

GISELE DA SILVA SIMONETI

**A INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA
NA GERAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PARA O
TRATAMENTO IMUNOTERÁPICO DE PACIENTES COM
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**



UNICAMP

CAMPINAS

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

GISELE DA SILVA SIMONETI

**“A INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA
NA GERAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PARA O
TRATAMENTO IMUNOTERÁPICO DE PACIENTES COM
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA”**

Orientador (a): Simone Cristina Olencki Gilli

Co-Orientador (a): Sara Teresinha Olalla Saad

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa
de Pós Graduação em Fisiopatologia Médica da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do Título de Mestra em Fisiopatologia Médica,
na Área de Concentração: Biologia Estrutural,
Celular, Molecular e do Desenvolvimento.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
DEFENDIDA PELA ALUNA GISELE DA SILVA SIMONETI
E ORIENTADA PELA PROFA.DRA.SIMONE CRISTINA OLENSCKI GILLI**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Si56i Simoneti, Gisele da Silva, 1983-
A influência de diferentes meios de cultura na
geração de células dendríticas para o tratamento
imunoterápico de pacientes com leucemia mieloide
aguda / Gisele da Silva Simoneti. -- Campinas, SP :
[s.n.], 2013.

Orientador : Simone Cristina Olenscki Gilli.
Coorientador : Sara Teresinha Olalla Saad.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Leucemia mieloide aguda. 2. Células dendríticas.
3. Imunoterapia. 4. Meios de cultura livres de soro. I.
Gilli, Simone Cristina Olenscki. II. Saad, Sara Teresinha
Olalla, 1956-. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: The influence of different culture media in generation of dendritic cells for immunotherapeutic treatment of acute myeloid leukemia patients.

Palavras-chave em inglês:

Leukemia, Myeloid, Acute

Dendritic cells

Immunotherapy

Culture media, Serum-free

Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

Titulação: Mestra em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora:

Simone Cristina Olenscki Gilli [Orientador]

Telma Miyuki Oshiro Sumida

Katia Borgia Barbosa Pagnano

Data da defesa: 04-01-2013

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

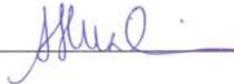
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

GISELE DA SILVA SIMONETI

Orientador (a) PROF(A). DR(A). SIMONE CRISTINA OLENSCKI GILLI

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). SIMONE CRISTINA OLENSCKI GILLI



2. PROF(A). DR(A). TELMA MIYUKI OSHIRO SUMIDA



3. PROF(A). DR(A). KATIA BORGIA BARBOSA PAGNANO



Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 04 de janeiro de 2013

Dedicatória

*Dedico este trabalho a minha mãe Valdeez,
a maior e melhor professora da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e saúde e por ter me capacitado a realizar esse trabalho.

À minha mãe, Valdevez, e a minhas amigas-irmãs Débora, Grasiely, Luciana e Tânia, pelo apoio, incentivo, amor por mim e por compartilhar de minhas conquistas, dos momentos de incertezas e de alegria.

À minha orientadora Dra. Simone Gilli, pela disponibilidade, compreensão, confiança e incentivo, fatores que contribuíram muito para minha evolução durante esse período. A finalização deste trabalho é uma conquista que compartilhamos juntas, fruto de sua orientação.

À Profa. Dra. Sara Saad, pela coorientação neste trabalho, pela disponibilidade e apoio em seu laboratório.

Aos funcionários e colegas de laboratório, especialmente a Tereza Sueko, Luis Gustavo e Ana Leda, por auxiliarem em diferentes momentos na condução desse trabalho.

Aos meus amigos, Adriana, Audrey, Irene, João, Lena, Mariana Lazarini, Simone, Thiago e Vanessa, que me ajudaram com os experimentos, análises e me deram força para seguir em frente. Muito obrigado pela amizade e a oportunidade de compartilhar as experiências acadêmicas e pessoais.

Aos docentes da disciplina de Hematologia da UNICAMP, Dr. Fernando F. Costa, Dra. Irene Lorand-Metze, Dr. Cármino A. de Souza pelo apoio e estrutura na realização deste trabalho.

Aos hematologistas do Hemocentro Dra Fabiola Traina e Dr. Fernando Pericole pela triagem e indicação dos pacientes para participação neste estudo.

Aos pacientes, um agradecimento especial, pois sem eles este trabalho não teria sido idealizado e nem realizado.

Ao Roberto Zulli pelo auxílio estatístico.

À Arlete e ao Michel pelo apoio didático durante a realização deste trabalho.

Às secretárias Patrícia e Raquel pela disponibilidade no serviço burocrático e amizade.

À secretária da pós-graduação Regina pela disponibilidade no serviço burocrático.

Às agências financiadoras, FAPESP, CNPq e INCT do sangue.

RESUMO

Células dendríticas (DCs) são as principais células apresentadoras de antígeno do sistema imune, capazes de estimular o linfócito T a iniciar resposta imune específica. Vacinas de DCs vêm sendo utilizadas como forma de tratamento imunoterápico adjuvante para várias neoplasias. Protocolos para geração dessas células têm sido desenvolvidos e o método ideal de produção para uso clínico ainda necessita ser definido. É fundamental a definição de protocolos e reagentes que ofereçam, a partir de células mononucleares do sangue periférico, células dendríticas seguras e funcionais para uso clínico. A suplementação de meios de cultura com soro de origem animal e humano leva a riscos de xenossensibilização e transmissão de doenças. O uso do soro autólogo parece oferecer menos riscos ao paciente, porém a presença de fatores imunossupressores nesse soro poderia interferir na qualidade das DCs produzidas. Vários tipos de meios livres de soro, baseados nas boas práticas de produção - “*good manufacture practice*” (GMP), têm sido utilizados recentemente e parecem ser uma opção viável. O objetivo desse estudo foi avaliar os resultados da diferenciação, maturação e funcionalidade de DCs de pacientes com LMA, produzidas em meios livres de soro e em meio suplementado com soro autólogo. Concluímos que os meios de cultura livres de soro foram eficientes na produção de DCs para fins imunoterápicos em pacientes com LMA. Em contrapartida, o uso de soro autólogo parece interferir na capacidade funcional das DCs geradas.

ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) are the main antigen-presenting cells of the immune system, capable of stimulating T lymphocytes to initiate specific immune responses. Vaccines based on DCs have been used as a treatment adjuvant immunotherapy for various malignancies. Protocols for generating these cells have been developed and the optimal method of production for clinical use remains to be defined. There is a great interest in the definition of protocols and reagents providing from peripheral blood mononuclear cells, functional and safe dendritic cells for clinical use. Supplementation of culture media with serum from animal and human leads to reactions due the animal proteins and transmission of disease. The use of autologous serum seems to offer less risk to the patient, but the presence of immunosuppressive factors may affect the quality of the DCs produced. Several types of serum-free media, based on "good manufacture practice" (GMP), have been used recently and seem to be a viable option. The aim of this study was to evaluate the results of the differentiation, maturation and function of DCs from AML patients, generated in serum-free media and media supplemented with autologous serum. We concluded that the serum-free media were efficient in the production of DCs for immunotherapy in AML patients. However, the use of autologous serum appears to interfere with the functional capacity of generated DCs.

LISTA DE ABREVIACOES

APC – *Antigen Presenting Cell*
APC (fluorocromo) - *Allophycocyanin*
AV - Anexina V
CD - *Cluster of Differentiation*
CFSE - *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*
CG -Meio de cultura *CellGro*
DC – *Dendritic Cell*
DMSO - Dimetil sulfoxido
ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
FITC - *Fluorescein isothiocyanate*
FITC-Dextran – Polissacarideo conjugado  FITC
GM-CSF - *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
GMP - *Good Manufacture Practice*
GVHD - *Graft-versus-host disease*
iDCs- *imature Dendritic Cells*
IFN - Interferon
IL - Interleucina
LMA - Leucemia mieloide aguda
LMA-DCs - Células dendríticas diferenciadas de células de leucemia mieloide aguda
mDCs – *mature Dendritic Cells*
MHC – *Major Histocompatibility Complex*
Mo-DCs – *Monocyte-derived Dendritic Cells*
MRD – *Minimal Residual Disease*
PBS – *Phosphate Saline Buffer*
PE – *Phycoerythrin*
PGE2 - Prostaglandina E2
PI – *Propidium Iodide*
RPMI - Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*
SFM – *Serum Free Media*

TCR – *T Cell Receptor*

Th - *T helper*

TMO - Transplante de medula óssea

TNF – *Tumoral necrosis factor*

XV-15 - Meio de cultura X-Vivo 15

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação da morfologia das células dendríticas imaturas (1,3,5) e maduras (2,4,6) geradas a partir de células de doadores nos meios de cultura testados. É possível observar a formação de colônias de células (indicadas pelas setas) no meio RPMI suplementado com 5% autólogo de forma mais evidente comparado aos outros meios testados. As imagens das DCs imaturas foram adquiridas no dia 5 (D5) de cultura e de DCs maduras foram adquiridas no dia 7 (D7)..... 38
- Figura 2.** Representação de gates realizadas nas populações de células CD11c⁺ (correspondentes às células dendríticas) e suas respectivas porcentagens dentro da população total recuperada. A, células geradas a partir de sangue periférico de doadores, nos respectivos meios de cultura; B, células geradas a partir de sangue periférico de pacientes. Foram adquiridos 10.000 eventos dentro dos gates.....39
- Figura 3.** Viabilidade das células dendríticas diferenciadas a partir de células de doadores e pacientes com LMA nos meios de cultura testados. Os três meios de cultura testados foram capazes de produzir DCs viáveis, sem diferenças significativas entre eles. As barras brancas correspondem as DCs geradas a partir de células de doadores e as barras pretas correspondem as DCs geradas a partir de células de pacientes. 40
- Figura 4.** Representação da análise imunofenotípica de células dendríticas imaturas (em cinza) e células dendríticas maduras (em preto) geradas a partir de monócitos de doador (A) e paciente com leucemia mieloide aguda (B). A expressão dos marcadores de maturação celular CD40, CD80, CD83 e HLA-DR foi investigada por citometria de fluxo através da análise da intensidade de fluorescência. As linhas tracejadas representam o controle negativo (células marcadas com o controle isotópico)..... 41
- Figura 5.** Análise imunofenotípica das células dendríticas produzidas a partir de células de doadores e pacientes nos meios RPMI + 5% de AS, CellGro (CG) e X-Vivo 15 (XV). Os valores de ER para cada condição testada e suas medianas foram plotados nos gráficos. O aumento na expressão dos marcadores investigados nas DCs maduras foi igual em todas as condições testadas.. Não houve diferenças significativas entre os meios testados.... 42
- Figura 6.** A atividade fagocítica das DCs imaturas diferenciadas de células de doadores e pacientes com LMA foi semelhante entre os indivíduos e meios testados. Os valores de ER para cada condição testada e suas medianas foram plotados nos gráfico. Não houve diferenças significativas entre os meios testados..... 43
- Figura 7.** Análise da proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ em resposta a estimulação antigênica por DCs maduras diferenciadas a partir de células de doadores e pacientes

com LMA nos meios testados. A proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foi semelhante entre doadores e pacientes, exceto quando DCs foram geradas em RPMI. Não houve diferenças significativas entre os meios testados..... 44

Figura 8. Produção de citocinas IL-10 (A e B) e IL-12 (C e D) por células dendríticas estimuladas com o coquetel de maturação e extrato de células K562. As DCs maduras geradas na presença de soro autólogo produziram maiores níveis de IL-10 (tanto em doadores quanto em pacientes) enquanto que o meio X-Vivo 15 demonstrou maior eficiência em produzir DCs maduras geradas a partir de células de pacientes, produtoras dos maiores níveis de IL-12p70 obtidos.. 46

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
SUMÁRIO.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. O sistema imune e o escape tumoral.....	17
1.2. As células dendríticas	17
1.3. Células dendríticas mielóides e plasmocitóides.....	18
1.4. Estágios de desenvolvimento e funções das células dendríticas.....	19
1.5. Leucemia mielóide aguda e vacinas de DCs para seu tratamento	20
1.6. GMP e suplementação proteica de meios de cultura	21
1.7. Geração de DCs <i>in vitro</i>	22
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. Objetivo Geral.....	25
2.2. Objetivos Específicos	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Produção de soro autólogo.....	27
3.2. Desenvolvimento de células dendríticas a partir do sangue periférico.....	27
3.3. Imunofenotipagem através da citometria de fluxo.....	28
3.4. Avaliação da viabilidade das células dendríticas produzidas	29
3.5. Avaliação da capacidade fagocítica das células dendríticas geradas.....	29
3.6. Avaliação da linfoproliferação.....	29
3.7. Avaliação da produção de citocinas IL-10 e IL12p70 pelas células dendríticas	31
4. ANÁLISE DOS RESULTADOS	32
5. ASPECTOS ÉTICOS	34
6. RESULTADO	36
6.1. Morfologia das células dendríticas produzidas.....	37
6.2. Imunofenotipagem das células dendríticas produzidas.....	39

6.3. Viabilidade das células dendríticas produzidas	40
6.4. Avaliação da capacidade fagocítica das células dendríticas produzidas	43
6.5. Avaliação da capacidade de estimulação da proliferação de células T autólogas pelas DCs produzidas.....	44
6.6. Avaliação da produção de citocinas IL-10 e IL12p70 pelas células dendríticas produzidas	45
7. DISCUSSÃO	47
8. CONCLUSÃO.....	53
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
10. ANEXOS	61
ANEXO I	62
ANEXO II.....	64
ANEXO III	68

1.INTRODUÇÃO

1.1. O sistema imune e o escape tumoral

Os mecanismos de defesa do sistema imune de um organismo constituem barreiras naturais contra a formação e o estabelecimento de uma neoplasia. Tanto a imunidade inata como a adaptativa determinam respostas antitumorais eficazes através da atividade de células dendríticas (DC), natural killer (NK, NKT), macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, citocinas e linfócitos T específicos. Porém, uma vez desenvolvido o câncer, raramente se observa sua regressão espontânea.

A grande maioria dos tumores “escapa” do reconhecimento imune através de vários mecanismos, como a perda de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) da superfície celular, mutação ou perda de antígenos tumorais, alterações em receptores que sinalizam a morte celular, além da produção de citocinas e outras substâncias imunossupressoras. Acredita-se que a resposta das células T exista, mas seja incapaz de gerar uma resposta imune efetiva [1-3].

O maior entendimento dos eventos celulares que levam à imunidade mediada pela célula T gerou um grande interesse no desenvolvimento de estratégias terapêuticas que provocassem respostas imunes específicas aos antígenos tumorais, com consequente destruição de células malignas. A imunoterapia é um método que tem como alvo a exploração da resposta imune antitumoral natural específica [4].

1.2. As células dendríticas

As células dendríticas (DCs) são essenciais para o desenvolvimento da resposta imune atuando como adjuvantes naturais, tanto na maquinaria coestimulatória, como na produção de citocinas necessárias para uma resposta imune apropriada [1, 5-10]. Assim, o potencial da utilização das células dendríticas em tratamentos imunoterápicos, somado ao potencial imunogênico universal de alguns antígenos, indica uma linha de pesquisa promissora e verdadeiramente efetiva no desenvolvimento de respostas imune-específicas contra vários tipos de tumores [11-13].

As DCs são as principais células apresentadoras de antígenos (APCs) do sistema imune, capazes de estimular linfócitos T a iniciarem respostas imunes antígeno-específicas. São, em última análise, responsáveis pelo início, regulação, desenvolvimento e manutenção da resposta imunológica [1, 5-10].

Descobertas em 1868 por Paul Langerhans como células presentes na pele e caracterizadas em 1973 e por Steinman e Cohn, como uma população celular heterogênea e rara no sangue periférico humano [14], as DCs são originadas de células tronco hematopoiéticas e estão presentes na pele, mucosa, vias aéreas, baço, linfonodos e fígado. Tais células possuem extensões citoplasmáticas e são especializadas na captura, fagocitose e processamento de antígenos presentes no sangue periférico e tecido, migrando então para linfonodos, onde apresentam por contato direto, os antígenos processados para linfócitos T.

Inicialmente, as células T respondem ao antígeno apresentado nas moléculas dos complexos de histocompatibilidade tipo I e II (MHC I ou MHC II), presentes na superfície das células dendríticas e, a partir de um sinal proveniente de moléculas coestimulatórias (presentes também na superfície de células dendríticas) ocorre à ativação e diferenciação de células T em células T efetoras. Na ausência desse sinal, as células T entram num estado de anergia ou são induzidas a apoptose. Durante a interação celular, citocinas secretadas por DCs (como IL-12, IL-23 e IL-10), determinam se a resposta gerada será do tipo anti ou pró-inflamatória [15].

1.3. Células dendríticas mielóides e plasmocitóides

A população de DCs é heterogênea. De acordo com a origem hematopoiética, dois subtipos são encontrados: DCs mielóides, originadas a partir de precursores de linhagem mielóide e DCs linfóides, originadas a partir de precursores de linhagem linfóide. A origem linfóide foi atribuída às células plasmocitóides por estas expressarem marcadores linfóides, como por exemplo, a enzima RAG [16]; por outro lado, as DCs mielóides expressam moléculas comuns às células mielóides, como CD11c e CD33 [17].

Os dois subtipos de DCs exibem diferentes fenótipos de superfície, função e localização. As DCs mielóides estão presentes na epiderme e outros epitélios, como o intestinal e respiratório (células de Langerhans) e as DCs intersticiais são encontradas nos espaços intersticiais na maioria dos órgãos. Por outro lado, as DCs plasmocitóides são encontradas na circulação sanguínea e caracterizadas pela expressão de CD123 (receptor de IL-3) e são as mais potentes células produtoras de IFN- α em resposta a patógenos virais.

1.4. Estágios de desenvolvimento e funções das células dendríticas

De acordo com o seu desenvolvimento, as DCs são classificadas em dois estágios de maturação: imaturas (iDC) e maduras (mDC), cada um apresentando morfologia, localização e funções diferentes. Quando imaturas, captam e processam antígenos e após o estímulo de mediadores inflamatórios, tornam-se maduras e aptas a apresentarem antígenos [13].

Após deixarem a medula óssea, os precursores das DCs penetram nos tecidos, passando a residir em locais com potencial para a entrada de patógenos, ainda num estágio imaturo de desenvolvimento [18].

As iDCs são encontradas essencialmente em todos os tecidos, representando cerca de 0,5-1% do total da população celular e são caracterizadas imunofenotipicamente pela presença de moléculas adesivas (CD11c) e expressão basal de moléculas coestimulatórias e de exposição de antígenos na superfície celular como CD40, CD80, CD83, CD86 e MHC II (HLA-DR). Elas monitoram constantemente o microambiente e capturam e processam antígenos por meio de macropinocitose, fagocitose ou endocitose [19, 20]. Antígenos internalizados são degradados em peptídeos menores e ligados a moléculas de MHC classe I e II para serem expostos na superfície celular. Além disso, produzem uma série de citocinas que podem modular a atividade de outras células do sistema imunológico, como macrófagos, eosinófilos e células NK [5].

Após o contato com antígeno, as DCs deixam os tecidos e migram para os linfonodos, onde interagem com linfócitos T e completam o processo de maturação. A interação entre DCs e linfócitos T ocorre através de receptores de células T (TCRs – presentes na superfície dos linfócitos T), complexos MHC-peptídeo, moléculas coestimulatórias e de adesão. Após a interação, 3 sinais são enviados para que a ativação dos linfócitos ocorra. O primeiro sinal corresponde à interação do complexo MHC-peptídeo com o TCR; o segundo é enviado pela ligação das moléculas coestimulatórias presentes nas DCs (CD40, CD80, CD86) e seus ligantes correspondentes nos linfócitos; o terceiro sinal é gerado pelas citocinas liberadas pelas DCs. A ausência de um dos sinais pode levar a anergia dos linfócitos [21, 22].

De modo geral, a ativação das DCs ocorre principalmente por fatores que incluem a estimulação da molécula CD40 por CD40L (molécula expressa em linfócitos) e o balanço

entre citocinas e mediadores inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β , L-6, IL-10 e prostaglandinas no microambiente [19]. Tal processo envolve diversas mudanças estruturais, incluindo a diminuição da atividade endocítica devido à perda dos receptores endocíticos e fagocíticos (como os receptores de manose); aumento na expressão de moléculas de adesão (CD11a, CD50, CD54 e CD58), moléculas coestimulatórias (CD40, CD80/B7.1, CD86), moléculas apresentadoras de antígeno (incluindo moléculas MHC I e II) e aumento na expressão de CD83, um membro da superfamília das imunoglobulinas, com função ainda desconhecida. Ocorrem ainda mudanças na expressão de receptores de quimiocinas (como a expressão de CCR7), secreção de citocinas (IL-12, IL-4, IL-10) e alterações na morfologia celular, caracterizadas pela perda de estruturas adesivas e reorganização do citoesqueleto [5]. A coexpressão de moléculas de adesão, coestimulatórias e apresentadoras de antígeno permite às DCs estabelecerem contatos com as células T e, eventualmente, ativá-las. [23, 24]. O processo de ativação das células T envolve uma sequência de eventos intracelulares que culmina na transcrição de genes específicos, na entrada das células T no ciclo celular e na diferenciação em células T efetoras, as quais migram para o local de inflamação de origem do antígeno [25].

O perfil de citocinas secretado pelas DCs irá determinar a diferenciação dos linfócitos em células efetoras ou reguladoras da resposta imune. A produção de IL-12 induz a diferenciação de linfócitos do tipo Th1, que respondem de forma pró-inflamatória e a produção de IL-10, induz a diferenciação de linfócitos do tipo Th2, que respondem de forma anti-inflamatória [26].

1.5. Leucemia mieloide aguda e vacinas de DCs para seu tratamento

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma neoplasia hematológica maligna caracterizada pela expansão clonal de células progenitoras não linfóides resultando na falha da hematopoiese normal [27]. A LMA exibe diferentes tipos morfológicos e citoquímicos, o que baseia sua classificação em diferentes subtipos (classificação Francês-Americano-Britânico-FAB, Organização Mundial da Saúde - OMS) [28].

De acordo com a classificação FAB, a LMA pode ser dividida em 8 subtipos (M0 a M7), tendo como variável entre eles o tipo de célula pela qual a doença se originou [29]. A LMA pode também ser dividida de acordo com a classificação OMS, a qual considera o

prognóstico da doença [30]. Cada uma das categorias desta classificação contém subcategorias descritivas de interesse para médicos com experiência na área de hematologia e oncologia (ex: LMA com características de anormalidades genética; LMA com displasia multilinear).

Atualmente, pacientes tratados com protocolos quimioterápicos alcançam a remissão completa em cerca de 80% de pacientes, porém existe uma alta taxa de recaída [31]. O transplante de medula óssea (TMO) alogênico tem sido empregado como meio de intensificar as doses de quimioterapia e radioterapia, porém este procedimento envolve um alto risco de reações imunológicas no paciente, sendo o GVHD (doença enxerto *versus* hospedeiro) a causa principal de morbidade e mortalidade. Em 75% dos pacientes acima de 60 anos, o tratamento atualmente disponível é pouco eficiente, resultando em baixa taxa de sobrevida desses indivíduos. Em pacientes mais jovens, o tratamento padrão utilizando citarabina e antraciclicos seguido de quimioterapia pós-remissional intensiva pode levar a 25-40% de taxa de sobrevida livre de doença em 5 anos após o diagnóstico [32]. Dessa forma, o desafio em se tratar a LMA não é apenas induzir a remissão após diagnóstico, mas também a prevenção da recaída e erradicação da doença residual mínima [33-35].

O primeiro estudo utilizando vacinas com células dendríticas em pacientes com câncer foi publicado por Hsu e colaboradores em 1996 [36]. Desde então, vacinas contendo essas células têm sido produzidas e sua eficiência e segurança na indução e desenvolvimento de repostas imunes específicas contra neoplasias têm sido comprovada em experimentos *in vitro* e *in vivo* [2, 9, 10, 37-39]. Hoje, existem vários estudos clínicos que utilizam vacinas de células dendríticas em pacientes com vários tipos de tumores [38], incluindo neoplasias hematológicas, como a LMA. A imunoterapia direcionada contra antígenos de células leucêmicas poderia gerar resposta imune-específica contra a doença residual mínima após a quimioterapia [33-35].

1.6. GMP e suplementação proteica de meios de cultura

Com o constante desenvolvimento de estratégias na produção de vacinas para manipular a imunidade em diversas doenças, incluindo o câncer, existe um grande interesse na definição protocolos com reagentes que garantam a qualidade na produção de DCs a partir de monócitos do sangue periférico e minimizem a variabilidade entre as células

produzidas [38, 40, 41]. Tais protocolos e reagentes devem ser elaborados seguindo as “boas práticas de produção” (*Good Manufacturing practice – GMP*), que são normas que estabelecem a padronização de procedimentos e métodos de controle de qualidade com o objetivo de desenvolver um tratamento imunoterápico eficiente e seguro para aplicação em seres humanos.

A geração de DCs para uso clínico em meios de cultura suplementados com soro é um assunto debatido na literatura [42, 43]. Apesar do risco de xenossensibilização contra antígenos bovinos e possível transferência de doenças animais, o soro bovino fetal é ainda utilizado em estudos clínicos [44-46], provavelmente devido à quantidade limitada de informações sobre o uso de outros meios e suplementações proteicas para geração de DCs [43].

Como alternativa para minimizar os potenciais riscos do uso do soro bovino fetal, o soro AB humano ou soro autólogo têm sido utilizados como suplementação do meio de cultura, entretanto, esses produtos não são isentos de riscos [47, 48]. Sabe-se, por exemplo, que a expressão de HLA-DR pode ser fortemente afetada em DCs geradas em meios suplementados com soro humano AB, devido à presença de moléculas alogênicas que poderiam ativar parcialmente as células durante sua diferenciação [49].

O soro humano contém quantidade variável de fatores imunomodulatórios que afetam o fenótipo e a função das células dendríticas. Em particular o soro de pacientes com determinados tipos de neoplasias pode conter moléculas associadas a tumores que exercem efeitos imunossupressores no desenvolvimento das células [50-53]. Além disso, alguns autores têm relatado diferenças na composição proteica do soro entre pacientes com câncer, tratados e não tratados, o que poderia exercer efeito no processo de diferenciação [50, 52, 54].

Existem vários meios de cultura celular livres de soro para uso sob condições GMP comercialmente disponíveis. O uso desses meios para a produção de células dendríticas para uso clínico em pacientes com câncer parece ser a melhor escolha.

1.7. Geração de DCs *in vitro*

As DCs formam uma população celular rara, representando 0,1 – 0,5% das células mononucleares sanguíneas em humanos [55], distribuídas por diversos tecidos, o que torna

difícil seu isolamento. Os estudos sobre estas células foram limitados por um longo período desde sua descoberta; entretanto, desde as primeiras descrições de que células precursoras CD34⁺ da medula óssea e monócitos circulantes no sangue periférico quando manipulados *in vitro* poderiam dar origem a células dendríticas [56], houve uma mudança neste cenário.

Romani e colaboradores, em 1994, concluíram que os monócitos estimulados com o fator estimulante de crescimento de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), o qual estimula a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular, se diferenciam em macrófagos a menos que esta tendência seja inibida pela presença de IL-4 [57]. Em paralelo, Sallusto e Lanzavecchi confirmaram estes dados e mostraram que além de obter DCs *in vitro* a partir de monócitos era possível obter células com características imaturas ou maduras dependendo da combinação de citocinas utilizada. A presença de GM-CSF e IL-4 promovem a diferenciação de células imaturas e a adição de TNF- α , torna as células ativadas [17]. Atualmente, a maioria dos estudos clínicos utiliza um coquetel de citocinas para maturação de DCs, consistindo de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e PGE2 [58, 59]. Este coquetel, descrito primeiramente por Jonuleit e colaboradores, induz alto potencial migratório das DCs para os linfonodos [60].

Além das citocinas, o meio de cultura e a sua suplementação proteica são importantes para a geração de células dendríticas viáveis e funcionais para uso imunoterápico. O meio de cultura celular RPMI 1640 tem sido amplamente utilizado em culturas de células dendríticas; porém, como já apresentado anteriormente, a questão da suplementação com soro continua sendo motivo de debate. Dentre os meios livres de soro comercialmente disponíveis, o CellGro, X-Vivo 15, AIM-V, entre outros, são utilizados na geração de DCs [61].

Apesar de diferentes estudos realizados com DCs, não existe atualmente um protocolo definido para geração de células dendríticas viáveis e funcionais para aplicação imunoterápica em pacientes com leucemia mieloide aguda.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi avaliar o desenvolvimento de células dendríticas, *in vitro*, em diferentes meios de cultura, além de monitorar o potencial dessas células em iniciar uma resposta imune-específica, para o uso imunoterapêutico em pacientes com leucemia mieloide aguda para aplicação em futuros estudos clínicos.

2.2. Objetivos Específicos

(1) Padronizar a produção *in vitro* de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico de pacientes com leucemia mieloide aguda, em remissão completa pós-quimioterapia;

(2) Analisar o grau de maturação das células dendríticas produzidas;

3) Analisar a indução de apoptose celular;

4) Analisar a capacidade fagocítica das células dendríticas produzidas;

5) Analisar a produção de citocinas anti e pró-inflamatórias IL-10 e IL-12p70 pelas células produzidas;

6) Analisar a estimulação da proliferação de diferentes subpopulações de linfócitos T pelas células produzidas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O desenho experimental consistiu na diferenciação e maturação de DCs a partir de células mononucleares presentes no sangue periférico de pacientes com LMA e doadores voluntários, em meio de cultura RPMI1640 (Gibco Laboratories, New York, USA) suplementado com soro autólogo e dois meios livres de soro, CellGro (Cell Genix, Frieburg, DEU) e X-Vivo-15 (Cambrex, Vervies, BEL).

A casuística do trabalho foi composta por 9 pacientes com LMA (3 para cada meio de cultura testado), tratados no Hemocentro da Unicamp, sendo 5 mulheres e 4 homens com idade média de 39,88 anos \pm 15,21) e 9 doadores de sangue (3 para cada meio, sendo 5 mulheres e 4 homens com idade média de 37 anos \pm 11,30). Os pacientes foram diagnosticados com os subtipos M3 e M4 (segundo a classificação FAB) e encontravam-se no estado de remissão pós-quimioterápica (com até 5% de blastos na medula óssea e sangue periférico sem blastos circulantes no momento da coleta). Os doadores foram submetidos aos procedimentos rotineiros de triagens clínicas e sorológicas para doação de sangue.

Os critérios de inclusão dos pacientes, como diagnóstico de LMA e remissão pós-consolidação quimioterápica, dificultaram a seleção dos mesmos. Apesar de baixo, o *n* do estudo foi suficiente para a padronização de um protocolo eficiente em gerar DCs viáveis e funcionais para aplicação clínica em pacientes com LMA.

3.1. Produção de soro autólogo

Soro autólogo foi obtido por centrifugação (3000 RPM/10 min.) de sangue periférico, inativado por 30 min. a 56°C e posteriormente congelado em alíquotas de 1 mL a - 80°C.

3.2. Desenvolvimento de células dendríticas a partir do sangue periférico

Foram coletados 100 mL de sangue periférico, em bolsas de coleta contendo CPDA e um tubo de sangue de 8 mL para coleta de soro autólogo de pacientes com LMA e de doadores saudáveis. O sangue foi diluído em PBS (tampão salino tamponado com fosfato, pH 7,2). 1:1 e centrifugado em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Upsala, SWE) 1500 RPM, 30 min. Após a centrifugação, as células mononucleares foram coletadas, lavadas por duas vezes em 40 mL de PBS, 1500 RPM por 5 min. e contadas em câmara de Neubauer. As células foram transferidas para placas de 6 poços, na quantidade de 5×10^6 células/poço no volume de 2ml e cultivadas nos meios X-

VIVO 15, CellGro e RPMI 1640 com adição de 20 µg/mL de gentamicina, 100 µg/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen, California, USA).

Após uma hora de incubação, as células não aderentes (predominantemente células T) foram removidas, lavadas em 40 mL de PBS, 1500 RPM por 5 min. e congeladas em soro autólogo e 10% de DMSO (Sigma, St Quentin Fallavier, FRA). Os monócitos aderentes foram cultivados nos respectivos meios indicados acima, com adição de 5% de soro autólogo no meio RPMI e em todas as culturas foram adicionados 40 ng/mL de IL4 e 40 ng/mL de GM-CSF (Peprotech, New Jersey, USA). No quinto dia foi adicionado um coquetel para maturação das células, consistindo em 10 ng/mL de TNF- α , 10 ng/mL de IL-1 β , 10 ng/mL de IL-6 (Peprotech, New Jersey, USA) e 1 µg/mL de PGE2 (Cayman Chemical Company, Michigan, USA). As células foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂ por 7 dias. O meio de cultura e as citocinas GM-CSF e IL-4 foram renovados no quarto dia. No sétimo dia de cada cultura a viabilidade celular foi avaliada através da marcação com azul de tripan e a morfologia das células foi observada através de um microscópio de luz invertido.

3.3. Imunofenotipagem através da citometria de fluxo

A avaliação maturação das células dendríticas foi realizada por meio de análise imunofenotípica de marcadores de superfície celular por citometria de fluxo no sétimo dia da cultura. Por esse método as células dendríticas imaturas (sem estímulo de maturação) e maduras (com estímulo de maturação) foram coletadas, centrifugadas a 300 g por 5 min. a 4°C, e ressuspensas em PBS por 3 vezes. Posteriormente, 1 x 10⁵ células foram adicionadas a tubos de citometria e incubadas no escuro por 30 min. a 4°C com os seguintes anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos diluídos em 100 µL de tampão para citometria (PBS com 0,5% de sororalbumina bovina e 0,02% de azida sódica): CD14-PE CD40-APC CD80-PE, CD83-APC e HLA-DR –APC (Caltag, California, USA). Em cada tubo, foi adicionado o anticorpo CD11c-FITC (BD Biosciences, California, USA), um marcador de células dendríticas mielóides. Como controle, células dendríticas foram incubadas com controles isotípicos (IgG-FITC, IgG-PE e IgG-APC; Caltag, California, USA). Em seguida as células foram lavadas duas vezes com tampão para citometria,

fixadas com paraformaldeído 1% e analisadas, dentro da população CD11c⁺, em um citômetro de fluxo (FACScalibur – BD, New Jersey, USA).

3.4. Avaliação da viabilidade das células dendríticas produzidas

Para analisar a viabilidade das células geradas a partir de células de doadores e pacientes, nos três meios testados, o *kit* de detecção de apoptose com anexina V (AV) e iodeto de propídio (PI) foi utilizado de acordo com o protocolo do fabricante (BD Pharmingen, California, USA). Células maduras foram coletadas no sétimo dia de cultura, lavadas com PBS (sem cálcio e magnésio) e ressuspensas em tampão. AV (FITC-conjugado) e anticorpos monoclonais específicos (anti-CD14 FITC-conjugado e anti-CD11c PE-conjugado) foram adicionados e as células foram incubadas por 15 min. no escuro a temperatura ambiente. PI foi adicionado nos últimos 5 min. de incubação aos tubos contendo AV. 5000 células foram adquiridas dentro de um gate para seleção de células CD11c⁺ e analisadas por citometria de fluxo.

3.5. Avaliação da capacidade fagocítica das células dendríticas geradas

No final do quinto e sétimo dia de cultura, as células geradas foram coletadas, ressuspensas em meio e incubadas com FITC-Dextran (Sigma, St Quentin Fallavier, FRA) na concentração de 1 mg/mL de meio a 37°C por 1 hora. Como controle, as células foram incubadas com FITC-Dextran a 4°C por 1 hora. A incubação foi interrompida pela adição de PBS gelado. As células foram lavadas 3 vezes em PBS gelado e imediatamente analisadas por citometria de fluxo.

3.6. Avaliação da linfoproliferação

As células mononucleares presentes no sangue periférico de pacientes e doadores foram coletadas e os linfócitos T foram purificados a partir do sobrenadante das culturas celulares através de separação imunomagnética, utilizando *beads* para seleção negativa de células T CD3⁺. Após a separação, os linfócitos foram congelados. No momento do ensaio, os linfócitos foram descongelados em banho à 37°C, centrifugados a 600 g por 10 min. para remover o sobrenadante e lavados duas vezes com 1mL de PBS pré-aquecido. As células foram ressuspensas em 1 mL de PBS contendo CFSE (Molecular Probes, Leiden, The

Netherlands) a 1 μ M e incubados por 15 min. à 37°C. Após esse período de incubação, as células foram lavadas duas vezes com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS e ressuspensas nesse mesmo meio a uma concentração de 1×10^5 cels/poço. Essas células foram co-cultivadas em placas de 24 poços (500 μ l de meio/poço) com células dendríticas maduras (5×10^4 cels/poço) na presença de 100 μ g/mL do estímulo antigênico por 5 dias a 37°C em 5% CO₂.

Como estímulo antigênico para as DCs foi utilizado o lisado de células K562, uma linhagem que expressa altos níveis de WT1 (*Wilms tumor 1*), um fator de transcrição expresso em diversos tumores e que possui alta antigenicidade. Para a preparação do lisado, células da linhagem tumoral K562 foram crescidas em meio RPMI suplementado com 10% de FBS e mantidas a 37°C, 5% CO₂. As células foram coletadas em tubo de 50 mL, centrifugadas a 1500 RPM em 40 mL de tampão PBS e o pellet foi ressuspensado em 2 mL do mesmo tampão. As células foram então submetidas a vários ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria, a 37°C para lise celular e então centrifugadas a 13000 RPM por 10 min. O sobrenadante contendo as proteínas celulares foi coletado e a concentração proteica foi quantificada por Nanodrop. As amostras foram aliqüotadas em tubos de 1 mL e armazenadas a -80°C.

Após o período de cultura, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos específicos para os marcadores de superfície de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e os seus respectivos controles isotípicos. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo.

Utilizando essa metodologia foi possível definir, por meio de análise semi-quantitativa, os subgrupos de linfócitos T que responderam ao estímulo e definir a porcentagem de proliferação pela quantidade de células que apresentam marcação com CFSE, através do software Modfit. Linfócitos T marcados com CFSE, mas não estimulados com DCs maduras, foram usados como controle para definir o limite inicial da intensidade de fluorescência para contagem das células-filhas. A porcentagem de células em proliferação foi definida pela seguinte fórmula:

$$\text{Células em Proliferação (\%)} = \text{Células marcadas e estimuladas (\%)} - \text{Células controle (\%)}$$

3.7. Avaliação da produção de citocinas IL-10 e IL12p70 pelas células dendríticas

A produção das citocinas IL-10 e IL12p70 pelas células dendríticas foi avaliada através do kit ELISA (BD Biosciences, California, USA), conforme o protocolo do fabricante. Para isso, células dendríticas foram cultivadas durante 7 dias como descrito anteriormente. No 5º dia, além do coquetel de maturação das DCs, foi adicionado 100 µg/mL de lisado de células K562 como estímulo antigênico. No final do sétimo dia de incubação, o sobrenadante das culturas de DCs foi coletado e armazenado em freezer -80°C para posterior quantificação das citocinas produzidas.

4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para avaliar a significância estatística, os testes não-paramétrico Wilcoxon, foi aplicado para comparação aos pares. O teste não paramétrico Kruskal-Wallis foi também aplicado para comparar os dois grupos. Valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos. A análise foi feita utilizando o programa estatístico R Development Core Team (2011) versão 2.13.1.

5. ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto obedeceu às normas da declaração de Helsinki e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, sob número 951/2008 (anexo 1).

Todos os indivíduos participantes deste estudo foram devidamente esclarecidos quanto às finalidades da pesquisa, através de formulários de consentimento informado, (anexo 2).

6. RESULTADOS

6.1. Morfologia das células dendríticas produzidas

No primeiro dia de cultura, foi possível notar a formação de colônias celulares, característica importante para o crescimento e diferenciação das células em cultura. Embora observada em todos os meios e condições testadas, tal característica foi mais evidente em células geradas no meio RPMI suplementado com soro autólogo (figura 1). Em CellGro, as colônias formadas foram menos frequentes e consistiram de um menor grupo de células. Raras colônias foram observadas em células geradas em X-Vivo 15 e quando presentes eram formadas por poucas células. Tais resultados foram semelhantes em células de doadores e pacientes.

Após o terceiro dia, as células apresentavam um citoplasma maior e finas expansões citoplasmáticas (características de células dendríticas). Após a adição do coquetel de maturação, as células exibiram um maior número de expansões citoplasmáticas, além de apresentar uma perda parcial da adesão á placa. Isto foi observado em todas as condições e meios testados.

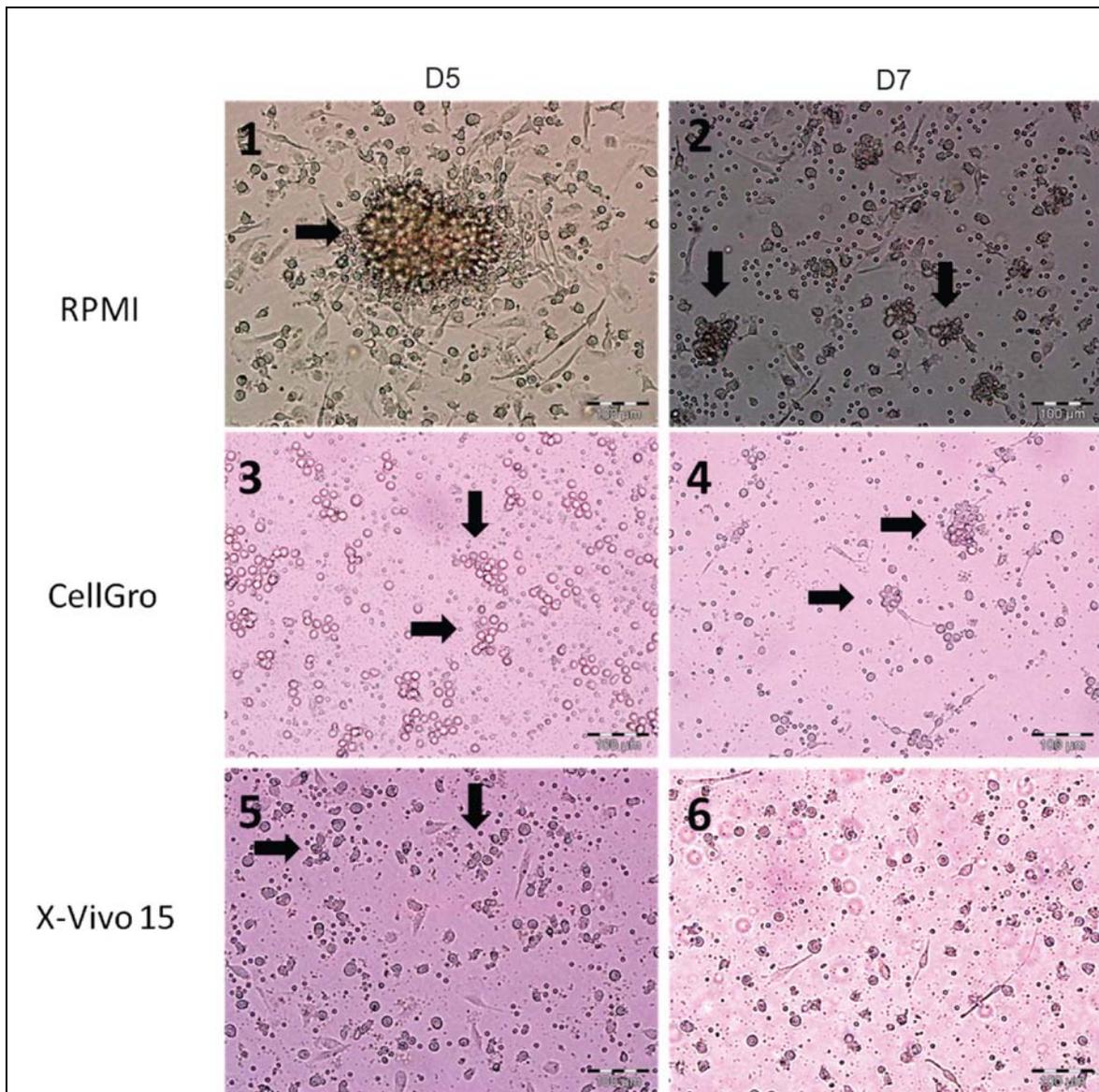


Figura 1. Representação da morfologia das células dendríticas imaturas (1,3,5) e maduras (2,4,6) geradas a partir de células de doadores nos meios de cultura testados. É possível observar a formação de colônias de células (indicadas pelas setas) no meio RPMI suplementado com 5% autólogo de forma mais evidente comparado aos outros meios testados. As imagens das DCs imaturas foram adquiridas no dia 5 (D5) de cultura e de DCs maduras foram adquiridas no dia 7 (D7).

6.2. Recuperação e viabilidade das células dendríticas produzidas

A quantidade de DCs (CD14⁻/CD11c⁺) recuperadas no final de cada cultura, diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico de doadores e pacientes variou entre $3-5 \times 10^6$ células/poço. A pureza de células recuperadas no final da cultura foi avaliada pela expressão do marcador de superfície celular CD11c, expresso em DCs mielóides (figura 2).

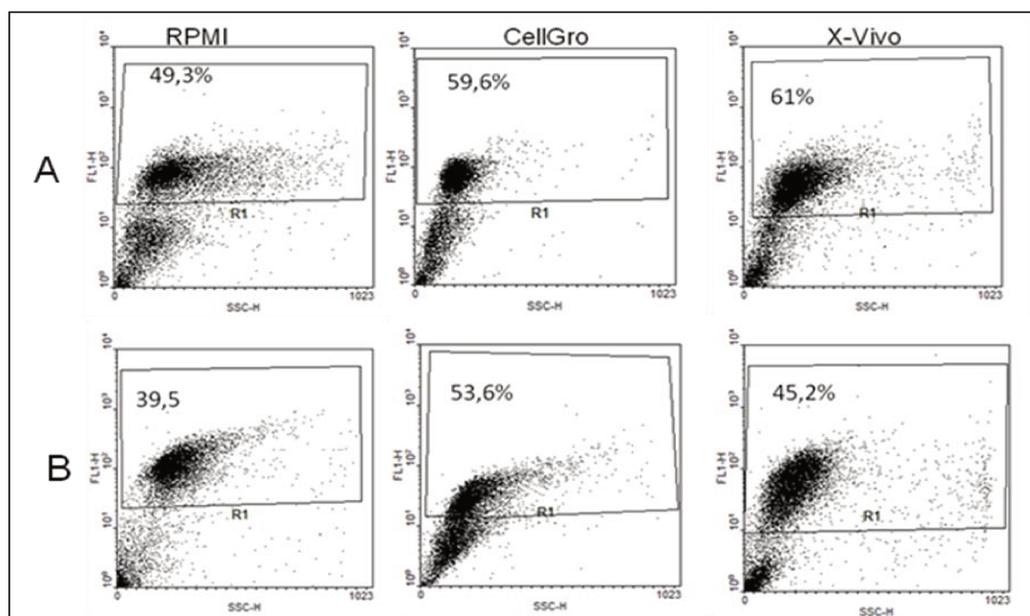


Figura 2. Representação de gates realizadas nas populações de células CD11c⁺ (correspondentes às células dendríticas) e suas respectivas porcentagens dentro da população total recuperada. A, células geradas a partir de sangue periférico de doadores, nos respectivos meios de cultura; B, células geradas a partir de sangue periférico de pacientes. Foram adquiridos 10.000 eventos dentro dos gates.

Por meio do protocolo de diferenciação e maturação proposto, foi possível obter células dendríticas viáveis em todos os meios de cultura testados (figura 3). Além disso, foi possível gerar DCs a partir de células de pacientes, com viabilidade semelhante àsquelas produzidas a partir de células de doadores. Não houve diferenças significativas nos resultados obtidos entre os diferentes meios testados; portanto os três foram eficientes na geração de DCs viáveis.

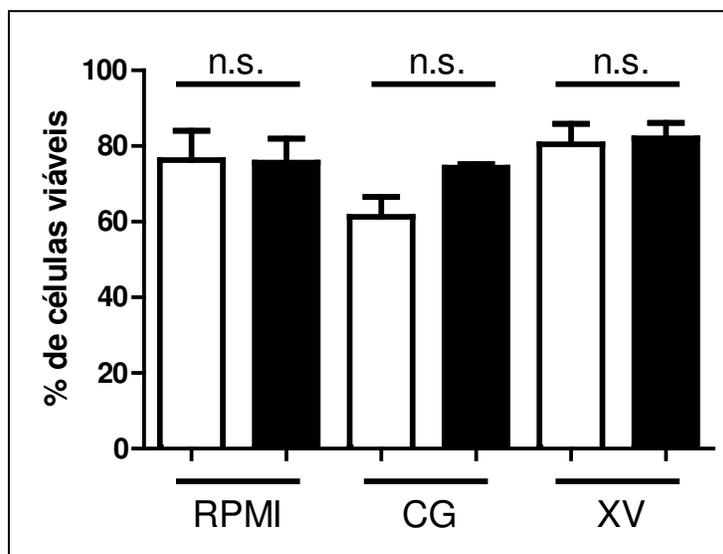


Figura 3. Viabilidade das células dendríticas diferenciadas a partir de células de doadores e pacientes com LMA nos meios de cultura testados. Os três meios de cultura testados foram capazes de produzir DCs viáveis, sem diferenças significativas entre eles. As barras brancas correspondem as DCs geradas a partir de células de doadores e as barras pretas correspondem as DCs geradas a partir de células de pacientes.

6.3. Imunofenotipagem das células dendríticas produzidas

As DCs geradas em cultura foram também avaliadas quanto à expressão dos marcadores de superfície celular CD40, CD80, CD83 e HLA-DR, cuja expressão é aumentada em células dendríticas maduras. Para a análise de tais marcadores, foi realizado um gate na população celular CD11c⁺.

De maneira geral, a diferenciação e maturação das DCs foram eficientes, tanto em doadores quanto em pacientes, em todos os meios testados, pois houve um aumento na expressão dos marcadores investigados (figuras 4 e 5).

Este aumento pôde ser observado pelo aumento na intensidade de fluorescência nas células marcadas com anticorpos específicos em relação ao controle, para cada marcador nos histogramas representados (figura 4). Os resultados mostraram ainda que o padrão de expressão dos marcadores foi semelhante nas DCs maduras de doadores e pacientes, em todos os meios testados.

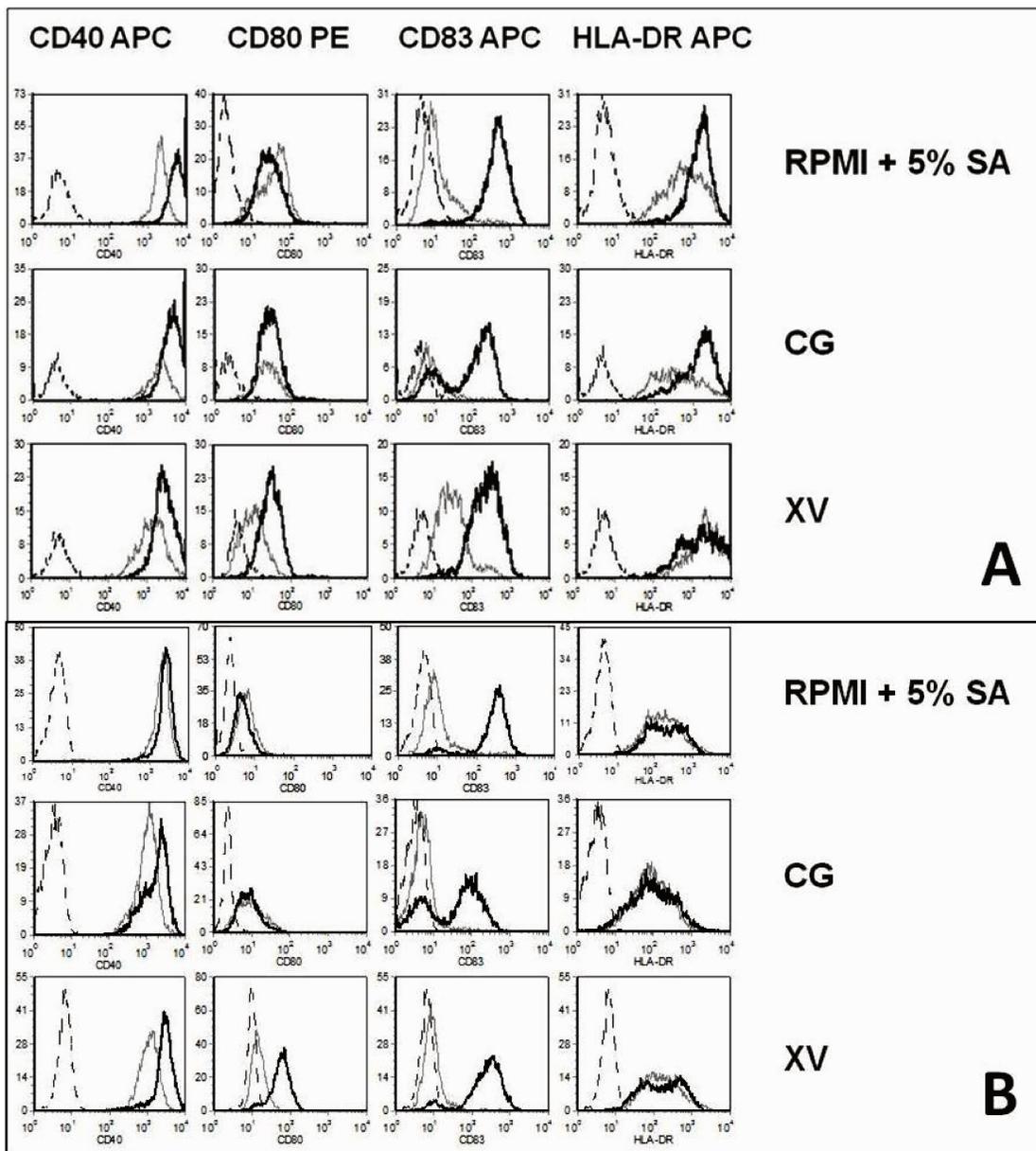


Figura 4. Representação da análise imunofenotípica de células dendríticas imaturas (em cinza) e células dendríticas maduras (em preto) geradas a partir de monócitos de doador (A) e paciente com leucemia mieloide aguda (B). A expressão dos marcadores de maturação celular CD40, CD80, CD83 e HLA-DR foi investigada por citometria de fluxo através da análise da intensidade de fluorescência. As linhas tracejadas representam o controle negativo (células marcadas com o controle isotípico).

Não houve diferenças significativas em relação à expressão dos marcadores investigados, entre indivíduos e meios testados (figura 5). Isso significa que foi possível gerar células dendríticas a partir de células de pacientes com características imunofenóticas semelhantes ao controle. Todos os meios testados foram eficientes para geração dessas células.

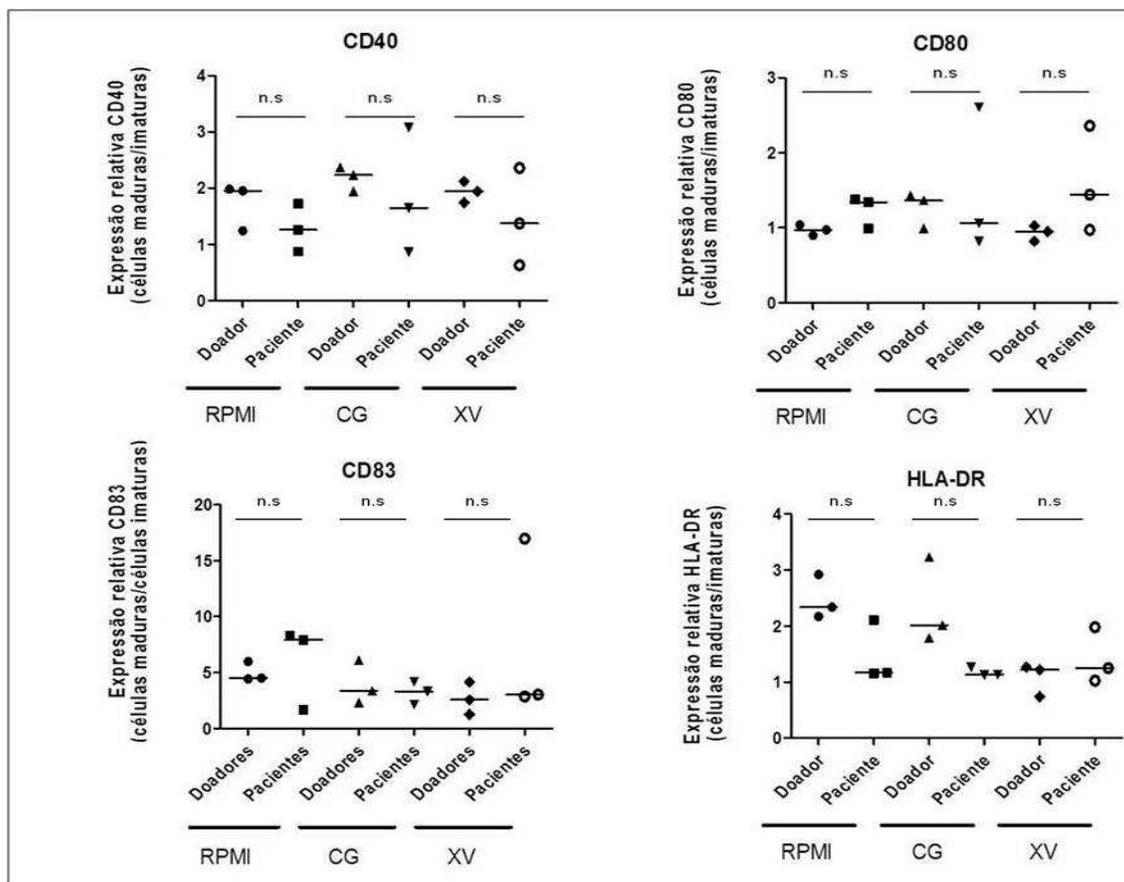


Figura 5. Análise imunofenotípica das células dendríticas produzidas a partir de células de doadores e pacientes nos meios RPMI + 5% de AS, CellGro (CG) e X-Vivo 15 (XV). Os valores de ER para cada condição testada e suas medianas foram plotados nos gráficos. O aumento na expressão dos marcadores investigados nas DCs maduras foi igual em todas as condições testadas.. Não houve diferenças significativas entre os meios testados.

6.4. Avaliação da capacidade fagocítica das células dendríticas produzidas

As DCs imaturas produzidas nas diferentes condições testadas não apresentaram diferenças significativas em relação à capacidade fagocítica (figura 6). Isso significa que foi possível, através do protocolo proposto, gerar DCs imaturas funcionais a partir de células de pacientes com LMA, capazes fagocitar antígenos de forma semelhante às DCs produzidas a partir de células de doadores.

Além disso, não houve diferenças significativas nos resultados relativos aos meios de cultura testados, o que significa que os três meios testados foram eficientes na geração de DCs imaturas funcionalmente capazes de realizar a fagocitose de antígenos.

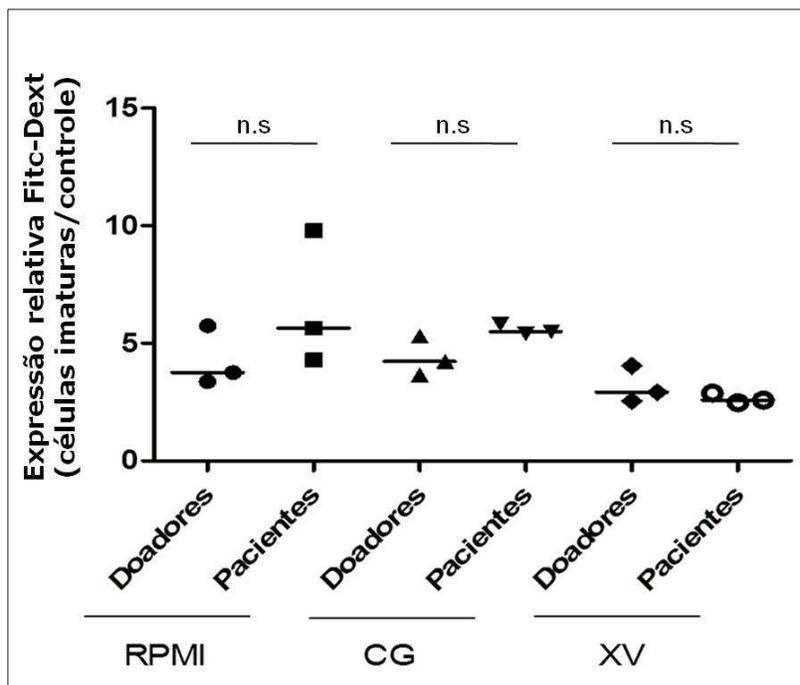


Figura 6. A atividade fagocítica das DCs imaturas diferenciadas de células de doadores e pacientes com LMA foi semelhante entre os indivíduos e meios testados. Os valores de ER para cada condição testada e suas medianas foram plotados nos gráfico. Não houve diferenças significativas entre os meios testados.

6.5. Avaliação da capacidade de estimulação da proliferação de células T autólogas pelas DCs produzidas

As DCs maduras geradas em meio RPMI suplementado com soro autólogo de paciente apresentaram uma capacidade significativamente menor ($p = 0,05$) de estimular a proliferação de linfócitos T $CD4^+$ ($7,33\% \pm 2,51$) e T $CD8^+$ ($11,33\% \pm 8,08$) do que as DCs maduras geradas em RPMI suplementadas com soro autólogo de doadores (T $CD4^+$ = $36,66\% \pm 24,94$ e T $CD8^+$ = $45,33\% \pm 17,09$), como apresentado na figura 7. Isso possivelmente deve-se a presença de fatores imunossupressores no soro autólogo dos pacientes com LMA que poderiam comprometer a função das DCs produzidas.

Por outro lado, observou-se que não houve diferenças significativas na proliferação de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ quando se comparou as DCs maduras geradas em pacientes e doadores em meios isentos de soro (figura 7). Portanto, foi possível gerar DCs de pacientes funcionalmente capazes de estimular a proliferação e diferenciação de linfócitos T utilizando-se meios isentos de soro, com resultados comparáveis ao controle (doadores).

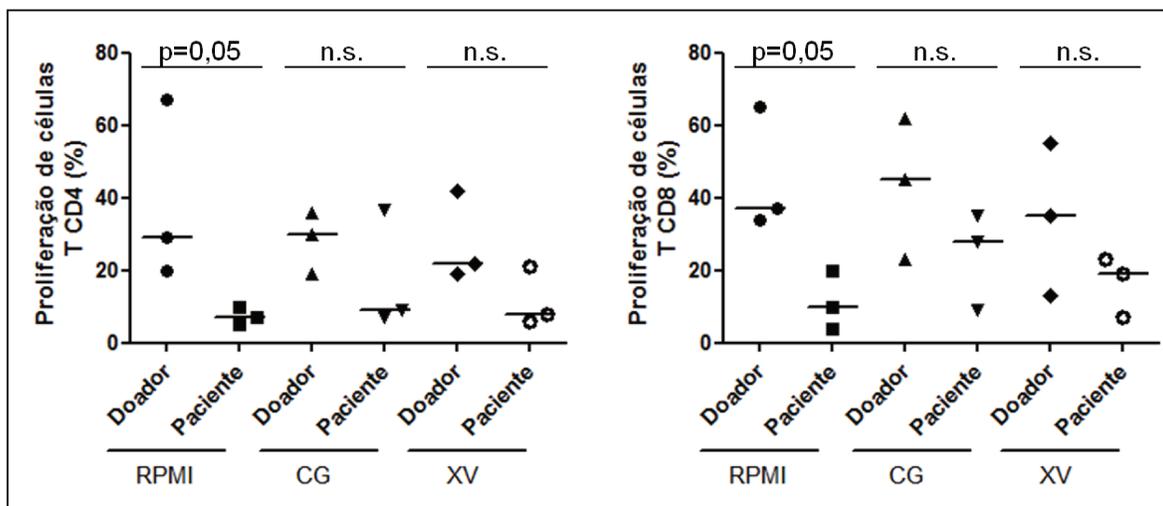


Figura 7. Análise da proliferação de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ em resposta a estimulação antigênica por DCs maduras diferenciadas a partir de células de doadores e pacientes com LMA nos meios testados. A proliferação de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ foi semelhante entre doadores e pacientes, exceto quando DCs foram geradas em RPMI. Não houve diferenças significativas entre os meios testados.

6.6. Avaliação da produção de citocinas IL-10 e IL12p70 pelas células dendríticas produzidas

A produção das citocinas IL-10 e IL-12 por DCs maduras geradas em meios suplementados ou não com soro autólogo foi avaliada. A estimulação com o coquetel de maturação utilizado induziu a produção dos maiores níveis de IL-10 por DCs geradas em meio RPMI suplementado com soro autólogo enquanto que os menores níveis dessa citocina foram produzidos por DCs geradas em meio X-Vivo 15 ($p=0,05$), tanto em doadores (RPMI = $165,63 \text{ pg}/\mu\text{L} \pm 7,44$; CellGro = $14,70 \text{ pg}/\mu\text{L} \pm 3,58$; X-Vivo = $7,50 \text{ pg}/\mu\text{L} \pm 0,32$) quanto em pacientes (RPMI = $528,95 \text{ pg}/\mu\text{L} \pm 80,57$; CellGro = $34,26 \text{ pg}/\mu\text{L} \pm 3,47$; X-Vivo 15 = $7,54 \text{ pg}/\mu\text{L} \pm 0,76$), como mostrado na figura 8. É possível observar também que as DCs diferenciadas a partir de células de pacientes, em meio X-Vivo 15, produziram maiores níveis de IL-12 ($p=0,05$) quando comparadas aos outros meios testados (X-Vivo 15 = $29,92 \text{ pg}/\mu\text{L} \pm 3,16$; RPMI = $16,47 \text{ pg}/\mu\text{L} \pm 3,61$; CellGro = $13,83 \text{ pg}/\mu\text{L} \pm 2,37$).

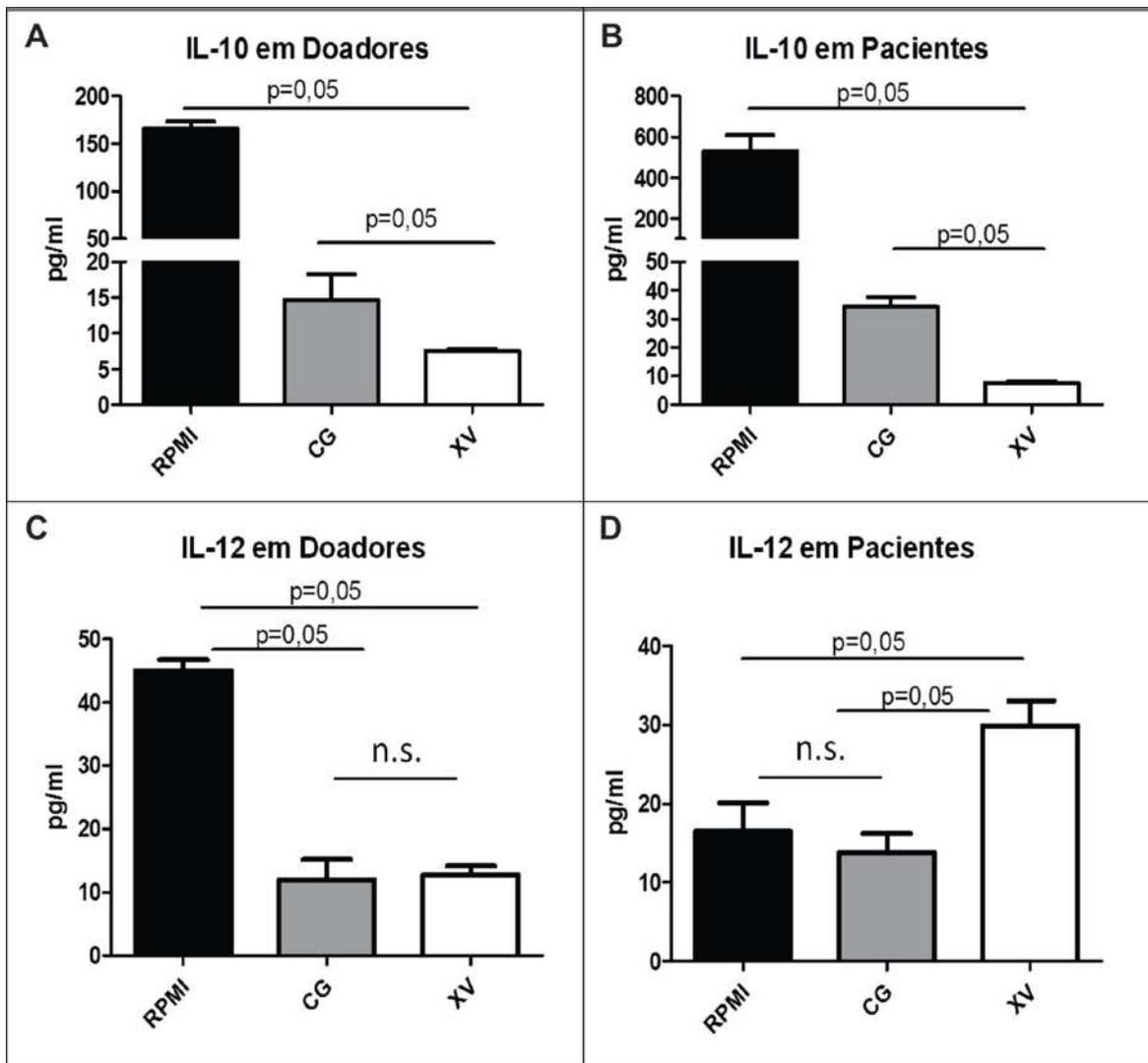


Figura 8. Produção de citocinas IL-10 (A e B) e IL-12 (C e D) por células dendríticas estimuladas com o coquetel de maturação e extrato de células K562. As DCs maduras geradas na presença de soro autólogo produziram maiores níveis de IL-10 (tanto em doadores quanto em pacientes) enquanto que o meio X-Vivo 15 demonstrou maior eficiência em produzir DCs maduras geradas a partir de células de pacientes, produtoras dos maiores níveis de IL-12p70 obtidos.

7. DISCUSSÃO

A exploração da resposta imune natural específica para o controle ou erradicação da LMA tem incentivado o desenvolvimento de estratégias de vacinação terapêutica para estimular a imunidade nos pacientes [62-65]. A ideia da aplicação de células dendríticas na vacinação de pacientes com LMA se baseia no conhecimento de que as células leucêmicas possuem antígenos (AAL – antígenos associados à leucemia) que permitem seu reconhecimento e eliminação através de respostas citotóxicas específicas iniciadas por linfócitos T. [62]. As DCs desempenham um papel fundamental nesse processo, por serem as células apresentadoras de antígenos mais eficientes do sistema imune humano e são consideradas ferramentas essenciais para a ativação de respostas imune específicas contra o tumor [66].

Nas últimas quatro décadas, avanços consideráveis foram realizados no tratamento da LMA em adultos. A introdução da quimioterapia associando citarabina com antraciclina em 1970 aumentou a possibilidade de se alcançar a remissão completa da doença nos pacientes [67]. Outro avanço importante foi o advento do transplante de medula óssea alogênica, o qual transformou a LMA em uma doença potencialmente curável. Apesar disso, a taxa de sobrevivência livre da doença, em adultos é de cerca de 25% (66), devido a alta reincidência da doença, mesmo entre aqueles que atingiram a remissão completa com a quimioterapia. Acredita-se que isso ocorra devido à presença de reservatórios de células leucêmicas que persistem após a quimioterapia, uma condição conhecida como doença mínima residual (MRD) [68]. O transplante de medula pode ser realizado para erradicar a MRD, porém seu uso está limitado a pacientes mais jovens. Portanto, pacientes sem doadores de medula compatíveis e pacientes mais velhos não dispõem atualmente de nenhuma terapia de controle pós remissional para evitar a reincidência da doença. [68-70]. Essas observações ressaltam a necessidade de novas estratégias efetivas para controlar a reincidência e aumentar a taxa de sobrevivência dos pacientes com LMA.

Existem poucos estudos clínicos descritos na literatura sobre vacinação de DCs em LMA, porém com resultados consistentes. [71-73]. Estes estudos se dividem de acordo com o tipo de células precursoras usadas para a geração de DCs em vacinas com DCs derivadas de células leucêmicas (LMA-DCs) e vacinas com DCs derivadas de monócitos (mo-DCs) [73]. Na primeira categoria, blastos leucêmicos autólogos são usados como fonte para gerar DC, que expressam uma variedade de antígenos associados à leucemia [74]. Estudos pilotos

demonstraram que o uso de LMA-DCs pode levar a estimulação da imunidade em pacientes com LMA, porém essa estratégia não parece conferir vantagem para aplicação clínica. As razões para as diferenças entre os resultados imunológicos e clínicos não estão totalmente esclarecidas, porém as LMA-DCs por manterem as características originais de células leucêmicas, podem não funcionar como APC apropriadas para imunoterapia. Tais características incluem diminuição na expressão de MHC e moléculas coestimulatórias e aumento na expressão de indoleamina 2, 3-dioxigenase (IDO) [73], que pode induzir a proliferação de células T regulatórias (Treg), capazes de suprimir a resposta imune celular direcionada contra LMA [75]. Talvez a melhor estratégia clinicamente viável seja a geração de DCs a partir de monócitos do sangue periférico.

Lee e colaboradores foram os primeiros a usarem DCs derivadas de monócitos em vacinação como estratégia para tratar LMA sem resposta ao tratamento convencional [76]. Eles mostraram que a vacinação com DCs foi segura e capaz de induzir respostas imunes. Em contraste, foi realizado um estudo clínico fase I/II para avaliar a eficácia da vacinação com DCs derivadas de monócitos como um tratamento pós-remissional [77]. Após a quimioterapia convencional, os monócitos dos pacientes foram coletados por leucaférese e diferenciados *in vitro* em DCs. As DCs geradas foram eletroporadas com mRNA da proteína WT1 (Wilm's tumor), um antígeno associado à leucemia, altamente imunogênico e superexpresso na maioria dos casos de LMA [78]. Resultados clínicos foram demonstrados pela conversão de remissão parcial em remissão completa em 2 pacientes; em 5 pacientes, os níveis de expressão de RNA do WT1, biomarcador para monitoramento de MRD em LMA, retornaram ao normal após a vacinação, resultado compatível com a indução de remissão molecular [77].

O método ideal de produção de DCs diferenciadas de monócitos para uso imunoterápico é extensivamente estudado e levou a confecção de vários protocolos descritos na literatura [48, 79-83], sendo o impacto dos meios de cultura e sua suplementação na geração de DCs abordados em alguns trabalhos [42]. Particularmente em LMA, as informações sobre o efeito exercido por diferentes meios de cultura e suplementação proteica na produção, viabilidade, maturação e capacidade funcional das DCs ainda são escassas.

Tanto o soro bovino fetal (FBS) quanto o plasma humano AB e o soro autólogo como suplementação proteica em culturas para desenvolvimento de DCs a partir de monócitos demonstram limitações para aplicação clínica [79, 81, 84]. Neste trabalho foi investigada a eficiência dos SFM CellGro e X-Vivo 15, e do meio RPMI suplementado com soro autólogo de pacientes com LMA, na geração de DCs diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico, com Il-4 e GM-CSF e maturadas com TNF- α , IL-1 β , IL-6 e PGE2.

Demonstramos que o protocolo utilizado nesse trabalho foi eficiente em gerar DCs viáveis, com características de células maduras e funcionais. A quantidade e pureza de DCs geradas foi equivalente entre todos os meios testados tanto em doadores como em pacientes.

Durante a fase de diferenciação dos monócitos em DCs é comum observar a formação de colônias de proliferação e diferenciação celular, atribuídas a fatores de crescimento como o GM-CSF. Nos resultados apresentados, a formação de colônias foi mais evidente entre as DCs geradas na presença de soro autólogo (doadores e pacientes) do que nas células geradas em SFM. Por outro lado, outras características morfológicas consideradas importantes como a presença de expansões citoplasmáticas e a perda parcial da adesão celular, foram observadas em todas as DCs geradas, independente do meio em que foram cultivadas.

Na literatura, os dados sobre a influência de meios de cultura e suplementação proteica exercida sobre a expressão de moléculas coestimulatórias pelas DCs são controversos. De Vries e colaboradores mostraram que as DCs geradas a partir de monócitos de pacientes com melanoma em SFM e RPMI suplementado com soro autólogo apresentaram níveis de expressão semelhantes em relação às moléculas coestimulatórias [40]. Em contraste, Duperrier e colaboradores mostraram que na presença de soro autólogo, grande parte das DCs geradas apresentaram maior expressão de CD86, uma molécula coestimulatória, quando comparado a DCs geradas em SFM [85]. Em nosso estudo observamos que a presença de soro autólogo de pacientes com LMA na geração de DCs não interferiu na expressão das moléculas coestimulatórias e de apresentação de antígeno e os níveis de expressão dessas moléculas foram semelhantes aos observados nas DCs geradas em SFM.

A estimulação das diferentes subpopulações de linfócitos T é essencial na determinação do tipo de resposta imune a ser desenvolvida. Células T não funcionais são ativadas durante a interação com DCs, via complexo TCR-MHC, resultando na proliferação de células T CD4⁺ ou CD8⁺ efectoras. A subpopulação de células T CD4⁺ pode desempenhar funções pró-inflamatórias (respostas do tipo Th1) ou anti-inflamatórias (respostas do tipo Th2). Células T CD8⁺ desempenham funções citotóxicas, induzindo a morte de células-alvo. Visto seu papel importante na ativação das células efectoras do sistema imune é fundamental que as DCs maduras desenvolvidas *in vitro* para aplicação imunoterápica, apresentem tal capacidade funcional.

Apesar de não ter sido observado diferenças na capacidade fagocítica de antígenos pelas DCs imaturas geradas em todas as condições testadas, os resultados observados no presente trabalho mostraram que as DCs maduras geradas na presença de soro autólogo de pacientes com LMA apresentaram menor capacidade de estimular a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ do que as DCs controle. Isso pode ser explicado pela presença de fatores imunossupressores no soro dos pacientes, que podem afetar ou inibir a função das DCs. Resultados semelhantes foram observados em estudos envolvendo outras neoplasias, onde a capacidade funcional das DCs geradas foi afetada pela presença de fatores imunossupressores derivados das células tumorais [83,84]. Tais resultados poderiam significar que os fatores imunossupressores secretados pelas células tumorais interferem tanto na diferenciação dos monócitos em DCs quanto no processo de maturação, podendo afetar a capacidade funcional das DCs geradas na presença de soro autólogo dos pacientes. Por outro lado, Krawczyk e colaboradores concluíram que o soro autólogo promoveu um microambiente favorável para geração de DCs em pacientes com câncer de pulmão [85].

Em LMA, a influência do soro autólogo, como suplementação proteica, ainda não havia sido testada e este estudo demonstrou que o seu uso interfere de maneira desfavorável na funcionalidade das DCs produzidas. Já os meios livres de soro foram eficientes na geração de DCs funcionais, capazes de fagocitar antígenos e estimular a proliferação de células T.

A produção de citocinas IL-10 e IL-12p70 pelas DCs maduras geradas nos meios testados foi também investigada. O conhecimento sobre o perfil de citocinas secretadas por essas células fornece informações acerca do tipo de resposta imune induzida, que pode ser

pró-inflamatória ou anti-inflamatória. Em pacientes, o meio X-VIVO 15 demonstrou maior eficiência na geração de DCs produtoras de IL-12p70 quando comparado ao meio RPMI suplementado com soro autólogo e ao meio CellGro. Por outro lado, o meio RPMI suplementado com soro autólogo levou a um aumento significativo dos níveis de IL-10 quando comparados ao meio CellGro e X-Vivo15, principalmente em pacientes. Este aumento pode ser reflexo da presença de fatores imunossupressores no soro autólogo dos pacientes com LMA.

A produção de IL-12p70 é fundamental na polarização de respostas imunes do tipo Th1, ou seja, pró-inflamatória. Ao contrário, a produção da citocina IL-10 induz respostas imunes do tipo Th-2, anti-inflamatórias. A maior eficiência na geração de DCs com características pró-inflamatórias poderia sugerir que o meio X-Vivo 15 seria o melhor meio de cultura, entre os testados, a ser adotado no protocolo para geração de DCs para uso em imunoterapia contra LMA.

Existem trabalhos que avaliaram a produção de IL-12p70 pelas DCs maduras, geradas em diferentes meios, sob diferentes estímulos de maturação. Alguns autores atribuem à baixa produção de IL-12p70 ao uso de prostaglandina E2 (PGE2) como componente do coquetel de maturação [59, 86] o que poderia explicar a baixa produção dessa citocina no presente trabalho.

Foi possível observar no presente trabalho que os meios isentos de soro testados foram eficientes na produção de DCs viáveis e funcionais, ideais para aplicação clínica em pacientes com LMA. Dentre eles, o meio X-Vivo 15 se destacou por apresentar maior eficiência na geração de DCs com características pró-inflamatórias.

CONCLUSÃO

Concluimos que os meios de culturas isentos de soro, especialmente o X-Vivo 15, demonstraram boa eficiência na geração de DCs viáveis e funcionais para fins imunoterápicos em pacientes com leucemia mieloide aguda. Embora viáveis, as DCs geradas em RPMI suplementado com soro autólogo de pacientes com LMA demonstraram menor capacidade funcional em relação aos outros meios testados, provavelmente devido à presença de fatores imunossupressores no soro. Acreditamos que o protocolo proposto com meios isentos de suplementação seja satisfatório para a vacinação com células dendríticas em pacientes com LMA atendidos no serviço (anexo III).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Santini, S.M. and F. Belardelli, *Advances in the use of dendritic cells and new adjuvants for the development of therapeutic vaccines*. *Stem Cells*, 2003. **21**(4): p. 495-505.
2. Whiteside, T.L. and C. Odoux, *Dendritic cell biology and cancer therapy*. *Cancer Immunol Immunother*, 2004. **53**(3): p. 240-8.
3. Ahmad, M., R.C. Rees, and S.A. Ali, *Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression*. *Cancer Immunol Immunother*, 2004. **53**(10): p. 844-54.
4. Mocellin, S., et al., *Part I: Vaccines for solid tumours*. *Lancet Oncol*, 2004. **5**(11): p. 681-9.
5. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*, 2000. **18**: p. 767-811.
6. Brossart, P., et al., *Dendritic cells in cancer vaccines*. *Exp Hematol*, 2001. **29**(11): p. 1247-55.
7. Dallal, R.M. and M.T. Lotze, *The dendritic cell and human cancer vaccines*. *Curr Opin Immunol*, 2000. **12**(5): p. 583-8.
8. Hart, D.N., *Dendritic cells and their emerging clinical applications*. *Pathology*, 2001. **33**(4): p. 479-92.
9. Paczesny, S., et al., *Dendritic cells as vectors for immunotherapy of cancer*. *Semin Cancer Biol*, 2003. **13**(6): p. 439-47.
10. Panoskaltis, N., C.D. Reid, and S.C. Knight, *Immune modulation with dendritic cells*. *Transfus Med*, 2004. **14**(2): p. 81-96.
11. Chang, G.C., et al., *A pilot clinical trial of vaccination with dendritic cells pulsed with autologous tumor cells derived from malignant pleural effusion in patients with late-stage lung carcinoma*. *Cancer*, 2005. **103**(4): p. 763-71.
12. Hirschowitz, E.A., et al., *Autologous dendritic cell vaccines for non-small-cell lung cancer*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(14): p. 2808-15.
13. Lindquist, R.L., et al., *Visualizing dendritic cell networks in vivo*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(12): p. 1243-50.
14. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. *J Exp Med*, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
15. Bobryshev, Y.V., *Dendritic cells and their role in atherogenesis*, in *Lab Invest*. 2010. p. 970-84.
16. Corcoran, L., et al., *The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells*. *J Immunol*, 2003. **170**(10): p. 4926-32.
17. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. *J Exp Med*, 1994. **179**(4): p. 1109-18.
18. Steinman, R.M., *Dendritic cells: understanding immunogenicity*. *Eur J Immunol*, 2007. **37** **Suppl 1**: p. S53-60.
19. Guermonprez, P., et al., *Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 621-67.
20. Jeras, M., M. Bergant, and U. Repnik, *In vitro preparation and functional assessment of human monocyte-derived dendritic cells-potential antigen-specific modulators of in vivo immune responses*. *Transpl Immunol*, 2005. **14**(3-4): p. 231-44.
21. Diebold, S.S., *Determination of T-cell fate by dendritic cells*. *Immunol Cell Biol*, 2008. **86**(5): p. 389-97.

22. Keir, M.E. and A.H. Sharpe, *The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity*. Immunol Rev, 2005. **204**: p. 128-43.
23. Granucci, F., I. Zanoni, and P. Ricciardi-Castagnoli, *Central role of dendritic cells in the regulation and deregulation of immune responses*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(11): p. 1683-97.
24. Mortellaro, A., et al., *Dendritic cells as sensors of environmental perturbations*. Microbes Infect, 2008. **10**(9): p. 990-4.
25. Bromley, S.K., et al., *The immunological synapse*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 375-96.
26. Watford, W.T., et al., *The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(5): p. 361-8.
27. Lowenberg, B., J.R. Downing, and A. Burnett, *Acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 1999. **341**(14): p. 1051-62.
28. Bennett, J.M., et al., *Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group*. Ann Intern Med, 1985. **103**(4): p. 620-5.
29. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group*. Br J Haematol, 1976. **33**(4): p. 451-8.
30. Vardiman, J.W., N.L. Harris, and R.D. Brunning, *The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2292-302.
31. Galea-Lauri, J., *Immunological weapons against acute myeloid leukaemia*. Immunology, 2002. **107**(1): p. 20-7.
32. Stone, R.M., *Treatment of acute myeloid leukemia: state-of-the-art and future directions*. Semin Hematol, 2002. **39**(3 Suppl 2): p. 4-10.
33. Arceci, R.J., *The potential for antitumor vaccination in acute myelogenous leukemia*. J Mol Med (Berl), 1998. **76**(2): p. 80-93.
34. Lowdell, M.W. and M.B. Koh, *Immunotherapy of AML: future directions*. J Clin Pathol, 2000. **53**(1): p. 49-54.
35. Torelli, G.F., et al., *Developmental approaches in immunological control of acute myelogenous leukaemia*. Best Pract Res Clin Haematol, 2001. **14**(1): p. 189-209.
36. Hsu, F.J., et al., *Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells*. Nat Med, 1996. **2**(1): p. 52-8.
37. Belardelli, F. and M. Ferrantini, *Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity*. Trends Immunol, 2002. **23**(4): p. 201-8.
38. Figdor, C.G., et al., *Dendritic cell immunotherapy: mapping the way*. Nat Med, 2004. **10**(5): p. 475-80.
39. Fong, L. and E.G. Engleman, *Dendritic cells in cancer immunotherapy*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 245-73.
40. de Vries, I.J., et al., *Phenotypical and functional characterization of clinical grade dendritic cells*. J Immunother, 2002. **25**(5): p. 429-38.
41. Romani, N., et al., *Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability*. J Immunol Methods, 1996. **196**(2): p. 137-51.
42. Peng, J.C., R. Thomas, and L.K. Nielsen, *Generation and maturation of dendritic cells for clinical application under serum-free conditions*. J Immunother, 2005. **28**(6): p. 599-609.
43. Napolitano, C., et al., *A comparative analysis of serum and serum-free media for generation of clinical grade DCs*. J Immunother, 2007. **30**(5): p. 567-76.

44. Dietz, A.B., et al., *Clinical-grade manufacturing of DC from CD14+ precursors: experience from phase I clinical trials in CML and malignant melanoma*. *Cytotherapy*, 2004. **6**(6): p. 563-70.
45. Fong, L., et al., *Dendritic cell-based xenoantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy*. *J Immunol*, 2001. **167**(12): p. 7150-6.
46. Toldbod, H.E., et al., *Potent influence of bovine serum proteins in experimental dendritic cell-based vaccination protocols*. *Scand J Immunol*, 2003. **58**(1): p. 43-50.
47. Ohishi, K., et al., *Efficient ex vivo generation of human dendritic cells from mobilized CD34+ peripheral blood progenitors*. *Int J Hematol*, 2001. **74**(3): p. 287-96.
48. Pietschmann, P., et al., *Functional and phenotypic characteristics of dendritic cells generated in human plasma supplemented medium*. *Scand J Immunol*, 2000. **51**(4): p. 377-83.
49. Dhodapkar, K.M., et al., *Selective blockade of inhibitory Fcγ receptor enables human dendritic cell maturation with IL-12p70 production and immunity to antibody-coated tumor cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(8): p. 2910-5.
50. Carlos, C.A., et al., *Human tumor antigen MUC1 is chemotactic for immature dendritic cells and elicits maturation but does not promote Th1 type immunity*. *J Immunol*, 2005. **175**(3): p. 1628-35.
51. Corinti, S., et al., *Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions*. *J Immunol*, 2001. **166**(7): p. 4312-8.
52. Hiltbold, E.M., et al., *The mechanism of unresponsiveness to circulating tumor antigen MUC1 is a block in intracellular sorting and processing by dendritic cells*. *J Immunol*, 2000. **165**(7): p. 3730-41.
53. Omata, N., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 selectively inhibits the acquisition of CD40 ligand-dependent IL-12-producing capacity of monocyte-derived dendritic cells and modulates Th1 immune response*. *J Immunol*, 2002. **169**(9): p. 4861-6.
54. Rughetti, A., et al., *Recombinant tumor-associated MUC1 glycoprotein impairs the differentiation and function of dendritic cells*. *J Immunol*, 2005. **174**(12): p. 7764-72.
55. Van Voorhis, W.C., et al., *Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood*. *J Exp Med*, 1982. **155**(4): p. 1172-87.
56. Caux, C., et al., *CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha*. *J Exp Med*, 1996. **184**(2): p. 695-706.
57. Romani, N., et al., *Proliferating dendritic cell progenitors in human blood*. *J Exp Med*, 1994. **180**(1): p. 83-93.
58. Ovali, E., et al., *Active immunotherapy for cancer patients using tumor lysate pulsed dendritic cell vaccine: a safety study*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2007. **26**(2): p. 209-14.
59. Ten Brinke, A., et al., *The clinical grade maturation cocktail monophosphoryl lipid A plus IFNγ generates monocyte-derived dendritic cells with the capacity to migrate and induce Th1 polarization*. *Vaccine*, 2007. **25**(41): p. 7145-52.
60. Jonuleit, H., et al., *Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions*. *Eur J Immunol*, 1997. **27**(12): p. 3135-42.
61. Royer, P.J., et al., *Culture medium and protein supplementation in the generation and maturation of dendritic cells*. *Scand J Immunol*, 2006. **63**(6): p. 401-9.
62. Smits, E.L., Z.N. Berneman, and V.F. Van Tendeloo, *Immunotherapy of acute myeloid leukemia: current approaches*. *Oncologist*, 2009. **14**(3): p. 240-52.

63. Barrett, A.J. and K. Le Blanc, *Immunotherapy prospects for acute myeloid leukaemia*. Clin Exp Immunol. **161**(2): p. 223-32.
64. Barrett, A.J. and K. Le Blanc, *Immunotherapy prospects for acute myeloid leukaemia*. Clin Exp Immunol, 2010. **161**(2): p. 223-32.
65. Peccatori, J. and F. Ciceri, *Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia*. Haematologica, 2010. **95**(6): p. 857-9.
66. Smits, E.L., et al., *Dendritic cell-based cancer gene therapy*. Hum Gene Ther, 2009. **20**(10): p. 1106-18.
67. Tallman, M.S., D.G. Gilliland, and J.M. Rowe, *Drug therapy for acute myeloid leukemia*. Blood, 2005. **106**(4): p. 1154-63.
68. Estey, E. and H. Dohner, *Acute myeloid leukaemia*. Lancet, 2006. **368**(9550): p. 1894-907.
69. Rowe, J.M. and M.S. Tallman, *How I treat acute myeloid leukemia*. Blood, 2010. **116**(17): p. 3147-56.
70. Sekeres, M.A., *Treatment of older adults with acute myeloid leukemia: state of the art and current perspectives*. Haematologica, 2008. **93**(12): p. 1769-72.
71. Schmitt, M., et al., *Peptide vaccines for patients with acute myeloid leukemia*. Expert Rev Vaccines, 2009. **8**(10): p. 1415-25.
72. van den Ancker, W., et al., *Recent advances in antigen-loaded dendritic cell-based strategies for treatment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia*. Immunotherapy. **2**(1): p. 69-83.
73. van den Ancker, W., et al., *Recent advances in antigen-loaded dendritic cell-based strategies for treatment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia*. Immunotherapy, 2010. **2**(1): p. 69-83.
74. van de Loosdrecht, A.A., et al., *Dendritic cell-based immunotherapy in myeloid leukaemia: translating fundamental mechanisms into clinical applications*. Handb Exp Pharmacol, 2009(188): p. 319-48.
75. Curti, A., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing leukemic dendritic cells impair a leukemia-specific immune response by inducing potent T regulatory cells*. Haematologica, 2010. **95**(12): p. 2022-30.
76. Lee, J.J., et al., *Immunotherapy using autologous monocyte-derived dendritic cells pulsed with leukemic cell lysates for acute myeloid leukemia relapse after autologous peripheral blood stem cell transplantation*. J Clin Apher, 2004. **19**(2): p. 66-70.
77. (Van Tendeloo, V.d.V.e.a.
78. Oka, Y. and H. Sugiyama, *WT1 peptide vaccine, one of the most promising cancer vaccines: its present status and the future prospects*. Immunotherapy, 2010 **2**(5): p. 591-4.
79. Araki, H., et al., *Efficient ex vivo generation of dendritic cells from CD14+ blood monocytes in the presence of human serum albumin for use in clinical vaccine trials*. Br J Haematol, 2001. **114**(3): p. 681-9.
80. Gatti, E. and P. Pierre, *Understanding the cell biology of antigen presentation: the dendritic cell contribution*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(4): p. 468-73.
81. Jakobsen, M.A., B.K. Moller, and S.T. Lillevang, *Serum concentration of the growth medium markedly affects monocyte-derived dendritic cells' phenotype, cytokine production profile and capacities to stimulate in MLR*. Scand J Immunol, 2004. **60**(6): p. 584-91.
82. Pedersen, A.E., et al., *Phenotypic and functional characterization of clinical grade dendritic cells generated from patients with advanced breast cancer for therapeutic vaccination*. Scand J Immunol, 2005. **61**(2): p. 147-56.

83. Shurin, G.V., et al., *Neuroblastoma-derived gangliosides inhibit dendritic cell generation and function*. *Cancer Res*, 2001. **61**(1): p. 363-9.
84. Eljaafari, A., et al., *Generation of stable monocyte-derived dendritic cells in the presence of high concentrations of homologous or autologous serum: influence of extra-cellular pH*. *Hum Immunol*, 1998. **59**(10): p. 625-34.
85. Duperrier, K., et al., *Distinct subsets of dendritic cells resembling dermal DCs can be generated in vitro from monocytes, in the presence of different serum supplements*. *J Immunol Methods*, 2000. **238**(1-2): p. 119-31.
86. Kalinski, P., et al., *Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer*. *Blood*, 2001. **97**(11): p. 3466-9.

10. ANEXOS

 **FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**
www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 25/11/08.
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 951/2008 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0757.0.146.000-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "A INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA LIVRES DE SORO NA GERAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PARA O TRATAMENTO IMUNOTERÁPICO DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA".
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gisele da Silva Simoneti
INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/11/2008
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 25/11/09 (O formulário encontra-se no site acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar o desenvolvimento de célula dendríticas *in vitro*, em meios de cultura livre de soro e em meios de cultura suplementados com soro autólogo, além de monitorar, *in vitro*, o potencial dessas células em iniciar uma resposta imune-específica, para o uso imunoterapêutico em pacientes com leucemia melóide aguda em futuros estudos clínicos.

III - SUMÁRIO

O desenho experimental deste estudo consistirá em cultura de células mononucleares de 5 pacientes com LMA em 3 tipos de meios (X-vivo-15, CellGro e RPMI 1640), com ou sem suplementação de soro autólogo. O Hemocentro da UNICAMP possui procedimentos operacionais para armazenamento de material biológico.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Projeto bem elaborado, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido bastante esclarecedor, portanto do ponto de vista ético nada que obste sua realização.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -



VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 25 de novembro de 2008.


Prof. Dra. Carmen Silyia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do projeto: *“A influência de diferentes meios de cultura na geração de células dendríticas para o tratamento imunoterápico de pacientes com leucemia mielóide aguda.”*

Responsáveis pela condução das pesquisas: Profa. Dra. Sara Teresinha O. Saad / Dra. Simone Cristina Olenscki Gilli

Você está convidado a participar de um estudo do hemocentro da UNICAMP, que tem como objetivo obter células do seu sangue periférico e diferenciá-las em células dendríticas. As células dendríticas são células naturalmente especializadas em estimular o sistema imune contra agentes invasores ou células de câncer, mas em pacientes com leucemia mielóide aguda, estas células não estão ativadas. Muitos estudos estão sendo realizados em outros países para ativar essas células e possibilitar que o seu organismo controle o crescimento de células leucêmicas. O nosso estudo tem o propósito de verificar qual o melhor método para realizar tal ativação.

Se você consentir em participar do estudo, você será submetido a uma coleta de sangue da veia, não sendo necessário jejum para esta coleta. Para estes experimentos serem realizados, precisaremos coletar as suas células, que podem estar presentes em 50 -100ml de sangue. A coleta de sangue não traz riscos à sua saúde e este estudo não trará benefícios para o seu tratamento. Entretanto, pretendemos contribuir para mostrar, no futuro, novos caminhos para o tratamento das leucemias.

Se você aceitar participar deste estudo, o seu nome não será divulgado e, portanto garantiremos o sigilo e a sua privacidade quanto aos dados do trabalho. Além disso, você terá a liberdade de abandonar a pesquisa a qualquer momento sem ter sua assistência médica comprometida. Se você não quiser participar do trabalho não haverá nenhum prejuízo ao seu atendimento no nosso hospital.

Caso esta redação contenha linguagem que você não entenda, peça esclarecimentos ou qualquer informação adicional para o seu médico ou entre em contato com um dos membros investigadores do estudo, Dra Sara Saad/ Dra Simone Gilli nos telefones 3521 8734 ou 3521 8603 . Uma cópia deste documento será dada a você.

O participante deve preencher toda esta página (marque cada frase se ela se aplicar a você).

-] Eu li as informações aos pacientes.
-] Eu tive a oportunidade de perguntar e discutir quaisquer dúvidas sobre este estudo.
-] Eu recebi respostas satisfatórias para minhas dúvidas.
-] Eu fui informado o suficiente sobre este estudo.

O estudo foi explicado por mim por:

Prof./Dr./Sr./Sra. _____

-] Eu estou ciente que estou livre para me retirar do estudo a qualquer momento, sem que para isso tenha que apresentar um motivo e sem que isto afete meu tratamento no futuro.
-] Eu concordo em participar do estudo.

O telefone da Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa para os casos de recurso ou reclamações do paciente é: (019) 3788-8936

Nome do paciente: _____

Idade: _____ anos RG: _____

Endereço: _____

Número HC: _____

Campinas, ____ de _____ de _____.

Assinatura do paciente

Assinatura do Responsável pela Pesquisa

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO APÓS INFORMAÇÃO

Carta de

Aceito participar do estudo proposto, no qual fornecerei uma amostra de sangue (volume 50 - 100ml) a ser colhida em veia de um dos braços. Estou ciente de que este material será utilizado para um projeto que estuda a diferenciação de células coletadas no sangue periférico em células dendríticas. Estou ciente de que não terei prejuízo com a realização da amostragem. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o meu tratamento na UNICAMP. Sei ainda que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar as Dra. Sara Saad ou Simone Gilli (F: 3521 8734 ou 3521 8603, pesquisadoras responsáveis pelo estudo), no Hemocentro, UNICAMP. Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo, poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética do FCM, UNICAMP, F: 3788 8936.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

.....

Assinatura do pesquisador

.....

Assinatura do paciente

Campinas,/...../.....

ANEXO III

PROTOCOLO PROPOSTO PARA GERAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PARA APLICAÇÃO

IMUNOTERAPÊUTICA EM PACIENTES COM LMA

- 1) Coletar células mononucleares do sangue periférico dos pacientes com LMA, por procedimento de leucaferese;
- 2) Diluir o sangue em PBS (tampão salino tamponado com fosfato, pH 7,2). 1:1 e centrifugar em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque, 1500rpm, 30 min;
- 3) Coletar as células mononucleares e centrifugá-las por duas vezes em PBS, 1500rpm por 5 min;
- 4) Contar as células em câmara de Neubauer, transferi-las para garrafas de cultura, na concentração adequada e cultivá-las no meio isento de soro X-VIVO15;
- 5) Após uma hora de incubação, remover as células não aderentes e lavar os poços com PBS;
- 6) Cultivar os monócitos aderentes no meio indicado acima e adicionar 40ng/ml de IL4 e 40ng/ml de GMCSF em cada poço;
- 7) No quarto dia de cultura, adicionar meio e citocinas GM-CSF e IL-4 em cada poço;
- 8) Pulsar as DCs coletadas com antígenos relevantes a LMA a fim de estimular respostas imunes específicas
- 9) No quinto dia de cultura, adicionar em cada poço um coquetel para maturação das células, consistindo de 10ng/ml de TNF- α , 10ng/ml de IL-1 β , 10ng/ml de IL-6 e 1 μ g/ml de PGE2;
- 10) Manter as células a 37°C com 5% de CO₂ por 7 dias;
- 11) Coletar as DCs com auxílio de pipetas estéreis e PBS gelado para descolamento das células da placa ou garrafa de cultura.