ *et al.*, 2010).

Algumas células que adquirem mutações imunogênicas também apresentam a capacidade de interagir com o sistema imunológico reduzindo a resposta imune ao não próprio (RABINOVICH *et al.*, 2007). As vias de ativação dos mecanismos de regulação do sistema imunológico são mal compreendidas. Há células que podem apresentar uma série de mutações em oncogenes sem produzir um peptídeo imunogênico que leva à ativação do sistema imune do hospedeiro. Desta forma, células tumorais que produzem um peptídeo imunogênico durante a sua transformação devem, continuamente, “escapar” das respostas imunológicas antitumorais, a fim de sobreviver. Por outro lado, os tumores que se transformam sem ativar o sistema imunológico não precisam de mecanismos de regulação imune para a sobrevivência (SCHREIBER, T. *et al.*, 2010).

## ANTÍGENOS TUMORAIS

Autoantígenos (*self-antigens*) são os antígenos mais relevantes e abundantes para os quais o sistema imunológico do hospedeiro deve ser tolerante. A indução e manutenção de tolerância aos autoantígenos são mediadas por diversos mecanismos que impedem danos para os tecidos normais do organismo. No entanto, esses mesmos mecanismos podem impor barreiras potenciais para o pleno desenvolvimento de respostas imunológicas contra antígenos expressos por tumores (SOTOMAYOR *et al.*, 1996). A indução de tolerância aos antígenos do tumor – fenômeno denominado como anergia induzida pelo tumor – através de mecanismos semelhantes aos que regulam as respostas para autoantígenos, representa uma importante estratégia imunossupressiva pela qual as células tumorais podem escapar da resposta anti-tumor mediada por células T (RABINOVICH *et al.*, 2007). Esta visão diferente da imunidade tumoral também contribuiu para por em evidência a imunoterapia no câncer, uma vez que a barreira imposta pela tolerância imunológica deve ser quebrada para que o sistema imunológico possa reconhecer e eliminar de forma eficaz os tumores que expressam principalmente autoantígenos (PARDOLL, 2003).

Os tumores podem expressar muitas moléculas capazes de serem reconhecidas pelo sistema imunológico e que são divididas em duas grandes categorias: os autoantígenos anormais (ASAs) ou antígenos associados a tumor (TAAs) que são expressos em ambos, células normais e tumorais, com algumas diferenças importantes (FINN, 2006; PALENA; SCHLOM, 2010; SCHREIBER, T. *et al.*, 2010); e os antígenos tumorais específicos (TSAs) que são expressos

apenas pelas células tumorais (FINN, 2006; GOTTFRIED *et al.*, 2008; MOCELLIN; NITTI, 2008; PALENA; SCHLOM, 2010; SCHREIBER, T. *et al.*, 2010). Os antígenos associados a tumor são antígenos que podem ser gerados de várias maneiras, incluindo: indução e desenvolvimento de genes embrionários que normalmente não são expressos na maioria dos tecidos adultos, expressão de proteínas normais com metade anormal de açúcares ou expressão de proteínas próprias (*self*) em níveis anormalmente elevados (SCHREIBER, T. *et al.*, 2010). Os antígenos tumorais específicos são produtos de genes que sofreram mutação por agentes cancerígenos químicos ou físicos, por mutações aleatórias no DNA, ou mutações não-aleatórias em genes relacionados ao câncer, tais como *ras*, *bcr-abl* e *p53* (FINN, 2006).

Os antígenos tumorais são geralmente classificados em (BRUGGEN, VAN DER *et al.*, 2012; COULIE, PG *et al.*, 2001; YASUMOTO *et al.*, 2009):

(1) antígenos mutantes tumores específicos: resultam de ponto de mutações em genes que são expressos ubiquamente. A mutação geralmente afeta a região da codificação do gene e é exclusivo para o tumor de um paciente individual ou restrito a poucos pacientes. Algumas destas mutações podem estar implicadas na transformação tumoral. Tais antígenos, que são estritamente específicos do tumor, podem desempenhar um papel importante na resposta imune antitumoral natural de pacientes individuais, mas a maioria deles não pode ser facilmente usada como destinos de imunoterapia porque não são compartilhados por tumores de diferentes pacientes.

(2) antígenos compartilhados: estão presentes em muitos tumores independentes. Eles podem ser divididos em três grupos.

A. Um grupo corresponde aos peptídeos codificados por genes relacionados a neoplasias de células germinativas, como o MAGE, que são expressos em muitos tumores, mas não em tecidos normais. Os trofoblastos placentários e as células germinais testiculares constituem as únicas células normais nas quais foi detectada uma expressão significativa de tais genes. Por essas células não expressarem moléculas MHC classe I, a expressão genética não deve resultar na expressão de peptídeos antigênicos e tais antígenos, portanto, podem ser considerados como estritamente específicas do tumor. Os genes que codificam esses antígenos também são referidos como genes do câncer de testículo (CT).

B. Um segundo grupo de antígenos tumor compartilhado, denominado antígenos de diferenciação, também são expressos no tecido normal de origem da malignidade. O paradigma é a tirosinase, que é expressa em melanócitos normais e na maioria dos melanomas. Os antígenos deste grupo não são específicos do tumor, e sua utilização como alvo para imunoterapia do câncer pode resultar em autoimunidade para o tecido normal correspondente. No caso dos melanócitos, o risco de induzir efeitos colaterais graves parece mínimo e pode ser limitado ao aparecimento de vitiligo. Preocupações mais relevantes sobre os efeitos colaterais autoimunes aplicam-se ao antígeno carcinoembrionário (CEA), uma proteína oncofetal expressa no epitélio normal do cólon e na maioria

dos carcinomas de intestino. A toxicidade autoimune não deve ser um problema em situações onde o tecido expressando o antígeno é dispensável ou mesmo removido por cirurgia, como no caso do antígeno prostático específico (PSA).

C. Os antígenos de amplificação ou superexpressão correspondem àqueles que são expressos em uma grande variedade de tecidos normais e superexpressos em tumores. É muito mais difícil fazer previsões sobre a segurança de direcionamento de antígenos compartilhados deste grupo. Isto porque uma quantidade mínima de peptídeo é necessária para o reconhecimento pelos Linfócitos T Citotóxicos Tumor Antígeno Específico (CTL) e um baixo nível de expressão em tecidos normais pode significar que danos autoimunes não podem ser suportados. No entanto, este limite é difícil de definir, bem como o nível normal de expressão de genes para cada tipo celular.

(3) antígenos codificados por vírus oncogênicos: esses também podem ser alvos ideais para imunoterapia tumoral. A infecção pelo vírus do papiloma humano 16 (HPV 16) pode induzir ao carcinoma cervical. Os peptídeos antigênicos derivados das proteínas oncogênicas E6 e E7 do HPV16 são conhecidos por serem bons alvos para o CTL e foram utilizados na imunoterapia planejada para prevenir o câncer cervical. Epstein-Barr vírus foi associado a linfomas de células B, câncer de nasofaringe e câncer gástrico. No entanto, nenhuma relação entre a incidência de câncer de pulmão e qualquer vírus oncogênico foi relatada.

Os antígenos tumorais específicos são de especial interesse para a imunoterapia devido à sua especificidade, característica essencial para evitar danos às células normais (FINN, 2006), e pela capacidade natural de desenvolver a memória celular a qual pode levar a um controle durável sobre a doença devido à capacidade de latência (MOCELLIN; NITTI, 2008).

Os quadros do anexo 1 relacionam os antígenos conhecidos por grupo (BRUGGEN, VAN DER *et al.*, 2012).

#### CÉLULAS DENDRÍTICAS

As células dendríticas (DCs) são células apresentadoras de antígenos capazes de ativar as respostas imunológicas inata e de memória e são mediadoras essenciais da imunidade e tolerância imunológicas (KUSHWAH; HU, 2011; SABADO; BHARDWAJ, 2010).

As células dendríticas são as células apresentadoras de antígenos (APCs)<sup>1</sup> mais potentes devido à sua capacidade superior de aquisição e processamento de antígenos para apresentação às células T e do seu potencial para expressar altos níveis de moléculas coestimulantes/coinibitórias que levam a ativação do sistema imunológico ou à anergia. Além disso, as DCs têm a capacidade de modular a resposta imune, direcionando a diferenciação e polarização das células T. Portanto, as células dendríticas desempenham um papel significativo na geração total de respostas imunes contra antígenos (SABADO; BHARDWAJ, 2010).

---

<sup>1</sup> Células Apresentadoras de Antígenos são os monócitos, macrófagos, células B e células dendríticas.

As células dendríticas são compostas por uma população heterogênea de células em vários órgãos e que possuem conjuntos únicos de marcadores de superfície celular (KUSHWAH; HU, 2011). Há evidências de que existem muitos subtipos de DCs distintos, cada um em um determinado local e com uma função especializada no sistema imunológico (SHORTMAN; LIU, Y., 2002).

As células tronco hematopoiéticas dão origem a células mieloides comuns (CMP) e células progenitoras linfoides comuns (CLP) durante hematopoiese. Os monócitos, macrófagos, megacariócitos, granulócitos e eritrócitos são provenientes da CMP e as células T, células B e células *Natural Killer* (NK) são provenientes da CLP (AKASHI *et al.*, 2000; KONDO *et al.*, 1997) conforme demonstrado na figura 2. Outro estudo demonstrou que células multi-linfoides progenitoras humanas podem dar origem a todos os tipos de células linfoides juntamente com monócitos, macrófagos e DCs (DOULATOV *et al.*, 2010).

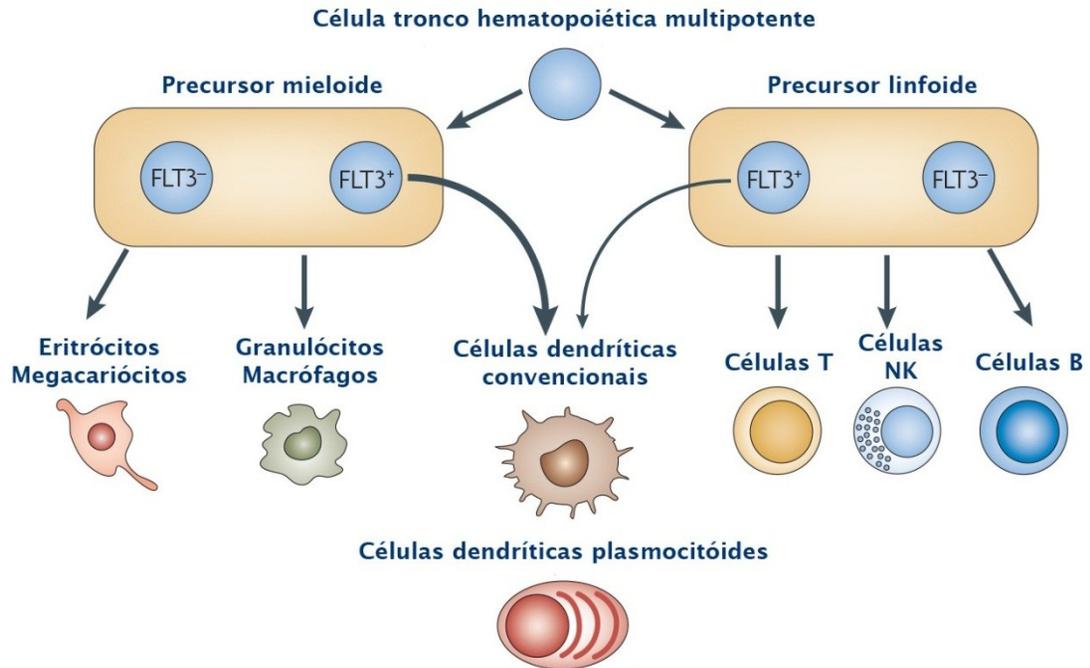


FIGURA 2 - Desenvolvimento das células dendríticas a partir de precursores hematopoiéticos.

A formação de uma série de células precursoras, que possuem uma forte tendência para linhagens mioide ou as linfoides, é o primeiro passo para o desenvolvimento dos tipos individuais de células sanguíneas. Originalmente, estas foram isoladas como populações de progenitoras mieloides comuns e progenitoras linfoides comuns. Estudos adicionais definiram uma série de precursores de cada tipo, ao invés de apenas duas formas precursoras. Destes, os precursores mieloides e os precursores linfoides que expressam o receptor FLT3 (tiosina quinase relacionada com FMS 3) tem uma capacidade maior para formar células dendríticas. Ambas, as células dendríticas convencionais residentes nos tecidos encontradas em órgãos linfoides e as células dendríticas plasmocitoides podem ser geradas a partir de qualquer precursor tipo FLT3+. O tipo de precursor que irá gerar células dendríticas in vivo dependerá da disponibilidade de precursores, do meio ambiente local e do tecido envolvido. Precursores mieloides são as principais fontes de células dendríticas na maioria das circunstâncias. (Adaptado de Shortman & Naik, 2007).

A célula progenitora de macrófagos-DC (MDP) é o precursor comum para macrófagos, monócitos e DCs. O MDP é derivado do CMP e só dá origem a monócitos, macrófagos e DCs (FOGG *et al.*, 2006). Provavelmente, o MDP diferencia-se em um progenitor DC-restrito chamado de progenitor DC comum (CDP) que dá origem a DCs, mas não a monócitos ou macrófagos (LIU, K *et al.*, 2009). Embora ambos MDP e CDP residam exclusivamente na medula óssea, uma população de células denominadas precursor-DC (pré-DCs), derivado do

CDP, foi identificada na medula óssea, sangue, baço e linfonodos e compreendem menos do que 0,05% dos leucócitos nestes tecidos (LIU, K; NUSSENZWEIG, MC, 2010; LIU, K *et al.*, 2009). Estas células pré-DCs migram para os tecidos linfoides através do sangue e passam por um processo de proliferação e diferenciação em DCs (LIU, K *et al.*, 2009). Portanto, CMPs podem dar origem a MDPs que dão origem a CDPs que, posteriormente, dará origem a pré-DCs que funcionam como precursores imediatos para DCs. Estas etapas de diferenciação estão demonstradas na figura 3.

A origem mieloide das DCs foi estabelecida, mas há estudos que demonstram que DCs podem ser formadas a partir de CLPs sob algumas condições (KARSUNKY *et al.*, 2003; NAGAI *et al.*, 2006; WELNER *et al.*, 2008).

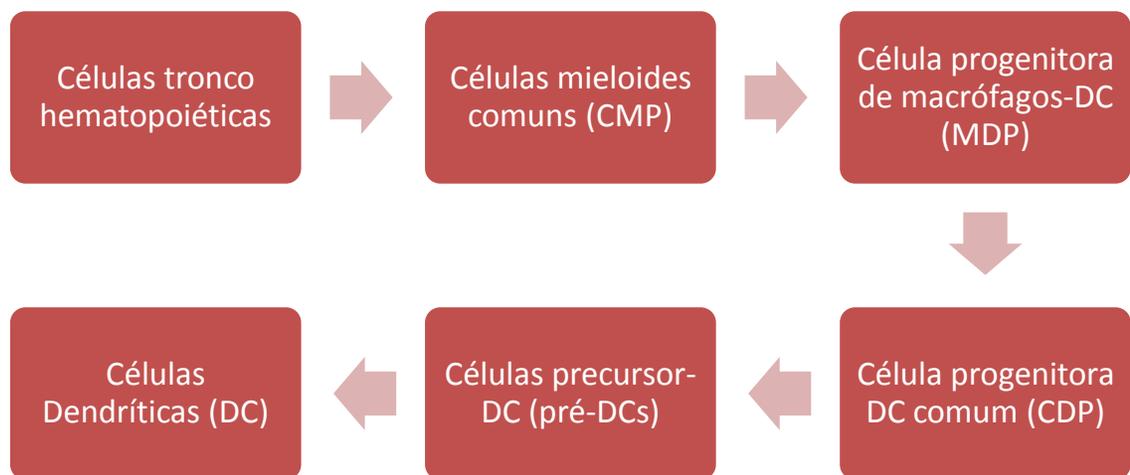


FIGURA 3 - Diferenciação das células tronco hematopoiéticas em células dendríticas.

As células dendríticas foram inicialmente classificadas em dois grupos, que incluem as DCs latentes convencionais e DCs não convencionais (SHORTMAN; NAIK, -2007). As DCs latentes convencionais são aquelas que possuem a forma e função de célula dendrítica. As DCs não convencionais são células dendríticas que geralmente não são encontradas em estado estacionário, mas que surgem em resposta a estímulos inflamatórios. As DCs não convencionais incluem as DCs plasmocitoide e as DCs derivadas de monócitos (LIU, K; NUSSENZWEIG, MC, 2010; LIU, K *et al.*, 2009; SHORTMAN; LIU, Y., 2002; SHORTMAN; NAIK, 2007).

As DCs convencionais são compostas por subconjuntos de células dendríticas derivadas de CDP e pré-DCs e podem ser subdivididas em DCs migratórias e DCs linfoides. As DCs migratórias têm a capacidade de migrar dos tecidos periféricos para órgãos linfoides, enquanto DCs linfoides residem nestes órgãos sem função migratória. Os subconjuntos de DCs migratórias incluem as células dendríticas presentes na pele, pulmão, fígado trato intestinal, e nos rins. As DCs linfoides são encontradas nos órgãos linfoides, tais como gânglios linfáticos, baço e timo e foram subdivididos de acordo com a expressão de CD4 e CD8 (KUSHWAH; HU, 2011).

As DCs não convencionais incluem DCs plasmocitoides que, apesar de serem derivadas de CDP, são únicas em sua capacidade de secretar quantidades elevadas de interferon (KUSHWAH; HU, 2011; SABADO; BHARDWAJ, 2010). Esta característica as distingue das DCs convencionais. Além disso, existem vários subgrupos de células dendríticas que também são classificados como DCs não convencionais por serem derivadas de monócitos e não das CDPs. Os

monócitos são derivados de CMPs e MDPs e podem dar origem a células dendríticas em condições de processo inflamatório, bem como de homeostase. As células dendríticas derivadas de monócitos são encontradas em tecidos periféricos, como o intestino, pele, pulmões e rins, são capazes de reconhecer antígenos e, posteriormente, migrar para os linfonodos de drenagem (KUSHWAH; HU, 2011). A figura 4 ilustra o potencial para diferenciação em macrófagos e células dendríticas.

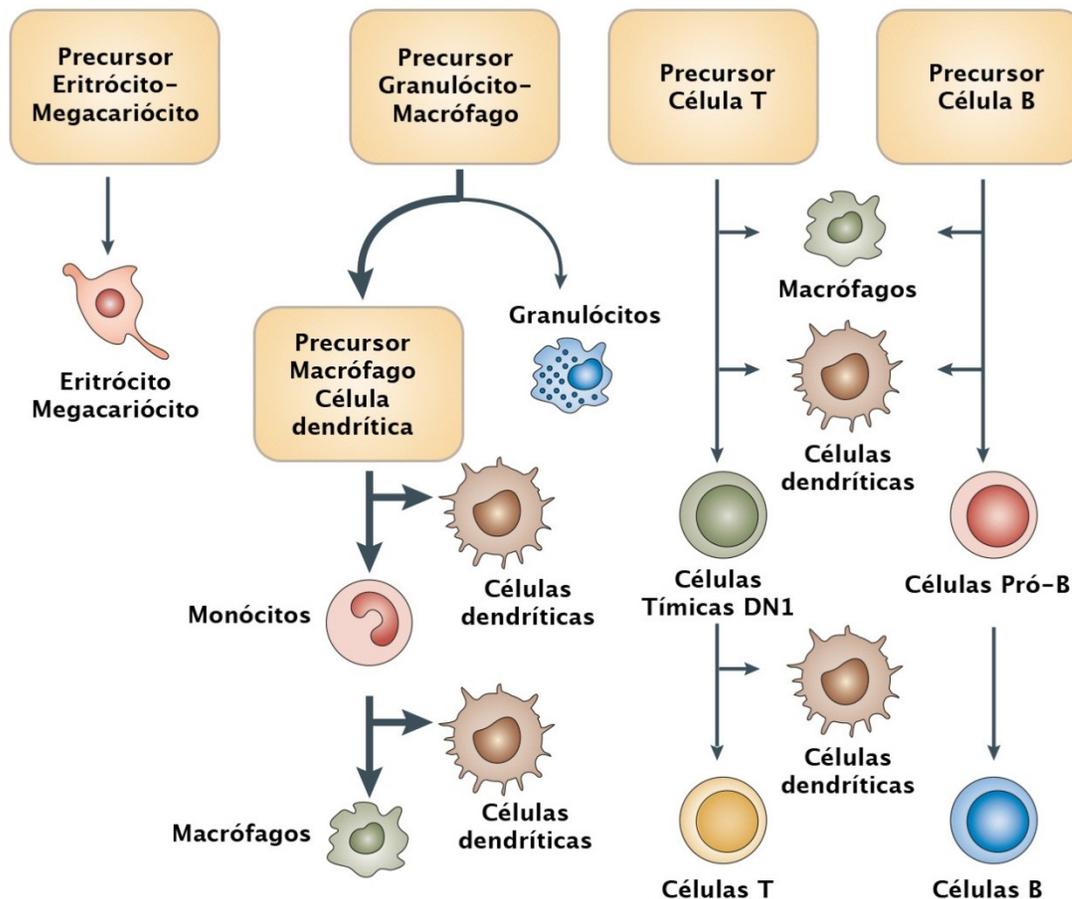


FIGURA 4 - Modelo para a retenção do potencial de macrófagos e células dendríticas de células durante a hematopoiese.

A visão de que a hematopoiese ocorre através de uma sequência de passos de diferenciação estritamente ordenada e irreversível foi substituída pelo conceito de um processo mais gradual, em várias etapas, e a irreversibilidade como uma consequência tardia de uma série de alterações. As produções de macrófagos e células dendríticas parecem estar intimamente ligadas durante a hematopoiese. Estudos com ratos descreveram uma via desenvolvimento mieloide de macrófagos e células dendríticas, que procede de uma célula precursora de macrófagos-células dendríticas que já não é capaz de produzir muitos granulócitos, mas que podem formar células dendríticas por duas vias: a produção direta de células dendríticas residentes do tecido linfóide e a produção de células dendríticas inflamatórias através de monócitos circulantes. No entanto, também foi observado em vários estudos com ratos que os macrófagos e células dendríticas podem ser produzidos por precursores que estão comprometidos com a produção de células T ou células B. A retenção de algum potencial para formar macrófagos e células dendríticas por precursores de células T e de células B pode explicar por que células dendríticas, que são basicamente um tipo de célula mieloide, podem ser geradas por precursores linfóides. DN1, Dupla 1 Negativo. (Adaptado de Shortman & Naik, 2007).

Em seu estado imaturo, as DCs são altamente especializadas na captação de antígeno. As DCs englobam os antígenos através macropinocitose, fagocitose ou endocitose usando receptores Fc, receptores tipos I e II, integrinas, lectinas tipo C- e receptores Scavenger. Após a captação, a DC processa antígenos da proteína em peptídeos que são carregados em moléculas de MHC para apresentação às células T. Antígenos endógenos são degradados em peptídeos pelo proteossoma no citoplasma. Esses peptídeos são transportados para o retículo endoplasmático utilizando moléculas transportadoras para apresentação de antígenos (TAP) e carregados nas moléculas de MHC classe I. Os complexos Peptídeo-MHC classe I são transportados para fora do retículo endoplasmático, através do complexo de Golgi, e para fora da superfície para a apresentação às células T CD8<sup>+</sup>. As DCs e outros tipos de células podem processar peptídeos utilizando esta via. Antígenos de proteína exógena são englobados e processados em endossomos que contêm proteases que degradam os antígenos da proteína em peptídeos antes de carregar em moléculas de MHC classe II. Os complexos Peptídeo-MHC classe II são transportados para a superfície celular para apresentação às células T CD4<sup>+</sup>. Devido à limitada expressão de moléculas MHC classe II, apenas APCs podem processar peptídeos através da via exógena. Antígenos de proteína exógena também podem ser processados pelas DCs e carregados em moléculas de MHC classe I utilizando apresentação cruzada. Embora o mecanismo exato da apresentação cruzada continue a ser controversa, a capacidade das DCs para utilizar este processo para ativar células T CD8<sup>+</sup> é bem estabelecida (BANCHEREAU, J *et al.*, 2000; GUERMONPREZ *et al.*, 2002).

A maturação de DCs é caracterizada pela redução da fagocitose; melhora na capacidade de processamento e apresentação de antígenos, de migrar para tecidos linfoides e de estimular células T e B. A maturação é acompanhada pelo aumento da expressão de receptores de quimiocinas, de moléculas de adesão celular e de moléculas coestimulatórias que estão envolvidas na migração das DCs para tecidos linfoides e são necessários para a ativação máxima, proliferação e diferenciação de células B e T. Além disso, a maturação de DCs também envolve a produção de citocinas e quimiocinas que influenciam o tipo de resposta imune gerada (SABADO; BHARDWAJ, 2010).

Após a maturação, as células dendríticas migram para os tecidos linfoides secundários, tais como os gânglios linfáticos (antígeno capturado da pele e órgãos sólidos), baço (antígeno capturado do sangue), ou placas de Peyer (antígeno capturado do lúmen intestinal), onde eles entram em contato com as células T e B (BANCHEREAU, J *et al.*, 2000). Através de seus receptores de células T (TCRs), as células T reconhecem especificamente antígenos ligados a moléculas de MHC na superfície das DCs. Peptídeos ligados nas moléculas MHC classe I são reconhecidos por células T CD8+, enquanto peptídeos ligados a moléculas de MHC classe II são reconhecidos por células T CD4<sup>+</sup> (SABADO; BHARDWAJ, 2010).

As células dendríticas desempenham um papel importante no equilíbrio do sistema imunológico entre imunidade e tolerância (COOLS *et al.*, 2007). As DCs mediam a tolerância periférica usando vários mecanismos. As DCs não ativam as células T em seu estado de imaturidade devido ao baixo nível de expressão de

MHC e moléculas coestimulatórias. As DCs também pode induzir a expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) levando a deleção das células T. A IDO é responsável pela degradação do triptofano, um aminoácido essencial para a proliferação de células T. O triptofano degradado induz a parada do ciclo celular ou apoptose nas células T. Além disso, metabólitos do triptofano podem exercer efeitos citotóxicos diretos sobre as células T (MELLOR; MUNN, 2004; MUNN; MELLOR, 2004). As DCs também podem induzir a diferenciação das células T reguladoras (JONULEIT *et al.*, 2000; LEVINGS *et al.*, 2005) que exercem seus efeitos através das atividades de TGF- $\beta$ , IL-10 e CTLA-4, entre outros mecanismos, para inibir a proliferação de células T (COOLS *et al.*, 2007; TANG; BLUESTONE, 2008). As células T reguladoras foram descritas infiltrando vários tumores (LIYANAGE *et al.*, 2002; WOO *et al.*, 2001) e a sua depleção leva ao aumento da resposta imune antígeno tumor específico (VIEHL *et al.*, 2006). Além das DCs mieloides, as DCs plasmocitoides também podem induzir células T reguladoras (CHEN, W. *et al.*, 2008; SHARMA *et al.*, 2007).

#### IMUNOVIGILÂNCIA

O sistema imunológico tem três papéis principais na prevenção de tumores. Primeiro, pode proteger o hospedeiro de tumores induzidos por vírus através da eliminação ou supressão de infecções virais. Em segundo lugar, a eliminação de patógenos e a rápida resolução da inflamação pode impedir o estabelecimento de um ambiente inflamatório propício para carcinogênese. O terceiro, referido como imunovigilância tumoral (*immunosurveillance*), é o processo pelo qual o sistema imunológico pode identificar e eliminar células tumorais com base na expressão de

antígenos tumorais específicos ou de moléculas por estresse celular (SWANN; SMYTH, 2007).

A hipótese do "*immunoediting*" no câncer, apresentada por Schreiber e seus colaboradores (DUNN *et al.*, 2004), integra os diferentes mecanismos de escape tumoral com a teoria da vigilância imunológica, ou imunovigilância, originalmente concebida no início do século XX por Paul Ehrlich e postulada em meados do século XX. O renascimento da vigilância imunológica tumoral no conceito de "*immunoediting*" está fundamentado na ideia de que o sistema imune não só protege o hospedeiro, mas também pode promover o crescimento tumoral (RABINOVICH *et al.*, 2007).

O conceito de *immunoediting* fornece uma explicação mais completa para o papel do sistema imunológico frente à gênese tumoral, pois o desenvolvimento tumoral pode ocorrer em indivíduos imunocompetentes. Segundo a hipótese de *immunoediting*, além do sistema imunológico impedir a formação de tumor, ele também atua promovendo ou selecionando variantes do tumor com reduzida imunogenicidade e propicia o desenvolvimento de tumores com capacidade de escapar à detecção e eliminação imunológica (DUNN *et al.*, 2002, 2004). Esta hipótese é um refinamento do conceito de imunovigilância e que abrange uma visão mais ampla das interações entre o sistema imune e o tumor, reconhecendo as ações de proteção do indivíduo e de modelação tumoral exercidas pelo sistema imunológico durante o desenvolvimento da neoplasia (DUNN *et al.*, 2002).

O *immunoediting* é dividido em três fases chamadas: eliminação, equilíbrio, e escape. A fase de eliminação é exatamente o mesmo processo descrito na teoria da imunovigilância tumoral, pelo qual o sistema imunológico, através da resposta imune inata e adaptativa (incluindo NK, células  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  T) e de moléculas imunorregulatórias (incluindo IFN- $\gamma$ , IL-12, perforina e TRAIL), detecta e elimina células tumorais que se desenvolveram como resultado da falha dos mecanismos intrínsecos de supressão tumoral (DUNN *et al.*, 2002, 2004; RABINOVICH *et al.*, 2007; SWANN; SMYTH, 2007; ZITVOGEL, L *et al.*, 2006). A fase de eliminação pode ser completa, quando todas as células tumorais são eliminadas, ou incompleta (DUNN *et al.*, 2002, 2004). No caso de eliminação parcial do tumor, segundo a teoria do *immunoediting*, pode ocorrer um estado temporário de equilíbrio dinâmico entre o sistema imunológico e o processo de desenvolvimento tumoral (DUNN *et al.*, 2002, 2004; SWANN; SMYTH, 2007). Neste processo, os linfócitos e IFN- $\gamma$  exercem uma pressão de seleção potente sobre as células tumorais que é o suficiente para conter, mas não para extinguir totalmente, uma “camada basal” de tumor que contém várias células menores geneticamente instáveis e rapidamente mutantes (DUNN *et al.*, 2002, 2004). As células tumorais permanecem latentes ou continuam a evoluir, acumulando mais alterações (tais como, mutações do DNA ou mudanças na expressão gênica) que podem modular antígenos tumorais específicos ou antígenos induzidos por estresse que elas expressam. Enquanto este processo continua, o sistema imunitário exerce uma pressão seletiva (darwiniana) que elimina clones tumorais suscetíveis, mas surgem novas variantes portadoras de diferentes mutações que lhes proporcionam

um aumento da resistência ao ataque do sistema imunológico. A pressão exercida pelo sistema imunológico durante esta fase é suficiente para controlar a progressão do tumor. Entretanto, se a resposta imune não for capaz de eliminar o tumor completamente, o processo de seleção de variantes celulares capazes de resistir, evitar ou suprimir a resposta imune antitumoral, permite que a neoplasia passe para a fase de escape na qual o sistema imunológico não é mais capaz de conter o crescimento do tumor (DUNN *et al.*, 2002, 2004; RABINOVICH *et al.*, 2007). Estas etapas são demonstradas na figura 5.



FIGURA 5 - Etapas da carcinogênese: interação entre o tumor e o sistema imunológico .

Ilustração do conceito central de que o processo de carcinogênese em múltiplas etapas decorre da interação entre fatores relacionados à célula neoplásica ("fatores intrínsecos" em azul) e ao sistema imunológico ("fatores extrínsecos" em vermelho). (Adaptado de Zitvogel et al, 2006).

É provável que o equilíbrio seja o mais longo dos três processos e podem ocorrer durante um período de muitos anos (DUNN *et al.*, 2002). Há evidência clínica sugerindo que os tumores podem permanecer latentes por muitos anos e há casos de recidiva após longos períodos de remissão do tumor; ao menos 10 anos, alguns superiores a 20 anos (CALLAWAY; BRIGGS, 1989; DEMICHELI *et al.*, 1996; HERRLINGER *et al.*, 2005; MATSUI *et al.*, 2006; SAGALOWSKY;

MOLBERG, 1999; STEWART *et al.*, 1991). Meng e colaboradores encontraram evidência de células tumorais circulantes em pacientes que estão livres de neoplasia clinicamente detectável vinte anos após o tratamento (MENG *et al.*, 2004). Outro estudo relatou seis casos de recorrência de carcinoma de pulmão não pequenas células entre 7 e 14 anos após a remissão da doença (STEWART *et al.*, 1991). Todos foram associados com um evento ou tratamento imunossupressor, fato indicativo do papel do sistema imunológico na supressão do crescimento tumoral. Entretanto, nem todos os casos de recorrência são associados com imunossupressão.

No processo de escape as células tumorais variantes que adquiriram insensibilidade à detecção e eliminação imunológica através de alterações genéticas ou epigenéticas começam a se expandir de forma descontrolada (DUNN *et al.*, 2002; SWANN; SMYTH, 2007). Isso resulta na neoplasia evidenciada na clínica e que, se não for controlada, resulta na morte do hospedeiro (DUNN *et al.*, 2002).

Evidências circunstanciais sugerem que a vigilância imunológica e o processo de *immunoediting* ocorrem em pacientes com câncer. Indivíduos com imunodeficiências hereditárias ou adquiridas têm maior incidência de alguns tipos de neoplasias associadas à infecção viral e à exposição a agentes cancerígenos. Pacientes transplantados mantidos com drogas supressoras são 3 a 8 vezes mais susceptíveis para o desenvolvimento de neoplasia maligna do que os controles normais, embora não apresentem uma distribuição aleatória de tumores em todas as localizações anatômicas. Em contraste, os pacientes com neoplasias de ovário,

colorretal e melanoma, cujos tumores têm altos níveis de infiltração por linfócitos, possuem um melhor prognóstico. Coletivamente, estudos experimentais e observações clínicas indicam que o sistema imunológico pode frustrar a carcinogênese e mediar a regressão de tumor estabelecido (OSTRAND-ROSENBERG, 2008).

O desenvolvimento de carcinoma em pacientes está intimamente correlacionado à sua capacidade de inativar linfócitos citotóxicos efetores (isto é, células CD8<sup>+</sup>, Linfócitos T citotóxicos e *Natural Killer* [NK]), em induzir apoptose nas células imunes infiltrantes tumorais (TIC) e/ou em suprimir a resposta imune antitumoral, através: da regulação negativa da proteína apresentadora de antígenos HLA de classe I; da regulação positiva de célula supressora mioide derivada (MDSC) proteínas imunossupressoras, como FasL, HLA-G, família B7, citocinas TGF- $\beta$  e Gal-1, enzima IDO (2,3 oxigenase indolamina); e indução/expansão de células imunossupressoras: e/ou células T regulatórias (Treg) Foxp3<sup>+</sup> (DU; WANG, Y, 2011; MOCELLIN; NITTI, 2008).

As três fases da imunoedição tumoral são demonstradas de forma esquemática na figura 6.

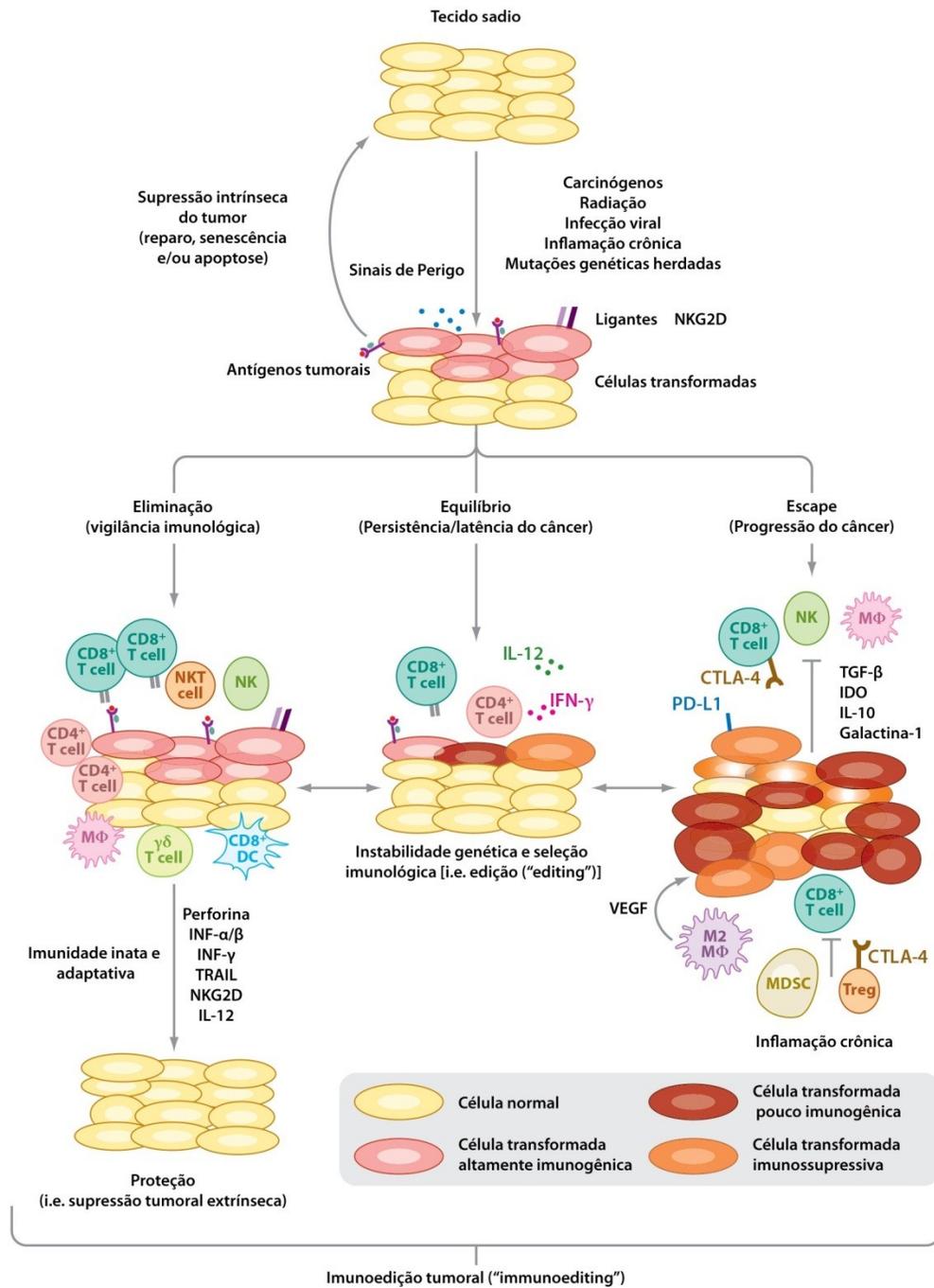


FIGURA 6 - As três fases da imunoedição no câncer.

Imunoedição no câncer (immunoediting) é o resultado de três processos que funcionam de forma independente ou em sequência para controlar e moldar o câncer. Uma vez que as células normais são transformadas em células tumorais pela combinação de oncogenes adquiridos e pelas falhas intrínsecas dos mecanismos supressores de tumores, o sistema

imunológico pode funcionar como um supressor extrínseco de tumores ao eliminar as células neoplásicas ou ao impedir o seu desenvolvimento. Na primeira fase, a eliminação, anteriormente conhecida como imunovigilância tumoral, células e moléculas do sistema imunológico inato e adaptativo reconhecem e destroem as células transformadas, resultando em um retorno ao normal tecido fisiológico. No entanto, se a imunidade antitumoral é incapaz de eliminar completamente as células transformadas, variantes tumorais sobreviventes podem entrar na fase de equilíbrio, onde as células e moléculas da imunidade adaptativa impedem o desenvolvimento tumoral. Essas variantes podem, eventualmente, adquirir mais mutações que permitirão as células neoplásicas escaparem do reconhecimento, da morte ou do controle mediados pelas células do sistema imunológico e progredirem para doença clinicamente detectável na fase de escape. (Mφ = Macrófago). (Adaptado de Veseley et al, 2011).

## IMUNOTERAPIA

O progresso no conhecimento de redes celulares e moleculares que regulam a resposta imune no microambiente tumoral renovou o entusiasmo no potencial terapêutico da imunoterapia (RABINOVICH *et al.*, 2007).

Os Linfócitos T Citotóxicos Tumor Antígeno Específico (CTL) são os principais efetores na resposta imune contra células tumorais. A identificação dos TAAs que são reconhecidos principalmente por linfócitos T CD8<sup>+</sup> levou ao desenvolvimento de diversas estratégias de vacinação que são capazes de induzir ou potencializar uma resposta imune específica. No entanto, grandes tumores já estabelecidos estão associados com a aquisição de resistência à lise tumoral específica e não são, geralmente, sujeitos ao controle do sistema imunológico (HAMAÏ *et al.*, 2010).

A meta de vacinas terapêuticas para o câncer (ou imunoterapia ativa) é instruir o próprio sistema imunológico do paciente para matar células cancerosas. Comparado com a quimioterapia, as vantagens teóricas de tal abordagem são sua maior capacidade de eliminar seletivamente as células transformadas, resultando em baixa toxicidade, e a capacidade de reconhecer e atacar múltiplas moléculas-alvo, mesmo os antígenos recém-formados resultantes da rápida mutação de células tumorais (KALINSKI *et al.*, 2009). Desta forma, a imunoterapia permite

induzir uma resposta imune específica em relação ao tumor capaz de reduzir a carga tumoral ao direcionar o equilíbrio imunológico a favor da resposta antitumor e contra as ações pró-tumorais (PALENA; SCHLOM, 2010).

Duas abordagens gerais foram utilizadas no desenvolvimento de novas intervenções imunoterápicas. Uma abordagem utiliza vacinas padronizadas que são preparações antigênicas capazes de ativar APCs endógenos, tais como DCs, induzindo a ativação de células T. As vantagens de vacinas padronizadas (geralmente proteínas recombinantes, vírus recombinantes ou peptídeos sintéticos, contendo um ou vários epítomos tumorais relevantes) são de que elas podem ser produzidas em grande quantidade, além de serem facilmente armazenadas e distribuídas. No entanto, a sua limitação é o repertório antigênico pré-determinado, geralmente limitado, que as tornam aplicáveis apenas aos pacientes cujos tumores expressam os antígenos da sua composição. No caso das vacinas baseadas em peptídeo, o seu uso é muitas vezes limitado a uma subpopulação ainda mais restrita de pacientes que expressam um tipo específico de HLA e a sua aplicação ainda é limitada pela ausência de antígenos tumorais superexpressos de forma universal em vários tipos de câncer. Além disso, a limitação de ambas as vacinas à base de proteínas e peptídeos decorre da pouca capacidade de induzir uma ativação equilibrada de subtipos de linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> que é essencial para a eficácia da imunidade antitumoral (BANCHEREAU, J; STEINMAN, R., 1998; FIGDOR *et al.*, 2004; ROSENBERG, S., 2004; SCHULER, G; STEINMAN, R., 1997; STEINMAN, R. M.; BANCHEREAU, JACQUES, 2007; STEINMAN, R., 1991). Outro dado importante é que a capacidade dessas vacinas

para ativar células T de pacientes depende das características e do nível de ativação de células dendríticas locais e esta é afetada de forma negativa pela presença de tumor (GABRILOVICH, D.; PISAREV, 2003).

Muitas das limitações acima podem ser evitadas mediante a aplicação de vacina personalizada e específica para cada paciente. Essas vacinas envolvem células do tumor do próprio paciente e apresentam um repertório antigênico único que é relevante para cada indivíduo em particular, tanto com relação ao tipo do HLA, quanto ao perfil único dos TAAs expressos nas células tumorais. Ao mesmo tempo, as abordagens baseadas em células APC do próprio paciente geradas “*ex-vivo*” (como as vacinas com células dendríticas) também evitam a dependência das APCs endógenas para resposta imune, pois estas são frequentemente disfuncionais em pacientes com câncer avançado (GABRILOVICH, D.; PISAREV, 2003).

Após a identificação de antígenos de tumor específico reconhecidos por CTLs, uma série de ensaios clínicos de imunoterapia foi realizada com estes antígenos em pacientes com melanoma avançado e em vários tipos de câncer (YASUMOTO *et al.*, 2009). Especificamente com DCs pulsadas, foram realizados ensaios clínicos por em pacientes com vários tipos de tumores, incluindo câncer de mama, mieloma múltiplo, câncer de próstata, carcinoma de células renais, melanoma maligno, o câncer colorretal e de câncer de pulmão não pequenas células (SABADO; BHARDWAJ, 2010).

A regressão tumoral foi observada em uma pequena proporção dos pacientes vacinados (SABADO; BHARDWAJ, 2010; YASUMOTO *et al.*, 2009). Rosemberg e colaboradores revisaram mais de 1.300 pacientes submetidos à imunoterapia. Cerca de 20% dos pacientes apresentaram alguma evidência de regressão, incluindo uma resposta mista, mas apenas 2% a 4% dos pacientes apresentaram regressão do tumor, quando avaliados pelo método RECIST (i.e. resposta parcial ou completa) (ROSENBERG, S. *et al.*, 2004). Dados de estudos mais recentes também são frustrantes em relação à resposta clínica (BERNTSEN *et al.*, 2008; FINN, 2008; HIRSCHOWITZ, E *et al.*, 2007; KRUG *et al.*, 2010; LESTERHUIS *et al.*, 2008; UM *et al.*, 2010).

Apesar de muitos ensaios clínicos com vacinas de antígenos tumorais terem resultado em respostas clínicas objetivas em apenas um pequeno número de pacientes, em um sentido teórico, a erradicação do tumor é considerada possível por meio da imunoterapia. Os mecanismos do tumor para escapar do sistema imunológico do hospedeiro continuam a ser um grande obstáculo para terapia imunológica no câncer e uma melhor compreensão destes mecanismos será imprescindível para o desenvolvimento de uma abordagem mais eficaz do câncer de pulmão (YASUMOTO *et al.*, 2009).

Embora estes estudos não tenham demonstrado a eficácia clínica da imunoterapia, os resultados comprovaram que terapia imunológica com células dendríticas pulsadas com antígenos é uma modalidade terapêutica segura e promissora para o tratamento de tumores (SABADO; BHARDWAJ, 2010).

Atualmente, há cerca de 240 estudos cadastrados no banco de dados do *U.S. National Institutes of Health* relacionados à imunoterapia com células dendríticas, sendo 16 protocolos em pacientes com neoplasia de pulmão, todos sem resultados finais analisados (U.S. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2012a, 2012b). Este cenário cria a expectativa de um grande avanço no conhecimento atual sobre o uso desta modalidade terapêutica.

## OBJETIVOS

Os objetivos primários deste estudo foram:

1. Avaliar a viabilidade da imunoterapia com células dendríticas maduras em pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células;
2. Avaliar a segurança e tolerabilidade imunoterapia com células dendríticas maduras.

Objetivo secundário deste estudo foi avaliar a resposta imunológica através da linfoproliferação.

## MATERIAL E MÉTODO

## CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES

Os seguintes critérios de elegibilidade para inclusão dos pacientes foram: diagnóstico confirmado de carcinoma de pulmão não pequenas células avançado (estadio IIIB-IV) (DETTERBECK *et al.*, 2009) confirmado por exame histopatológico; idade inferior a 70 anos; *performance* clínica  $\leq 2$  (OKEN *et al.*, 1982); sem antecedentes de tratamento cirúrgico, quimio ou radioterapia; ausência de metástases no sistema nervoso central e pelo menos uma lesão mensurável de acordo com critérios de RECIST (THERASSE *et al.*, 2000); nenhuma doença aguda associada; fenótipo HLA-A2 e expressão de WT1 (Proteína do Tumor de Wilms), HER-2 (Receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2), CEA (Antígeno Carcinoembrionário) ou MAGE1 (Antígeno Melanoma 1) avaliada por imunohistoquímica no tecido tumoral.

A manutenção das funções orgânicas foi confirmada por: contagem de leucócitos  $\geq 3.000/\text{mm}^3$ , neutrófilos  $\geq 1.500/\text{mm}^3$ , hemoglobina  $\geq 9,0$  g/dL e plaquetas  $\geq 100.000/\text{mm}^3$ ; bilirrubina  $\leq 1,5$  mg/dL, aspartato aminotransferase  $\leq 40$  IU/L; clearance de creatinina  $> 55$  mL/minuto. O consentimento pós-informado por escrito foi obtido de todos os pacientes. O estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes da *International Conference on Harmonisation* (ICH), regulamentos aplicáveis e as diretrizes que regem a condução de estudos clínicos e os princípios éticos da declaração de Helsinque.

## DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A seleção e inclusão dos pacientes não foram aleatórias. Todos os pacientes selecionados receberam tratamento convencional (quimioterapia com ou sem radioterapia). O protocolo de quimioterapia foi realizado com paclitaxel 175 mg/m<sup>2</sup> e cisplatina 70 mg/m<sup>2</sup> no dia 1, repetidos quatro vezes a cada 21 dias. Os pacientes foram submetidos à tomografia computadorizada (TC) de tórax, abdômen e crânio após o quarto ciclo de quimioterapia para avaliar a resposta do tumor. A doença progressiva foi um critério de exclusão. Os pacientes elegíveis foram encaminhados para a vacina de células dendríticas, como uma terapia adjuvante, que foi administrada após recuperação hematológica (plaquetas  $\geq 70,000/\text{mm}^3$ ). A tolerabilidade clínica foi avaliada por exames laboratoriais de rotina e pelos eventos clínicos descritos *Cancer Therapy Evaluation Program* (CTEP), e *Common Terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAEv3) (“ctcae3.pdf (objeto application/pdf)”, [S.d.]).

A figura 7 representa a organização cronológica do protocolo.

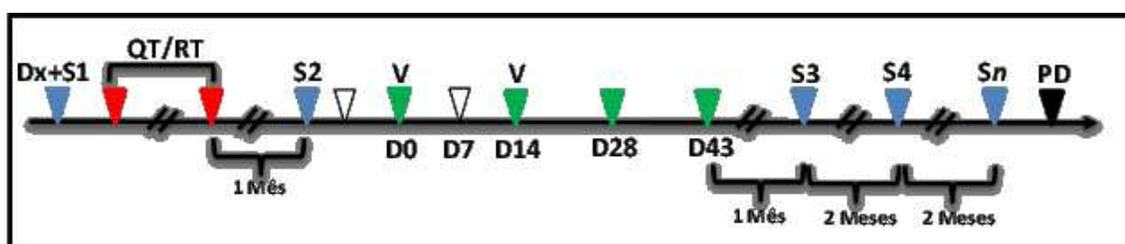


FIGURA 7 - Etapas do protocolo.

O dia a imunização está marcada com um “V” (D0 e D14). Triângulo azul – Etapa de avaliação: “Dx+S1” = Diagnóstico e 1º estadiamento radiológico; “S2” = 2º estadiamento radiológico (1 mês após o tratamento convencional); “S3” = 3º estadiamento radiológico (1 mês após a vacina); “S4...Sn” = o estadiamento radiológico foi repetido a cada 2 meses até a progressão da doença (“PD” – triângulo preto). Triângulo vermelho – Tratamento convencional (quimioterapia e radioterapia). Triângulo branco – Dia da leucaférese. Triângulo verde – Teste de linfoproliferação (realizado antes da imunização nos dias D0 e D14).

## MONITORAMENTO DA RESPOSTA CLÍNICA

A avaliação de resposta ao tratamento quimioterápico foi feita ao final do 4º ciclo baseada na resposta clínica (melhora dos sintomas e performance clínica) e nos critérios estabelecidos pelo RECIST para a avaliação radiológica (THERASSE *et al.*, 2000). O estudo radiológico foi realizado por tomografia computadorizada e foi repetido cerca de 4 semanas após a aplicação da última dose da vacina. O acompanhamento radiológico foi mantido a cada 2 meses até a progressão da doença. Todos os exames radiológicos foram laudados por radiologistas. A medida das lesões foi realizada por softwares do aparelho de tomografia computadorizada (Toshiba Aquilion; 64 canais) e do Synapse (PACS - *Picture Archiving and Communication System* – Fuji).

## AVALIAÇÃO BASAL

Foram consideradas lesões mensuráveis aquelas com medidas, em pelo menos uma dimensão (o maior diâmetro a ser registrado),  $\geq 20$  mm, utilizando técnicas convencionais, ou  $\geq 10$  mm, utilizando a tomografia computadorizada (TC) helicoidal. As lesões com medidas abaixo dos critérios acima foram consideradas não mensuráveis. Os derrames pleurais ou pericárdicos, as lesões císticas, a linfangite pulmonar, e as alterações radiográficas ósseas ou exames de imagens anormais com defeitos de preenchimento não mensuráveis, foram considerados não mensuráveis.

A carga tumoral global foi estimada na avaliação basal, contra a qual foram comparadas as medições posteriores para definir respostas objetivas. Todas as lesões mensuráveis de até um máximo de 5 por órgão e 10 no total,

representativas de todos os órgãos envolvidos foram identificadas como lesões-alvo sendo registradas e medidas na avaliação basal. O mesmo método foi usado em todo o estudo. As lesões-alvo foram selecionadas com base no seu tamanho (aquelas com maior diâmetro) e sua adequação para medições precisas repetidas. A soma dos maiores diâmetros de todas as lesões-alvo foi calculada e informada como a soma do maior diâmetro na avaliação basal (BSLD). O BSLD foi usado como a referência para a qual se caracterizou a resposta tumoral objetiva. Todas as outras lesões (ou sítios da doença) foram identificadas como lesões “não alvo” e registradas na avaliação basal. As medições destas lesões não foram realizadas, porém a presença, ausência ou aumento de cada uma delas foi registrada durante todo o acompanhamento.

#### CRITÉRIOS DE RESPOSTA

Para cada indivíduo, a resposta da doença ao tratamento foi avaliada radiologicamente. A resposta tumoral foi julgada usando os critérios do RECIST (Anexo 2).

#### IMUNOISTOQUÍMICA

Foram obtidos cortes histológicos (três micrômetros) de tecido tumoral de biópsia realizada no momento do diagnóstico e submetidos à marcação imunoistoquímica dos antígenos tumorais CEA (CEA-A5B7 monoclonal, DAKO) Her-2/neu (DAKO), WT1 (WT1-C19, Santa Cruz Biotechnology) e MAGE-1 (MA454, DAKO). A marcação imunoistoquímica foi realizada com o reagente NovoLink (Vision BioSystems, EUA), seguindo as instruções do fabricante, sendo

padronizadas apenas as diluições dos anticorpos (WT1, 1:80; MAGE 1, 1:100; CEA, 1:50; Her-2/neu, 1:500).

As lâminas foram analisadas em microscópio ótico, observando-se os padrões de coloração das células neoplásicas e a porcentagem de células coradas por campo visualizado ao microscópio ótico em aumento de 400 vezes. Células normais do tecido foram utilizadas como controles negativos dentro de cada reação e para cada lâmina. Tecidos com expressão comprovada dos antígenos investigados (tecidos padrões) foram selecionados e utilizados como controles positivos da reação e como parâmetros para quantificar a expressão das proteínas em questão (controle positivo WT1 = Tumor de Wilms; controle positivo MAGE 1, melanoma de pele; controle positivo CEA, adenocarcinoma colorretal; controle positivo Her-2/neu, câncer de mama).

A intensidade de expressão em relação aos tecidos padrões foi calculada através de uma grade de classificação composta pela soma da porcentagem de células positivas (valores de 1 a 4, sendo 1 = até 25%, 2 = de 25 a 50%, 3 = de 50 a 75% e 4 = >75% de células positivas) e pela intensidade de positividade apresentada por célula (valores de 1 a 3, sendo, 1= baixa, 2= moderada, 3=alta). A quantificação de Her-2/neu utilizou um sistema diferenciado, sendo a intensidade de expressão desse antígeno classificada de grau 1 a 3. Para avaliação foi considerado para Her-2/neu a classificação: baixa expressão = grau 1; expressão moderada = grau 2; alta expressão = grau 3. Para os outros antígenos analisados, considerou-se a classificação: baixa expressão = grau 1 a 3;

expressão moderada = grau 4 a 5; alta expressão = grau 6 a 7. Desta forma, foi possível unificar os sistemas de classificação (Figura 8).

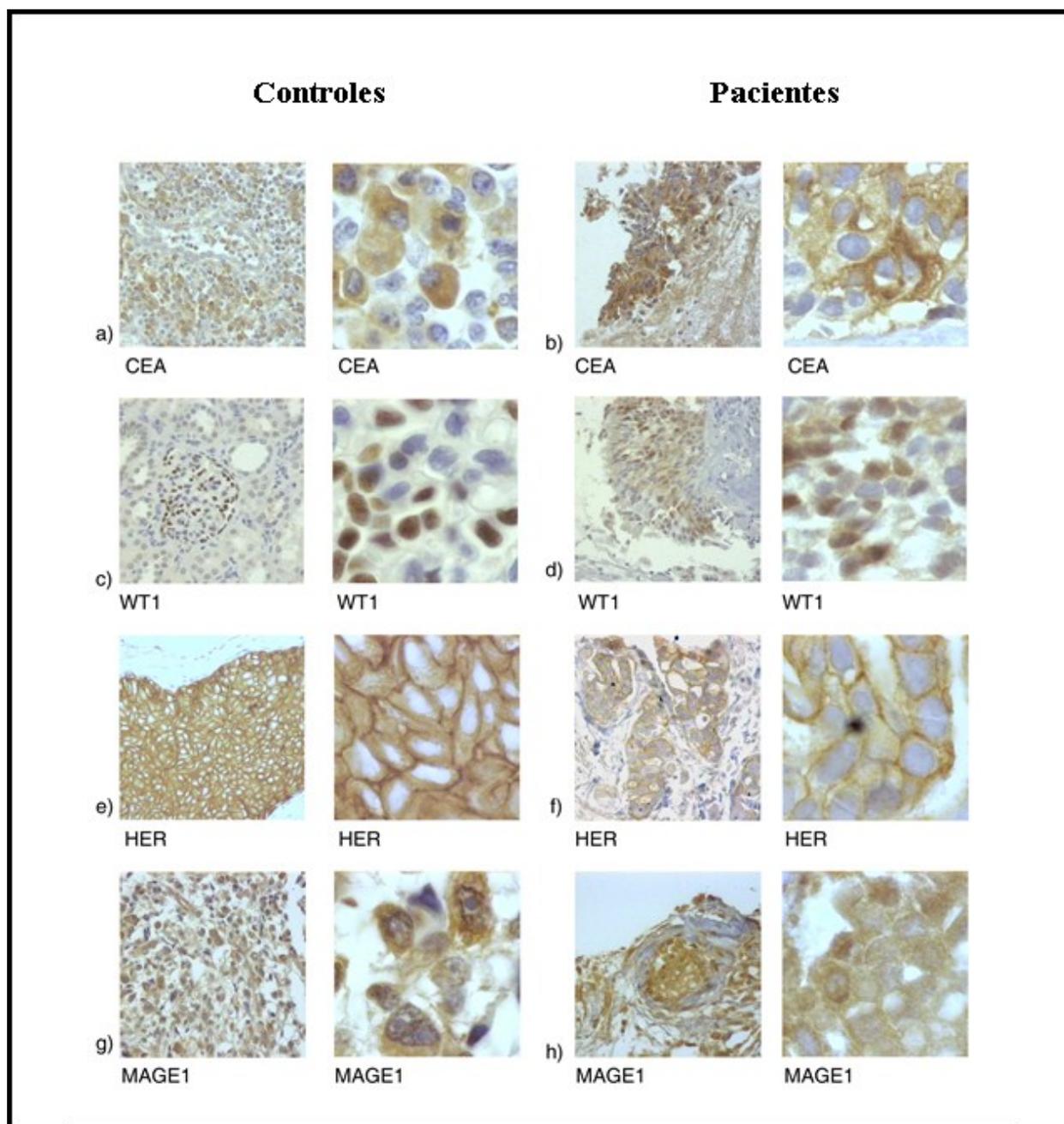


FIGURA 8 - Intensidade de expressão dos antígenos tumorais em lâminas controles.

(a = adenocarcinoma colorretal; c = Tumor de Wilms; e = câncer de mama; g = melanoma de pele) e em tecido tumoral de pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células em estádios avançados (b, d, f e h). Quantificação da expressão: b = alta; d = moderado; f = moderado; h = moderado.

## LEUCAFÉRESE

O sangue periférico dos pacientes foi processado através de leucaférese para a obtenção das células mononucleares necessárias para a produção da vacina. Foram empregados os separadores celulares de fluxo contínuo Fresenius Com.Tec. utilizando kits P1Y, programa MNC, com velocidade de centrifugação 1500rpm (297g), com fluxo de retirada em torno de 50 ml/min. O volume processado variou entre os pacientes e foi determinado pela contagem celular estimada através de hemograma após 150 ml de sangue processado. A concentração de ACD utilizada foi de 1:10, diminuindo gradativamente até 1:16. Não houve necessidade de reposição, já que o volume de sangue retirado foi inferior a 15%.

Foram realizados dois procedimentos de aférese para cada paciente, com o objetivo de evitar o congelamento de células para a preparação da segunda dose da vacina. Observou-se que volume de sangue processado necessário para a produção de uma dose da vacina é de aproximadamente 150 ml, sendo necessário o tempo máximo de 1 hora para a finalização do procedimento de aférese.

As seguintes condições clínicas foram observadas antes de submeter os pacientes ao procedimento descrito acima: apresentação de processo infeccioso ou febril; cardiopatias; desnutrição; síndromes alérgicas; Hb>7,5g/dl; mononucleares > 1.000/mm<sup>3</sup>; plaquetas > 30.000/mm<sup>3</sup>; sorologia completa (hepatite B, hepatite C, HIV, sífilis, toxoplasmose, mononucleose, Chagas e citomegalovírus).

## MONITORAMENTO MICROBIOLÓGICO

As análises microbiológicas foram realizadas no início da cultura de células dendríticas, no quinto dia e no momento da imunização. Amostras foram incubadas durante 10 dias para a certificação da ausência de contaminação.

## GERAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

Células dendríticas (DC) maduras provenientes de células mononucleares autólogas foram isoladas através de gradiente de densidade de centrifugação por Ficoll-Hypaque (Amersham, Uppsala, Suécia). Em seguida, monócitos foram enriquecidos gradiente de densidade de centrifugação hiper-osmótico por Percoll seguido por duas horas de adesão à placa de cultura. As células foram centrifugadas a 500 g para separar as populações de celulares distintas. Monócitos aderentes foram cultivados por sete dias em placas de 6-poços em  $2 \times 10^6$  células/mL de RPMI médio (Gibco BRL, Paisley, Reino Unido) com 1% de penicilina/estreptomicina, 2mm L-glutamina, 10% de autólogo, 50 ng/mL de GM-CSF e 30 ng/mL de IL-4 (Peprotech, NJ, EUA). No dia 7, as DCs imaturas foram induzidas a se diferenciar em DCs maduras através de cultura por 48 horas com 30 ng/mL Interferon gama (IFN- $\gamma$ ).

De acordo com a expressão anterior detectada por imunistoquímica, o HLA-A2 restringido ao peptídeo WT1 (RMFPNAPYL), CEA peptídeo (YLSGANLNL), peptídeo MAGE-1 (KVAELVHFL) e peptídeo HER-2 (KIFGSLAFL) foram adicionados, na concentração de 25  $\mu$  g/mL, à cultura de DC (dia 9) e incubados durante 24 horas para a administração da vacina.

## CITOMETRIA DE FLUXO

Células dendríticas foram coletadas no dia 7 e lavadas com PBS. Os anticorpos monoclonais conjugados fluorescentes direcionados contra os seguintes antígenos foram utilizados para análise fenotípica: CD14 (PerCp), CD80 (Pe), CD83 (APC), CD86 (Fitc), HLA-A (Fitc), HLA-DR (Pe-Cy7), CD11c (Pe), CD154 (PerCp-Cy5.5), CCR5 (Pe), CCR7 (Fitc), IL-10 (Pe) e IL-12p70 (Fitc) (Caltag, Burlingame, Califórnia, EUA). Anticorpos direcionados contra CD3 (Pe), CD8 (PE-Cy7), CD4 (PerCp) e IFN- $\gamma$  (Fitc) foram utilizados para análise fenotípica de linfócitos após o ensaio de linfoproliferação. Anticorpos isotípicos combinados foram usados como controles (Caltag, Burlingame, Califórnia, EUA). A marcação foi realizada à temperatura ambiente durante 30 minutos em PBS. Para marcação intracelular (IL-10 e IL-12p70), células foram permeabilizadas e fixadas utilizando Fix-Cells Permeabilization Kit (Caltag, Burlingame, Califórnia, EUA). Depois de marcadas, as células foram lavadas duas vezes na PBS e analisadas por citometria FACSArea usando o programa CELL QUEST PRO. As populações DCs e linfócitos foram definidas com base no seu perfil de dispersão para frente e de dispersão lateral (população celular granular grande ou pequena, respectivamente). Os resultados foram expressos em percentagem de células positivas e de expressão IL-12 e IL-10, a intensidade média da fluorescência também foi observada.

## MARCAÇÃO DE CFSE

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) ( $1 \times 10^7$ ) foram incubadas a 37°C por 15 min em 1 mL de PBS contendo CFSE (Molecular Probes Europa, Leiden, Holanda) a 0,6  $\mu$ M, uma concentração que foi determinada como ideal em experimentos preparatórios. Depois de uma etapa na qual foram lavadas com PBS contendo 1% FCS, as células foram ressuspensas em uma densidade de  $1 \times 10^6$  células/mL e utilizadas para efetuar a análise de linfoproliferação. Após seis dias de incubação, as células marcadas com CFSE foram lavadas uma vez em PBS e imediatamente fixadas em PBS contendo formaldeído a 4% e submetidas à análise por FACSArea e CellQuest software (BD, Mountain View, CA, EUA). A fluorescência-CFSE foi plotada contra dispersão frontal (*forward scatter*). A manutenção do brilho da CFSE é consistente com nenhuma resposta proliferativa e a perda da fluorescência da CFSE indica a indução de proliferação. O nível reduzido de fluorescência de CFSE em linfócitos estimulados em relação aos não estimulados foi usado para calcular um índice de proliferação.

## PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO

No dia da aplicação da vacina, as células foram coletadas e lavadas três vezes com soro fisiológico estéril. A viabilidade das células foi investigada através de contagem em câmara de Neubauer com azul de trypan, sendo sempre superior a 80%. O imunofenótipo das células também foi investigado, sendo a presença de células dendríticas superior a 90%.

Para cada dose da vacina, duas alíquotas foram preparadas em seringas de 1 ml, com 500 $\mu$ l/dose de soro fisiológico contendo  $5 \times 10^7$  células. A aplicação

foi realizada por enfermeiras, com acompanhamento do médico responsável pelo estudo, no ambulatório de transfusão do Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas. Inicialmente, aplicou-se a dose subcutânea no braço, aguardando por 1 hora para a aplicação da segunda dose endovenosa. Após a aplicação da segunda dose, o paciente ficou em observação por mais uma hora e recebeu avaliação de sua pressão sanguínea e temperatura.

### AVALIAÇÃO CLÍNICA

O acompanhamento após a aplicação da vacina incluiu avaliação clínica, exame físico, radiograma de tórax e tomografias de tórax, abdome e crânio em intervalos regulares, como descrito na figura 8, ou conforme sintomas e sinais de progressão da doença.

### AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA

#### A. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE CÉLULAS IMUNES DO SANGUE PERIFÉRICO DOS PACIENTES.

A composição celular do sistema imunológico, antes e após a vacinação com as células dendríticas, foi avaliada a partir de amostras de sangue periférico usando citometria de fluxo. O dia de imunização foi considerado como o "Dia 0". As amostras de sangue periférico foram coletadas uma semana antes da vacinação ("dia -7"), duas semanas após a primeira dose da vacina ("dia 14"), duas semanas após a segunda dose da vacina ("dia 28") e um mês após o final do protocolo de vacinação ("dia 43").

Foram utilizados antígenos de superfície marcados com fluorocromos específicos para linfócitos T (CD4 e CD8), células NK (CD56), linfócitos B (CD19)

e células dendríticas maduras (CD86, CD80, CD83, CD154 e HLA-DR) para a imunofenotipagem das células sanguíneas dos pacientes.

Aproximadamente  $2 \times 10^5$  células por teste foram tratadas com uma solução de lise para os glóbulos vermelhos, centrifugada em 300 g por 5 minutos, lavadas com PBS e ressuspensas em 100  $\mu$ l de tampão para citometria (PBS com albumina de soro bovino 0.5% e 0,02% de azida de sódio). Posteriormente, essas células foram incubadas no escuro durante 30 minutos a 4° C com anticorpos monoclonais marcados com os fluorocromos específicos descritos acima. Em seguida, as amostras foram lavadas duas vezes com buffer de citometria de fluxo, fixado com paraformaldeído e analisados por um citômetro de fluxo (FACSCalibur - Xeroform Dicknson).

#### B. ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE ESPECÍFICA *IN VITRO* POR CITOMETRIA DE FLUXO.

O teste de linfoproliferação foi utilizado para avaliar a capacidade das células dendríticas de estimular linfócitos específicos *em vivo*.

#### C. COLETA DE LINFÓCITOS T.

As amostras de sangue periférico, coletadas nos tempos acima referidos, foram enriquecidas com linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) pela seleção imune negativa com grânulos immunomagnéticos específicos para células NK (CD56<sup>+</sup>), linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) e monócitos (CD14<sup>+</sup>).

As células coletadas antes de vacinação foram centrifugadas a 600 g durante 10 minutos e o sedimento celular foi lavado duas vezes com PBS, ressuspensado em RPMI com soro humano AB 1% e dimetilsulfóxido 10% e, em

seguida, congelado a  $-90^{\circ}\text{C}$  a uma velocidade controlada de  $1^{\circ}\text{C}$  por minuto até que o momento do primeiro teste (duas semanas após a primeira dose da vacina).

#### D. ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO

As células T ( $1 \times 10^6$  células/ml) foram ressuspensas em 1 ml de PBS contendo  $0,25 \mu\text{m}$  de CFSE (Molecular Probes, Países Baixos) e incubados durante 15 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após este período de incubação, as células foram lavadas duas vezes com RPMI 1640 suplementadas com soro humano AB 1% frio por centrifugação a  $600 g$  durante 10 minutos e incubadas no gelo durante 5 minutos.

Após este período, as células foram novamente centrifugadas a  $600 g$  durante 10 minutos e ressuspensas no mesmo meio e suplementada com  $25 \text{ ng/mL}$  de IL-7. Esses linfócitos foram cultivados em placas de 24-poços ( $1 \times 10^5$  células/poço) com  $25 \mu\text{g/ml}$  de cada peptídeo de tumor definido para cada paciente, separadamente. Esta cultura foi incubada durante 4 dias a  $37^{\circ}\text{C}$  em 5% de  $\text{CO}_2$ .

A porcentagem de proliferação foi calculada usando o número de células marcadas com CFSE usando a seguinte fórmula: [(número de células marcadas com CFSE no grupo teste – número de células marcadas com CFSE no grupo de controle) / número de células marcadas com CFSE no grupo de controle] x 100. Assim como para o controle, o mesmo teste foi realizado usando linfócitos não estimulados marcados com CFSE. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Os resultados de linfoproliferação foram analisados e comparados através do método de *Wilcoxon Signed Ranks Test*.

## APLICATIVOS UTILIZADOS

Microsoft Word® - elaboração de texto e editoração.

Microsoft Excel® - elaboração de tabelas e gráficos

SOFA Statistics® (Paton-Simpson & Associates Ltd) - análise estatística

Zotero® (*Roy Rosenzweig Center for History and New Media*) – organização de biblioteca, referências bibliográficas e citação.

## RESULTADOS

Entre junho/2006 e agosto/2008, 48 pacientes foram avaliados. Apenas cinco pacientes preencheram todos os critérios para a inclusão no estudo. As características de todos os pacientes avaliados estão resumidas na Tabela 1. A Tabela 7 resume os dados dos pacientes elegíveis para a imunoterapia.

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DOS ANTÍGENOS TUMORAIS ENTRE OS 48 INDIVÍDUOS PRÉ-SELECIONADOS DE ACORDO COM SEXO, IDADE, TIPO HISTÓLOGICO, ESTADIO E TRATAMENTO.

	<i>Total</i>	<i>Total</i>	<i>WT1</i>	<i>CEA</i>	<i>HER-2</i>	<i>MAGE 1</i>
	<i>% total</i>	<b>48</b>	<b>7</b>	<b>31</b>	<b>26</b>	<b>33</b>
			<b>15%</b>	<b>65%</b>	<b>54%</b>	<b>69%</b>
<b>Sexo</b>	<b>Masculino</b>	<b>38</b>	13%	61%	55%	68%
	<b>Feminino</b>	<b>10</b>	20%	80%	50%	70%
<b>Idade</b>	<b>40-60</b>	<b>12</b>	8%	58%	33%	58%
	<b>60-70</b>	<b>18</b>	17%	67%	72%	67%
	<b>70-80</b>	<b>18</b>	17%	61%	50%	83%
<b>Histologia</b>	<b>Adenocarcinoma</b>	<b>19</b>	16%	58%	63%	58%
	<b>Carcinoma epidermoide</b>	<b>25</b>	16%	72%	48%	80%
	<b>Outros</b>	<b>4</b>	0%	25%	25%	25%
<b>Estadio</b>	<b>IIIA</b>	<b>6</b>	17%	83%	33%	83%
	<b>IIIB</b>	<b>32</b>	13%	69%	59%	72%
	<b>IV</b>	<b>10</b>	20%	50%	60%	20%
<b>Cirurgia</b>	<b>Sim</b>	<b>4</b>	0%	75%	100%	100%
	<b>Não</b>	<b>44</b>	16%	64%	50%	66%
<b>Quimioterapia</b>	<b>Sim</b>	<b>44</b>	11%	68%	52%	68%
	<b>Não</b>	<b>4</b>	50%	50%	75%	75%
<b>Radioterapia</b>	<b>Sim</b>	<b>34</b>	9%	65%	56%	68%
	<b>Não</b>	<b>14</b>	29%	71%	57%	86%

Entre os pacientes incluídos, a idade média foi 60 anos e 3 eram do sexo masculino. Os subtipos histológicos foram as seguintes: adenocarcinoma [2], adenocarcinoma mucinoso invasivo (anteriormente, carcinoma bronquíoloalveolar)

[1], carcinoma de células escamosas [1] e carcinoma de células escamosas/adenocarcinoma [1]. Quatro pacientes tinham estadios IIIB e um era estadio IV, no momento do diagnóstico, pelos exames de imagem.

#### DESCRIÇÃO DOS PACIENTES ELEGÍVEIS PARA IMUNOTERAPIA

A seguir, são detalhados os casos dos pacientes submetidos à imunoterapia. A evolução tumoral de cada paciente é descrita nas tabelas 2 a 5.

##### PACIENTE 1:

SAP, 61 anos, branco, sexo masculino.

Data do diagnóstico: 26/10/2006

Data da progressão após a vacina: 04/06/2007

Data do óbito: 11/07/2007

Realizado o diagnóstico de carcinoma epidermoide de pulmão em outubro de 2006, através biópsia por broncoscopia, após dois meses de história de tosse com escarro hemoptoico. Ex-tabagista (50 anos/maço), havia parado de fumar há três anos. Sem antecedente de etilismo.

Sem antecedentes pessoais, profissionais ou familiares relevantes.

Estadiamento no momento do diagnóstico: IIIB (T4N2M0).

Antígenos tumorais: HER-2 (grau 4) e MAGE-1 (grau 5).

-Esquemas terapêuticos:

O paciente foi submetido aos quatro ciclos de quimioterapia com paclitaxel e cisplatina. A radioterapia foi contraindicada devido à função pulmonar

(espirometria). A avaliação após o tratamento convencional demonstrou uma resposta parcial.

QUADRO 1 - DATAS DA QUIMIOTERAPIA; PACIENTE #1.

QUIMIOTERAPIA	
ESQUEMA	PACLITAXEL+CISPLATINA
1º CICLO	08/11/2006
2º CICLO	28/11/2006
3º CICLO	21/12/2006
4º CICLO	17/01/2007

QUADRO 2 - DATAS DA IMUNOTERAPIA; PACIENTE #1.

IMUNOTERAPIA	
1ª APLICAÇÃO	04/04/2007
2ª APLICAÇÃO	18/04/2007

-Intercorrências durante o tratamento:

Não houve intercorrências durante o tratamento quimioterápico ou eventos adversos relacionados à quimioterapia com grau  $\geq 2$ .

O paciente apresentou fadiga (grau 2) e calafrios cinco dias após a primeira aplicação da vacina e foi hospitalizado, entre os dias 11/04/2007 e 20/04/2007, por apresentar leucopenia ( $1.500/\text{mm}^3$ ; grau 3), granulocitopenia ( $900/\text{mm}^3$ ; grau 3); linfopenia ( $495/\text{mm}^3$ ; grau 3), trombocitopenia ( $88.000/\text{mm}^3$ ; grau 1), anemia (hemoglobina 8,5 g/dL; grau 2) e hiponatremia (126 mEq/L; grau 3). As sorologias foram negativas para HIV, mononucleose, citomegalovírus, Epstein Barr, *Mycoplasma pneumoniae* e dengue. As culturas bacterianas também foram negativas. Cefepime foi prescrito empiricamente. Não foi administrado qualquer fator de estimulação de colônias, e paciente recuperou-se das alterações

sanguíneas após cinco dias, espontaneamente, exceto pela anemia. A hiponatremia foi tratada com reposição de sódio e retornou à normalidade após uma semana.

-Evolução após a imunoterapia:

Em 11/07/2007, foi atendido no setor de urgência com quadro de insuficiência respiratória aguda (suspeita de tromboembolismo pulmonar, não confirmada) e evoluiu para óbito.

PACIENTE 2:

JB, 66 anos, branco, sexo masculino.

Data do diagnóstico: 21/09/2007

Data da progressão após a vacina: 20/04/2008

Data do óbito: 13/09/2008

Realizado o diagnóstico de adenocarcinoma de pulmão em setembro de 2007, através biópsia por broncoscopia, após dois meses de história de tosse com chiado. Ex-tabagista (60 anos/maço), havia parado de fumar há dez anos. Sem antecedente de etilismo.

Sem antecedentes pessoais, profissionais ou familiares relevantes.

Estadiamento no momento do diagnóstico: IIIB (T2N3M0).

Antígenos tumorais: CEA (grau 6) e WT1 (grau 4).

-Esquemas terapêuticos:

O paciente foi submetido aos quatro ciclos de quimioterapia com paclitaxel e cisplatina. A radioterapia foi indicada após a quimioterapia. Entretanto, como o início desta foi programado para sessenta dias após o término da quimioterapia, foi decidido realizar a imunoterapia antes da aplicação da radioterapia. A avaliação após o tratamento quimioterápico foi compatível com doença estável.

QUADRO 3 - DATAS DA QUIMIOTERAPIA; PACIENTE #2.

QUIMIOTERAPIA	
ESQUEMA	PACLITAXEL+CISPLATINA
1º CICLO	08/10/2007
2º CICLO	29/10/2007
3º CICLO	26/11/2007
4º CICLO	07/01/2008

QUADRO 4 - DATAS DA RADIOTERAPIA; PACIENTE #2.

RADIOTERAPIA LOCAL	
DATA INÍCIO	03/03/2008
DATA FINAL	22/04/2008
DOSE TOTAL	5940 CGy

QUADRO 5 - DATAS DA RADIOTERAPIA; PACIENTE #2.

RADIOTERAPIA METÁSTASE	
DATA INÍCIO	15/08/2008
DATA FINAL	28/08/2008
DOSE TOTAL	3000 CGy

QUADRO 6 - DATAS DA IMUNOTERAPIA; PACIENTE #2.

IMUNOTERAPIA	
1ª APLICAÇÃO	14/02/2008
2ª APLICAÇÃO	28/02/2008

-Intercorrências durante o tratamento:

O paciente teve o quarto ciclo de quimioterapia adiado por ter leucopenia (leucocitos 2.250/mm<sup>3</sup>; grau 2).

Não apresentou intercorrências durante a radio ou imunoterapia.

-Evolução após a imunoterapia:

Em 29/05/2008, foi atendido em outro serviço com abscesso pulmonar em lobo superior direito e iniciado o tratamento ambulatorial com ampicilina. Foi internado no período de 13/06/2008 a 23/06/2008 por falta de resposta terapêutica ao tratamento do abscesso; prescrito clindamicina intravenosa que foi mantida após a alta hospitalar. Evoluiu com trombose venosa profunda em membro superior direito durante a internação que foi tratada com enoxiparina e varfarina. Esta suspensão durante o acompanhamento ambulatorial devido à presença de hemoptise.

Em 25/08/2008, foi feito o diagnóstico de metástase óssea em quadril através de raio X e cintilografia óssea. Encaminhado para radioterapia da metástase. A cintilografia de controle, realizada em 08/09/2008, evidenciou múltiplas lesões.

PACIENTE 3:

OM, 59 anos, pardo, sexo masculino.

Data do diagnóstico: 17/12/2007

Data da progressão após a vacina: 20/04/2008

Data do óbito: 10/11/2008

Realizado o diagnóstico de adenocarcinoma de pulmão em dezembro de 2007, através de biópsia por broncoscopia, após quatro meses de história de tosse com escarro hemoptoico acompanhada por dor torácica e emagrecimento de 6 Kg no período. Ex-tabagista (40 anos/maço), havia parado de fumar há dois anos. Sem antecedente de etilismo.

Sem antecedentes pessoais, profissionais ou familiares relevantes.

Estadiamento no momento do diagnóstico: IIIB (T4N2M0).

Antígenos tumorais: CEA (grau 7).

-Esquemas terapêuticos:

O paciente foi submetido aos quatro ciclos de quimioterapia com paclitaxel e cisplatina. A radioterapia foi iniciada trinta dias após a quimioterapia. A avaliação após o tratamento convencional foi compatível com doença estável e, após 52 dias, o paciente foi submetido à imunoterapia.

QUADRO 7 - DATAS DA QUIMIOTERAPIA; PACIENTE #3.

QUIMIOTERAPIA	
ESQUEMA	PACLITAXEL+CISPLATINA
1º CICLO	21/01/2008
2º CICLO	11/02/2008
3º CICLO	03/03/2008
4º CICLO	24/03/2008

QUADRO 8 - DATAS DA RADIOTERAPIA; PACIENTE #3.

RADIOTERAPIA LOCAL	
DATA INÍCIO	23/04/2008
DATA FINAL	13/06/2008
DOSE TOTAL	6120 CGy

QUADRO 9 - DATAS DA IMUNOTERAPIA; PACIENTE #3.

IMUNOTERAPIA	
1ª APLICAÇÃO	04/08/2008
2ª APLICAÇÃO	20/08/2008

-Intercorrências durante o tratamento:

Não apresentou intercorrências durante a quimioterapia, radioterapia ou imunoterapia.

-Evolução após a imunoterapia:

A primeira tomografia computadorizada após a imunoterapia evidenciou doença estável.

O paciente evoluiu com dor torácica em região dorsal esquerda controlada com paracetamol associado à codeína (500 mg + 30 mg), via oral, 4 vezes ao dia. Óbito por progressão da doença na cidade onde residia.

PACIENTE 4:

RASL, 63 anos, branca, sexo feminino.

Data do diagnóstico: 04/01/2008

Data da progressão após a vacina: 17/06/2008

Data do óbito: 06/10/2008

Realizado o diagnóstico de adenocarcinoma mucinoso invasivo de pulmão, em janeiro de 2008, através de biópsia por broncoscopia, após história de tosse, dispneia e chiado acompanhados por febre e emagrecimento (não quantificado) há quatro meses. Sem antecedente de tabagismo e etilismo.

Sem antecedentes pessoais, profissionais ou familiares relevantes.

Estadiamento no momento do diagnóstico: IV (T4N2M1).

Antígenos tumorais: CEA (grau 7), WT1 (grau 2) e Her-2 (grau 1).

-Esquemas terapêuticos:

A paciente foi submetida aos quatro ciclos de quimioterapia com paclitaxel e cisplatina. A avaliação após o tratamento convencional foi compatível com doença estável e, após 45 dias, a paciente foi submetida à imunoterapia.

QUADRO 10 - DATAS DA QUIMIOTERAPIA; PACIENTE #4.

QUIMIOTERAPIA	
ESQUEMA	PACLITAXEL+CISPLATINA
1º CICLO	11/02/2008
2º CICLO	03/03/2008
3º CICLO	24/03/2008
4º CICLO	14/04/2008

QUADRO 11 - DATAS DA IMUNOTERAPIA; PACIENTE #4.

IMUNOTERAPIA	
1ª APLICAÇÃO	29/05/2008
2ª APLICAÇÃO	16/06/2008

-Intercorrências durante o tratamento:

Não apresentou intercorrências durante a quimio ou imunoterapia.

-Evolução após a imunoterapia:

Um dia após a aplicação da última dose da vacina, a paciente começou a apresentar piora da tosse e dispneia. A investigação clínica, laboratorial e radiológica confirmou que os sintomas eram decorrentes da progressão da doença. Encaminhada para quimioterapia de 2ª linha (Gemcitabina + Cisplatina) que foi suspensa após o 2º ciclo devido ao aparecimento de estomatite e pela piora das condições clínicas.

PACIENTE 5:

VAM, 50 anos, branca, sexo feminino.

Data do diagnóstico: 01/10/2007

Data da progressão após a vacina: 01/08/2008

Data do óbito: 13/04/2009

Realizado o diagnóstico de carcinoma epidermoide de pulmão, moderadamente diferenciado, em outubro de 2007, através biópsia por broncoscopia, após história de tosse com dispneia acompanhada por dor torácica há cerca de cinco meses. Tabagista (35 anos/maço), sem antecedente de etilismo.

Sem antecedentes pessoais, profissionais ou familiares relevantes.

Estadiamento no momento do diagnóstico: IIIB (T4N2M0).

Antígenos tumorais: CEA (grau 3) e Her-2 (grau 2).

-Esquemas terapêuticos:

A paciente foi submetida aos quatro ciclos de quimioterapia com paclitaxel e cisplatina. A radioterapia foi iniciada 50 dias após a quimioterapia. A avaliação após o tratamento convencional foi compatível com resposta parcial e, após 56 dias, a paciente foi submetida à imunoterapia.

QUADRO 12 - DATAS DA QUIMIOTERAPIA; PACIENTE #5.

QUIMIOTERAPIA	
ESQUEMA	PACLITAXEL+CISPLATINA
1º CICLO	29/10/2007
2º CICLO	26/11/2007
3º CICLO	17/12/2007
4º CICLO	14/01/2008

QUADRO 13 - DATAS DA RADIOTERAPIA; PACIENTE #5.

RADIOTERAPIA LOCAL	
DATA INÍCIO	05/03/2008
DATA FINAL	30/04/2008
DOSE TOTAL	6600 CGy

QUADRO 14 - DATAS DA IMUNOTERAPIA; PACIENTE #5.

IMUNOTERAPIA	
1ª APLICAÇÃO	25/06/2008
2ª APLICAÇÃO	10/07/2008

-Intercorrências durante o tratamento:

Não apresentou intercorrências durante a quimio, radio ou imunoterapia.

-Evolução após a imunoterapia:

Após a aplicação da vacina, a paciente evoluiu com progressão da doença, inicialmente, sem repercussão clínica. Cerca de dois meses após o término da

imunoterapia, começou a apresentar tosse seca de leve intensidade que evoluiu com piora progressiva, sendo acompanhada por dispneia e síndrome consumptiva a partir de dezembro/2008.

#### SUMÁRIO DOS RESULTADOS CLÍNICOS

O acompanhamento clínico dos pacientes foi realizado por no mínimo 8,5 meses a partir diagnóstico e quase três meses a partir de segunda dose da imunoterapia.

Dois indivíduos tiveram uma resposta parcial à terapia convencional, enquanto três apresentaram doença estável. Todos eles receberam quimioterapia e esses três foram submetidos à radioterapia adjuvante. O Paciente #2 foi submetido à imunoterapia anterior à radioterapia, os demais realizaram o tratamento convencional antes da imunoterapia.

A partir da última dose da vacina, o tempo para a progressão da doença e sobrevida variou entre 1 a 82 e 82 a 277 dias, respectivamente. Um dia depois imunoterapia, a paciente #4 apresentou piora da tosse acompanhada por dispneia progressiva que foram relacionadas à progressão da doença após o acompanhamento por exames radiológicos.

TABELA 2 - EVOLUÇÃO RADIOLOGICA DO PACIENTE 1.

<b>PACIENTE 1</b>	<b>TC DIAGNÓSTICO</b>	<b>TC PÓS 2<sup>a</sup> QT</b>	<b>TC PÓS 4<sup>a</sup> QT</b>	<b>TC PRÉ IMT</b>	<b>TC PÓS IMT</b>
<b>DATA</b>	26/10/2006	19/12/2006	16/02/2007	26/03/2007	04/06/2007
<b>Lesão alvo 1 Hilo direito</b>	50 X 37 mm	28 X 20 mm	28 X 20 mm	28 X 20 mm	60 X 56 mm
<b>Lesão alvo 2 Lesão subpleural (B10)</b>	12 mm	12 mm	12 mm	12 mm	12 mm
<b>Lesão não alvo 1 Linfonodo paratraqueal direito</b>	0	0	0	0	29 mm

TABELA 3 - EVOLUÇÃO RADIOLOGICA DO PACIENTE 2.

<b>PACIENTE 2</b>	<b>TC DIAGNÓSTICO</b>	<b>TC PÓS 3<sup>a</sup> QT</b>	<b>TC PÓS 4<sup>a</sup> QT</b>	<b>TC PÓS IMT</b>	<b>TC PÓS RT</b>
<b>DATA</b>	24/08/2007	12/12/2007	29/01/2007	13/03/2008	28/04/2008*
<b>Lesão alvo 1 Lobo Superior Direito</b>	58 X 57 mm	50 X 50 mm	35 X 56 mm	50 X 50 mm	66 x 60 mm
<b>Lesão alvo 2 Linfonodo Pré- caval</b>	0	0	0	0	13 X 9 mm

\*necrose da massa em lobo superior direito

\*\*Tomografia de 08/09/2008: destruição do lobo superior direito com nível líquido, derrame pleural à direita e presença de linfonomegalia mediastinal.

TABELA 4 - EVOLUÇÃO RADIOLOGICA DO PACIENTE 3.

<b>PACIENTE 3</b>	<b>TC DIAGNÓSTICO</b>	<b>TC PÓS 4<sup>a</sup> QT</b>	<b>TC PÓS RT</b>	<b>TC PÓS IMT</b>
<b>DATA</b>	30/11/2007	14/04/2008	31/07/2008	09/09/2008
<b>Lesão alvo 1 Lobo Superior Esquerdo</b>	70 X 85 mm	66 x 60 mm	66 X 65 mm	69 X 61 mm

TABELA 5 - EVOLUÇÃO RADIOLOGICA DO PACIENTE 5.

<b>PACIENTE 5</b>	<b>TC DIAGNÓSTICO</b>	<b>TC PÓS QT/RT</b>	<b>TC PÓS IMT (1)</b>	<b>TC PÓS IMT (2)</b>	<b>TC PÓS IMT (3)</b>
<b>DATA</b>	03/09/2007	15/05/2008	01/08/2008	11/09/2008	24/11/2008
<b>Lesão alvo 1</b>					
<b>Lobo Superior Esquerdo</b>	58 X 42 mm	9,8 X 13,5 mm	39 X 44 mm	39 X 48 mm	52 X 62 mm
<b>Lesão alvo 2</b>					
<b>Lifonodo Subcarinal</b>	32 mm	0	0	0	0

TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS E RESULTADOS DOS PACIENTES ELEGÍVEIS PARA IMUNOTERAPIA.

Paciente	Sexo	Idade	Histologia	Estadio	ECOG*	Expressão	Sequência da terapia	Dias entre as modalidades terapêuticas	Resposta ao tratamento convencional (RECIST)	Tempo para progressão a partir da quimioterapia (dias)	Tempo para progressão a partir da imunoterapia (dias)	Sobrevida a partir do diagnóstico (dias)	Sobrevida a partir da imunoterapia (dias)
1	M	61	CEC/Ad	IIIB (T4,N2)	1	HER-2 (grau 3) MAGE1(grau 5)	QT - IT	77	Resposta parcial	138	47	258	84
2	M	66	Ad	IIIB (T2,N3)	2	WT1 (grau 4) CEA (grau 6)	QT - IT - RT	38; 3	Doença estável	112	60	358	198
3	M	59	Ad	IIIB (T4,N2)	1	CEA (grau 7)	QT - RT - IT	30; 52	Doença estável	231	82	276	112
4	F	63	BAC	IV (T4,N2,M1) <sup>#</sup>	2	WT1 (grau 2) CEA (grau 7) HER-2 (grau 1)	QT - IT - QT	45; 56	Doença estável	64	1	329	82
5	F	50	CEC	IIIB (T4,N2)	1	CEA (grau 3) HER-2 (grau 2)	QT - RT - IT	51; 56	Resposta parcial	200	22	560	277

CEC, carcinoma epidermoide; Ad, adenocarcinoma; AMI, adenocarcinoma mucinoso invasivo.

\*ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group performance status.

<sup>#</sup>T4<sub>ipsi Nod</sub>, N2,M1a<sub>Cont Nod</sub>

## SEGURANÇA

Durante a quimio e radioterapia não houve evento adverso maior que grau 2. Não ocorreram eventos adversos durante a realização da leucaférese. Também não foi observada qualquer reação no local de administração da vacina, tanto por via intravenosa quanto por via subcutânea.

Um paciente (#1) apresentou reações sistêmicas após a imunoterapia, como descrito acima.

## RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS À IMUNOTERAPIA

O ensaio de linfoproliferação mostrou uma melhora na resposta imune específica após a vacinação. Esta resposta não foi de longa duração e houve uma tendência à redução que foi observada duas semanas após a segunda dose da vacina.

O padrão de resposta variou entre os indivíduos (Figuras 9 a 13). Dois pacientes (#3 e #5) expressaram uma resposta notável nos testes de linfoproliferação, mas pontual, após a primeira dose. Os pacientes #1 e #4 apresentaram uma resposta de reforço (“booster”), temporária, relacionada à segunda dose da imunoterapia.

O paciente #2 apresentou um resultado combinado das respostas acima. Houve uma resposta mais intensa após a primeira dose em relação ao antígeno WT1 e uma resposta mais expressiva, de reforço (“booster”), relacionada ao CEA.

Todos os resultados do ensaio de linfoproliferação – englobando todos os pacientes e todos os antígenos – são mostrados na Figura 14.

Estes resultados foram comparados usando o *Wilcoxon signed ranks test*. A diferença entre "D-7" e "D 14" não foi significativa ( $p = 0,135$ ). No entanto, a diferença foi significativa entre "D -7" e "D 28" ( $p = 0,005$ ) e entre "D -7" e "D 43" ( $p = 0,002$ ).

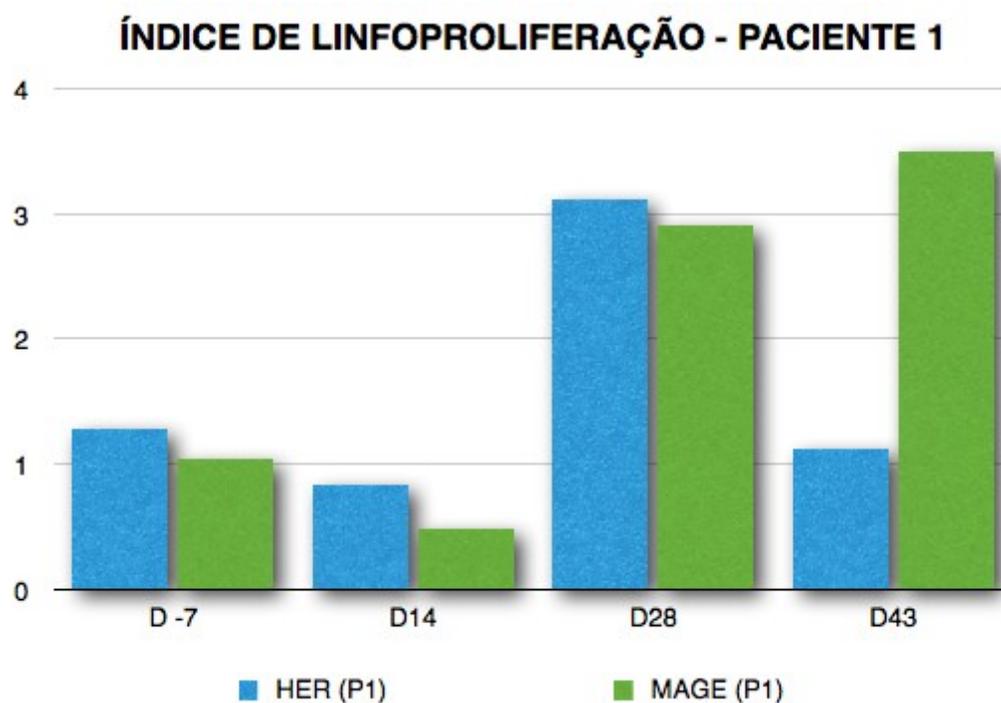


FIGURA 9 - ÍNDICE DE LINFOPROLIFERAÇÃO DO PACIENTE #1.

### ÍNDICE DE LINFOPROLIFERAÇÃO - PACIENTE 2

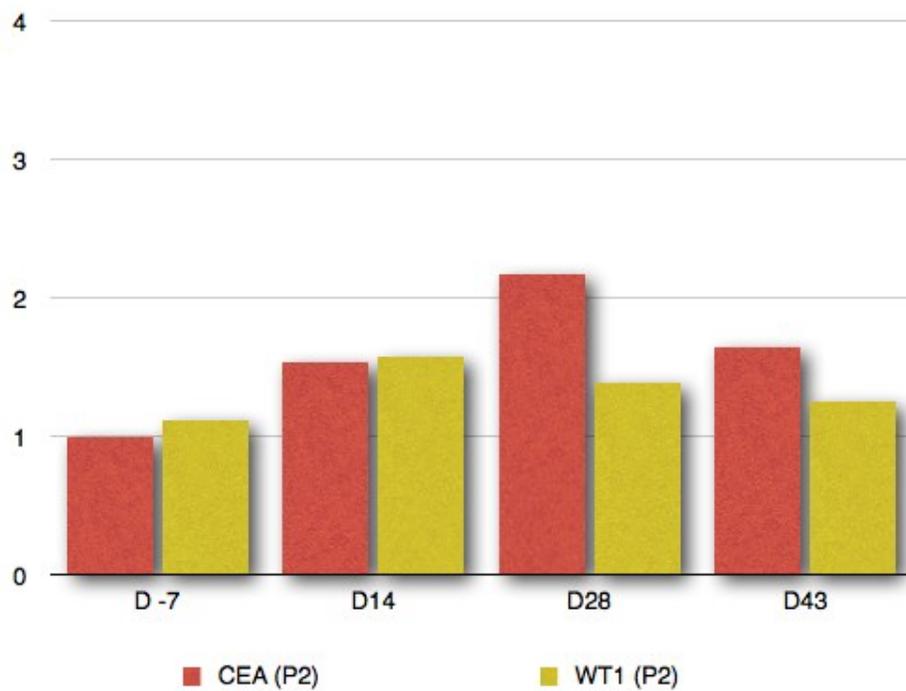


FIGURA 10 - ÍNDICE DE LINFOPROLIFERAÇÃO DO PACIENTE #2.

### ÍNDICE DE LINFOPROLIFERAÇÃO - PACIENTE 3

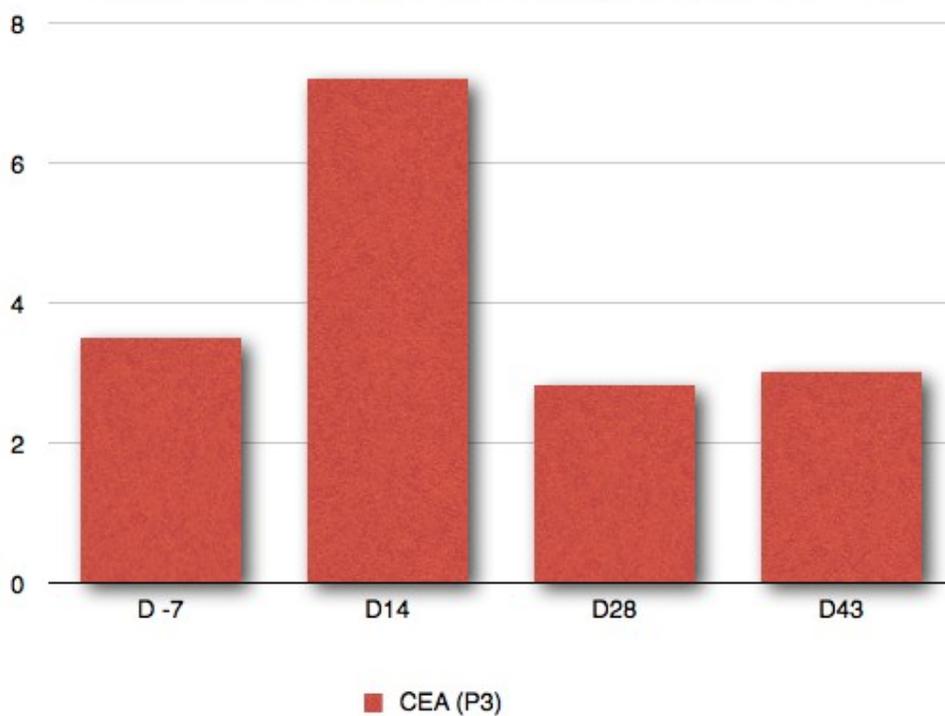


FIGURA 11 - ÍNDICE DE LINFOPROLIFERAÇÃO DO PACIENTE #3.

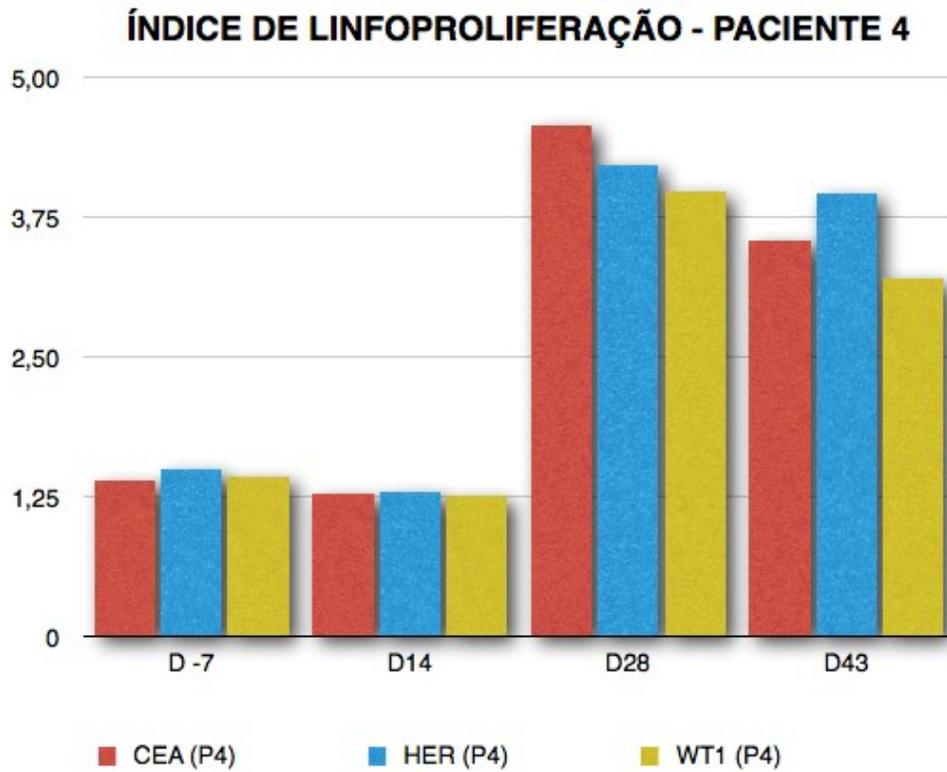


FIGURA 12 - ÍNDICE DE LINFOPROLIFERAÇÃO DO PACIENTE #4.

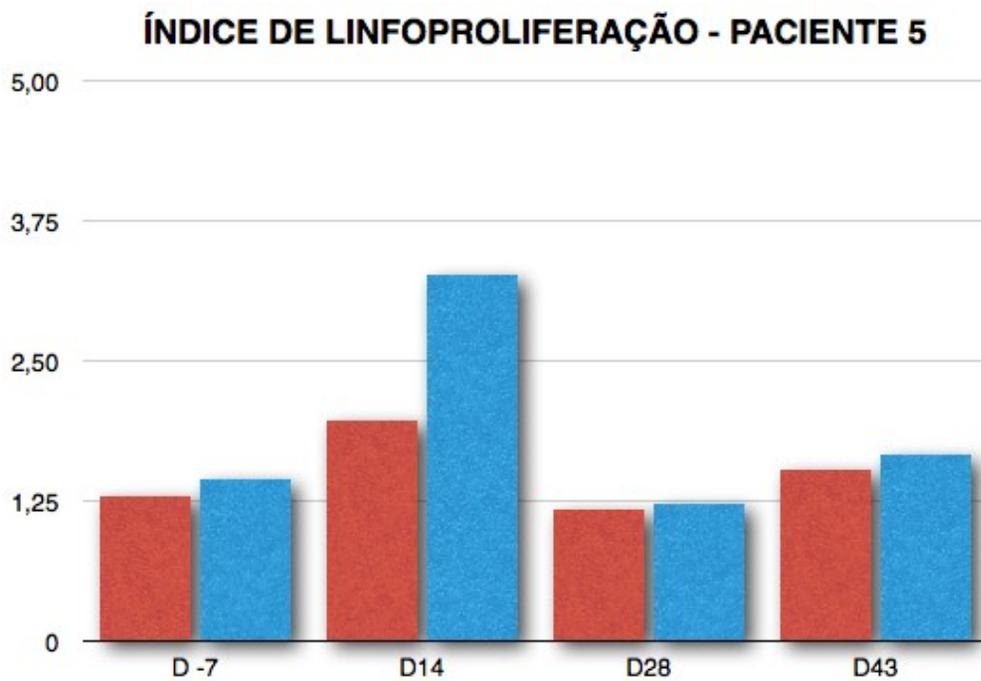


FIGURA 13 - ÍNDICE DE LINFOPROLIFERAÇÃO DO PACIENTE #5.

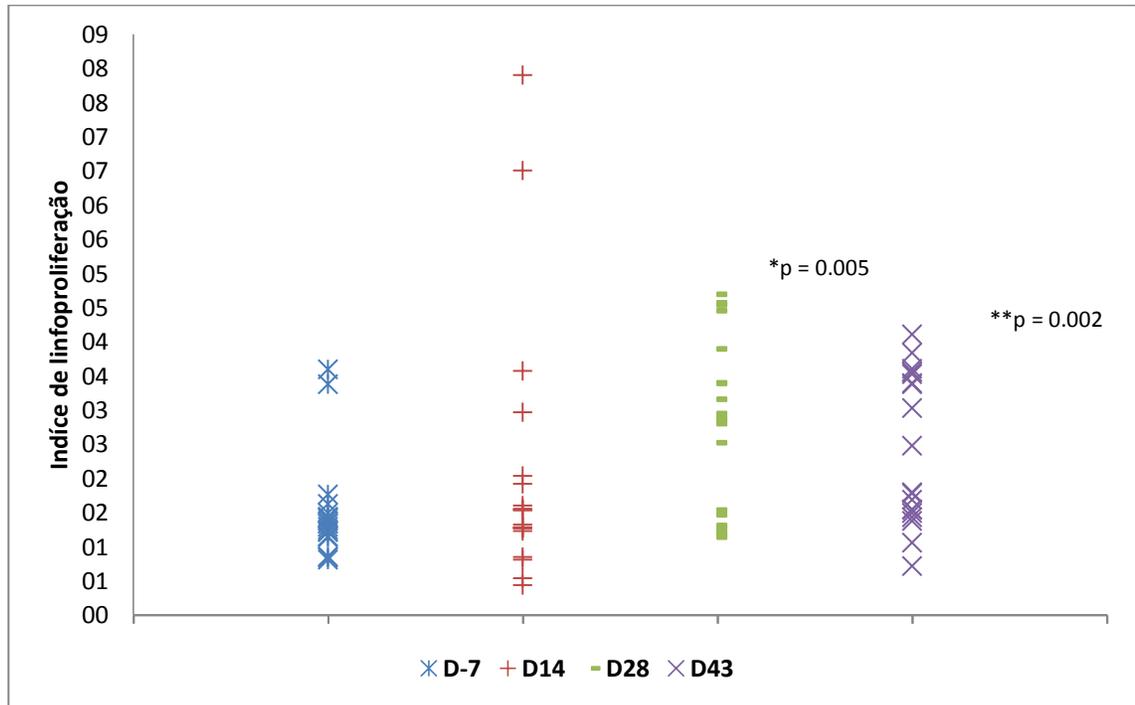


FIGURA 14 - Comparação das respostas imunológicas de todos os pacientes e todos os antígenos.

Wilcoxon signed ranks test. "D -7" (mediana = 1,33; Min = 0,81; Max = 3,59); "D 14 "(mediana = 1,42; Min = 0,44; Max = 7,90);" D 28 "(mediana = 2,86; Min = 1,13; Max = 4,68), "D 43" (mediana 2,13; Min = 0,72; Max = 4.10). A diferença foi significativa entre "D -7" e "D 28" (\* p = 0,005) e "D-7" e "D-43" (\*\* p = 0,002).

## DISCUSSÃO

Apesar dos avanços em quimioterapia e radioterapia, a taxa de sobrevivência de 5 anos melhorou apenas 3% (13 a 16,2%) entre 1975 e 2002 (ALTEKRUSE *et al.*, 2010). Este fato está relacionado, principalmente, a inexistência de um método de triagem eficiente para o diagnóstico precoce de neoplasia pulmonar, além de demonstrar que novas modalidades são necessárias para o manejo da terapêutica do câncer de pulmão.

Por outro lado, há paciente com diagnóstico precoce que apresenta recaída precoce e evolução para morte mesmo depois de uma aparentemente remoção cirúrgica completa do tumor, com níveis indetectáveis de carga tumoral residual e sem sinais de metástase. Uma das razões para a precisão aparentemente limitada dos métodos de estadiamento convencionais (histopatológicos e radiológicos), usados para prever a evolução da doença, pode decorrer do fato deles considerarem a progressão tumoral como um processo autônomo focado apenas no comportamento das células neoplásicas. Estes métodos não avaliam a evolução do câncer como um equilíbrio de fatores que podem propiciar ou suprimir o crescimento do tumor (BINDEA *et al.*, 2010). Por outro lado, o impacto da resposta imune e dos mecanismos de escape tumoral no desenvolvimento de metástases e no prognóstico dos pacientes ainda são mal compreendidos (MLECNIK *et al.*, 2011).

O uso da imunoterapia adjuvante, após a terapia convencional definitiva, seria a via terapêutica ideal fundamentada na resposta antígeno específica do sistema imunológico e no perfil de segurança já descrito para o uso de vacinas em pacientes com câncer (HIRSCHOWITZ, EA *et al.*, 2006). Entretanto, há inúmeras

variáveis relacionadas ao paciente e à vacina que podem ser relevantes para o efeito terapêutico pleno e, ao nível local, a resistência imunológica do tumor às células imunes efetoras constitui uma limitação potencial à eficácia da imunoterapia (HIRSCHOWITZ, E, 2004). As células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, desempenham um papel importante na indução de uma resposta imune e o desequilíbrio dentro do tumor na proporção de macrófagos, células dendríticas imaturas e maduras pode afetar, significativamente, a resposta imunológica à neoplasia (BALEIRO *et al.*, 2008).

Apesar de haver numerosos ensaios clínicos para vários tipos de câncer, existem poucos estudos de vacinas de células dendríticas em pacientes com câncer de pulmão e muitos aspectos relacionados com a imunoterapia, como dose máxima, esquema de administração, resposta e segurança, são desconhecidos.

A escolha dos antígenos a serem utilizados constitui um passo relevante para a resposta imunológica à vacina e para a eficácia terapêutica (HIRSCHOWITZ, E, 2004). Primeiro, é essencial avaliar se a resposta imune ao tumor será capaz de destruir as células neoplásicas e preservar as células normais. O segundo critério é o estado do antígeno no tumor. Uma resposta imune a um antígeno tumor específico pode ser irrelevante se a célula tumoral sofreu mutação e não expressa mais este antígeno (FINN, 2008).

Vacinas produzidas de forma personalizada com derivados do tumor, como de preparações obtidas do tumor todo (células tumorais apoptóticas ou necróticas, ou lisados tumorais) podem ser interessantes por conterem um grande número de

antígenos, conhecidos e desconhecidos, permitindo a estimulação de uma resposta imune policlonal (BERNTSEN *et al.*, 2008; FIELDS *et al.*, 1998; GRUIJL, DE *et al.*, 2008; O'ROURKE *et al.*, 2003). Desta forma, a “marcação” das células dendríticas com todas as células tumorais mortas tem a vantagem teórica de que, essencialmente, todos os componentes antigênicos do tumor poderiam ser apresentados ao sistema imunológico, além de ser específica para cada paciente (JANIKASHVILI *et al.*, 2010). Porém, o risco de desenvolvimento de resposta autoimune é uma preocupação a ser considerada com o uso de material retirado da neoplasia (BOS *et al.*, 2008; FINN, 2008; GILBOA, 2001; THOMAS-KASKEL *et al.*, 2007).

O uso de tumor alogênico para produzir uma vacina multivalente permite a imunização de indivíduos que não possuem tumor autólogo para a elaboração da vacina. Além de simplificar a execução do protocolo, o uso de vacinas com antígenos padronizados facilita a comparação das reações imunológicas em um grupo heterogêneo de pacientes. A desvantagem deste método é que os antígenos selecionados podem não ser relevantes para todos os pacientes (HIRSCHOWITZ, E, 2004; HIRSCHOWITZ, E *et al.*, 2007).

Neste estudo foram utilizados os antígenos MAGE-1, Her-2/neu, CEA e WT1 por serem expressos em diversas neoplasias, incluindo carcinoma pulmonar de células não pequenas, e serem capazes de estimular respostas de células T específicas em humanos em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Essas proteínas não são expressas ou são muito pouco expressas em tecidos normais (ATANACKOVIC *et al.*, 2004; BERINSTEIN, 2002; DISIS *et al.*, 2002; GODELAINE *et al.*, 2003;

KEILHOLZ, U *et al.*, 2005; KRUIT *et al.*, 2005; LIU, KJ *et al.*, 2004; MORSE, MICHAEL A *et al.*, 2005; OJI, Y *et al.*, 2004; OJI, YUSUKE *et al.*, 2002; OKA, YOSHIHIRO *et al.*, 2004; OKADA *et al.*, 2004; PELLEGRINI *et al.*, 2003; SOTIROPOULOU *et al.*, 2003; TSUBOI, AKIHIRO *et al.*, 2004).

Desde a identificação do primeiro gene MAGE humano em 1991, o número de genes da família MAGE cresceu para mais de 25 genes. O MAGE-A é uma família multigênica formada por 12 genes homólogos MAGE-A1 a MAGE-A12 localizado no cromossoma Xq28 (CHINNASAMY *et al.*, 2011). A frequência dos subtipos de MAGE varia em diferentes regiões do mundo (KARIMI *et al.*, 2012). Entre 14 e 60% dos pacientes com carcinoma pulmonar expressam MAGE (ATANACKOVIC *et al.*, 2004; CHINNASAMY *et al.*, 2011; KARIMI *et al.*, 2012; YANAGAWA *et al.*, 2011)- e respostas imunes específicas foram evidenciadas em pacientes com essa neoplasia após a vacinação com peptídeos derivados dessa proteína (ATANACKOVIC *et al.*, 2004). O antígeno Her-2/neu é uma glicoproteína transmembrana possivelmente correlacionada ao potencial de invasão tumoral ou ao seu potencial de metastático, sendo superexpresso em cerca de 25% dos casos de adenocarcinoma pulmonar (LUDOVINI *et al.*, 2008; PELLEGRINI *et al.*, 2003; TAKENAKA *et al.*, 2011) e infrequente no carcinoma epidermóide (TAKENAKA *et al.*, 2011). Tem sido demonstrada a presença de linfócitos T específicos para o antígeno Her-2/neu em pacientes com câncer, indicando que a tolerância ao Her-2/neu é incompleta e o aumento da resposta imune pode promover um ataque expressivo contra as células tumorais (SOTIROPOULOU *et al.*, 2003). Linfócitos T específicos pré-existentes também têm sido observados

para o antígeno carcinoembrionário (CEA), que é expresso em 62% dos pacientes com adenocarcinoma de pulmão, sendo que 76,9% destes apresentam alta expressão dessa proteína (LIU, KJ *et al.*, 2004; OKADA *et al.*, 2004). Alguns estudos sugerem que esse antígeno esteja envolvido no processo de invasão e metástase ou atuando na inibição da apoptose através da perda do contato com a matriz extracelular (BLUMENTHAL *et al.*, 2005). Uma proteína que também provavelmente exerce uma função oncogênica, é o WT1, a proteína do tumor de Wilm, um fator de transcrição, provavelmente relacionado com a proliferação e diferenciação celular, expresso em 96% das neoplasias de pulmão (OJI, YUSUKE *et al.*, 2002). A vacinação de pacientes com várias neoplasias, incluindo câncer de pulmão, com peptídeos derivados dessa proteína induziu linfócitos T citotóxicos específicos ao WT1 e a redução da massa tumoral sem danos aos tecidos normais (OKA, YOSHIHIRO *et al.*, 2004).

A alta frequência de expressão dessas proteínas em tecidos neoplásicos de carcinoma pulmonar, a ausência ou pouca expressão delas em tecidos normais, a comprovação das suas capacidades em estimular resposta imune citotóxica específica *in vitro* e *in vivo* e a ausência de toxicidade das vacinas humanas que utilizaram essas proteínas como alvos imunoterapêuticos, justificam a inclusão de peptídeos derivados dessas proteínas para a preparação da vacina com células dendríticas seguindo o protocolo realizado nesse estudo.

Neste protocolo foi produzida uma vacina polivalente, individualizada para cada paciente, de acordo com expressão antigênica do tumor analisada por imunistoquímica em amostras da lesão neoplásica coletadas para o diagnóstico

histológico. O uso de uma vacina polivalente tem como objetivo melhorar os resultados da imunoterapia através da indução de um amplo repertório de células T antígeno-específica (BERNTSEN *et al.*, 2008; CRANMER *et al.*, 2004; LESTERHUIS *et al.*, 2004). As células tumorais podem perder antígenos ao longo do tempo e apresentar uma susceptibilidade reduzida à imunidade induzida pela vacina durante o curso de vacinação. O uso de vacinas polivalentes pode ser uma estratégia em potencial para evitar esse fenômeno (BERNTSEN *et al.*, 2008).

Entretanto, essa abordagem possui dois pontos de fragilidade, relacionados ao momento da análise dos antígenos tumorais, que podem resultar em uma resposta imunológica menos acentuada. Primeiro, a análise foi realizada em amostras da lesão neoplásica coletadas por broncoscopia e nem todos os tumores pulmonares são homogêneos quanto ao tipo histológico e, por isso, podem apresentar variações antigênicas de acordo com a topografia da lesão (biópsia). O carcinoma adenoescamoso pode corresponder de 0,5 a 2,6% dos casos de câncer de pulmão e cerca de 10% dos carcinomas de pequenas células podem conter outro componente histológico do grupo do carcinoma de não pequenas células (TRAVIS, WD *et al.*, 2000). Segundo, o perfil antigênico do tumor pode mudar, como resultado do crescimento durante o tratamento convencional, e tornar-se insensível à terapia alvo inicial (tumor-antígeno) (BERNTSEN *et al.*, 2008; UM *et al.*, 2010). A metodologia e o perfil dos antígenos que apresentam a melhor resposta terapêutica ainda não foram determinados.

A definição do processo de maturação das células dendríticas é de extrema importância para alcançar a resposta imunológica. Neste protocolo foi optado pela

aplicação de células dendríticas maduras, pois estas demonstram um poder maior de induzir a resposta antitumoral.

As células dendríticas imaturas são consideradas como responsáveis pelo processo de reconhecimento e captura de antígeno e por induzir tolerância (LESTERHUIS *et al.*, 2008; RABINOVICH *et al.*, 2007; THOMAS-KASKEL *et al.*, 2007). Ao receber sinais de maturação (e.g. citocinas pró-inflamatórias, interação com linfócitos T e interação com patógenos), estas células mudam o seu repertório de receptor de quimiocina, sofrem regulação positiva de moléculas coestimulatórias e adquirem a capacidade de migrar para linfonodos e ativar células T (HUGUES, 2010; LESTERHUIS *et al.*, 2008).

Há dados que demonstram que células dendríticas imaturas podem inibir a imunidade das células T ou mesmo induzir tolerância contra um dado antígeno *in vitro* e *in vivo* (STEINMAN, R. M. *et al.*, 2003). Em uma meta-análise de dez estudos em pacientes com melanoma, o resultado foi melhor com células dendríticas maduras (MCILROY; GREGOIRE, 2003). Em estudos comparativos de células dendríticas imaturas e maduras marcadas com peptídeo, somente as células dendríticas maduras foram capazes de induzir imunidade antígeno-específica e resposta clínica em pacientes com melanoma submetidos à vacinação (JONULEIT *et al.*, 2001; VRIES, DE; LESTERHUIS; *et al.*, 2003). A menor resposta imunológica obtida com células dendríticas imaturas pode estar relacionada com uma migração ineficiente destas células nas vacinas marcadas (pulsadas) com antígenos (HIRSCHOWITZ, E *et al.*, 2007).

Por outro lado, Hirschowitz e colaboradores encontraram respostas imunológicas semelhantes em protocolos de vacinação com células maduras e imaturas, em pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células, e propuseram a hipótese de que células dendríticas imaturas pulsadas com células tumorais apoptóticas podem completar o processo de maturação de forma efetiva e apresentar antígenos *in vivo* (HIRSCHOWITZ, E, 2004; HIRSCHOWITZ, E *et al.*, 2007).

O processo de maturação é altamente complexo e diferentes estímulos para maturação não conduzem a uma célula dendrítica comum. De fato, há uma grande quantidade de diferentes tipos de células dendríticas maduras que exercem funções diferentes que vão desde a indução de fortes respostas tipo Th1 à indução de tolerância (LESTERHUIS *et al.*, 2008).

Este estudo foi realizado com duas alíquotas de  $5 \times 10^7$  células para cada dose, uma por via intradérmica e outra por via subcutânea, sendo duas doses com intervalo de duas semanas. Ainda não há uma posologia definida para a imunoterapia com células dendríticas. Esta dose é similar à de outros estudos que usaram doses variando entre 8,2 e  $10 \times 10^7$  células (AVIGAN *et al.*, 2007; HIRSCHOWITZ, E, 2004; HIRSCHOWITZ, E *et al.*, 2007), mas as doses utilizadas variaram de  $0,1 \times 10^7$  a  $320 \times 10^7$  células por administração nos estudos publicados (AVIGAN *et al.*, 2007; BAEK *et al.*, 2011; BRAY *et al.*, 2011; BURCH *et al.*, 2004; CHU, C. S. *et al.*, 2011; GOWANS *et al.*, 2010; HIRSCHOWITZ, E, 2004; HIRSCHOWITZ, E *et al.*, 2007; JÄHNISCH *et al.*, 2010; KIMURA *et al.*, 2011; THOMAS-KASKEL *et al.*, 2006; UM *et al.*, 2010). Um estudo demonstrou que a

dose de  $1,2 \times 10^7$  células não atingiu a dose máxima tolerável(UM *et al.*, 2010). Protocolos de dose em ensaios clínicos têm comprovado a constatação de que a imunidade mediada por células dendríticas é um mecanismo "liga/desliga", em vez de um fenômeno dose-resposta, desta forma, um número crescente de células apresentadoras de antígenos não afeta a magnitude da resposta dos linfócitos T citotóxicos (CTL) (KIM, W.; LIAU, 2010).

Assim como a dose, também não há um intervalo entre doses e um número padronizado de doses como ideais para a imunoterapia. Nos estudos publicados, o intervalo entre doses varia entre 2, 3, 4 e 6 semanas, sendo que o intervalo de 2 semanas é o mais comum. Já o número de doses varia de 2 a 22 administrações (UM *et al.*, 2010; HIRSCHOWITZ, E *et al.*, 2007; HIRSCHOWITZ, E, 2004; THOMAS-KASKEL *et al.*, 2006; BAEK *et al.*, 2011; CHU, C. S. *et al.*, 2011; BRAY *et al.*, 2011; KIMURA *et al.*, 2011; GOWANS *et al.*, 2010; KIM, W.; LIAU, 2010). Aparentemente, não há uma quantidade mínima para a indução de resposta imunológica, pois esta foi observada em estudos que utilizaram duas e três administrações (HIRSCHOWITZ, E, 2004; HIRSCHOWITZ, E *et al.*, 2007; UM *et al.*, 2010).

Os padrões de reatividade variaram entre os indivíduos (Figuras 9 a 13). Dois pacientes expressaram uma reação imunológica significativa após a primeira dose; outros dois apresentaram uma resposta de reforço ("*booster*") após a segunda dose e um deles apresentou resposta mista. O ensaio de linfoproliferação mostrou uma melhora na resposta imune específica após a imunização (Figura 14). No entanto, esta resposta não foi de longa duração e, duas semanas após a

administração da segunda dose da vacina, houve uma tendência à redução. Este achado é consistente com outros estudos que mostraram uma resposta de reforço (“*booster*”) em imunizações subsequentes (HIRSCHOWITZ, E, 2004; HIRSCHOWITZ, E *et al.*, 2007; LOU *et al.*, 2004; PARK, M.-Y. *et al.*, 2007). O aumento do número de aplicações melhora a imunidade contra o tumor com respostas mais rápidas e mais intensas das células T CD8<sup>+</sup> quando comparadas às respostas obtidas após a primeira dose (LOU *et al.*, 2004; PARK, M.-Y. *et al.*, 2007). A tendência para voltar à linha de base após um aumento de células T reativas pode ser visto como uma resposta transitória (HIRSCHOWITZ, E *et al.*, 2007), associada a um ambiente intratumoral que induz a imunossupressão. Este fato sugere que o protocolo de vacinação deve ser atividade repetitiva, pois múltiplas doses podem ser necessárias para alcançar a eficácia clínica.

Devido à falta de estudos controlados, o tempo e a frequência de administração da vacina de células dendríticas permanecem em grande parte com base na experiência empírica e vão exigir estudos futuros para determinar um esquema ideal (KIM, W.; LIAU, 2010).

O local da administração da vacina com células dendríticas tem importância fundamental por dois motivos. Primeiro, porque diferentes vias levam ao acúmulo de células dendríticas vacinais em sítios distintos (LESTERHUIS *et al.*, 2008). Segundo, porque essas células devem migrar para os órgãos linfoides secundários para a apresentação de antígenos às células T. Na maioria dos protocolos de vacinação, as células dendríticas são inoculadas por via intradérmica ou subcutânea (JANIKASHVILI *et al.*, 2010). Estas vias podem limitar

substancialmente a eficiência da vacina, pois apenas 2-10% das células alcançam os gânglios linfáticos (JANIKASHVILI *et al.*, 2010; VRIES, DE; KROOSHOOP; *et al.*, 2003). Porém, vários estudos em humanos evidenciaram que a migração após a inoculação por via subcutânea é muito menor do que a por via intradérmica (MORSE, M A *et al.*, 1999; RIDOLFI, R. *et al.*, 2004; TRAKATELLI *et al.*, 2006; VRIES, DE; KROOSHOOP; *et al.*, 2003).

Fong e colaboradores compararam a vacinação com DC injetada através de três vias diferentes em pacientes com câncer de próstata avançado: injeção intradérmica, intravenosa e intralinfática. Respostas antígeno específicas de células T foram observadas independentemente da via de administração, embora a produção IFN- $\gamma$  após estimulação antigênica *in vitro* só foi demonstrada nos pacientes vacinados por via intradérmica e intralinfática. No entanto, a resposta humoral (anticorpos) mais acentuada ocorreu pela via intravenosa (FONG *et al.*, 2001). Outro estudo demonstrou que a injeção intravenosa de DC é essencial para a resposta imune contra metástases viscerais de melanoma, enquanto que a administração por via subcutânea é necessária para metástases não viscerais (MULLINS *et al.*, 2003). Adema e colaboradores observaram que há uma absorção pulmonar transitória das células dendríticas após a injeção intravenosa, seguida pela redistribuição para o fígado, baço e medula óssea. Já a vacinação por via subcutânea ou intradérmica melhora a migração das células dendríticas para os linfonodos. Portanto, a combinação de diferentes vias de administração pode ser benéfica para atingir o tumor em diferentes locais do corpo (ADEMA *et al.*, 2005).

Apesar da dose elevada, a vacina foi bem tolerada como já fora observado em muitos estudos (AVIGAN *et al.*, 2007; BERNTSEN *et al.*, 2008; HIRSCHOWITZ, E, 2004; HIRSCHOWITZ, E *et al.*, 2007; UM *et al.*, 2010), mesmo em um estudo realizado em indivíduos infectados Vírus da Hepatite C (HCV) (GOWANS *et al.*, 2010). Dados de literatura demonstram que os eventos adversos associados à imunoterapia com células dendríticas são, habitualmente, leves (grau 1 ou 2; CTCAEv3), autolimitados e com predomínio de reações no local de aplicação, fadiga, febre, prurido, rash, mialgia, cefaléia e sintomas semelhantes à gripe (AVIGAN *et al.*, 2007; BAEK *et al.*, 2011; BERNTSEN *et al.*, 2008; BRAY *et al.*, 2011; CHU, C. S. *et al.*, 2011; HIRSCHOWITZ, E, 2004; HIRSCHOWITZ, E *et al.*, 2007; KIM, W.; LIAU, 2010; KIMURA *et al.*, 2011; THOMAS-KASKEL *et al.*, 2007; UM *et al.*, 2010). A ausência de toxicidade significativa é de extrema importância para este grupo de pacientes, pois estes são geralmente idosos e fragilizados pela neoplasia (KRUG *et al.*, 2010).

Não foi observada nenhuma reação no local de aplicação da vacina. Em relação aos eventos sistêmicos, um paciente apresentou fadiga, calafrios, pancitopenia e hiponatremia cinco dias após a primeira dose da vacina. Normalmente, as reações sistêmicas ocorrem 24 a 48 horas após a aplicação da imunoterapia (HIRSCHOWITZ, E, 2004; MCNEEL *et al.*, 2009). Por este motivo, foi feita a hipótese de que o paciente desenvolveu uma infecção que não pode ser comprovada porque as culturas bacterianas e os testes virais foram negativos.

A resposta imunológica mensurada pelos testes de linfoproliferação não foram acompanhados por resposta clínica, sendo este o padrão de resultado em

outros estudos (BERNTSEN *et al.*, 2008; FINN, 2008; HIRSCHOWITZ, E, 2004; HIRSCHOWITZ, E *et al.*, 2007; ROSENBERG, S. *et al.*, 2004; UM *et al.*, 2010). Três pacientes tiveram uma sobrevida maior do que a média esperada para seu estadio TNM. Dois destes (pacientes # 4 e # 5) tiveram uma sobrevida quase duas vezes maior do que a média esperada e foram os únicos que expressaram os antígenos HER-2 e CEA concomitantemente. Embora o pequeno tamanho da amostra impeça a avaliação dos efeitos terapêuticos e que qualquer resultado pode ser devido ao acaso, não podemos excluir que estes resultados clínicos possam indicar algum sinal de eficácia terapêutica.

Um ponto a ser avaliado é que os critérios convencionais do RECIST nem sempre podem ser o parâmetro mais apropriado para avaliar a resposta clínica e decidir qual vacina será a mais adequada para ser testada em grandes estudos clínicos, pois a resposta imune induzida pela imunoterapia irá levar algum tempo para se tornar clinicamente aparente e seria aceitável uma pequena progressão inicial (HOOS *et al.*, 2007). Na verdade, indução imunológica adequada poderia, teoricamente, provocar primeiro um alargamento das lesões tumorais devido à infiltração de células T e inflamação local (LESTERHUIS *et al.*, 2008).

A maioria dos estudos com vacina de células dendríticas são de fase I e fase II que englobam apenas indivíduos com doença avançada, sem perspectivas de melhora com as terapias convencionais e, portanto, elegíveis para protocolos experimentais. Este pode ser um dos motivos principais para a falta de eficácia clínica nos estudos com imunoterapia. Pacientes com doença extensa e rapidamente progressiva tem tumores que são mais resistentes à terapia e,

teoricamente, a capacidade de estabelecer uma resposta imune com potencial clínico é bem menos provável (BERNTSEN *et al.*, 2008; LESTERHUIS *et al.*, 2008; UM *et al.*, 2010).

Devido ao uso generalizado de quimioterapia para o tratamento da maioria das neoplasias malignas, é racional projetar abordagens combinadas utilizando vacinas e agentes quimioterápicos padrões (PALENA; SCHLOM, 2010). Esta integração é um desafio devido aos efeitos imunossupressivos da maioria dos tratamentos convencionais (FINN, 2008).

Apesar do sucesso limitado de vacinas contra o câncer humano, observações intrigantes em estudos clínicos de fase I/II revelaram altos índices de respostas clínicas objetivas quando a imunoterapia foi combinada com quimioterapia (APETOH *et al.*, 2011) e resultados semelhantes foram observados quando associada à radioterapia (HUANG *et al.*, 2007; PALENA; SCHLOM, 2010; TEITZ-TENNENBAUM *et al.*, 2003, 2008).

A combinação de quimioterapia ou radioterapia e a imunoterapia pode ser vantajoso porque a morte de células tumorais fornece antígenos tumorais em um ambiente inflamatório, que por sua vez pode induzir a maturação de células dendríticas, contribuindo para a resposta imune induzida pela vacina (THOMAS-KASKEL *et al.*, 2007). Além de promover a ativação de células dendríticas, a quimioterapia pode modular o fenótipo das células tumorais tornando-as mais suscetíveis a morte imuno mediada (PALENA; SCHLOM, 2010). A radioterapia pode, sem induzir citotoxicidade, melhorar a capacidade das células dendríticas

para capturar antígenos tumorais, migrar para o linfonodo de drenagem e apresentar antígenos processados às células T (TEITZ-TENNENBAUM *et al.*, 2008). Portanto, a resposta geral do paciente à quimioterapia ou radioterapia não é apenas decorrente dos efeitos citotóxicos diretos, mas também da resposta imunológica contra o tumor (APETOH *et al.*, 2011). A figura 15 resume as intervenções que podem potencializar a eficácia da vacina de células dendríticas.

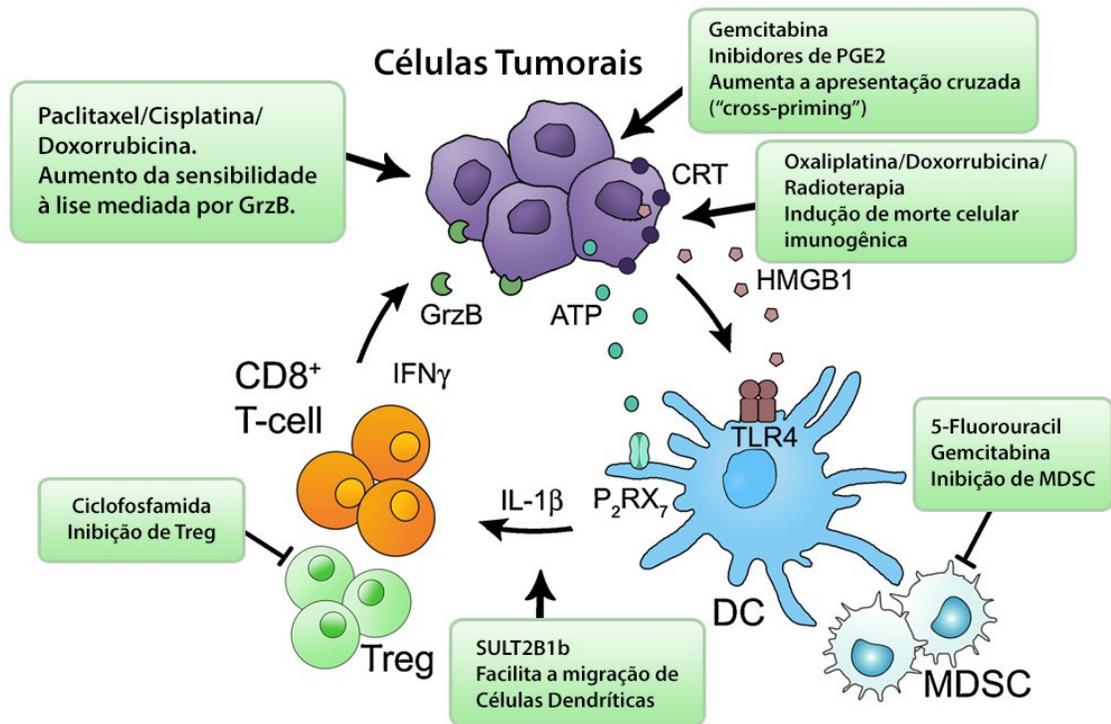


FIGURA 15 - INTERVENÇÕES TERAPÊUTICAS PARA MELHORAR A EFICÁCIA DAS VACINAS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS.

Terapias antineoplásicas como oxaliplatina, antraciclina ou radioterapia podem aumentar a fagocitose e a apresentação cruzada de antígenos tumorais pelas células dendríticas, resultando na liberação de interferon pelas células T CD8<sup>+</sup> e na resposta imune contra o tumor. A resposta imune contra o tumor através da DC pode ainda ser potencializada pela ciclofosfamida e 5-fluorouracil que selectivamente eliminam, respectivamente, Treg e MDSC. O paclitaxel e cisplatina também sensibilizam células tumorais para células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> através de um aumento da permeabilidade à granzima b (Grzb). Finalmente, as funções das DCs também podem ser restauradas através da prevenção do acúmulo de lipídios pela inibição da carboxilase acetil-coa e/ou pelo bloqueio da síntese de colesterol com sult2b1b que restaura a migração DC. Adaptado de Apetoh et al, 2011.

Antonia e colaboradores compararam os resultados da quimioterapia seguida pela imunização com uma vacina de células dendríticas marcadas com o gene *p53* com os resultados do tratamento apenas com quimioterapia em pacientes com carcinoma de pulmão de pequenas células. A imunoterapia foi realizada 8 semanas após o término da quimioterapia. O tratamento quimioterápico de segunda linha foi aplicado aos pacientes que apresentaram progressão tumoral. Inesperadamente, a resposta à quimioterapia de segunda linha foi muito melhor nos pacientes que receberam a vacina, alcançando 61,9% de resposta clínica objetiva (resposta completa + resposta parcial) entre esses pacientes quando, habitualmente, é esperada uma resposta em torno de 8% dos pacientes (ANTONIA *et al.*, 2006).

Apesar de não encontrar diferença estatística significativa, Kimura e colaboradores observaram uma sobrevida maior entre pacientes com neoplasia de pâncreas tratados com a associação de imunoterapia com células dendríticas e gemcitabina quando comparados aos pacientes tratados apenas com a imunoterapia e S-1 (forma oral da 5-fluorouracil), respectivamente, média de 360 dias contra 168 dias (KIMURA *et al.*, 2011). A gemcitabina apresenta várias ações favoráveis à resposta imunológica. Apesar de induzir a leucopenia como evento adverso, a gemcitabina não afeta a função linfocitária e é capaz de aumentar o número de células dendríticas circulantes no sangue, além de promover a ativação destas (SOEDA *et al.*, 2009). Suzuki e colaboradores demonstraram que a gemcitabina regula os efeitos imunológicos moduladores e pode promover a ativação de respostas imunológicas antitumorais (SUZUKI, E. *et al.*, 2007), além

de suprimir a atividade de células supressoras derivadas da medula e de inibir a supressão imunológica associada ao tumor (SUZUKI, E. *et al.*, 2005).

Agentes anticancerígenos também pode aumentar a resposta antitumoral através da eliminação de células imunossupressoras. Na ausência de adjuvantes, exossomos de células dendríticas (DEX) podem mediar efeitos antitumorais antígeno-específicos potentes contra tumores pré-estabelecidos em ratos previamente tratados com baixa dose de ciclofosfamida. A ciclofosfamida aboliu a imunossupressão causada pelas células T reguladoras  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ , promoveu as respostas secundárias de CTL induzido por vacinas DEX e agiu em sinergia com DEX para evitar o crescimento de melanoma em ratos (TAIEB *et al.*, 2006). A gemcitabina é capaz de reduzir a imunossupressão induzida pelo tumor através de MDSC e de aumentar a apresentação cruzada de antígeno (NOWAK *et al.*, 2003). O 5-fluorouracil (5FU), um análogo da pirimidina que é utilizado rotineiramente no tratamento de câncer de cólon e de mama, tem ação citotóxica seletiva sobre MDSC sem efeitos sobre as células dendríticas convencionais, NK, linfócitos T e B. A supressão de MDSC pela 5FU leva ao aumento da produção  $IFN-\gamma$  por células T  $CD8^+$  intratumorais e da imunidade contra o tumor (VINCENT *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, vários estudos sobre imunoterapia em câncer foram publicados com grande avanço no conhecimento da fisiopatologia das células dendríticas em pacientes com neoplasia maligna. Entretanto, a análise comparativa dos resultados destes estudos é extremamente difícil devido à falta de padronização de técnicas e procedimentos operacionais (DOHNAL *et al.*, 2008;

THOMAS-KASKEL *et al.*, 2007). Além da questão técnica, as autoridades regulatórias em todo o mundo estão começando a focar suas ações sobre a biotecnologia e deverão aumentar a regulação governamental sobre esta área. Por esses motivos, a elaboração de padrões de boas práticas (GMP – *Good Manufacturing Practice*) é essencial para o desenvolvimento da imunoterapia para tratamento de câncer (DOHNAL *et al.*, 2008; FIGDOR *et al.*, 2004).

Além de padronizar as técnicas e procedimentos, é necessário estabelecer o padrão ideal de estudo clínico para imunoterapia. Os protocolos convencionais de fase I, II ou III, que são aplicados no estudo das drogas citostáticas não são um modelo ideal para estudo de vacinas para o câncer (LESTERHUIS *et al.*, 2008).

O *Cancer Vaccine Clinical Trial Working Group* – representando pela academia e pelas indústrias farmacêuticas e de biotecnologia com a participação do *Food and Drug Administration* (FDA EUA) – propôs o desenvolvimento de ensaios clínicos em duas etapas para avaliação da imunoterapia em câncer: ensaio de prova de princípio e ensaio de eficácia. Os seguintes critérios foram propostos para o ensaio de princípio: deve incluir um mínimo de 20 ou mais pacientes, constituindo uma população homogênea bem definida; a doença não deve ser rapidamente progressiva, a fim de permitir que as vacinas tenham tempo suficiente para induzir a atividade imunológica; objetivos do estudo devem incluir a determinação da dose e frequência de administração; e, por fim, demonstrar a atividade imunológica como prova de princípio. Atividade imunológica é demonstrada, se determinada em dois ensaios distintos, estabelecidos e reproduzíveis em dois pontos consecutivos na linha do tempo de acompanhamento

após a avaliação inicial. Os testes de eficácia devem definir, formalmente, o benefício clínico de forma direta ou através de um desfecho alternativo (HOOS *et al.*, 2007).

Os dados atuais permitem pressupor que o protocolo de pesquisa ideal a ser desenvolvido para determinar a eficácia clínica da imunoterapia com células dendríticas em pacientes com câncer de pulmão, seguindo regras de GMP, teria como pontos fundamentais: [1] inclusão de pacientes com estágio precoce submetidos ao tratamento cirúrgico curativo; [2] administração da imunoterapia concomitante ao tratamento convencional (químico e/ou radioterapia) adjuvante; [3] uso de antígenos tumorais do próprio tumor para produção de vacina policlonal; [4] produção de vacina com células dendríticas maduras; [5] uso das vias intravenosa e intradérmica para administração da vacina; [6] administração a cada 2 semanas para manter o efeito de reforço (*booster*).

## CONCLUSÕES

1. A imunoterapia com células dendríticas maduras marcadas com antígenos tumorais próprios (vacina policlonal) em pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células é um procedimento tecnicamente viável com os recursos humanos, físicos e técnicos existentes no país.

2. A imunoterapia com células dendríticas maduras marcadas com antígenos tumorais próprios (vacina policlonal) é um procedimento seguro para o paciente, com baixa incidência de reações adversas e com predomínio de eventos não graves.

3. A imunoterapia com células dendríticas maduras marcadas com antígenos tumorais próprios (vacina policlonal) é um procedimento bem tolerado pelos pacientes, mesmo com o uso de vacinas com concentrações mais altas de células dendríticas.

4. Avaliação de segurança (perfil de benefício-risco): os dados de segurança e tolerabilidade indicam que, em pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células em estágio avançado, o uso da vacina de células dendríticas maduras marcadas com antígenos tumorais próprios (vacina policlonal) é um procedimento de baixo risco, mas não há um efeito clínico benéfico (i.e. resposta clínica) que justifique o seu uso nesta população.

5. A imunoterapia com células dendríticas maduras marcadas com antígenos tumorais próprios (vacina policlonal) produziu uma resposta imunológica identificada através da linfoproliferação com evidências de efeito de reforço (*booster*).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERLE, D.; ADAMS, A.; BERG, C. *et al.* Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 5, p. 395-409, ago 2011.

ADEMA, G.; VRIES, I. DE; PUNT, C.; FIGDOR, C. Migration of dendritic cell based cancer vaccines: in vivo veritas? **Current Opinion in Immunology**, v. 17, n. 2, p. 170-174, abr 2005.

AKASHI, K.; TRAVER, D.; MIYAMOTO, T.; WEISSMAN, I. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. **Nature**, v. 404, n. 6774, p. 193-197, 9 mar 2000.

AL-SHIBLI, K.; DONNEM, T.; AL-SAAD, S. *et al.* Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 14, n. 16, p. 5220-5227, 15 ago 2008.

ALTEKRUSE, S.; KOSARY, C.; KRAPCHO, M. *et al.* **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2007/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/), based on November 2009 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2010.** . [S.l: s.n.]. , 2010

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2012.** . Atlanta: American Cancer Society. , 2012

ANDERSON, M.; SPANDIDOS, D. Oncogenes and onco-suppressor genes in lung cancer. **Respiratory Medicine**, v. 87, n. 6, p. 413-420, ago 1993.

ANTONIA, S. J.; MIRZA, N.; FRICKE, I. *et al.* Combination of p53 cancer vaccine with chemotherapy in patients with extensive stage small cell lung cancer. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 12, n. 3 Pt 1, p. 878-887, 1 fev 2006.

APETOH, L.; LOCHER, C.; GHIRINGHELLI, F.; KROEMER, GUIDO; ZITVOGEL, LAURENCE. Harnessing dendritic cells in cancer. **Seminars in Immunology**, v. 23, n. 1, p. 42-49, fev 2011.

ATANACKOVIC, D.; ALTORKI, N. K.; STOCKERT, E. *et al.* Vaccine-induced CD4+ T cell responses to MAGE-3 protein in lung cancer patients. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 172, n. 5, p. 3289-3296, 1 mar 2004.

AVIGAN, D. E.; VASIR, B.; GEORGE, D. J. *et al.* Phase I/II study of vaccination with electrofused allogeneic dendritic cells/autologous tumor-derived cells in patients with stage IV renal cell carcinoma. **Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)**, v. 30, n. 7, p. 749-761, out 2007.

BAEK, S.; KIM, C.-S.; KIM, S.-B. *et al.* Combination therapy of renal cell carcinoma or breast cancer patients with dendritic cell vaccine and IL-2: results from a phase I/II trial. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, n. 1, p. 178, 2011.

BALEEIRO, R.; ANSELMO, L.; SOARES, F. *et al.* High frequency of immature dendritic cells and altered in situ production of interleukin-4 and tumor necrosis factor-alpha in lung cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy: CII**, v. 57, n. 9, p. 1335-1345, set 2008.

BANCHEREAU, J; STEINMAN, R. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-252, 19 mar 1998.

BANCHEREAU, J; BRIERE, F.; CAUX, C. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p. 767-811, 2000.

BERINSTEIN, N. L. Carcinoembryonic antigen as a target for therapeutic anticancer vaccines: a review. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 20, n. 8, p. 2197-2207, 15 abr 2002.

BERNTSEN, A.; TREPIAKAS, R.; WENANDY, L. *et al.* Therapeutic dendritic cell vaccination of patients with metastatic renal cell carcinoma: a clinical phase 1/2 trial. **Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)**, v. 31, n. 8, p. 771-780, out 2008.

BINDEA, G.; MLECNIK, B.; FRIDMAN, WF; PAGÈS, F.; GALON, J. Natural immunity to cancer in humans. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 2, p. 215-222, abr 2010.

BLUMENTHAL, R. D.; OSORIO, L.; HAYES, M. K. *et al.* Carcinoembryonic antigen antibody inhibits lung metastasis and augments chemotherapy in a human colonic carcinoma xenograft. **Cancer Immunology, Immunotherapy: CII**, v. 54, n. 4, p. 315-327, abr 2005.

BORCZUK, A.; TOONKEL, R.; POWELL, C. Genomics of lung cancer. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 6, n. 2, p. 152-158, 15 abr 2009.

BOS, R.; DUIKEREN, S. VAN; MORREAU, H. *et al.* Balancing between antitumor efficacy and autoimmune pathology in T-cell-mediated targeting of carcinoembryonic antigen. **Cancer Research**, v. 68, n. 20, p. 8446-8455, 15 out 2008.

BRAY, S. M.; VUJANOVIC, L.; BUTTERFIELD, L. H. Dendritic Cell-Based Vaccines Positively Impact Natural Killer and Regulatory T Cells in Hepatocellular Carcinoma Patients. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, p. 1-11, 2011.

BRUGGEN, P. VAN DER; STROOBANT, V.; VIGNERON, N.; EYNDE, B. VAN DEN. **Cancer Immunity - Peptide Database**. Disponível em: <<http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm>>. Acesso em: 15 jan. 2012.

BURCH, P. A.; CROGHAN, G. A.; GASTINEAU, D. A. *et al.* Immunotherapy (APC8015, Provenge) targeting prostatic acid phosphatase can induce durable remission of metastatic androgen-independent prostate cancer: a Phase 2 trial. **The Prostate**, v. 60, n. 3, p. 197-204, 1 ago 2004.

CALLAWAY, M.; BRIGGS, J. The incidence of late recurrence (greater than 10 years); an analysis of 536 consecutive cases of cutaneous melanoma. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 42, n. 1, p. 46-49, jan 1989.

CETIN, K.; ETTINGER, D.; HEI, Y.; O'MALLEY, C. Survival by histologic subtype in stage IV nonsmall cell lung cancer based on data from the Surveillance, Epidemiology and End Results Program. **Clinical Epidemiology**, v. 3, p. 139-148, 2011.

CHEN, W.; LIANG, X.; PETERSON, A.; MUNN, D.; BLAZAR, B. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 181, n. 8, p. 5396-5404, 15 out 2008.

CHINNASAMY, N.; WARGO, J. A.; YU, Z. *et al.* A TCR targeting the HLA-A\*0201-restricted epitope of MAGE-A3 recognizes multiple epitopes of the MAGE-A antigen superfamily in several types of cancer. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 186, n. 2, p. 685-696, 15 jan 2011.

CHU, C. S.; BOYER, J.; SCHULLERY, D. S. *et al.* Phase I/II randomized trial of dendritic cell vaccination with or without cyclophosphamide for consolidation therapy of advanced ovarian cancer in first or second remission. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, 22 out 2011.

COOLS, N.; PONSARTS, P.; TENDELOO, V. VAN; BERNEMAN, Z. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n. 6, p. 1365-1374, dez 2007.

COSTA, D. **Determinantes clínicos e moleculares de resposta e resistência causada pela mutação no gene do receptor do fator de crescimento epidérmico em pacientes com carcinoma de pulmão não pequenas células**. Campinas: UNICAMP, 2008.

COULIE, PG; HANAGIRI, T; TAKENOYAMA, M. From tumor antigens to immunotherapy. **International Journal of Clinical Oncology / Japan Society of Clinical Oncology**, v. 6, n. 4, p. 163-170, ago 2001.

CRANMER, L. D.; TREVOR, K. T.; HERSH, E. M. Clinical applications of dendritic cell vaccination in the treatment of cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy: CII**, v. 53, n. 4, p. 275-306, abr 2004.

**ctcae3.pdf (objeto application/pdf)**. [S.l: s.n.]. Disponível em: <[http://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic\\_applications/docs/ctcae3.pdf](http://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/ctcae3.pdf)>. Acesso em: 9 jan. 2011. , [S.d.]

DEMICHELI, R.; ABBATTISTA, A.; MICELI, R.; VALAGUSSA, P.; BONADONNA, G. Time distribution of the recurrence risk for breast cancer patients undergoing mastectomy: further support about the concept of tumor dormancy. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 41, n. 2, p. 177-185, 1996.

DETTERBECK, F.; BOFFA, D.; TANOUE, L. The new lung cancer staging system. **Chest**, v. 136, n. 1, p. 260-271, jul 2009.

DISIS, M. L.; GOOLEY, T. A.; RINN, K. *et al.* Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 20, n. 11, p. 2624-2632, 1 jun 2002.

DOHNAL, A. M.; GRAFFI, S.; WITT, V. *et al.* Comparative evaluation of techniques for the manufacturing of dendritic cell-based cancer vaccines. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 1, p. 125-135, mar 2008.

DOLL, R. Uncovering the effects of smoking: historical perspective. **Statistical Methods in Medical Research**, v. 7, n. 2, p. 87-117, jun 1998.

DOLL, R.; HILL, A. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. **British Medical Journal**, v. 2, n. 4682, p. 739-748, 30 set 1950.

DOLL, R.; HILL, A. Lung cancer and other causes of death in relation to smoking; a second report on the mortality of British doctors. **British Medical Journal**, v. 2, n. 5001, p. 1071-1081, 10 nov 1956.

DOULATOV, S.; NOTTA, F.; EPPERT, K. *et al.* Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. **Nature Immunology**, v. 11, n. 7, p. 585-593, jul 2010.

DU, C.; WANG, Y. The immunoregulatory mechanisms of carcinoma for its survival and development. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 1, p. 12, 2011.

DUGUID, J. The Incidence of Intrathoracic Tumors in Manchester. **The Lancet**, v. 210, n. 5420, p. 111-116, jul 1927.

DUNN, G.; BRUCE, A.; IKEDA, H.; OLD, L.; SCHREIBER, R. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nature Immunology**, v. 3, n. 11, p. 991-998, nov 2002.

DUNN, G.; OLD, L.; SCHREIBER, R. The three Es of cancer immunoediting. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p. 329-360, 2004.

FIELDS, R. C.; SHIMIZU, K.; MULÉ, J. J. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 16, p. 9482-9487, 4 ago 1998.

FIGDOR, C.; VRIES, I. DE; LESTERHUIS, W.; MELIEF, C. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. **Nature Medicine**, v. 10, n. 5, p. 475-480, maio 2004.

FINN, O. Human tumor antigens, immunosurveillance, and cancer vaccines. **Immunologic Research**, v. 36, n. 1-3, p. 73-82, 2006.

FINN, O. Cancer immunology. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 25, p. 2704-2715, 19 jun 2008.

FOGG, D.; SIBON, C.; MILED, C. *et al.* A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 311, n. 5757, p. 83-87, 6 jan 2006.

FONG, L.; BROCKSTEDT, D.; BENIKE, C.; WU, L.; ENGLEMAN, E. G. Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 166, n. 6, p. 4254-4259, 15 mar 2001.

FUJINO, M.; DOSAKA-AKITA, H.; HARADA, M. *et al.* Prognostic significance of p53 and ras p21 expression in nonsmall cell lung cancer. **Cancer**, v. 76, n. 12, p. 2457-2463, 15 dez 1995.

GABRILOVICH, D.; PISAREV, V. Tumor escape from immune response: mechanisms and targets of activity. **Current Drug Targets**, v. 4, n. 7, p. 525-536, out 2003.

GALON, J.; COSTES, A.; SANCHEZ-CABO, F. *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 313, n. 5795, p. 1960-1964, 29 set 2006.

GAUGHAN, E.; COSTA, D. Genotype-driven therapies for non-small cell lung cancer: focus on EGFR, KRAS and ALK gene abnormalities. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 3, n. 3, p. 113-125, maio 2011.

GILBOA, E. The risk of autoimmunity associated with tumor immunotherapy. **Nature Immunology**, v. 2, n. 9, p. 789-792, set 2001.

GODELAINE, D.; CARRASCO, J.; LUCAS, S. *et al.* Polyclonal CTL responses observed in melanoma patients vaccinated with dendritic cells pulsed with a MAGE-3.A1 peptide. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 171, n. 9, p. 4893-4897, 1 nov 2003.

GOTTFRIED, E.; KREUTZ, M.; MACKENSEN, A. Tumor-induced modulation of dendritic cell function. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 19, n. 1, p. 65-77, fev 2008.

GOWANS, E. J.; ROBERTS, S.; JONES, K. *et al.* A phase I clinical trial of dendritic cell immunotherapy in HCV-infected individuals. **Journal of Hepatology**, v. 53, n. 4, p. 599-607, out 2010.

GRAHAM, E.; SINGER, J. SUCCESSFUL REMOVAL OF AN ENTIRE LUNG FOR CARCINOMA OF THE BRONCHUS. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 101, n. 18, p. 1371-1374, 28 out 1933.

GRUIJL, T. D. DE; EERTWEGH, A. J. M. VAN DEN; PINEDO, H. M.; SCHEPER, R. J. Whole-cell cancer vaccination: from autologous to allogeneic tumor- and dendritic cell-based vaccines. **Cancer Immunology, Immunotherapy: CII**, v. 57, n. 10, p. 1569-1577, out 2008.

GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITVOGEL, L; THÉRY, C.; AMIGORENA, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 621-667, 2002.

HALPERN, M. T.; GILLESPIE, B. W.; WARNER, K. E. Patterns of absolute risk of lung cancer mortality in former smokers. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 6, p. 457-464, 17 mar 1993.

HAMAÏ, A.; BENLALAM, H.; MESLIN, F. *et al.* Immune surveillance of human cancer: if the cytotoxic T-lymphocytes play the music, does the tumoral system call the tune? **Tissue Antigens**, v. 75, n. 1, p. 1-8, jan 2010.

HERRLINGER, U.; HEBART, H.; KANZ, L.; DICHGANS, J.; WELLER, M. Relapse of primary CNS lymphoma after more than 10 years in complete remission. **Journal of Neurology**, v. 252, n. 11, p. 1409-1410, nov 2005.

HIRSCHOWITZ, E. Autologous Dendritic Cell Vaccines for Non-Small-Cell Lung Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 14, p. 2808-2815, jul 2004.

HIRSCHOWITZ, E; FOODY, T.; HIDALGO, G.; YANNELLI, J. Immunization of NSCLC patients with antigen-pulsed immature autologous dendritic cells. **Lung Cancer**, v. 57, n. 3, p. 365-372, set 2007.

HIRSCHOWITZ, EA; HIESTAND, D.; YANNELLI, JR. Vaccines for lung cancer. **Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer**, v. 1, n. 1, p. 93-104, jan 2006.

HONMA, H. N.; CAPITANI, E. M. DE; PERROUD, M. W., Jr; *et al.* Influence of p53 codon 72 exon 4, GSTM1, GSTT1 and GSTP1\*B polymorphisms in lung cancer risk in a Brazilian population. **Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)**, v. 61, n. 2, p. 152-162, ago 2008.

HOOS, A.; PARMIANI, G.; HEGER, K. *et al.* A clinical development paradigm for cancer vaccines and related biologics. **Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)**, v. 30, n. 1, p. 1-15, jan 2007.

HUANG, J.; WANG, YAO; GUO, J. *et al.* Radiation-induced apoptosis along with local and systemic cytokine elaboration is associated with DC plus radiotherapy-mediated renal cell tumor regression. **Clinical Immunology**, v. 123, n. 3, p. 298-310, jun 2007.

HUGUES, S. Dynamics of dendritic cell-T cell interactions: a role in T cell outcome. **Seminars in Immunopathology**, v. 32, n. 3, p. 227-238, set 2010.

IHDE, D. Chemotherapy of lung cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 20, p. 1434-1441, 12 nov 1992.

INCA. **Estimativa 2012 - Incidência de Câncer no Brasil**. . Rio de Janeiro: INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA); MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/mapa.asp?ID=15>>. Acesso em: 8 maio. 2011. , 2011

JÄHNISCH, H.; FÜSSEL, S.; KIESSLING, A. *et al.* Dendritic Cell-Based Immunotherapy for Prostate Cancer. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2010, p. 1-8, 2010.

JANIKASHVILI, N.; LARMONIER, N.; KATSANIS, E. Personalized dendritic cell-based tumor immunotherapy. **Immunotherapy**, v. 2, n. 1, p. 57-68, jan 2010.

JONULEIT, H.; GIESECKE-TUETTENBERG, A.; TÜTING, T. *et al.* A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 93, n. 2, p. 243-251, 15 jul 2001.

JONULEIT, H.; SCHMITT, E.; SCHULER, G; KNOP, J.; ENK, A. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 9, p. 1213-1222, 6 nov 2000.

KALINSKI, P.; URBAN, J.; NARANG, R. *et al.* Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: what we have and what we need. **Future Oncology**, v. 5, n. 3, p. 379-390, abr 2009.

KARIMI, S.; MOHAMMADI, F.; PORABDOLLAH, M. *et al.* Characterization of melanoma-associated antigen-a genes family differential expression in non-small-cell lung cancers. **Clinical lung cancer**, v. 13, n. 3, p. 214-219, maio 2012.

KARSUNKY, H.; MERAD, M.; COZZIO, A.; WEISSMAN, I.; MANZ, M. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 2, p. 305-313, 21 jul 2003.

KEILHOLZ, U; MENSSEN, H. D.; GAIGER, A. *et al.* Wilms' tumour gene 1 (WT1) in human neoplasia. **Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.**, v. 19, n. 8, p. 1318-1323, ago 2005.

KERN, J.; SLEBOS, R.; TOP, B. *et al.* C-erbB-2 expression and codon 12 K-ras mutations both predict shortened survival for patients with pulmonary adenocarcinomas. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 2, p. 516-520, fev 1994.

KIM, W.; LIAU, L. M. Dendritic cell vaccines for brain tumors. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 21, n. 1, p. 139-157, jan 2010.

KIMURA, Y.; TSUKADA, J.; TOMODA, T. *et al.* Clinical and Immunologic Evaluation of Dendritic Cell-Based Immunotherapy in Combination With Gemcitabine and/or S-1 in Patients With Advanced Pancreatic Carcinoma. **Pancreas**, 22 jul 2011.

KONDO, M.; WEISSMAN, I. L.; AKASHI, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. **Cell**, v. 91, n. 5, p. 661-672, 28 nov 1997.

KRUG, L. M.; DAO, T.; BROWN, A. B. *et al.* WT1 peptide vaccinations induce CD4 and CD8 T cell immune responses in patients with mesothelioma and non-small cell lung cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy: CII**, v. 59, n. 10, p. 1467-1479, out 2010.

KRUIT, W. H. J.; OJIK, H. H. VAN; BRICHARD, V. G. *et al.* Phase 1/2 study of subcutaneous and intradermal immunization with a recombinant MAGE-3 protein in patients with detectable metastatic melanoma. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 117, n. 4, p. 596-604, 20 nov 2005.

KUSHWAH, R.; HU, J. Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. **Immunology**, v. 133, n. 4, p. 409-419, ago 2011.

LANTUÉJOL, S.; SALAMEIRE, D.; SALON, C.; BRAMBILLA, E. Pulmonary preneoplasia--sequential molecular carcinogenetic events. **Histopathology**, v. 54, n. 1, p. 43-54, jan 2009.

LESTERHUIS, W.; AARNTZEN, E.; VRIES, I. DE; *et al.* Dendritic cell vaccines in melanoma: From promise to proof? **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 66, n. 2, p. 118-134, maio 2008.

LESTERHUIS, W.; VRIES, I. DE; ADEMA, G.; PUNT, C. Dendritic cell-based vaccines in cancer immunotherapy: an update on clinical and immunological results. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 15 Suppl 4, p. iv145-151, 2004.

LEVINGS, M.; GREGORI, S.; TRESOLDI, E. *et al.* Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. **Blood**, v. 105, n. 3, p. 1162-1169, 1 fev 2005.

LIU, K; NUSSENZWEIG, MC. Origin and development of dendritic cells. **Immunological Reviews**, v. 234, n. 1, p. 45-54, mar 2010.

LIU, K; VICTORA, G.; SCHWICKERT, T. *et al.* In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 324, n. 5925, p. 392-397, 17 abr 2009.

LIU, KJ; WANG, C.; CHEN, L. *et al.* Generation of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific T-cell responses in HLA-A\*0201 and HLA-A\*2402 late-stage colorectal cancer patients after vaccination with dendritic cells loaded with CEA peptides. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 10, n. 8, p. 2645-2651, 15 abr 2004.

LIYANAGE, U.; MOORE, T.; JOO, H. *et al.* Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 169, n. 5, p. 2756-2761, 1 set 2002.

LOU, Y.; WANG, G.; LIZÉE, G. *et al.* Dendritic cells strongly boost the antitumor activity of adoptively transferred T cells in vivo. **Cancer Research**, v. 64, n. 18, p. 6783-6790, 15 set 2004.

LUDOVINI, V.; PISTOLA, L.; GREGORC, V. *et al.* Biological markers and DNA flow cytometric analysis in radically resected patients with non-small cell lung cancer. A study of the Perugia Multidisciplinary Team for Thoracic Tumors. **Tumori**, v. 94, n. 3, p. 398-405, jun 2008.

MAO, L.; HRUBAN, R.; BOYLE, J.; TOCKMAN, M.; SIDRANSKY, D. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. **Cancer Research**, v. 54, n. 7, p. 1634-1637, 1 abr 1994.

MATSUI, K.; SAWA, T.; SUZUKI, H. *et al.* Relapse of stage I small cell lung cancer ten or more years after the start of treatment. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 7, p. 457-461, jul 2006.

MCILROY, D.; GREGOIRE, M. Optimizing dendritic cell-based anticancer immunotherapy: maturation state does have clinical impact. **Cancer Immunology, Immunotherapy: CII**, v. 52, n. 10, p. 583-591, out 2003.

MCKENNA JR, R. Lobectomy by video-assisted thoracic surgery with mediastinal node sampling for lung cancer. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 107, n. 3, p. 879-881; discussion 881-882, mar 1994.

MCKENNA JR, R. New approaches to the minimally invasive treatment of lung cancer. **Cancer Journal (Sudbury, Mass.)**, v. 11, n. 1, p. 73-76, fev 2005.

MCNEEL, D. G.; DUNPHY, E. J.; DAVIES, J. G. *et al.* Safety and Immunological Efficacy of a DNA Vaccine Encoding Prostatic Acid Phosphatase in Patients With Stage D0 Prostate Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 25, p. 4047-4054, jul 2009.

MCWILLIAMS, A.; LAM, B.; SUTEDJA, T. Early proximal lung cancer diagnosis and treatment. **The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology**, v. 33, n. 3, p. 656-665, mar 2009.

MELLOR, A.; MUNN, D. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. **Nature Reviews. Immunology**, v. 4, n. 10, p. 762-774, out 2004.

MENG, S.; TRIPATHY, D.; FRENKEL, E. *et al.* Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 10, n. 24, p. 8152-8162, 15 dez 2004.

MLECNIK, B.; BINDEA, G.; PAGÈS, F.; GALON, J. Tumor immunosurveillance in human cancers. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 30, n. 1, p. 5-12, 21 jan 2011.

MOCELLIN, S.; NITTI, D. Therapeutics targeting tumor immune escape: Towards the development of new generation anticancer vaccines. **Medicinal Research Reviews**, v. 28, n. 3, p. 413-444, maio 2008.

MOLINA, J.; YANG, P.; CASSIVI, S.; SCHILD, S.; ADJEI, A. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. **Mayo Clinic Proceedings. Mayo Clinic**, v. 83, n. 5, p. 584-594, maio 2008.

MORA, P. **Análise de Sobrevida em Pacientes com Câncer de Pulmão**. Rio de Janeiro: UFRJ/NESC, 2004.

MORSE, M A; COLEMAN, R. E.; AKABANI, G. *et al.* Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. **Cancer Research**, v. 59, n. 1, p. 56-58, 1 jan 1999.

MORSE, MICHAEL A; GARST, J.; OSADA, T. *et al.* A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 3, n. 1, p. 9, 21 fev 2005.

MUKHERJEE, S. **O Imperador de todos os males {Uma biografia do Câncer}**. 1. ed. São Paulo, Brasil: Companhia das Letras, 2012.

MULLINS, D. W.; SHEASLEY, S. L.; REAM, R. M. *et al.* Route of immunization with peptide-pulsed dendritic cells controls the distribution of memory and effector T cells in lymphoid tissues and determines the pattern of regional tumor control. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 7, p. 1023-1034, 6 out 2003.

MUNN, D.; MELLOR, A. IDO and tolerance to tumors. **Trends in Molecular Medicine**, v. 10, n. 1, p. 15-18, jan 2004.

NAGAI, Y.; GARRETT, K.; OHTA, S. *et al.* Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. **Immunity**, v. 24, n. 6, p. 801-812, jun 2006.

NAIR, A.; HANSELL, D. European and North American lung cancer screening experience and implications for pulmonary nodule management. **European Radiology**, v. 21, n. 12, p. 2445-54, ago 2011.

NON-SMALL CELL LUNG CANCER COLLABORATIVE GROUP. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. **BMJ (Clinical Research Ed.)**, v. 311, n. 7010, p. 899-909, 7 out 1995.

NOWAK, A. K.; LAKE, R. A.; MARZO, A. L. *et al.* Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 170, n. 10, p. 4905-4913, 15 maio 2003.

O'ROURKE, M. G. E.; JOHNSON, M.; LANAGAN, C. *et al.* Durable complete clinical responses in a phase I/II trial using an autologous melanoma cell/dendritic cell vaccine. **Cancer Immunology, Immunotherapy: CII**, v. 52, n. 6, p. 387-395, jun 2003.

OJI, Y; MIYOSHI, S; TAKAHASHI, E; *et al.* Absence of mutations in the Wilms' tumor gene wt1 in de novo non-small cell lung cancers. **Neoplasma**, v. 51, n. 1, p. 17-20, 2004.

OJI, YUSUKE; MIYOSHI, SHINICHIRO; MAEDA, HAJIME; *et al.* Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 100, n. 3, p. 297-303, 20 jul 2002.

OKA, YOSHIHIRO; TSUBOI, AKIHIRO; TAGUCHI, T. *et al.* Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 38, p. 13885-13890, 21 set 2004.

OKADA, M.; NISHIO, W.; SAKAMOTO, T. *et al.* Prognostic significance of perioperative serum carcinoembryonic antigen in non-small cell lung cancer: analysis of 1,000 consecutive resections for clinical stage I disease. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 78, n. 1, p. 216-221, jul 2004.

OKEN, M. M.; CREECH, R. H.; TORMEY, D. C. *et al.* Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 6, p. 649-655, dez 1982.

OSTRAND-ROSENBERG, S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 18, n. 1, p. 11-18, fev 2008.

PAGÈS, F.; BERGER, A.; CAMUS, M. *et al.* Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 25, p. 2654-2666, 22 dez 2005.

PAGÈS, F.; GALON, J.; DIEU-NOSJEAN, M. *et al.* Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. **Oncogene**, v. 29, n. 8, p. 1093-1102, 25 fev 2010.

PALENA, C.; SCHLOM, J. Vaccines against Human Carcinomas: Strategies to Improve Antitumor Immune Responses. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-13, 2010.

PARDOLL, D. Does the immune system see tumors as foreign or self? **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 807-839, 2003.

PARK, M.-Y.; KIM, C.-H.; SOHN, H.-J. *et al.* The optimal interval for dendritic cell vaccination following adoptive T cell transfer is important for boosting potent anti-tumor immunity. **Vaccine**, v. 25, n. 42, p. 7322-7330, 16 out 2007.

PELLEGRINI, C.; FALLENI, M.; MARCHETTI, A. *et al.* HER-2/Neu alterations in non-small cell lung cancer: a comprehensive evaluation by real time reverse transcription-PCR, fluorescence in situ hybridization, and immunohistochemistry. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 9, n. 10 Pt 1, p. 3645-3652, 1 set 2003.

PEREZ, C.; STANLEY, K.; RUBIN, P. *et al.* Patterns of tumor recurrence after definitive irradiation for inoperable non-oat cell carcinoma of the lung. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 6, n. 8, p. 987-994, ago 1980.

PETO, J. That lung cancer incidence falls in ex-smokers: misconceptions 2. **British Journal of Cancer**, v. 104, n. 3, p. 389, 1 fev 2011.

PIERSMA, S.; JORDANOVA, E.; POELGEEST, M. VAN; *et al.* High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. **Cancer Research**, v. 67, n. 1, p. 354-361, 1 jan 2007.

PORT META-ANALYSIS TRIALISTS GROUP. Postoperative radiotherapy in non-small-cell lung cancer: systematic review and meta-analysis of individual patient data from nine randomised controlled trials. PORT Meta-analysis Trialists Group. **Lancet**, v. 352, n. 9124, p. 257-263, 25 jul 1998.

PORT META-ANALYSIS TRIALISTS GROUP. Postoperative radiotherapy for non-small cell lung cancer. **Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)**, n. 2, p. CD002142, 2005.

RABINOVICH, G.; GABRILOVICH, D.; SOTOMAYOR, E. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. **Annual Review of Immunology**, v. 25, p. 267-296, 2007.

RAMALINGAM, S.; OWONIKOKO, T.; KHURI, F. Lung cancer: New biological insights and recent therapeutic advances. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 2, p. 91-112, mar 2011.

RIDOLFI, R.; RICCOBON, A.; GALASSI, R. *et al.* Evaluation of in vivo labelled dendritic cell migration in cancer patients. **Journal of Translational Medicine**, v. 2, n. 1, p. 27, 30 jul 2004.

ROSENBERG, S. Shedding light on immunotherapy for cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 14, p. 1461-1463, 1 abr 2004.

ROSENBERG, S.; YANG, JC; RESTIFO, N. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. **Nature Medicine**, v. 10, n. 9, p. 909-915, set 2004.

SABADO, R.; BHARDWAJ, N. Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment. **Immunotherapy**, v. 2, n. 1, p. 37-56, jan 2010.

SAGALOWSKY, A. I.; MOLBERG, K. Solitary metastasis of renal cell carcinoma to the contralateral adrenal gland 22 years after nephrectomy. **Urology**, v. 54, n. 1, p. 162, jul 1999.

SAMET, J.; AVILA-TANG, E.; BOFFETTA, P. *et al.* Lung cancer in never smokers: clinical epidemiology and environmental risk factors. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 15, n. 18, p. 5626-5645, 15 set 2009.

SCHILLER, J. Chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. In: PASS, H. I. (Ed.). **Lung cancer : principles and practice**. 2. ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 899-902.

SCHILLER, J.; HARRINGTON, D.; BELANI, C. *et al.* Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 2, p. 92-98, 10 jan 2002.

SCHREIBER, T.; RAEZ, L.; ROSENBLATT, J.; PODACK, E. Tumor immunogenicity and responsiveness to cancer vaccine therapy: the state of the art. **Seminars in Immunology**, v. 22, n. 3, p. 105-112, jun 2010.

SCHULER, G; STEINMAN, R. Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 8, p. 1183-1187, 20 out 1997.

SCOTT, W.; ALLEN, M.; ABEDINPOUR, G. *et al.* Video-assisted thoracic surgery versus open lobectomy for lung cancer: a secondary analysis of data from the American College of Surgeons Oncology Group Z0030 randomized clinical trial. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 139, n. 4, p. 976-981; discussion 981-983, abr 2010.

SHAFEY, O.; ERIKSEN, M.; ROSS, H.; MACKAY, J. **The Tobacco Atlas**. . [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.tobaccoatlas.org/default.html#>>. Acesso em: 26 jul. 2011. , 2002

SHARMA, M.; BABAN, B.; CHANDLER, P. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 9, p. 2570-2582, set 2007.

SHORTMAN, K.; LIU, Y. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nature Reviews. Immunology**, v. 2, n. 3, p. 151-161, mar 2002.

SHORTMAN, K.; NAIK, S. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. **Nature Reviews. Immunology**, v. 7, n. 1, p. 19-30, jan 2007.

SMYTH, M.; DUNN, G.; SCHREIBER, R. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. **Advances in Immunology**, v. 90, p. 1-50, 2006.

SOEDA, A.; MORITA-HOSHI, Y.; MAKIYAMA, H. *et al.* Regular dose of gemcitabine induces an increase in CD14+ monocytes and CD11c+ dendritic cells in patients with advanced pancreatic cancer. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 39, n. 12, p. 797-806, dez 2009.

SOTIROPOULOU, P. A.; PEREZ, S. A.; VOELTER, V. *et al.* Natural CD8+ T-cell responses against MHC class I epitopes of the HER-2/ neu oncoprotein in patients with epithelial tumors. **Cancer Immunology, Immunotherapy: CII**, v. 52, n. 12, p. 771-779, dez 2003.

SOTOMAYOR, E.; BORRELLO, I.; LEVITSKY, H. Tolerance and cancer: a critical issue in tumor immunology. **Critical Reviews in Oncogenesis**, v. 7, n. 5-6, p. 433-456, 1996.

SOX, H. Better Evidence about Screening for Lung Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 5, p. 455-457, ago 2011.

STEINMAN, R. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annual Review of Immunology**, v. 9, p. 271-296, 1991.

STEINMAN, R. M.; BANCHEREAU, JACQUES. Taking dendritic cells into medicine. **Nature**, v. 449, n. 7161, p. 419-426, 27 set 2007.

STEINMAN, R. M.; HAWIGER, D.; NUSSENZWEIG, M. C. Tolerogenic dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 685-711, 2003.

STEWART, T.; HOLLINSHEAD, A.; RAMAN, S. Tumour dormancy: initiation, maintenance and termination in animals and humans. **Canadian Journal of Surgery. Journal Canadien De Chirurgie**, v. 34, n. 4, p. 321-325, ago 1991.

SUZUKI, E.; KAPOOR, V.; JASSAR, A. S.; KAISER, L. R.; ALBELDA, S. M. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 11, n. 18, p. 6713-6721, 15 set 2005.

SUZUKI, E.; SUN, J.; KAPOOR, V.; JASSAR, A. S.; ALBELDA, S. M. Gemcitabine has significant immunomodulatory activity in murine tumor models independent of its cytotoxic effects. **Cancer Biology & Therapy**, v. 6, n. 6, p. 880-885, jun 2007.

SWANN, J.; SMYTH, M. Immune surveillance of tumors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1137-1146, maio 2007.

SZABO, E.; BIRRER, M.; MULSHINE, J. Early detection of lung cancer. **Seminars in Oncology**, v. 20, n. 4, p. 374-382, ago 1993a.

SZABO, E.; BIRRER, M.; MULSHINE, J. Early detection of lung cancer. **Seminars in Oncology**, v. 20, n. 4, p. 374-382, ago 1993b.

TAIEB, J.; CHAPUT, N.; SCHARTZ, N. *et al.* Chemoimmunotherapy of tumors: cyclophosphamide synergizes with exosome based vaccines. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 176, n. 5, p. 2722-2729, 1 mar 2006.

TAKENAKA, M.; HANAGIRI, TAKESHI; SHINOHARA, S. *et al.* The prognostic significance of HER2 overexpression in non-small cell lung cancer. **Anticancer research**, v. 31, n. 12, p. 4631-4636, dez 2011.

TANG, Q.; BLUESTONE, J. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. **Nature Immunology**, v. 9, n. 3, p. 239-244, mar 2008.

TEITZ-TENNENBAUM, S.; LI, Q.; OKUYAMA, R. *et al.* Mechanisms involved in radiation enhancement of intratumoral dendritic cell therapy. **Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)**, v. 31, n. 4, p. 345-358, maio 2008.

TEITZ-TENNENBAUM, S.; LI, Q.; RYNKIEWICZ, S. *et al.* Radiotherapy potentiates the therapeutic efficacy of intratumoral dendritic cell administration. **Cancer Research**, v. 63, n. 23, p. 8466-8475, 1 dez 2003.

THERASSE, P.; ARBUCK, S. G.; EISENHAEUER, E. A. *et al.* New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 3, p. 205-216, 2 fev 2000.

THOMAS-KASKEL, A.; WALLER, C.; SCHULTZE-SEEMANN, W.; VEELKEN, H. Immunotherapy with dendritic cells for prostate cancer. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 121, n. 3, p. 467-473, 1 ago 2007.

THOMAS-KASKEL, A.; ZEISER, R.; JOCHIM, R. *et al.* Vaccination of advanced prostate cancer patients with PSCA and PSA peptide-loaded dendritic cells induces DTH responses that correlate with superior overall survival. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 119, n. 10, p. 2428-2434, 15 nov 2006.

TRAKATELLI, M.; TOUNGOUZ, M.; BLOCKLET, D. *et al.* A new dendritic cell vaccine generated with interleukin-3 and interferon-beta induces CD8+ T cell responses against NA17-A2 tumor peptide in melanoma patients. **Cancer Immunology, Immunotherapy: CII**, v. 55, n. 4, p. 469-474, abr 2006.

TRAVIS, WD; LINDER, J.; MACKAY, B. Classification, Histology, Cytology, and Electron Microscopy. In: PASS, H. I. (Ed.). **Lung cancer : principles and practice**. 2. ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 453-495.

TSUBOI, AKIHIRO; OKA, YOSHIHIRO; OSAKI, T. *et al.* WT1 peptide-based immunotherapy for patients with lung cancer: report of two cases. **Microbiology and Immunology**, v. 48, n. 3, p. 175-184, 2004.

U.S. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Search of: dendritic cell vaccine - List Results - ClinicalTrials.gov**. Disponível em: <<http://www.clinicaltrial.gov/ct2/results?term=dendritic+cell+vaccine>>. Acesso em: 15 jan. 2012a.

U.S. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Search of: dendritic cell vaccine | lung cancer - List Results - ClinicalTrials.gov**. Disponível em: <[http://www.clinicaltrial.gov/ct2/results?term=dendritic+cell+vaccine&recr=&rslt=&type=&cond=lung+cancer&intr=&outc=&lead=&spons=&id=&state1=&cntry1=&state2=&cntry2=&state3=&cntry3=&locn=&gndr=&rcv\\_s=&rcv\\_e=&lup\\_s=&lup\\_e](http://www.clinicaltrial.gov/ct2/results?term=dendritic+cell+vaccine&recr=&rslt=&type=&cond=lung+cancer&intr=&outc=&lead=&spons=&id=&state1=&cntry1=&state2=&cntry2=&state3=&cntry3=&locn=&gndr=&rcv_s=&rcv_e=&lup_s=&lup_e)>. Acesso em: 15 jan. 2012b.

UM, S.-J.; CHOI, Y. J.; SHIN, H.-J. *et al.* Phase I study of autologous dendritic cell tumor vaccine in patients with non-small cell lung cancer. **Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)**, v. 70, n. 2, p. 188-194, nov 2010.

VIEHL, C.; MOORE, T.; LIYANAGE, U. *et al.* Depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells promotes a tumor-specific immune response in pancreas cancer-bearing mice. **Annals of Surgical Oncology**, v. 13, n. 9, p. 1252-1258, set 2006.

VINCENT, J.; MIGNOT, G.; CHALMIN, F. *et al.* 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. **Cancer Research**, v. 70, n. 8, p. 3052-3061, 15 abr 2010.

VRIES, I. DE; KROOSHOO, D.; SCHARENBOG, N. *et al.* Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. **Cancer Research**, v. 63, n. 1, p. 12-17, 1 jan 2003.

VRIES, I. DE; LESTERHUIS, W.; SCHARENBOG, N. *et al.* Maturation of dendritic cells is a prerequisite for inducing immune responses in advanced melanoma patients. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 9, n. 14, p. 5091-5100, 1 nov 2003.

WELNER, R.; PELAYO, R.; NAGAI, Y. *et al.* Lymphoid precursors are directed to produce dendritic cells as a result of TLR9 ligation during herpes infection. **Blood**, v. 112, n. 9, p. 3753-3761, 1 nov 2008.

WOO, E.; CHU, C.; GOLETZ, T. *et al.* Regulatory CD4(+)/CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. **Cancer Research**, v. 61, n. 12, p. 4766-4772, 15 jun 2001.

YANAGAWA, N.; TAMURA, G.; OIZUMI, H.; ENDOH, M.; MOTOYAMA, T. MAGE expressions mediated by demethylation of MAGE promoters induce progression of non-small cell lung cancer. **Anticancer research**, v. 31, n. 1, p. 171-175, jan 2011.

YASUMOTO, K.; HANAGIRI, T.; TAKENOYAMA, M. Lung cancer-associated tumor antigens and the present status of immunotherapy against non-small-cell lung cancer. **General Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 57, n. 9, p. 449-457, 13 set 2009.

ZAMBON, L. **Carcinoma Brônquico: Análise de uma série de casos atendidos no ambulatório de oncopneumologia das disciplinas de pneumologia e cirúrgica torácica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP**. Campinas: UNICAMP, 1994.

ZITVOGEL, L.; TESNIERE, A.; KROEMER, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. **Nature Reviews. Immunology**, v. 6, n. 10, p. 715-727, out 2006.

## ANEXO 1 - QUADROS DE ANTÍGENOS TUMORAIS

- LISTA DOS ANTÍGENOS RESULTANTES DE MUTAÇÃO

<b>Antígenos resultantes de mutação</b>
alpha-actinina-4
ARTC1
BCR-ABL proteína de fusão (b3a2)
B-RAF
CASP-5
CASP-8
beta-catenina
Cdc27
CDK4
CDKN2A
COA-1
dek-can
EFTUD2
Fator de alongamento 2
ETV6-AML1 proteína de fusão
FLT3-ITD
FN1
GPNMB
LDLR-fucosiltransferaseAS proteína de fusão
HLA-A2
HLA-A11
hsp70-2
KIAAO205
MART2
ME1
MUM-1
MUM-2
MUM-3
neo-PAP
Miosina classe I
NFYC
OGT
OS-9
p53
pml-RAR alfa proteína de fusão
PRDX5
PTPRK
K-ras

N-ras
RBAF600
SIRT2
SNRPD1
SYT-SSX1 ou SSX2 proteína de fusão
TGF-betaRII
Triose-fosfato isomerase

- LISTA DOS ANTÍGENOS TUMOR ESPECÍFICO COMPARTILHADO.

<b>Antígenos tumor específico compartilhado</b>
GAGE-1,2,8
GAGE-3,4,5,6,7
GnTV
HERV-K-MEL
KK-LC-1
KM-HN-1
LAGE-1
MAGE-A1
MAGE-A2
MAGE-A3
MAGE-A4
MAGE-A6
MAGE-A9
MAGE-A10
MAGE-A12
MAGE-C1
MAGE-C2
Mucina k
NA88-A
NY-ESO-1 / LAGE-2
SAGE
Sp17
SSX-2
SSX-4
TAG-1
TAG-2
TRAG-3
TRP2-INT2
XAGE-1b

- LISTA DE ANTÍGENOS DE DIFERENCIAÇÃO.

<b>Antígenos de diferenciação</b>
CEA
gp100 / Pmel17
Calecreína 4
Mamaglobina-A
Melan-A / MART-1
NY-BR-1
OA1
PAP
PSA
RAB38 / NY-MEL-1
TRP-1 / gp75
TRP-2
Tirosinase

- LISTA DE ANTÍGENOS DE SUPEREXPRESSÃO.

<b>Antígenos de superexpressão</b>
Adipofilina
AIM-2
ALDH1A1
BCLX (L)
BING-4
CALCA
CPSF
Ciclina D1
DKK1
ENAH (hMena)
Ep-CAM
EphA3
EZH2
FGF5
G250 / MN / CAIX
HER-2 / neu
IDO1
IL13Ralpha2

Carboxil Esterase Intestinal
Alfa-fetoproteína
M-CSF
MCSP
mdm-2
Meloe
MMP-2
MMP-7
MUC1
p53
PAX5
PBF
PRAME
PSMA
RAGE-1
RGS5
RhoC
RNF43
RU2AS
Secernina 1
SOX10
STEAP1
Survivina
Telomerase
VEGF
WT1

## ANEXO 2 – AVALIAÇÃO DE RESPOSTA (RECIST)

QUADRO 15 - CRITÉRIOS PARA A RESPOSTA DA DOENÇA.

<b>Resposta da doença</b>	<b>Definição</b>
Resposta Completa (RC)	Desaparecimento de toda doença conhecida, lesões-alvo e não alvo.
Resposta Parcial (RP)	Diminuição de pelo menos 30% na soma dos maiores diâmetros das lesões-alvo tomando como referência o BSLD, com ausência de novas lesões ou a sua progressão.
Doença Estável (DE)	Ausência de redução suficiente para ser quantificada como resposta parcial e ausência de um aumento suficiente para ser quantificado como doença progressiva, tomando como referência a menor soma dos maiores diâmetros (SSLD) desde o início do tratamento.
Doença Progressiva (DP)	Aumento de pelo menos 20% na soma dos maiores diâmetros para as lesões-alvo, tomando como referência o SSLD registrado desde o início do tratamento ou o aparecimento de uma ou mais lesões novas. Para as lesões não alvo, a doença progressiva é confirmada se houver o aparecimento de novas lesões ou a progressão inequívoca de lesões não alvo pré-existentes.

Foi realizada a avaliação da resposta global do indivíduo através da integração da resposta às lesões-alvo, não alvo e novas, atingido para cada medição individual, sendo essas respostas classificadas de acordo com o Quadro 2.

QUADRO 16 - RESPOSTA INTEGRADA DO INDIVÍDUO.

<b>Lesões-alvo</b>	<b>Lesões não alvo</b>	<b>Novas Lesões</b>	<b>Resposta Integrada Global</b>
Resposta completa	Resposta completa	Não	Resposta completa
Resposta completa	Resp. incompleta/ Doença estável	Não	Resposta parcial
Resposta parcial	Não há doença progressiva	Não	Resposta parcial
Doença estável	Não há doença progressiva	Não	Doença estável
Doença progressiva	Qualquer	Sim ou Não	Doença progressiva
Qualquer	Doença progressiva	Sim ou Não	Doença progressiva
Qualquer	Qualquer	Sim	Doença progressiva

Depois de pelo menos três avaliações, incluindo a avaliação basal, o paciente possuía duas determinações objetivas de sua condição. Essa resposta integrada sequencial foi determinada pelo Quadro 3, avaliando a resposta para qualquer sequência de dois tratamentos (resposta completa, resposta parcial, doença estável, doença progressiva e desconhecido).

QUADRO 17 - RESPOSTA INTEGRADA SEQUENCIAL.

<b>1ª Resposta Integrada</b>	<b>2ª Resposta Integrada</b>	<b>Resposta Integrada Sequencial</b>
Doença progressiva	Sem avaliação posterior	Doença progressiva
Desconhecida	Doença progressiva	Doença progressiva
Resposta completa	Doença progressiva	Doença estável
Resposta parcial	Doença progressiva	Doença estável
Doença estável	Doença progressiva	Doença estável
Resposta completa	Resposta completa	Resp. completa confirmada
Resposta completa	Resposta parcial	*
Resposta completa	Desconhecida	Doença estável
Resposta completa	Doença estável	*
Resposta parcial	Resposta completa	Resp. parcial confirmada
Resposta parcial	Resposta parcial	Resp. parcial confirmada
Resposta parcial	Doença estável	Doença estável
Resposta parcial	Desconhecida	Doença estável
Doença estável	Resposta completa	Doença estável
Doença estável	Resposta parcial	Doença estável
Doença estável	Doença estável	Doença estável
Doença estável	Desconhecida	Doença estável
Desconhecida	Resposta completa	Doença estável
Desconhecida	Resposta parcial	Doença estável
Desconhecida	Doença estável	Doença estável
Desconhecida	Desconhecida	Desconhecida

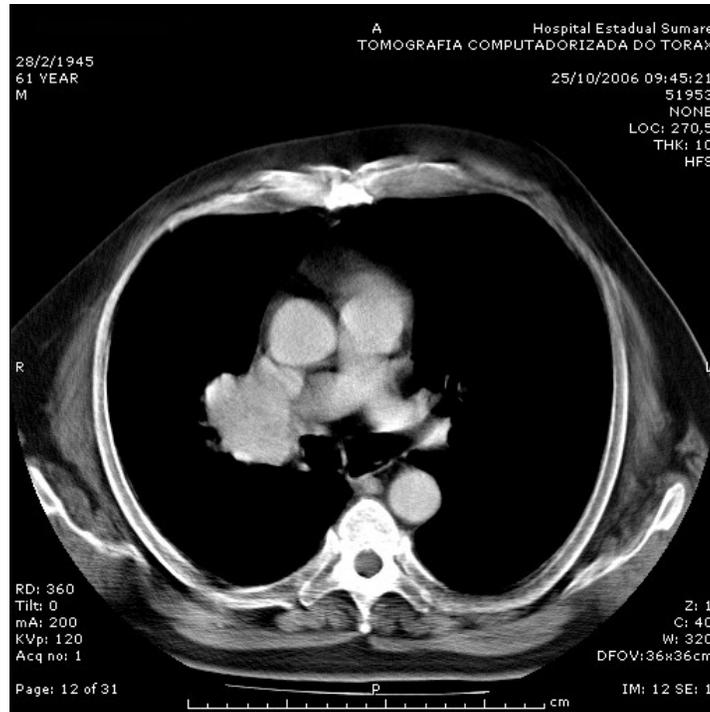
\*A sequência não é possível logicamente, pois para ir de nenhuma doença para alguma doença deve ser DP. Note-se, contudo, que é possível matematicamente ir de RP para DS. Embora quantitativamente isto seja mais doença, pode não atender o requisito para DP.

Uma resposta confirmada, resposta completa ou resposta parcial pode ser determinada após um mínimo de três avaliações; enquanto que doença progressiva ou doença estável podem ser determinadas após duas, pois não necessitam de confirmação. Quanto uma resposta integrada for desconhecida, mas uma resposta integrada anterior for conhecida, neste caso a comparação será feita com o último valor conhecido. Por exemplo, se a sequência foi resposta completa>desconhecida>resposta completa, neste caso a resposta integrada sequencial é resposta completa.

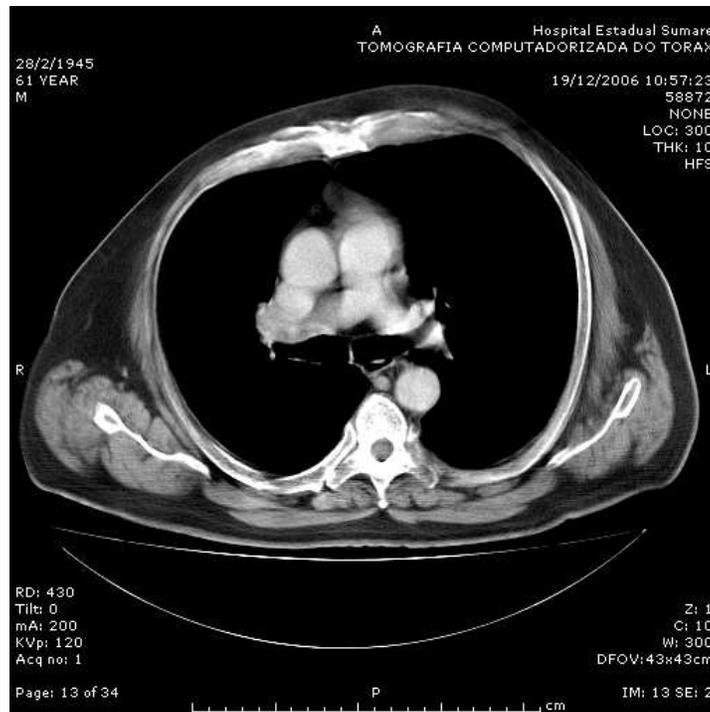
## ANEXO 3 - TOMOGRAFÍAS COMPUTADORIZADAS

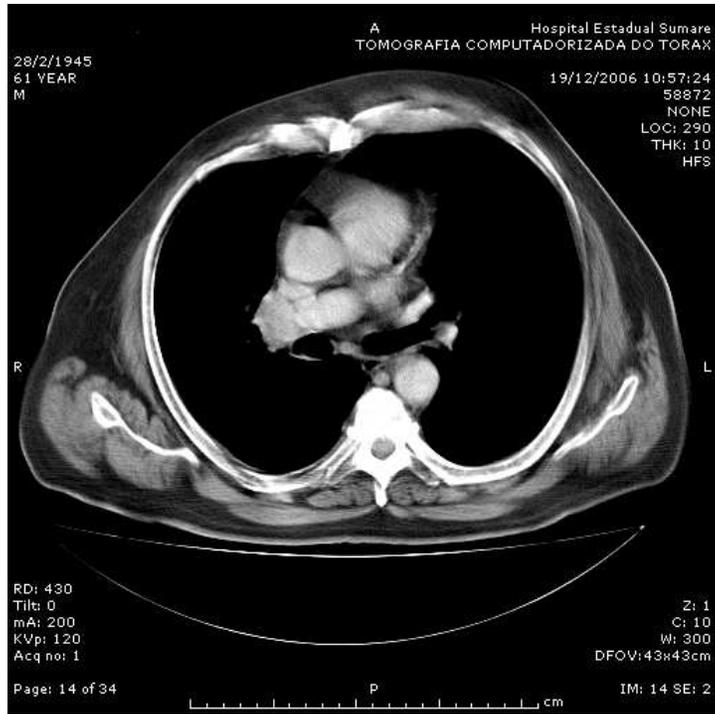
Paciente 1:

A. Pré-tratamento convencional:

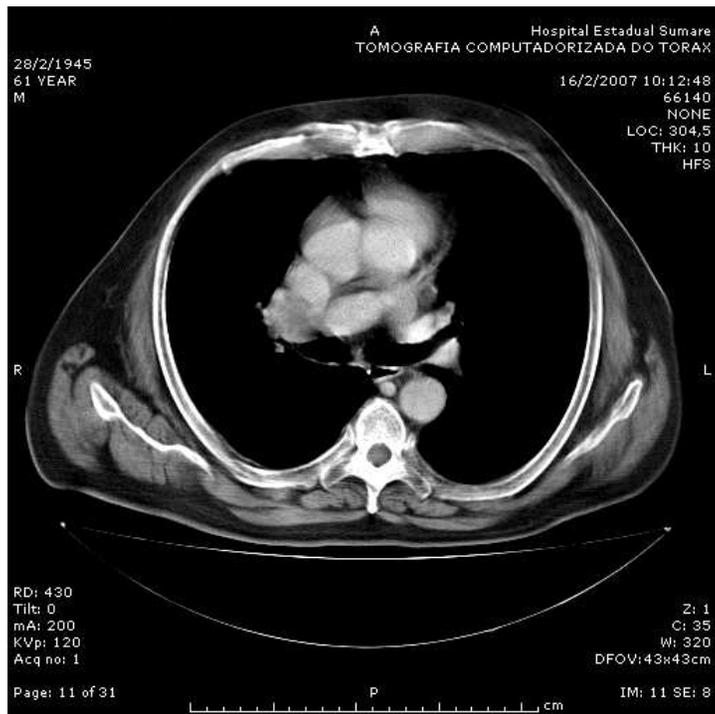


B. Após 2 ciclos de quimioterapia:

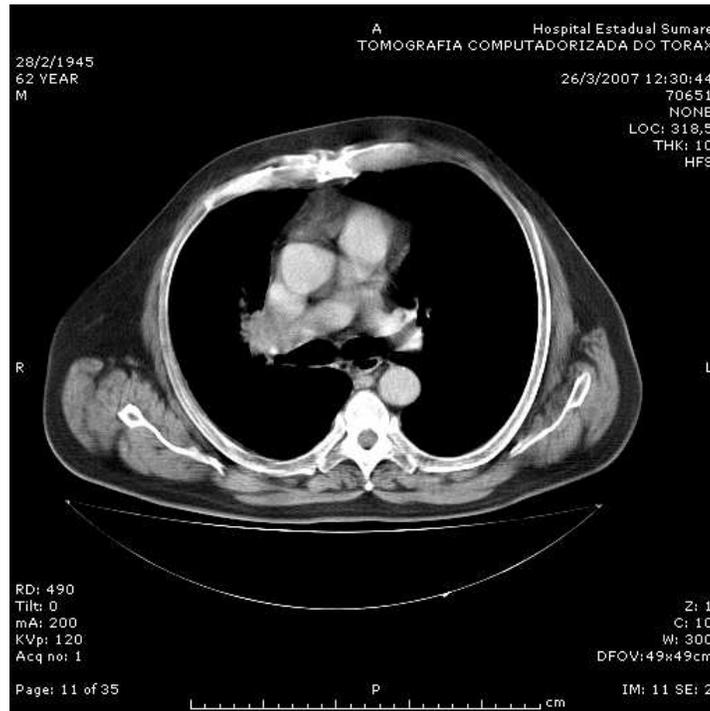




C. Após 4 ciclos de quimioterapia:



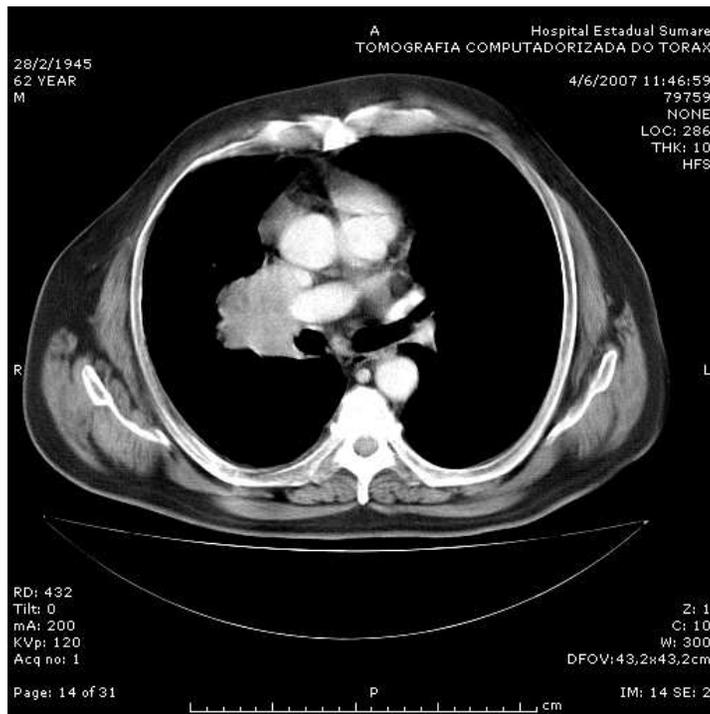
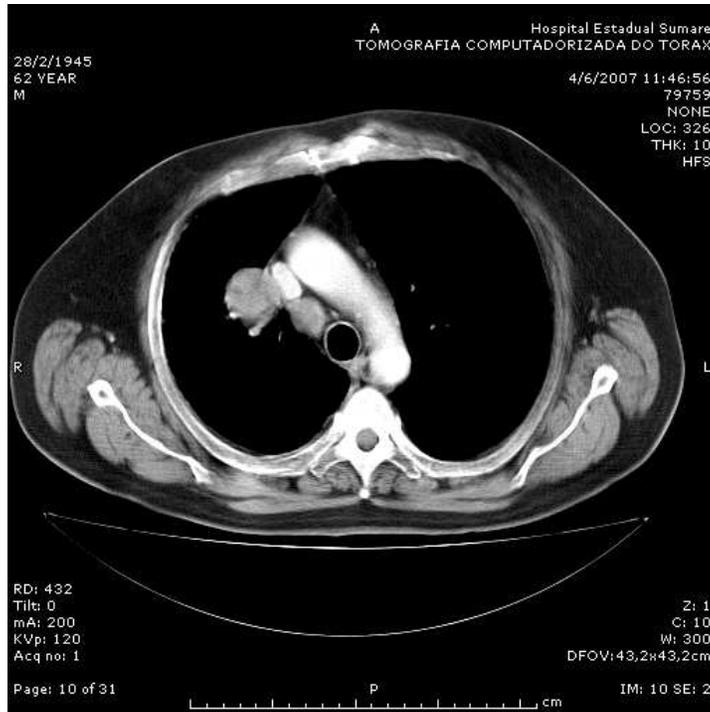
D. Pré-imunoterapia:



E. Após 2ª dose da imunoterapia (exame do dia da aplicação):

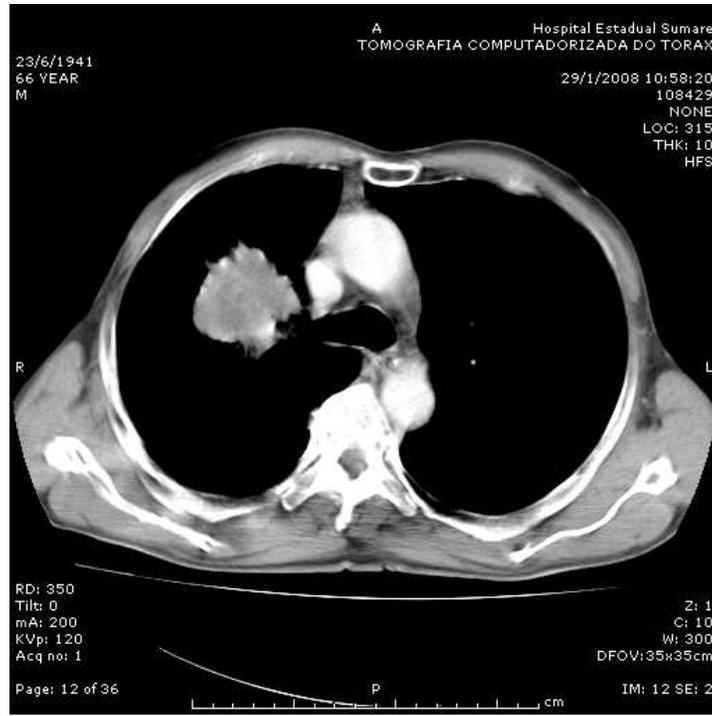


F. Dois meses após a 1ª dose da imunoterapia:

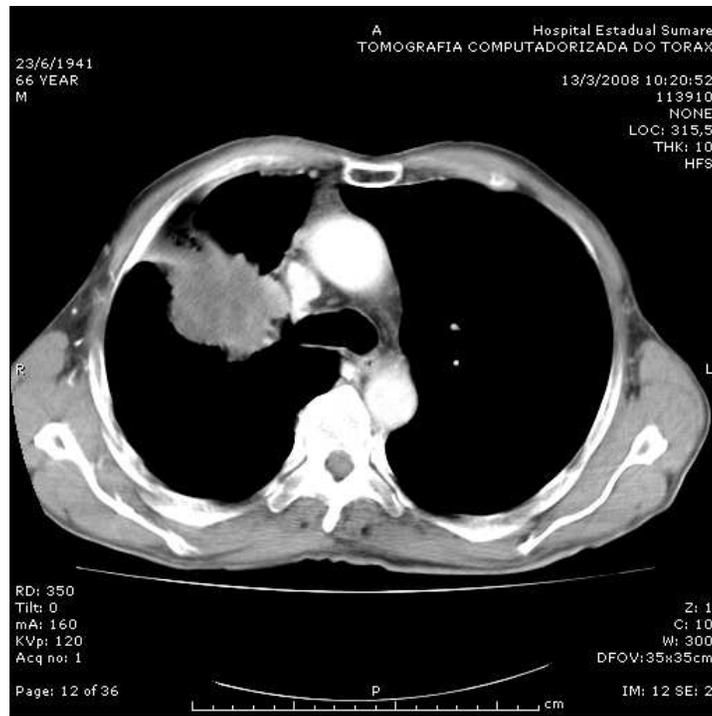


Paciente 2:

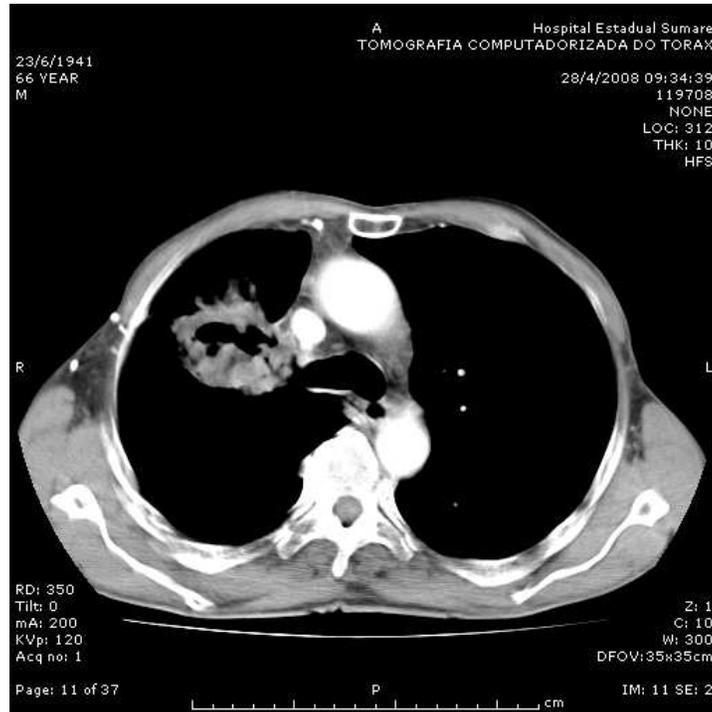
A. Após 4 ciclos de quimioterapia:



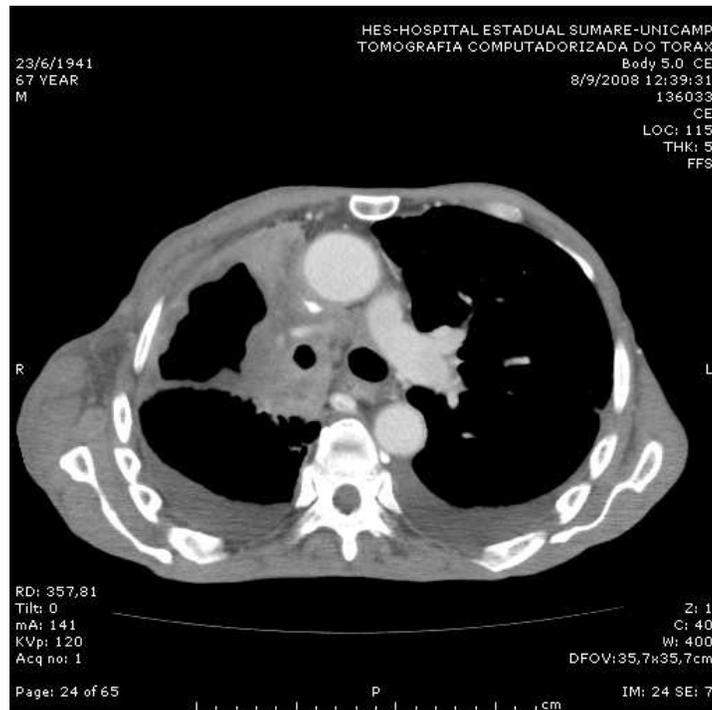
B. Duas semanas após a 2ª dose da imunoterapia:

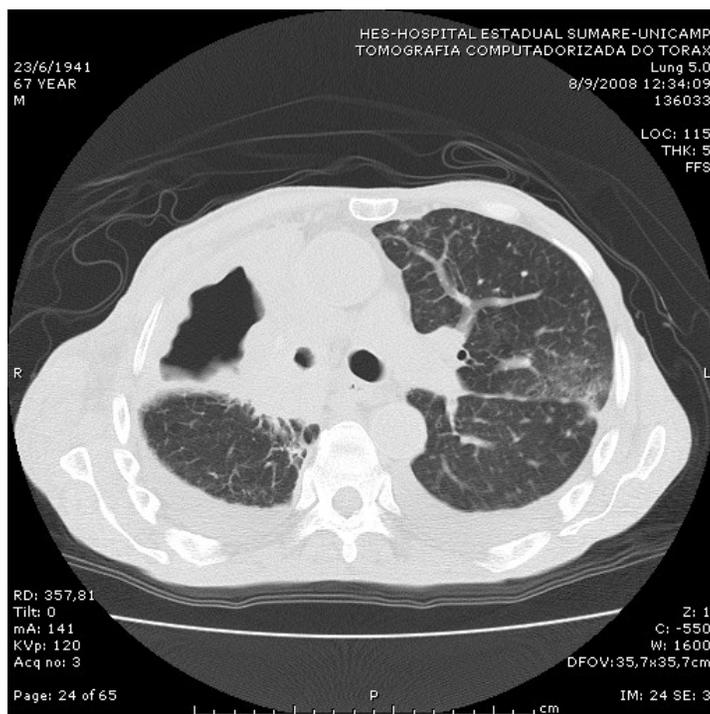


C. Uma semana após a radioterapia e dois meses após a 2ª dose da imunoterapia:



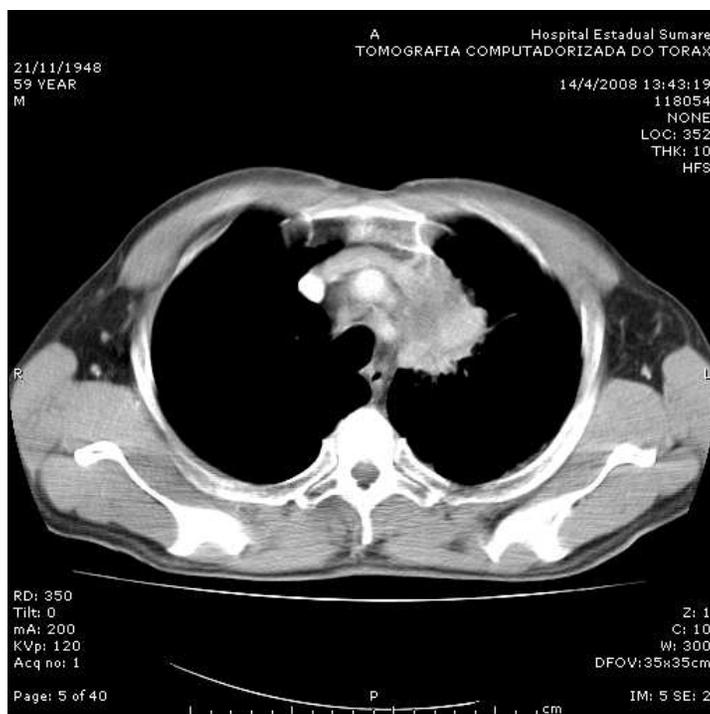
D. Sete meses após a 2ª dose da imunoterapia:

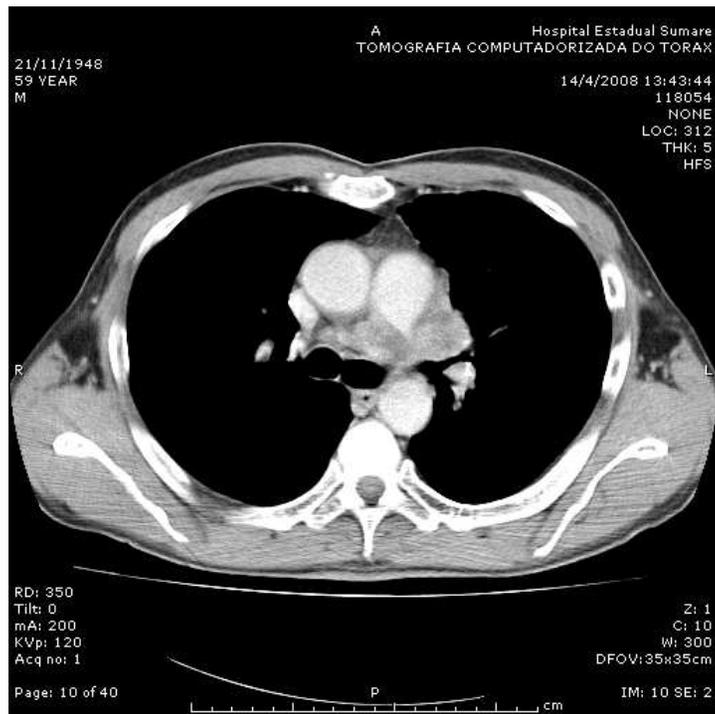
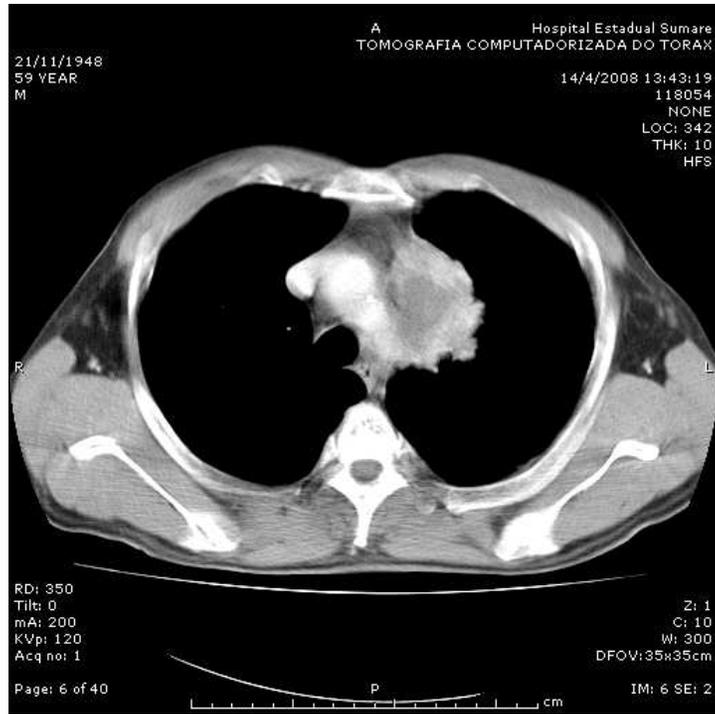


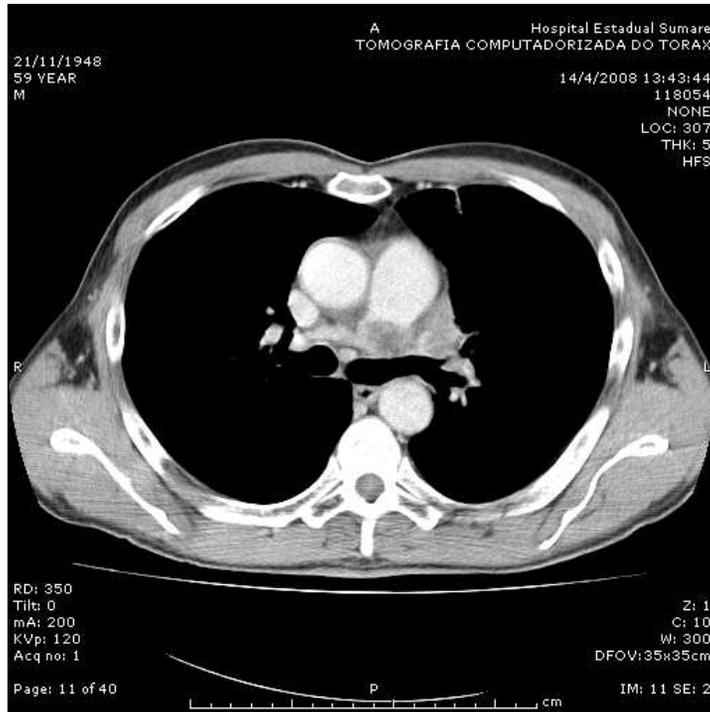


Paciente 3:

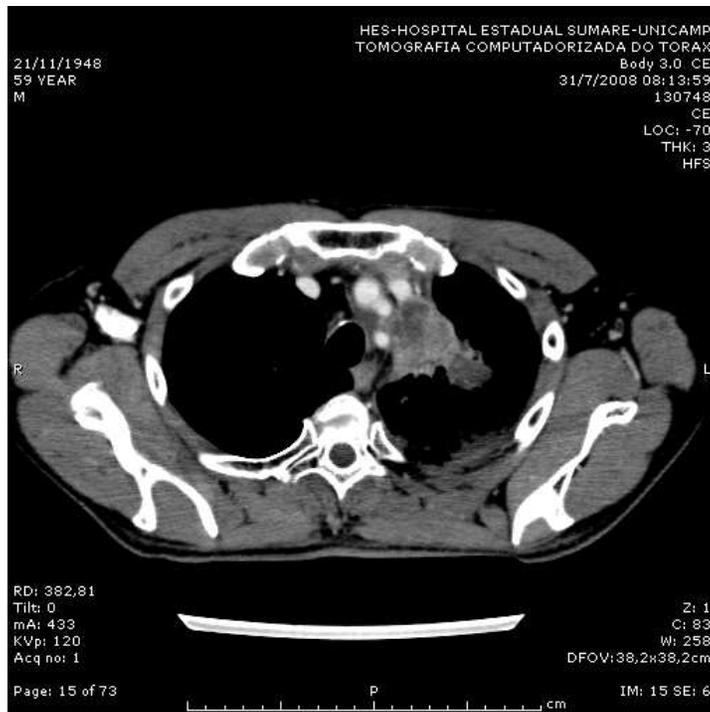
A. Após 4 ciclos de quimioterapia:



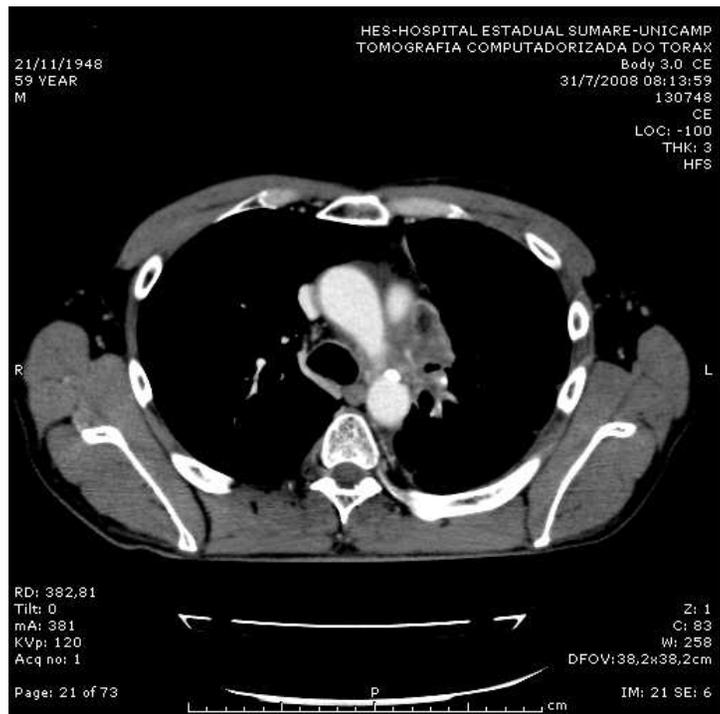
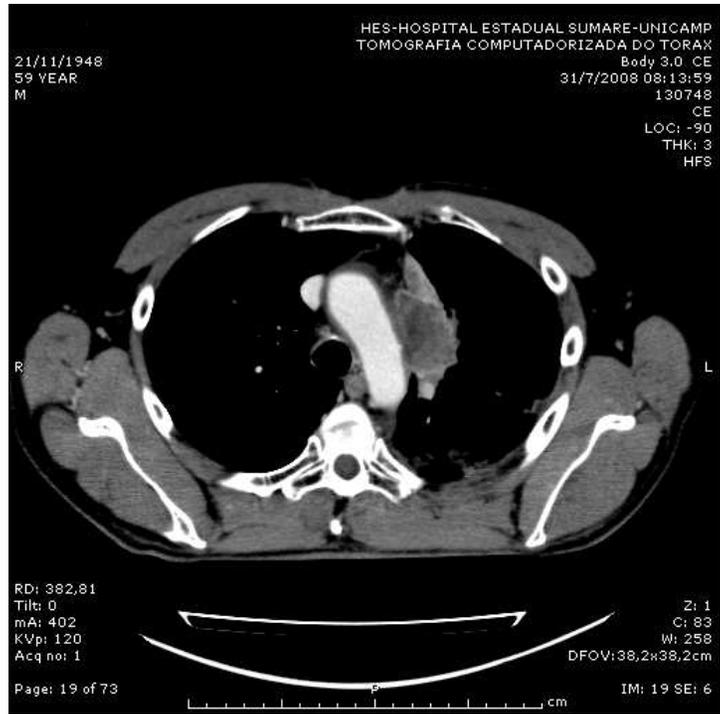


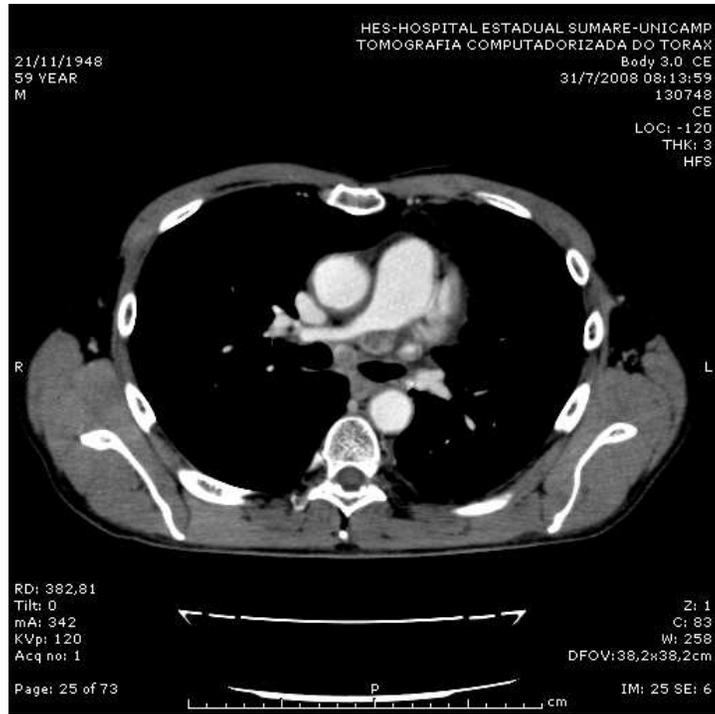


B. Após radioterapia:

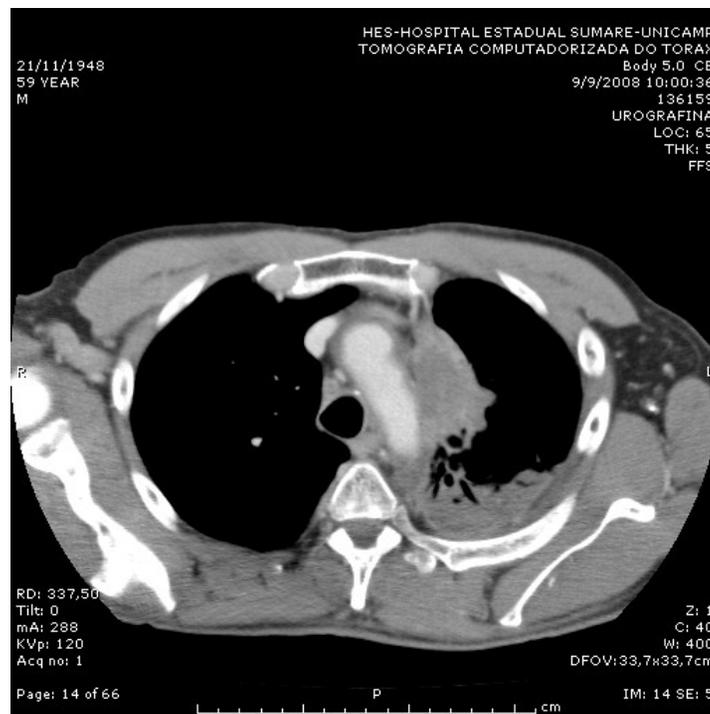
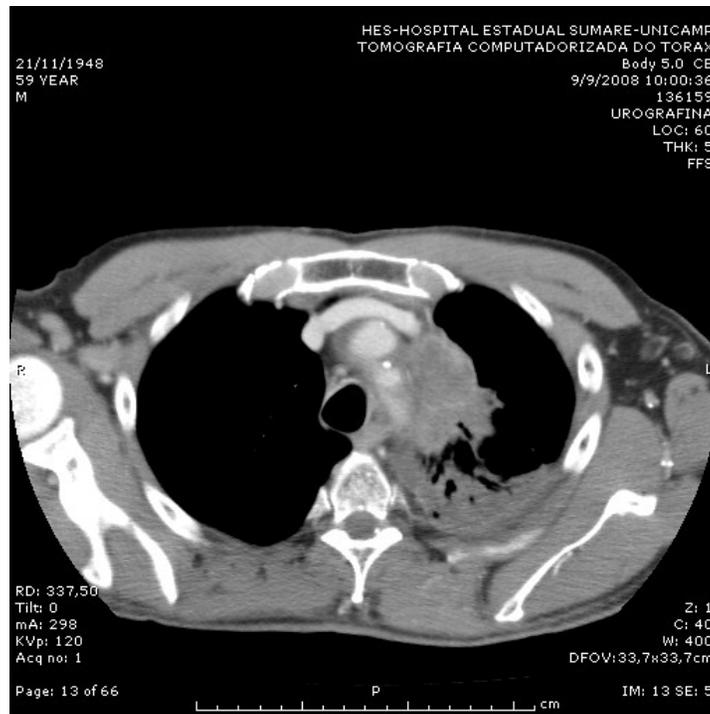


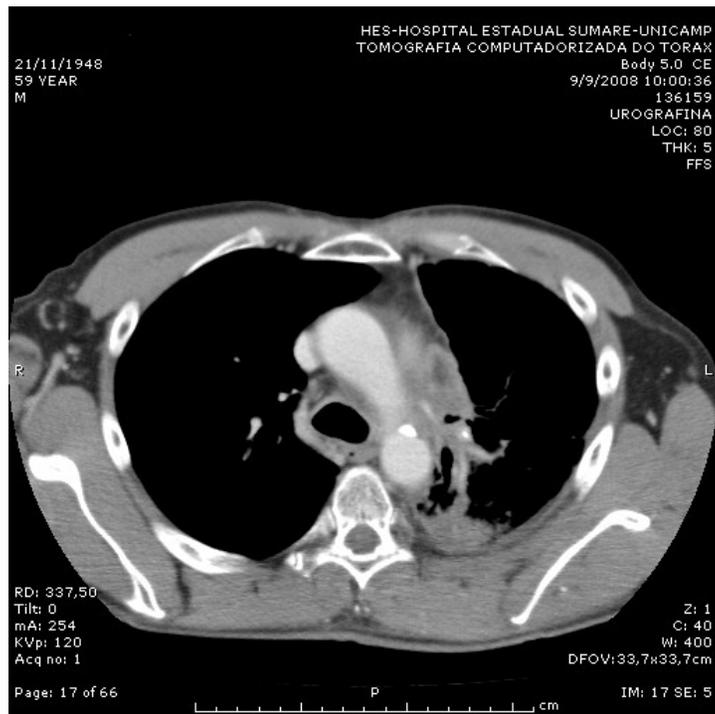
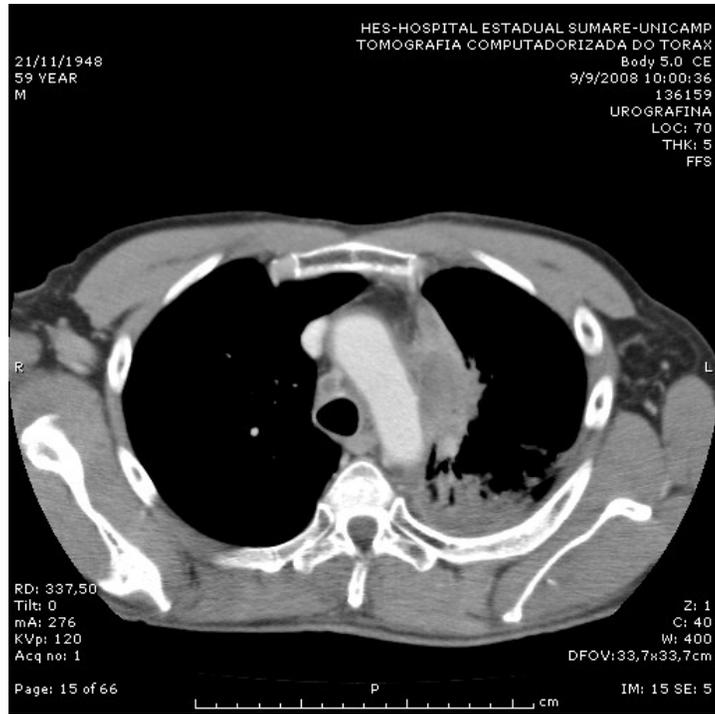


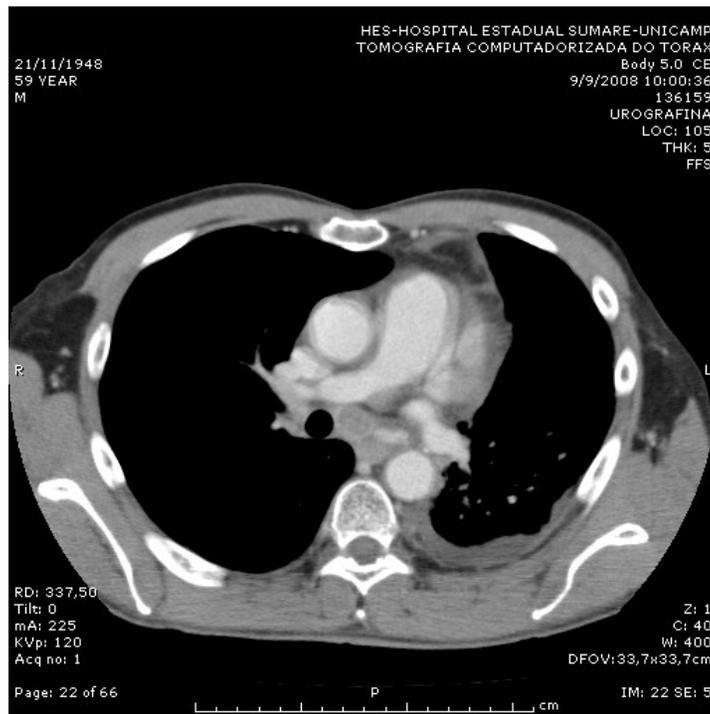
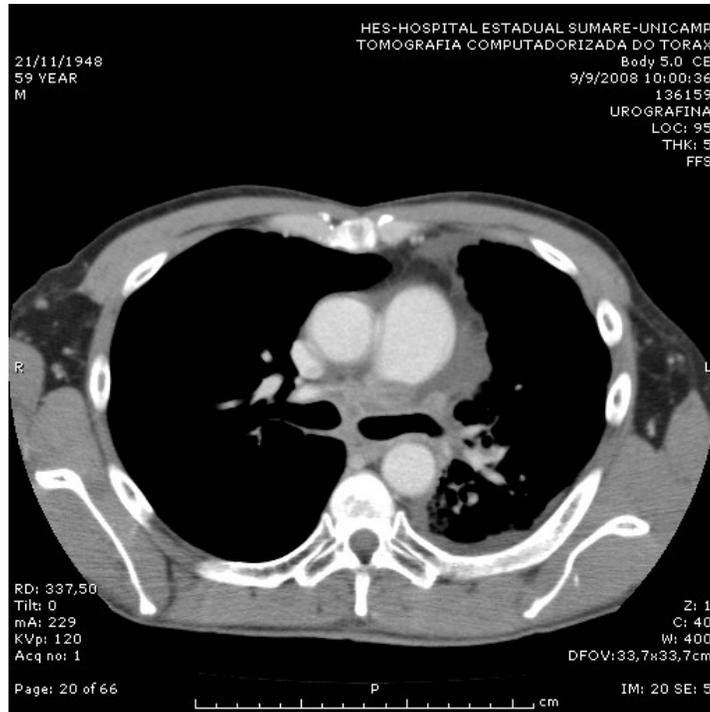


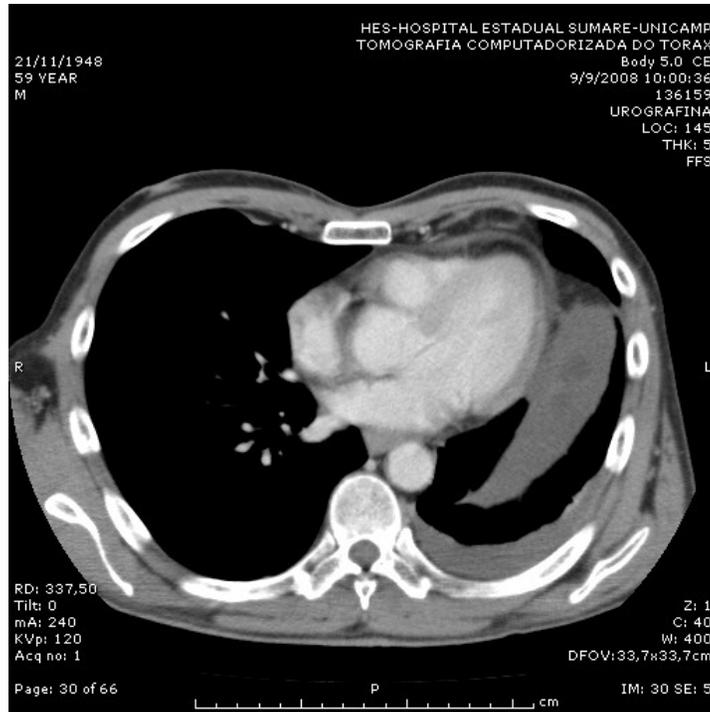


A. Três semanas após a 2ª dose da imunoterapia:



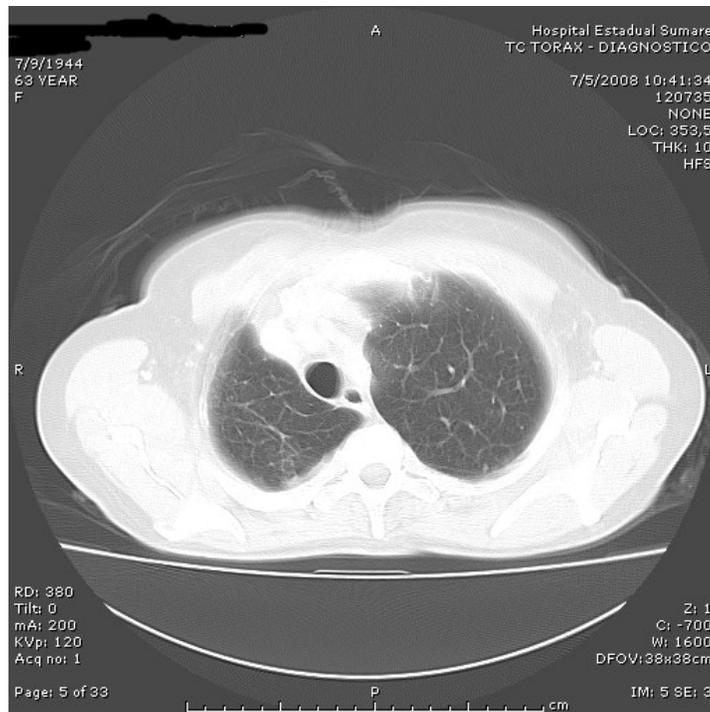


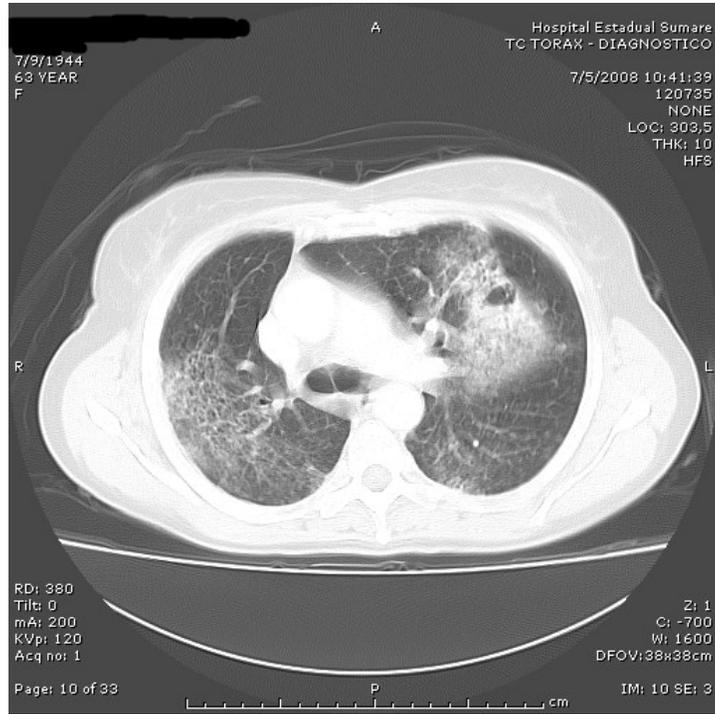
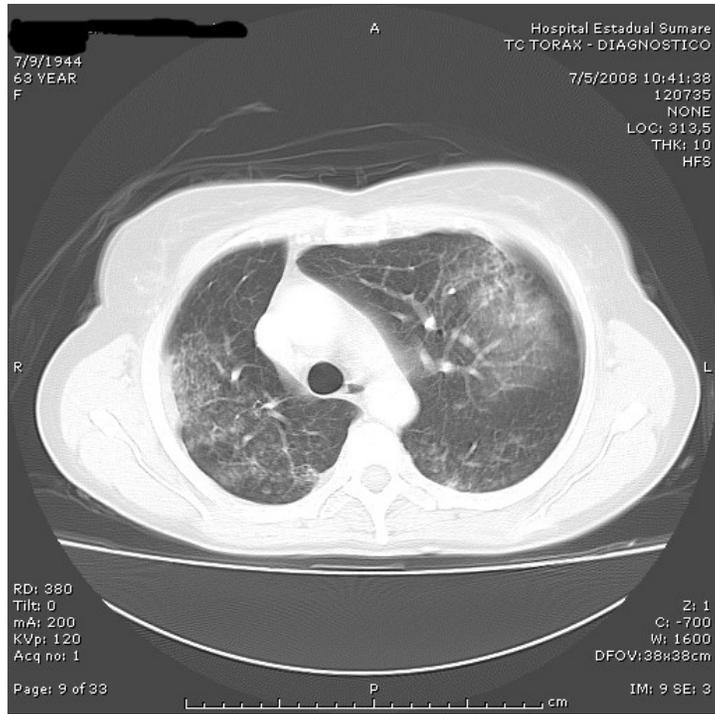


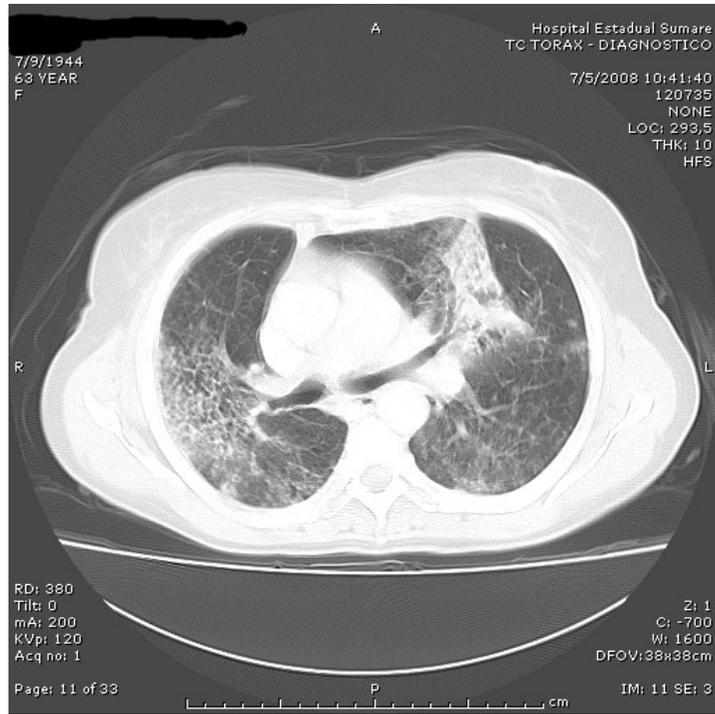


PACIENTE 4:

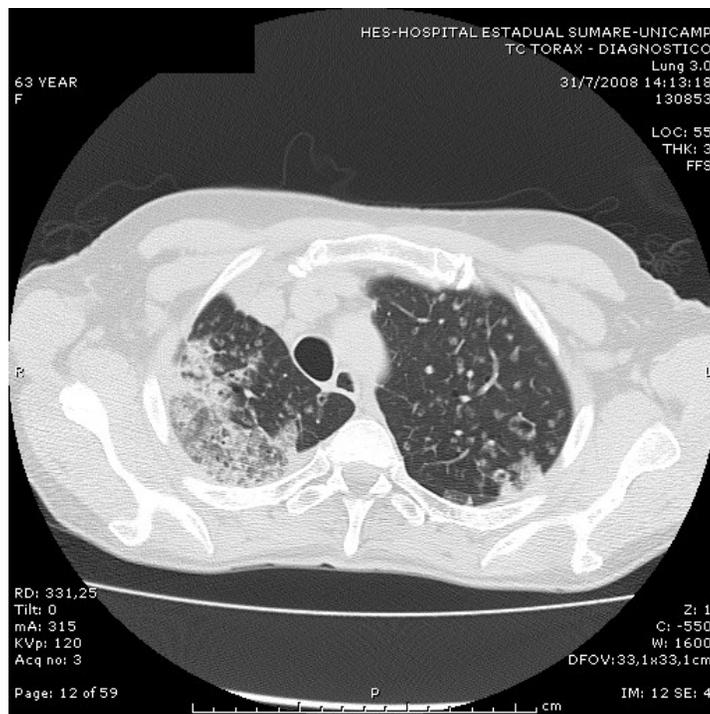
A. Após 4 ciclos de quimioterapia:

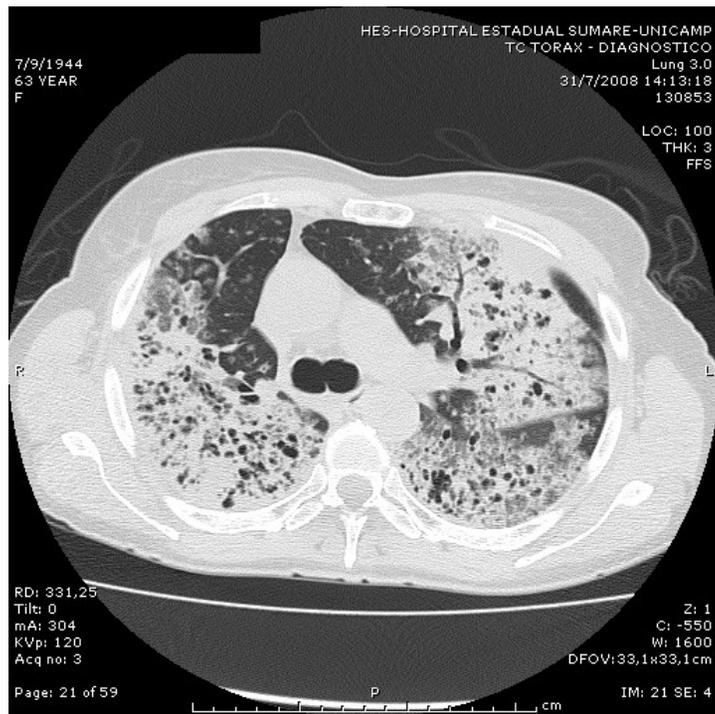
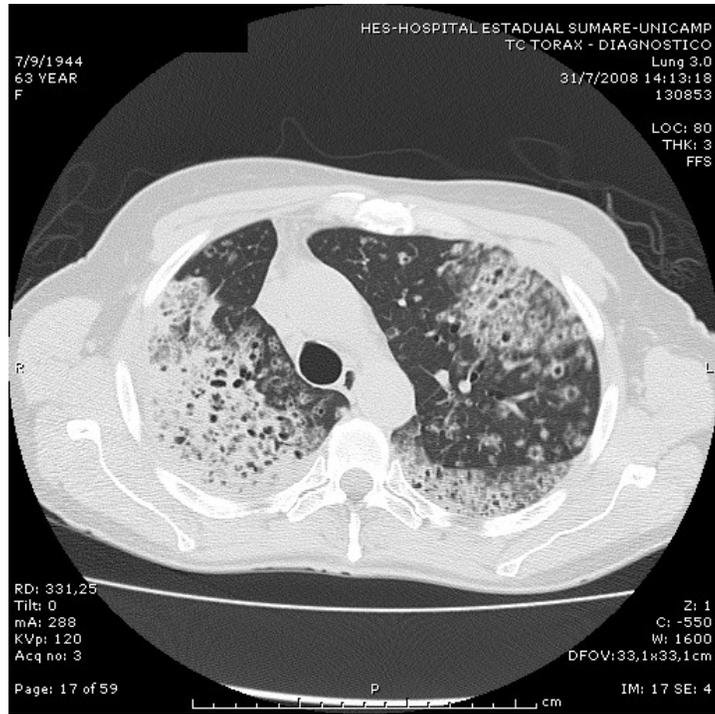


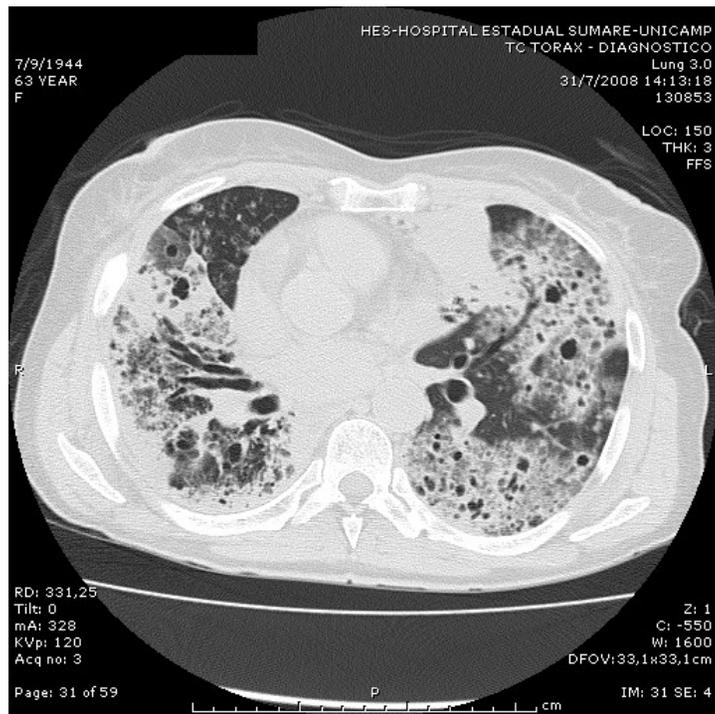
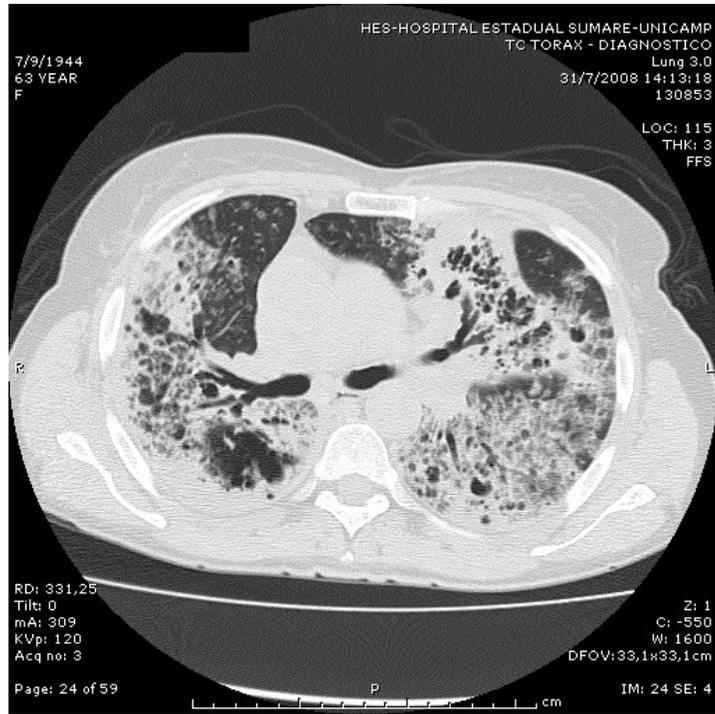


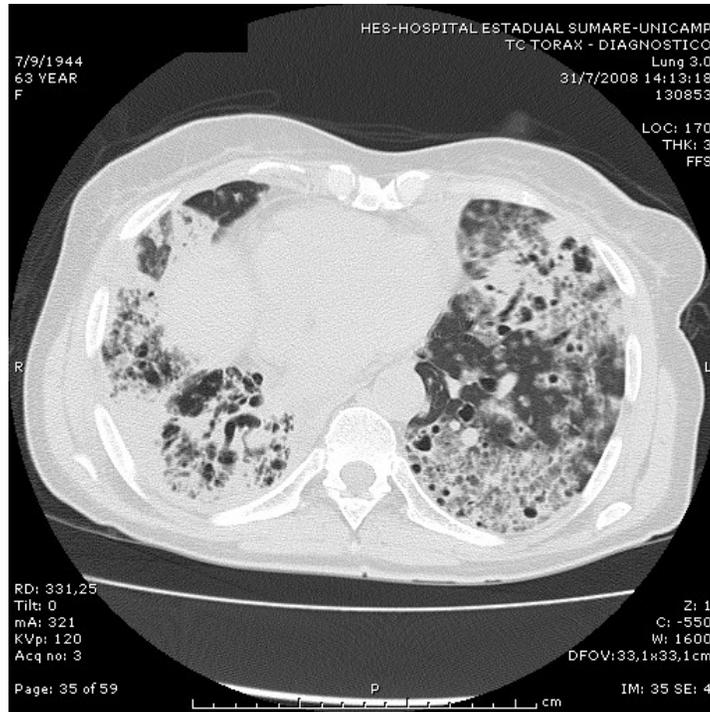


B. Seis semanas após a 2ª dose da imunoterapia:



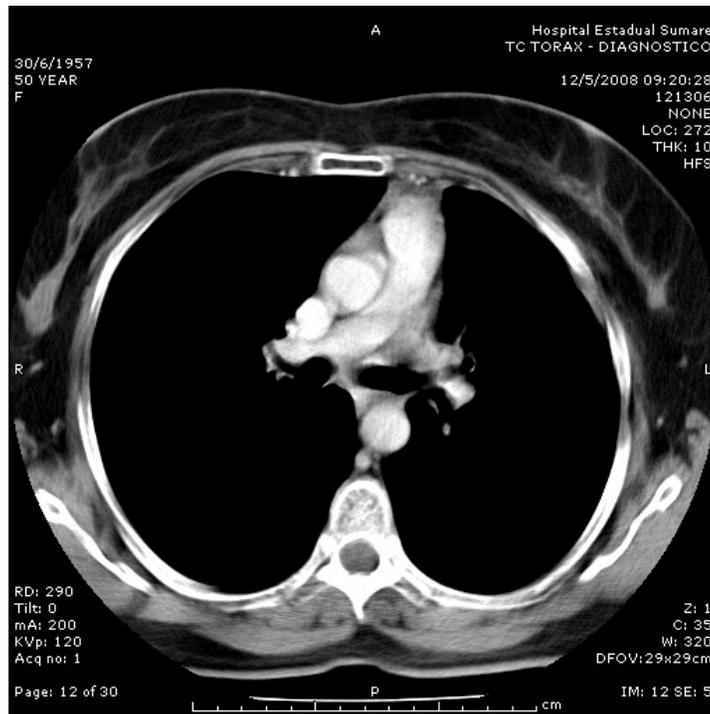


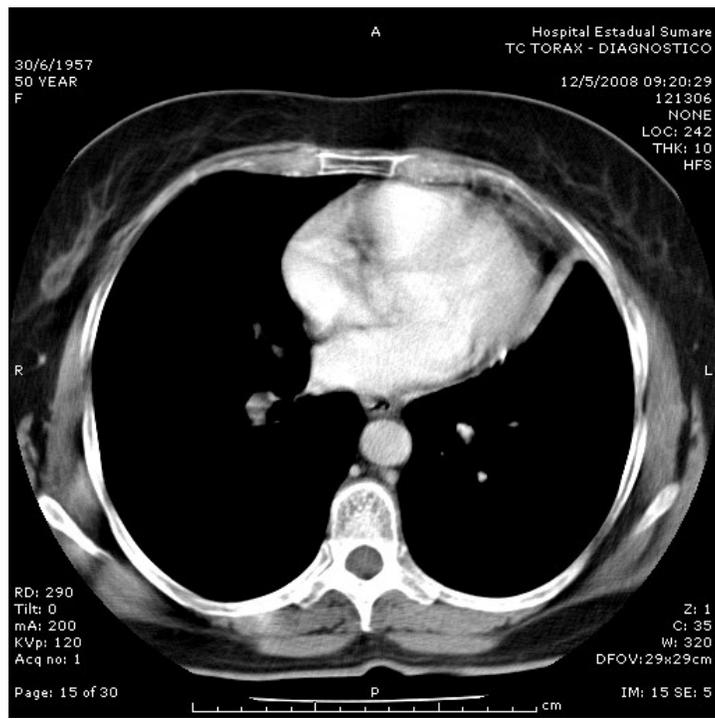
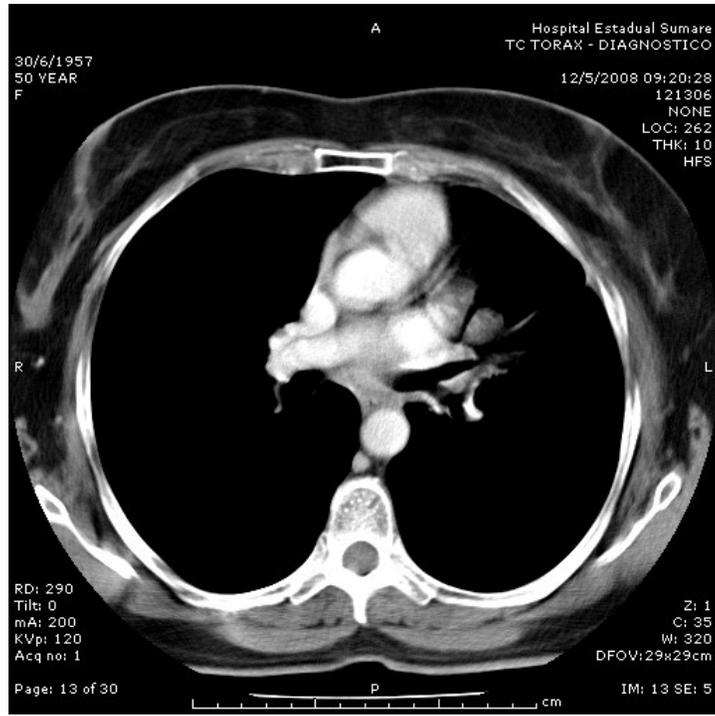




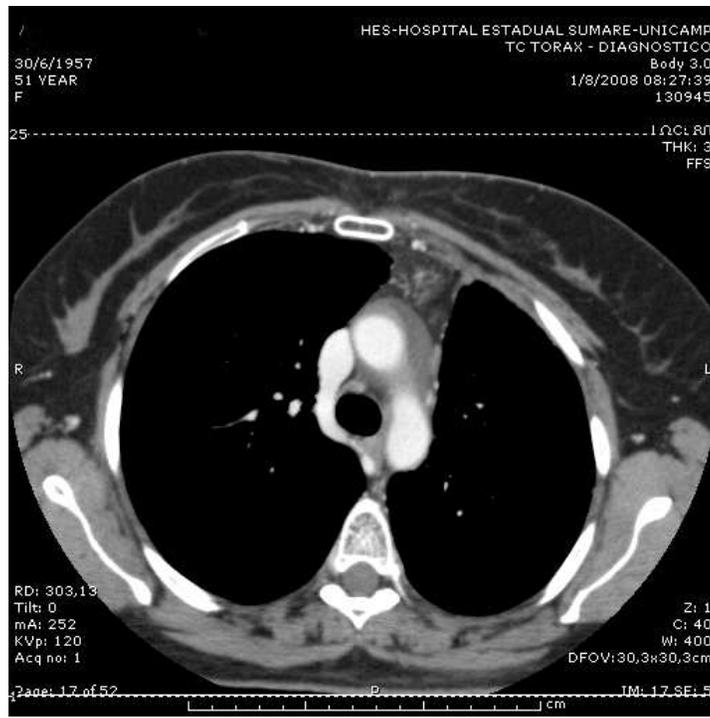
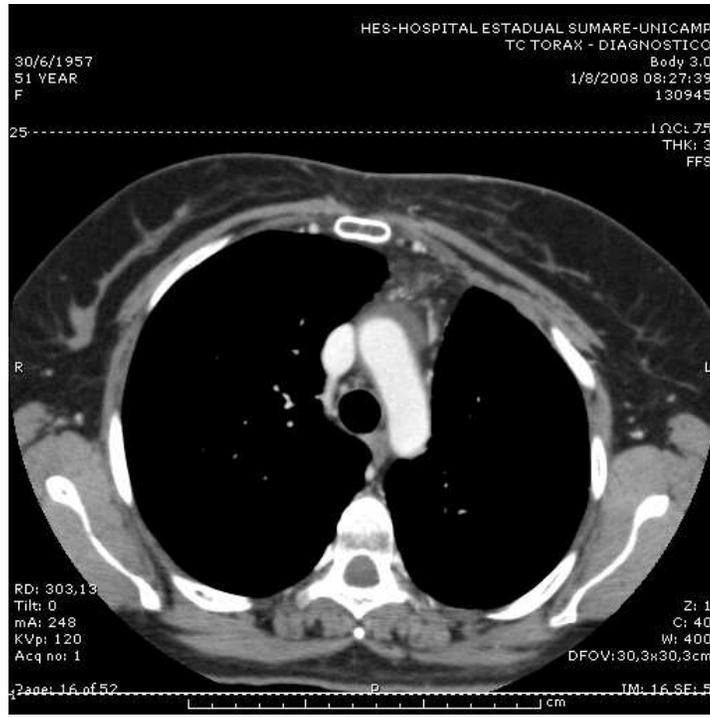
### PACIENTE 5:

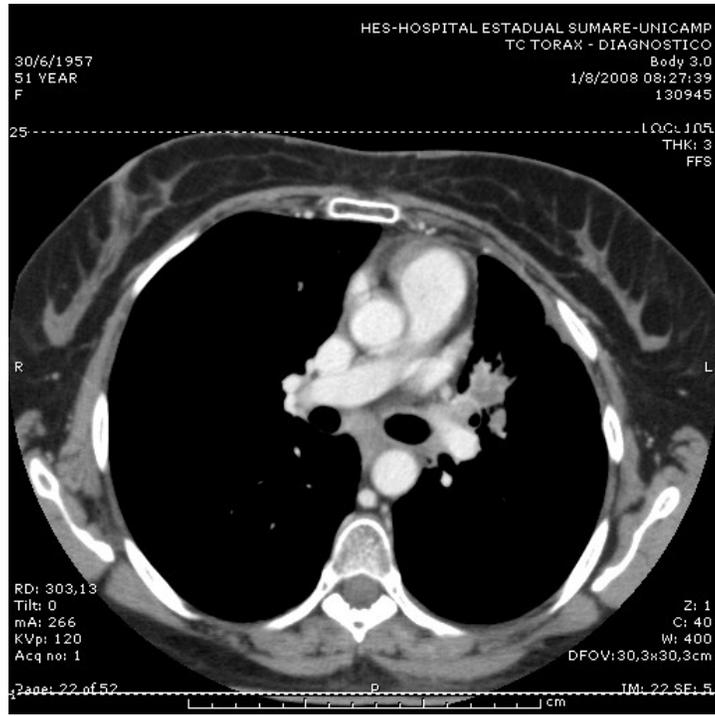
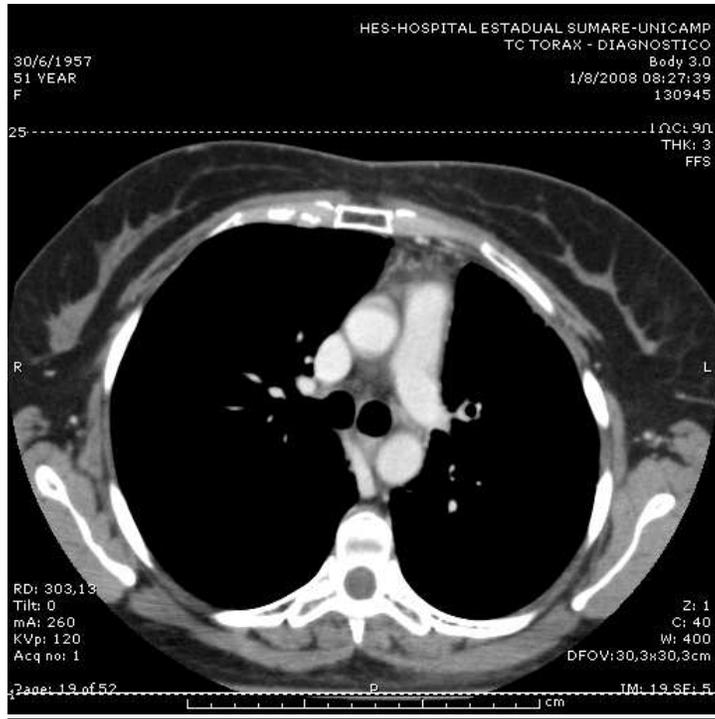
A. Após tratamento convencional (4 meses após a quimioterapia, 2 semanas após a radioterapia):

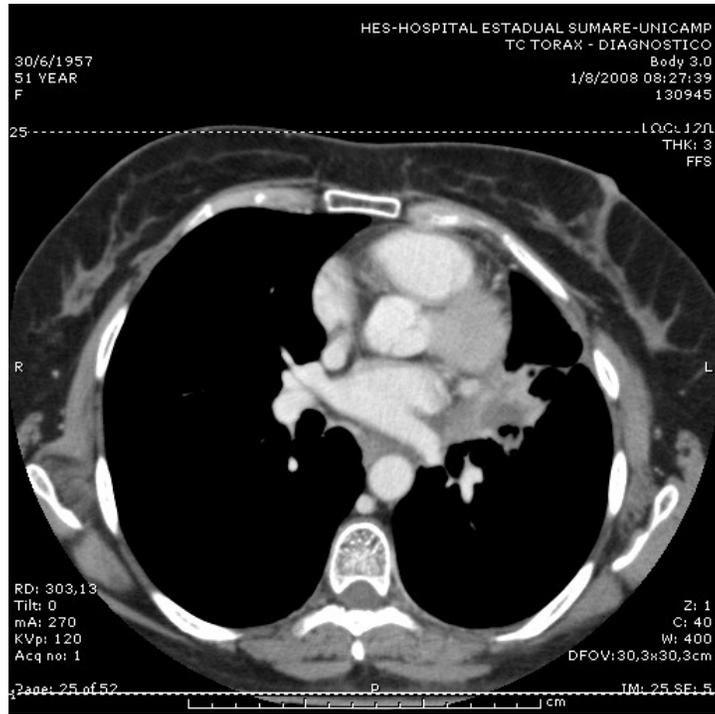
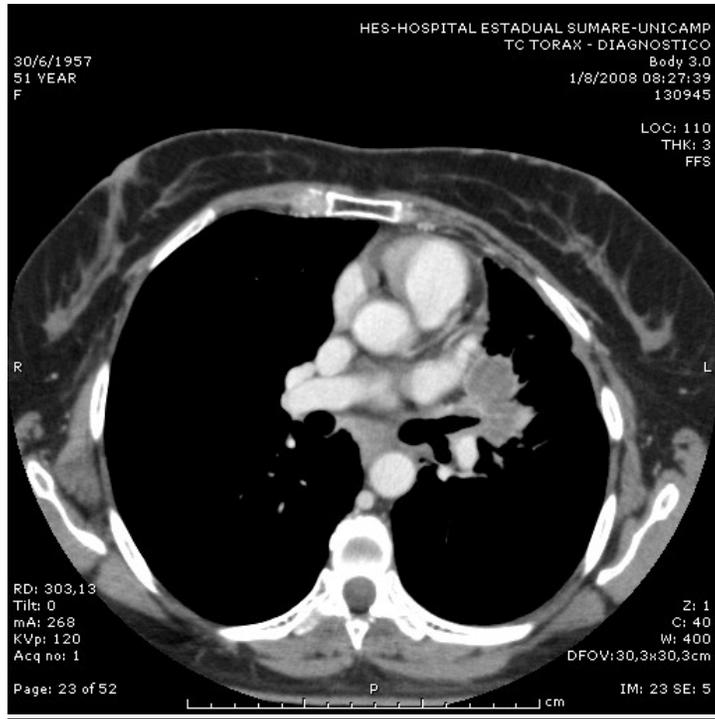




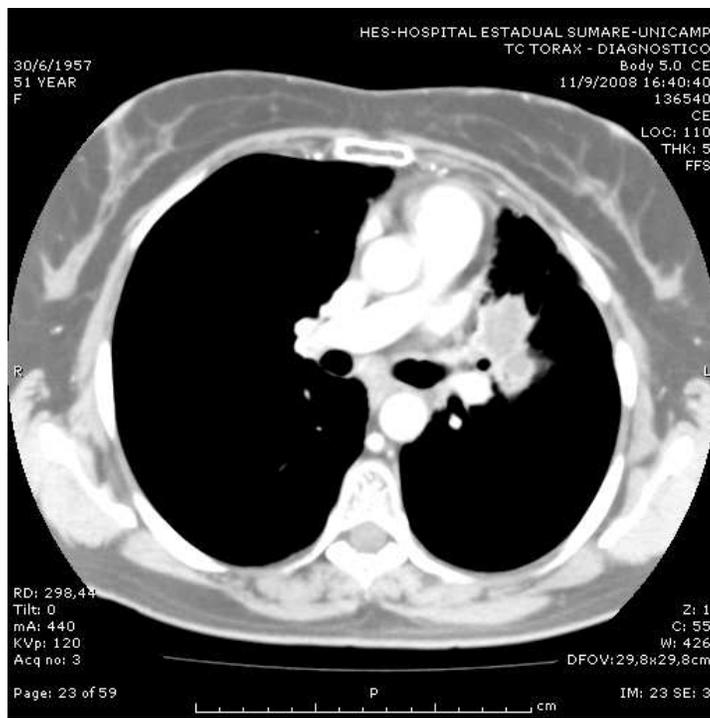
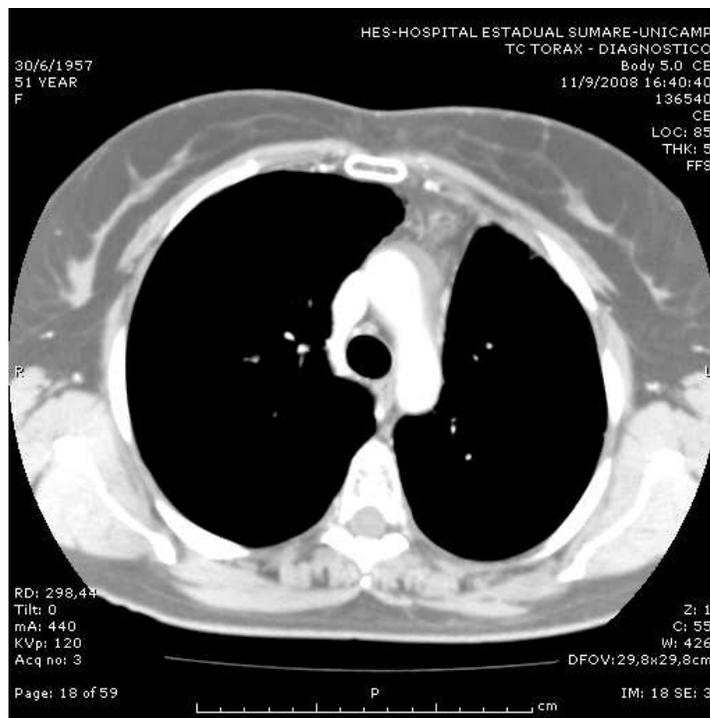
B. Três semanas após a 2ª dose da imunoterapia:

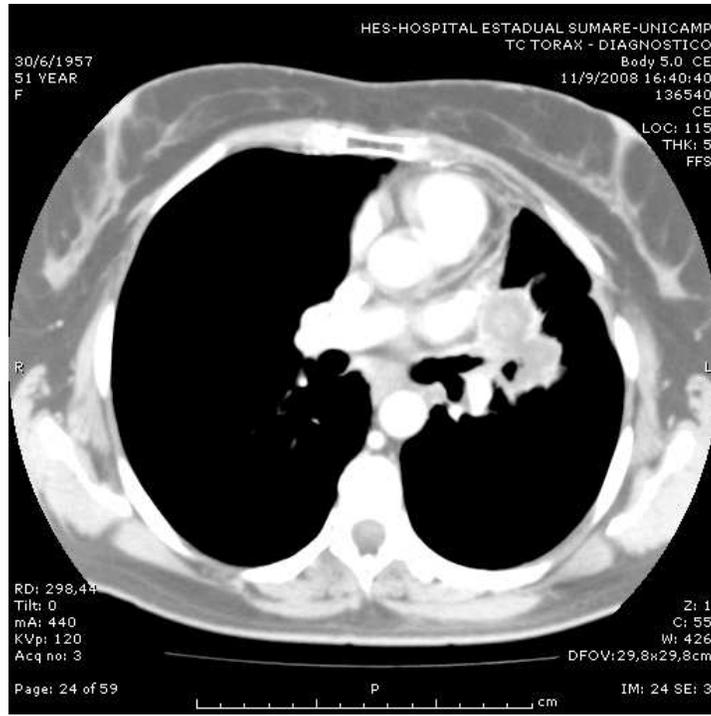




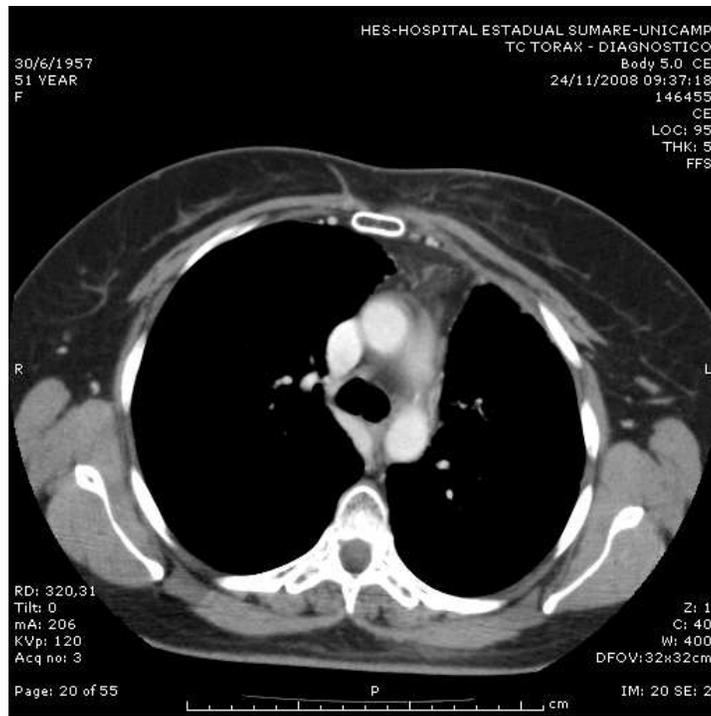


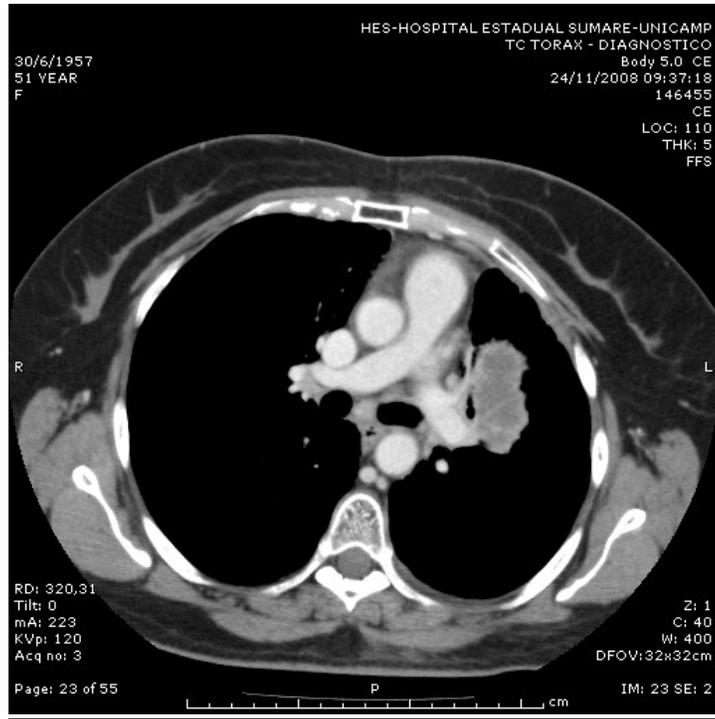
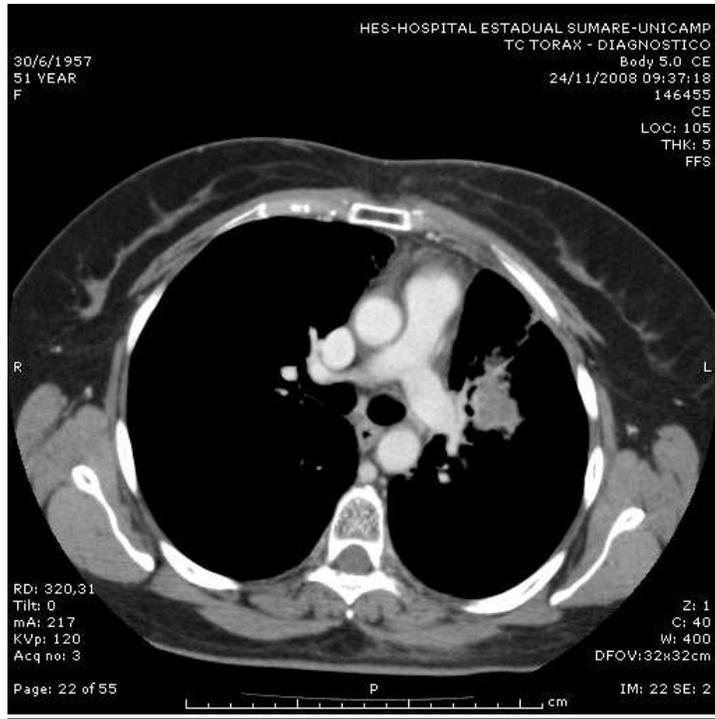
C. Oito semanas após a 2ª dose da imunoterapia:

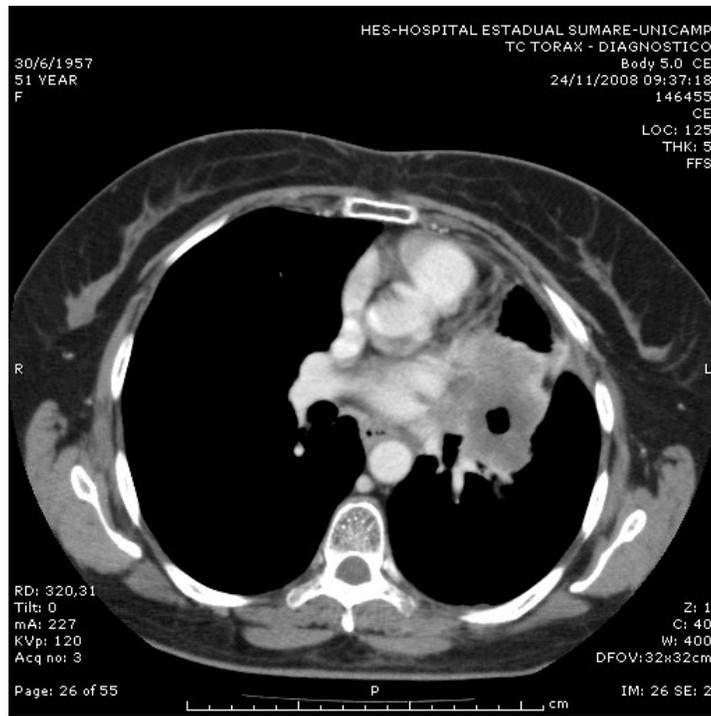
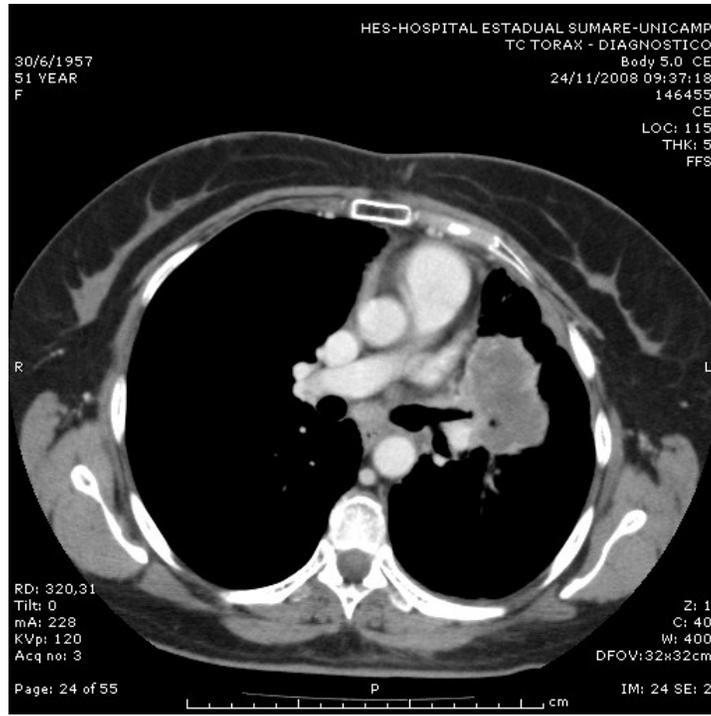


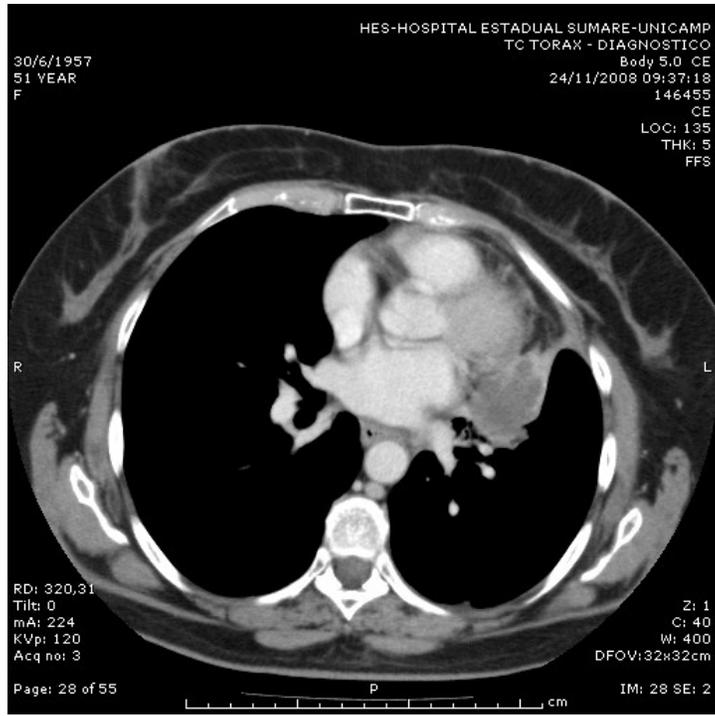


C. Dezoito semanas após a 2ª dose da imunoterapia:









## ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO

## Consentimento Livre e Esclarecido

**“Vacina de células dendríticas autólogas em pacientes com adenocarcinoma de pulmão”.**

**Tipo de estudo: Estudo fase II, prospectivo.**

Centro de pesquisa: Disciplinas de Hematologia e Pneumologia; Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Este termo de consentimento contém:

1. Informação para pacientes (original)

- O original deve ser arquivado no centro do investigador
- A cópia deve ser entregue ao paciente

2. Termo de Consentimento do Paciente

- O original assinado deve ser arquivado no centro do investigador
- A cópia assinada deve ser entregue ao paciente

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

H.C.: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Número do paciente: \_\_\_\_\_

Caro paciente,

Seu médico, Dr Maurício W. Perroud Jr. lhe pediu que participasse deste estudo clínico. O presente estudo está sendo conduzido de acordo com as exigências legais locais e a Declaração de Helsinki. Este é um código para proteger os direitos e bem-estar de pacientes que concordam em participar de estudos clínicos. O estudo foi aprovado por uma comissão de ética independente. A informação a seguir destina-se a ajudá-lo em sua decisão de participar ou não do estudo.

Além disso, seu médico do estudo informará sobre a natureza, riscos, conseqüências e procedimentos do estudo clínico. Por favor, leia o folheto informativo a seguir cuidadosamente e não hesite em perguntar ao seu médico sobre outros detalhes ou no caso de algo incompreensível. Se não puder ler, uma testemunha explicará a informação escrita neste folheto adequadamente. Por favor, certifique-se de ter compreendido porque o estudo está sendo conduzido e os exames realizados.

Se o(a) Senhor(a) se recusar a participar, seu atendimento médico futuro não será afetado. Se concordar em participar, o(a) Senhor(a) (e/ou sua testemunha) será solicitado(a) a assinar um termo de consentimento declarando que está participando por sua própria vontade e que é livre para se retirar a qualquer momento. Uma cópia do folheto informativo e do termo de consentimento serão entregues ao(à) Senhor(a).

Será fornecida a seguinte informação:

1. Por que são conduzidos estudos clínicos?
2. Por que o presente estudo está sendo realizado?
3. Quais são os aspectos experimentais deste estudo?
4. Quais são os tratamentos alternativos disponíveis?
5. O que acontece durante o estudo? Uma descrição do estudo.
6. Exames adicionais que podem ser solicitados
7. A que o(a) Senhor(a) deve prestar atenção
8. Quais os efeitos indesejáveis ou riscos possíveis durante o tratamento?
9. Onde está o seu benefício?
10. Para quem os dados serão encaminhados?
11. O que acontece se o Senhor(a) recusar o seu consentimento?

12. Quem irá responder suas dúvidas durante o estudo?

14. Mais perguntas?

### **1. Por que são conduzidos estudos clínicos?**

Estudos clínicos são necessários para descobrir sobre a eficácia e a segurança de drogas novas ou novas propostas de tratamento para uma determinada doença. Existem padrões internacionais – a Orientação “A Boa Prática Clínica” e princípios éticos “A Declaração de Helsinki”, da associação mundial de médicos – que garantem a boa condução de um estudo clínico.

É exigido por lei e padrões internacionais que Comissões de Ética independentes forneçam seu parecer favorável e que autoridades competentes independentes aproveem a condução do estudo.

O presente estudo é conduzido de acordo com as orientações mencionadas acima e a legislação local.

### **2. Por que o presente estudo está sendo realizado?**

Carcinoma de pulmão (ou câncer de pulmão) é uma doença grave e no nosso país menos de 10% dos pacientes alcançam a cura. Existem três modalidades de tratamento para um paciente com câncer de pulmão que são a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia. Destes, o tratamento mais efetivo é a cirurgia. Entretanto, no momento do diagnóstico somente 1 em 5 pacientes tem indicação de realizar o tratamento cirúrgico e este é um dos motivos da alta taxa de mortalidade desta doença.

A quimioterapia é a administração de quimioterápicos (que são medicações que “combatem” o câncer) e seu principal objetivo é reduzir o tamanho do tumor. O paclitaxel é um quimioterápico de 3ª geração e a sua associação com cisplatina para tratamento de câncer de pulmão já foi amplamente testada em vários estudos, e demonstrou ter uma alta taxa de resposta com efeitos colaterais aceitáveis. Esta associação de drogas já foi utilizada no tratamento do câncer de pulmão em vários estudos e os resultados são promissores.

A radioterapia é um tratamento que utiliza a emissão de raio X diretamente no tumor, também com o objetivo de reduzir o seu tamanho. Esta modalidade de tratamento pode ser utilizada sozinha ou em associação com a quimioterapia.

Entretanto, em alguns casos a utilização da quimioterapia e da radioterapia não são suficientes para reduzir ou acabar com o tumor. Quando isto acontece, não existe outra proposta de tratamento direcionada para controle do tumor.

### **3. Quais são os aspectos experimentais deste estudo?**

A parte experimental deste estudo é a implementação de um novo protocolo de tratamento no nosso serviço. Acreditamos que o tratamento com imunoterapia (“vacina”) no carcinoma de pulmão não pequenas células, quando utilizado nos pacientes que preenchem os critérios de inclusão, pode aumentar a taxa de sobrevida.

### **4. Quais são os tratamentos alternativos disponíveis?**

Nos pacientes com estadio avançado, IIIB ou IV, após o tratamento com quimioterapia e/ou radioterapia não há outro tratamento específico para o tumor. Resta apenas o tratamento de suporte clínico.

### **5. O que acontece durante o estudo? Uma descrição do estudo.**

Se o Senhor(a) foi convidado(a) a participar desse protocolo é porque preenche todos os critérios de inclusão no estudo. Portanto, já realizou todos os exames iniciais que são necessários. Os exames que serão pedidos durante o tratamento fazem parte da avaliação de qualquer tratamento radio e/ou quimioterápico. Os exames que são solicitados são: raio X de tórax; tomografia computadorizada de tórax, abdômen e crânio; ultrassonografia de abdômen; cintilografia óssea; broncoscopia; espirometria; eletrocardiograma; laboratoriais (hemograma, sódio, potássio, cálcio, creatinina, uréia, AST, ALT, fosfatase alcalina, gama GT, bilirrubinas, urina I, protoparasitológico de fezes).

O esquema de tratamento proposto pelo nosso estudo pode ser dividido em 5 etapas.

- 1ª etapa – Tratamento Quimioterápico: Será realizado 4 ciclos de quimioterapia, cada ciclo dura 3 semanas que são divididas da seguinte forma:
  - 1º dia do ciclo: sempre será feito em uma segunda-feira. Neste dia o(a) Senhor(a) será avaliado(a) por um(a) médico(a) da nossa equipe e será liberada a primeira dose do tratamento que é composta apenas

por paclitaxel e cisplatina. Tempo de infusão da medicação é de aproximadamente 3 horas.

- 15º dia do ciclo: é o começo da 3ª semana do ciclo e será uma segunda-feira. Neste dia o(a) Senhor(a) passará em consulta no nosso ambulatório às 13:00 horas. Não será administrado a quimioterapia.
- 19º dia do ciclo: será uma sexta-feira. Neste dia o(a) Senhor(a) virá ao hospital para colher alguns exames de sangue para o próximo ciclo de quimioterapia. Estes exames poderão ser colhidos na cidade em que o Senhor(a) reside.

- 2ª etapa – Avaliação do Tratamento Quimioterápico: o(a) Senhor(a) fará uma tomografia de tórax para que possamos avaliar o resultado do tratamento quimioterápico. Este exame será repetido de 2 em 2 meses até completar 12 meses do início do tratamento.
- 3ª etapa – Esta etapa será realizada em 50% dos pacientes. Consiste na realização de leucaferese, que é um procedimento realizado em uma máquina semelhante à hemodiálise, em que são retiradas algumas células do sangue para a produção da vacina.
- 4ª etapa – Aplicação da vacina. Será feita somente nos pacientes submetidos à leucaferese após, aproximadamente, 2 meses do final da quimioterapia. Serão duas aplicações, uma na pele (intradérmica) e outra na veia (intravenosa), que serão repetidas após 15 dias. Devido à aplicação da vacina será necessário coletar amostras de sangue nas seguintes datas: 1 semana antes da primeira dose da vacina; 2 semanas após a primeira e a segunda dose; 1 mês após o término da vacinação.
- 5ª etapa – Acompanhamento: após o término de todo tratamento o(a) Senhor(a) ficará em acompanhamento ambulatorial. No primeiro ano as consultas são realizadas mensalmente, no segundo ano são feitas a cada

quatro meses. Entre o 3º e o 5º ano, as consultas são realizadas a cada seis meses.

#### **6.Exames adicionais que podem ser solicitados.**

Eventualmente poderemos solicitar algum exame fora da rotina citada acima. Isto poderá acontecer caso o(a) Senhor(a) apresente algum efeito adverso ao tratamento ou alguma complicação relacionada à doença. Antes de realizar qualquer exame adicional, informaremos e explicaremos o(s) motivo(s) da solicitação. É importante salientar que faremos tudo pensando no seu bem estar.

#### **7.A que o(a) Senhor(a) deve prestar atenção.**

Os riscos do tratamento que estamos propondo é o mesmo de qualquer tratamento quimioterápico. Ao participar desse estudo o(a) Senhor(a) não estará correndo riscos desnecessários ou maiores do que outro tratamento quimioterápico. Lembramos que este não é um novo esquema de drogas e que seu uso já está bem estabelecido na literatura médica.

Em relação à vacina não é esperado efeito adverso pois, apesar de ser um procedimento relativamente novo, ela será produzida com as células do seu organismo.

Os efeitos adversos do tratamento serão discutidos no próximo item. Dentre eles, o que pode ocasionar as complicações mais graves é o efeito sobre a medula óssea. Como efeito do tratamento pode ocorrer anemia, queda do número de glóbulos brancos e de plaquetas. Em alguns casos, devido à anemia e à queda no número de plaquetas, é necessário realizar a transfusão de sangue (hemácias e/ou plaquetas). A queda do número de glóbulos brancos favorece o aparecimento de infecções, por isso você deve procurar o serviço médico caso apresente febre durante o tratamento.

#### **8.Quais os efeitos indesejáveis ou riscos possíveis durante o tratamento?**

Os efeitos colaterais da quimioterapia que utilizaremos já são bem conhecidos e são semelhantes aos encontrados em outros esquemas. É incomum o aparecimento de efeitos adversos sérios, como sangramentos ou infecções graves.

As reações adversas mais frequentes são: náuseas; vômitos; inapetência; diarreia; queda de cabelo; alterações hematológicas (anemia, queda no número de plaquetas e/ou glóbulos brancos), que raramente são graves.

### **9. Onde está o seu benefício?**

Esperamos que a vacina tenha um importante efeito na redução e/ou controle do tumor, propiciando uma maior sobrevida e ganho na qualidade de vida.

Entretanto, é possível que o(a) Senhor(a) não receba qualquer benefício adicional de saúde pela sua participação. O seu estado de saúde será acompanhado muito estreita e cuidadosamente durante o estudo e, se necessário, seu médico poderá alterar o tratamento.

A informação derivada do presente estudo pode beneficiar outras pessoas com câncer de pulmão.

### **10. Para quem os dados serão encaminhados?**

Todos os dados relativos ao(a) Senhor(a) são confidenciais. A informação obtida durante este estudo será utilizada para a elaboração de trabalhos científicos que serão publicados. Seu nome ou qualquer outra identificação pessoal não serão usados em relatórios ou publicações resultantes do estudo e não serão liberados sem a sua permissão, exceto se obrigado por lei.

### **11. O que acontece se o Senhor(a) recusar o seu consentimento?**

Sua participação é inteiramente voluntária e o(a) Senhor(a) poderá se retirar do estudo a qualquer momento. O(A) Senhor(a) não necessariamente precisa fornecer um motivo para se retirar, a menos que tenha ocorrido um evento adverso. Neste caso, solicitamos gentilmente que considere fornecer mais informações para proteger também os outros pacientes neste estudo.

A recusa em participar ou sua retirada do estudo não afetarão de forma alguma a forma como o Sr(a) será tratado(a) ou seus direitos como paciente. Seu médico pode também decidir, se necessário, por seu afastamento do estudo.

**12. Quem irá responder suas dúvidas durante o estudo?**

Se o(a) Senhor(a) tiver outras dúvidas sobre o estudo e seus direitos a qualquer momento durante este estudo, poderá entrar em contato com

Médico: Maurício Wesley Perroud Junior

Telefone: (19) 3521-7907

Emergência (24 horas): (19) 9112-8192

**14. Mais perguntas?**

Outras dúvidas                      ( ) sim ( ) não

Caso afirmativo, por favor, apresente suas dúvidas por escrito abaixo:

---

---

---

---

---

**Responsáveis pelo estudo:**

Prof. Dra. SaraTheresinha Ollala Saad – Telefone: (19) 3521-8734

Prof. Dr. Lair Zambon - Telefone: (19) 3521-7907

Maria Teresa Almeida de Azevedo - Telefone: (19) 3521-8734

Maurício Wesley Perroud Junior - Telefone: (19) 3521-7907

**Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) / UNICAMP - Telefone: (19) 3521-8936**

## Consentimento Livre e Esclarecido

**“Vacina de células dendríticas autólogas em pacientes com adenocarcinoma de pulmão”.**

**Tipo de estudo: Estudo fase II, prospectivo.**

Centro de pesquisa: Disciplinas de Hematologia e Pneumologia; Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

H.C.: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Número do paciente: \_\_\_\_\_

### **1.Confirmação do médico**

Confirmo que informei completamente o paciente sobre a natureza, riscos e conseqüências do estudo supracitado bem como sobre o tratamento dos dados clínicos do paciente. O paciente recebeu uma cópia do Folheto Informativo.

Nome do Médico: Maurício Wesley Perroud Junior

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Telefone: (19) 3521-7907 / (19) 9112-8192

Assinatura: \_\_\_\_\_

## Consentimento Livre e Esclarecido

**“Vacina de células dendríticas autólogas em pacientes com adenocarcinoma de pulmão”.**

**Tipo de estudo: Estudo fase II, prospectivo.**

Centro de pesquisa: Disciplinas de Hematologia e Pneumologia; Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

### **2. Confirmação do Paciente**

Confirmando que fui plenamente informado pelo Dr Maurício Wesley Perroud Junior sobre a natureza, riscos e conseqüências deste estudo e o tratamento dos dados clínicos. Li e compreendi a informação para pacientes. Recebi uma cópia do Folheto Informativo e estou de acordo com seu conteúdo. Forneço aqui, por minha própria vontade, meu consentimento em particular do estudo e concordo plenamente com o tratamento dos dados clínicos.

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## Consentimento Livre e Esclarecido

**“Vacina de células dendríticas autólogas em pacientes com adenocarcinoma de pulmão”.**

**Tipo de estudo: Estudo fase II, prospectivo.**

Centro de pesquisa: Disciplinas de Hematologia e Pneumologia; Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

### **3.Confirmação de Testemunha/Representante legal, quando houver**

Atesto que a informação no termo de consentimento e qualquer outra informação escrita foram explicadas precisamente e aparentemente compreendidas pelo paciente, e que o consentimento foi livremente fornecido pelo paciente.

Nome da testemunha/ responsável legal: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## ACESSO AO ARTIGO PUBLICADO

PERROUD, M. W., Jr; HONMA, H. N.; BARBEIRO, A. S. et al. Mature autologous dendritic cell vaccines in advanced non-small cell lung cancer: a phase I pilot study. *Journal of experimental & clinical cancer research*: CR, v. 30, p. 65, 2011.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21682877>

<http://www.jeccr.com/content/30/1/65>