

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA**

**ESTUDO DE FASE I COM VACINA CELULAR  
AUTÓLOGA IMUNOMODULADA PARA  
TRATAMENTO DE CÂNCER DE PRÓSTATA  
LOCALMENTE AVANÇADO OU METASTÁTICO**

**MILTON BERGER**

**TESE DE DOUTORADO**

**Porto Alegre  
2005**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA**

**ESTUDO DE FASE I COM VACINA CELULAR  
AUTÓLOGA IMUNOMODULADA PARA  
TRATAMENTO DE CÂNCER DE PRÓSTATA  
LOCALMENTE AVANÇADO OU METASTÁTICO**

**MILTON BERGER**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor em Cirurgia. Área de Concentração: Urologia

Orientador: Prof. Dr. Walter José Koff

**Porto Alegre  
2005**

B496e **Berger, Milton**

Estudo de fase I com vacina celular autóloga imunomodulada para tratamento de câncer de próstata localmente avançado ou metastático / Milton Berger ; orient. Walter José Koff. – 2005.

144 f. : il. color.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia. Porto Alegre, BR-RS, 2005.

1. Neoplasias prostáticas 2. Metástase neoplásica 3. Vacinas anti-câncer 4. Imunoterapia celular adotiva 5. Transplante autólogo  
I. Koff, Walter José II. Título.

NLM: WJ 752

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

**A Silvana e Ana**  
pelo amor, carinho, apoio e compreensão de minhas ausências.

**A minha mãe, Célia**  
pela eterna dedicação, afeto e amor.

**A meus irmãos, Sara, Henrique, Rosa e Léo**  
pela convivência, amizade e apoio.

**A meu pai, Prof. Dr. Jacob Berger**  
pelo ensino de muito mais que a Urologia e a quem devo o que sou.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Ao Prof. Dr. Walter J. Koff, orientador deste trabalho, chefe do Serviço de Urologia do HCPA, atual Presidente da Sociedade Brasileira de Urologia, homem de múltiplos interesses e habilidades, conciliando diversas atividades e exercendo-as com criatividade, eficiência, capacidade e competência. A isso, conjuga-se seu incomum conhecimento médico e urológico e invulgar habilidade cirúrgica. Ele pertence àquela rara estirpe de indivíduos que iniciam uma linhagem singular de profissionais, caracterizada por diversos aspectos como perícia, técnica, conhecimento, raciocínio, atitude e postura. É possível identificar naqueles formados em seu serviço, traços comuns desta linhagem, à qual sinto-me grato e honrado por pertencer.

## **AGRADECIMENTOS**

- Ao Prof. Dr. Protásio Martins Costa Alves, pelo ensino urológico, pela contribuição à minha formação, pela convivência, e pela palavra alegre e gentil.
- Ao Prof. Dr. Fernando Thomé Kreutz, pelo apoio e orientação.
- À FK Biotecnologia SA, pelo suporte laboratorial e financeiro.
- À bioquímica Aline Chies Baldi, pelo trabalho desenvolvido no laboratório de cultura celular.
- À Prof. Jandyra Fachel, pela orientação na análise estatística.
- Ao Dr. Jorge Luiz Horst, que desenvolveu sua Dissertação de Mestrado nesta linha de pesquisa e cujo auxílio na condução deste trabalho foi imprescindível.
- Ao Dr. Roberto Lodeiro Muller, cujo auxílio foi fundamental e inestimável em todas as etapas deste estudo, desde as atividades de coleta de material e atendimento a pacientes, passando pela confecção do banco de dados e revisão de prontuários, e finalmente na análise estatística e confecção dos gráficos.
- Ao Dr. Marcelo Pimentel, pelo auxílio essencial e disponibilidade constante nas atividades de coleta de material, atendimento a pacientes e revisão de prontuários.
- Ao Dr. Brasil Silva Neto, pelo apoio constante, ajuda na revisão bibliográfica, e pelo tempo despendido, e a mim poupado, nos cuidados hospitalares e perioperatórios de meus pacientes.
- Aos Drs. Carlos Eduardo Fay e Fabrício Bergelt de Souza, pela ajuda nas atividades envolvidas neste trabalho e pela coleta de dados.
- Ao Dr. André Berger, pela ajuda na revisão bibliográfica e revisão de prontuários.

- 
- Aos Residentes do Serviço de Urologia do HCPA, pela amizade, convivência, disponibilidade, questionamentos, e razão de estímulo constante a meu aprimoramento e atualização profissionais.
  - Aos Drs. Nancy Tamara Denicol, Renato Scaletsky, Cláudio Luiz Martins Lima e Bernardo da Silva Moreira, pela amizade e pela convivência urológica estimulante.
  - Aos Drs. Mauro Weiss e Pedro Nery da Luz Jr, pela amizade e apoio.
  - Às secretárias Norma da Silva e Estela Maris Araripe, pela amizade, apoio, atenção, disponibilidade e eficiência, sem as quais muitas das tarefas envolvidas nesta tese não teriam tido sucesso.
  - Ao Serviço de Urologia do HCPA, por minha formação urológica.
  - À Faculdade de Medicina da UFRGS, por minha formação médica.
  - Ao HCPA, em cujas dependências grande parte deste trabalho foi realizada.
  - Ao Curso de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia da UFRGS, pela compreensão e estímulo.
  - Ao CNPq, pela concessão de bolsa para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE TABELAS .....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Câncer de próstata .....	12
1.1.1 Epidemiologia do câncer de próstata.....	12
1.1.2 Câncer de próstata localizado, localmente avançado e metastático .....	13
1.2 Imunologia e imunoterapia.....	16
1.2.1 Imunologia.....	16
1.2.2 Imunologia tumoral .....	25
1.2.3 Imunoterapia tumoral .....	29
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	42
2.1 Imunoterapia em câncer de próstata .....	42
3 OBJETIVOS.....	53
4 REFERÊNCIAS .....	54
5 ARTIGO -ESTUDO DE FASE I COM VACINA CELULAR AUTÓLOGA IMUNOMODULADA PARA CÂNCER DE PRÓSTATA LOCALMENTE AVANÇADO OU METASTÁTICO .....	66
RESUMO .....	67
INTRODUÇÃO.....	68
MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
RESULTADOS .....	76
DISCUSSÃO.....	80
CONCLUSÃO.....	89
REFERÊNCIAS .....	91
6 PAPER – PHASE I STUDY WITH AN IMMUNOMODULATED AUTOLOGOUS CELL VACCINE FOR LOCALLY ADVANCED OR METASTATIC PROSTATE CANCER.....	106



---

ABSTRACT .....	107
INTRODUCTION .....	108
MATERIALS AND METHODS .....	111
RESULTS .....	115
DISCUSSION.....	119
CONCLUSION .....	128
REFERENCES .....	130

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Ab(s)</b>	– Anticorpo(s)/ <i>antibody(ies)</i>
<b>ADCC</b>	– Citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo/ <i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
<b>AICD</b>	– Morte celular induzida por ativação/ <i>activation-induced cell death</i>
<b>APC(s)</b>	– Célula(s) apresentadora(s) de antígenos/ <i>antigen presenting cell(s)</i>
<b>BCG</b>	– <i>Bacille Calmette-Guérin</i>
<b>CD</b>	– <i>Cluster of differentiation</i>
<b>CD/5-FC</b>	– <i>Cytosine deaminase/5-fluorocytosine</i>
<b>CTL(s)</b>	– Linfócito(s) T citotóxico(s)/ <i>cytotoxic T lymphocyte(s)</i>
<b>CTLA-4</b>	– Antígeno-4 do linfócito T citotóxico/ <i>cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>
<b>DNA</b>	– Ácido desoxirribonucleico/ <i>deoxyribonucleic acid</i>
<b>DTH</b>	– Hipersensibilidade de tipo retardado/ <i>delayed-type hypersensitivity</i>
<b>FasL</b>	– <i>Fas ligand</i>
<b>G-CSF</b>	– Fator estimulador de colônias de granulócitos/ <i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
<b>GM-CSF</b>	– Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos/ <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>HLA</b>	– Antígeno leucocitário humano/ <i>human leukocyte antigen</i>
<b>HPV</b>	– Vírus papiloma humano/ <i>human papilloma virus</i>
<b>HSP</b>	– <i>Heat shock protein</i>
<b>HSVtk/GCV</b>	– <i>Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir</i>
<b>ThL(s)</b>	– Linfócito(s) T auxiliar(es)/ <i>helper T lymphocyte(s)</i>
<b>HTLV</b>	– Vírus linfotrópico-T humano/ <i>human T-lymphotropic virus</i>
<b>IFN</b>	– Interferon

---

<b>Ig</b>	– Imunoglobulina/ <i>immunoglobulin</i>
<b>IL</b>	– Interleucina/ <i>interleukin</i>
<b>KLH</b>	– <i>Keyhole limpet hemocyanin</i>
<b>LT</b>	– Linfotoxina/ <i>lymphotoxin</i>
<b>mAb(s)</b>	– Anticorpos(s) monoclonal(is)/ <i>monoclonal antibody(ies)</i>
<b>MHC</b>	– Complexo principal de histocompatibilidade/ <i>major histocompatibility complex</i>
<b>NK</b>	– <i>Natural killer</i>
<b>NKT</b>	– <i>Natural killer T cell</i>
<b>PAP</b>	– Fosfatase ácida prostática/ <i>prostatic acid phosphatase</i>
<b>PCa</b>	– Câncer de próstata/ <i>prostate cancer</i>
<b>PCTA-1</b>	– Antígeno tumoral de carcinoma prostático 1/ <i>prostate carcinoma tumor antigen 1</i>
<b>PSA</b>	– Antígeno prostático específico/ <i>prostate-specific antigen</i>
<b>PSADT</b>	– Tempo de duplicação do PSA/ <i>PSA doubling time</i>
<b>PSCA</b>	– Antígeno de célula tronco prostática/ <i>prostate stem cell antigen</i>
<b>PSMA</b>	– Antígeno de membrana prostático específico/ <i>prostate-specific membrane antigen</i>
<b>RNA</b>	– Ácido ribonucleico/ <i>ribonucleic acid</i>
<b>RRP</b>	– Prostatectomia radical retropúbica/ <i>radical retropubic prostatectomy</i>
<b>RT</b>	– Radioterapia/ <i>radiotherapy</i>
<b>TAA</b>	– Antígeno associado ao tumor/ <i>tumor-associated antigen</i>
<b>TAP</b>	– Transportador associado com processamento de antígenos/ <i>transporter associated with antigen processing</i>
<b>TCR(s)</b>	– Receptor(es) de célula(s) T/ <i>T cell receptor(s)</i>
<b>TGF</b>	– Fator transformador de crescimento/ <i>transforming growth factor</i>
<b>TNF</b>	– Fator de necrose tumoral/ <i>tumor necrosis factor</i>
<b>TSA</b>	– Antígeno específico tumoral/ <i>tumor-specific antigen</i>

## LISTA DE FIGURAS

### Artigo

Figura 1: Resultados da cultura celular de acordo com o método de coleta .....	100
Figura 2: Evolução do PSA e intervenções realizadas (PPL).....	100
Figura 3: Evolução do PSA e intervenções realizadas (MRS) .....	101
Figura 4: Evolução do PSA e intervenções realizadas (JaB).....	101
Figura 5: Evolução do PSA e intervenções realizadas (OAC) .....	102
Figura 6: Evolução do PSA e intervenções realizadas (AAS).....	102
Figura 7: Evolução do PSA e intervenções realizadas (AI) .....	103
Figura 8: Evolução do PSA e intervenções realizadas (JoB) .....	103
Figura 9: Evolução do PSA e intervenções realizadas (APS) .....	104
Figura 10: Evolução do PSA e intervenções realizadas (ASO).....	104
Figura 11: Evolução do PSA e intervenções realizadas (RC) .....	105
Figura 12: Evolução do PSA e intervenções realizadas (RG).....	105

### Paper

Figure 1: Cell culture results according to collection method.....	139
Figure 2: PSA progress and performed interventions (PPL).....	139
Figure 3: PSA progress and performed interventions (MRS) .....	140
Figure 4: PSA progress and performed interventions (JaB).....	140
Figure 5: PSA progress and performed interventions (OAC) .....	141
Figure 6: PSA progress and performed interventions (AAS).....	141
Figure 7: PSA progress and performed interventions (AI).....	142
Figure 8: PSA progress and performed interventions (JoB).....	142
Figure 9: PSA progress and performed interventions (APS) .....	143
Figure 10: PSA progress and performed interventions (ASO).....	143
Figure 11: PSA progress and performed interventions (RC) .....	144
Figure 12: PSA progress and performed interventions (RG) .....	144

## LISTA DE TABELAS

### Artigo

Tabela 1: Características dos grupos TURP e RRP.....	98
Tabela 2: Características relevantes dos pacientes vacinados.....	98
Tabela 3: Medidas (mm) das reações DTH (enduração) obtidas nos 11 pacientes vacinados.....	99
Tabela 4: Efeitos adversos.....	99

### Paper

Table 1: Baseline characteristics of TURP and RRP groups.....	137
Table 2: Relevant characteristics of the vaccinated patients.....	137
Table 3: Measures (mm) of DTH reactions (induration) in the 11 vaccinated patients.....	138
Table 4: Adverse effects.....	138

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 Câncer de próstata**

### ***1.1.1 Epidemiologia do câncer de próstata***

Câncer de próstata (PCa) é um tema relevante em saúde pública. No mundo, excetuando-se o câncer de pele não-melanoma, é o segundo câncer mais incidente em homens, com cerca de 680.000 novos casos por ano, e a sexta causa de mortalidade por câncer em homens, com cerca de 220.000 mortes; sua prevalência de 5 anos em homens acima de 15 anos é de aproximadamente 2.360.000 casos, o que o torna a neoplasia maligna mais prevalente em homens no mundo. Quando consideramos somente as regiões mais desenvolvidas do planeta, PCa se torna a neoplasia maligna de maior incidência e a terceira causa de mortalidade por câncer em homens<sup>1</sup>.

Houve um gradual aumento da incidência de PCa desde os anos 60 em todo o mundo, e aumento expressivo no fim dos anos 80 e início dos anos 90, especialmente nos Estados Unidos<sup>2</sup>. Tal observação reflete, em parte, o progressivo envelhecimento da população

mundial, já que  $\frac{3}{4}$  dos casos de PCa ocorrem em homens com mais de 65 anos, mas também o uso crescente de dosagem do antígeno prostático específico (PSA) desde o final da década de 80<sup>2,3</sup>.

Nos Estados Unidos da América, estima-se em 232.090 o número de novos casos de PCa em 2005, o que o torna a neoplasia maligna mais comum em homens, excluindo-se câncer de pele não-melanoma. O número estimado de mortes por PCa em 2005 é de 30.350 casos, o que o identifica como a segunda causa de morte por câncer em homens. PCa é responsável por 33% dos casos incidentes de câncer em homens e sua incidência continua a aumentar, apesar de crescer a uma taxa mais lenta que em anos anteriores. A chance de um homem desenvolver PCa durante sua vida é de 1 em 6 (17,81%). Com base em casos detectados entre 1995 e 2000, cerca de 90% dos casos de PCa são diagnosticados em estágios locais ou regionais, e somente 10% com lesões à distância<sup>4</sup>.

No Brasil, para 2005, o número de novos casos de PCa é estimado em 46.330, o que corresponde a uma incidência de 51 novos casos para cada 100.000 homens, tornando o PCa o câncer mais incidente em homens, excluindo-se câncer de pele não-melanoma. É a segunda causa de mortalidade por câncer no país, sendo superado somente pelo câncer de pulmão<sup>5</sup>.

### ***1.1.2 Câncer de próstata localizado, localmente avançado e metastático***

Cerca de 90% dos casos detectados de PCa nos EUA compreendem tumores localizados ou regionais<sup>4</sup>. Apesar da eventual prolongada evolução da história natural de casos de PCa detectados precocemente por rastreamento ou não, cerca de 25 a 33% dos homens com PCa vão morrer devido à doença<sup>6</sup>. Cirurgia e radioterapia (RT) são os

tratamentos convencionais para PCa localizado. O número de pacientes submetidos a cirurgia e a RT aumentou substancialmente desde a recomendação, por parte das sociedades urológicas, de rastreamento anual com toque retal e dosagem de PSA<sup>7</sup>. Cerca de metade dos pacientes com PCa detectado por rastreamento é submetida a prostatectomia radical retropúbica (RRP) e cerca de ¼ deles a RT, externa ou intersticial (braquiterapia)<sup>6</sup>.

O tratamento do PCa localizado apresenta altas taxas de efetividade e eficácia. RRP é o tratamento primário mais frequentemente utilizado<sup>8</sup>. Estudos com grandes séries de pacientes submetidos a RRP demonstram altas taxas de controle da neoplasia a médio e longo prazos<sup>9-12</sup>.

Uma série de modelos tem sido proposta para identificar pacientes com alto risco de progressão após tratamento com RRP. Alguns deles utilizam dados convencionais como PSA, escore de Gleason definitivo e aspectos anatomopatológicos da peça cirúrgica para identificar pacientes com risco de recorrência<sup>13-18</sup>. Outros utilizam análises mais elaboradas para identificar preditores de sobrevida e recorrência<sup>19,20</sup>. A existência de diversos modelos para prever recorrência ou progressão do PCa após RRP demonstra que, apesar dos bons resultados da cirurgia, parcela considerável de pacientes apresenta recidiva pós-operatória. Talvez os pacientes com PCa localizado que apresentem maior risco de progressão ou recidiva após tratamento possam ser selecionados para terapias adjuvantes ou mesmo experimentais<sup>13</sup>.

De fato, cerca de 30 a 40% dos pacientes submetidos a RRP apresentam evidência bioquímica (elevação do PSA) de recorrência neoplásica<sup>21,22</sup>, sendo que tal recidiva pode se tornar evidente somente 5 anos ou mais após a cirurgia<sup>23,24</sup>. Uma parcela significativa destes



pacientes apresentará metástases clinicamente detectáveis nos anos que se seguirão à elevação do PSA, especialmente aqueles pacientes com elevações precoces do PSA, com tumores menos diferenciados (Gleason 8 a 10) e com tempo de duplicação do PSA (PSADT) menor do que 10 meses, e boa parte deles morrerá devido a doença metastática<sup>23</sup>.

RT externa de alta dose e braquiterapia podem apresentar resultados comparáveis com RRP para tratamento de PCa localizado, com taxas similares de recidiva bioquímica em 5 anos<sup>25</sup>. No entanto, entre 25 a 32% dos pacientes tratados com RT apresentam recidiva local<sup>26</sup> e esta está fortemente associada ao desenvolvimento de metástases à distância<sup>27</sup>.

PCa localmente avançado é definido como o tumor que se estende além dos limites da glândula, extensão essa percebida ao exame clínico ou por exames de imagem, ou definida por exame anatomopatológico de espécime cirúrgico. Portanto, doença localmente avançada compreende uma população relativamente heterogênea de pacientes. Pacientes com doença localmente avançada, detectada por métodos clínicos, apresentam 50% de chances de recorrência após tratamento local, tal como RRP ou RT<sup>28</sup>. Em pacientes submetidos a RRP, as taxas de recidiva bioquímica são diretamente proporcionais ao estadiamento patológico. A presença de margem cirúrgica positiva ou extensão extracapsular com escore de Gleason  $\geq 7$  está associada com uma chance maior de doença residual após RRP<sup>29,30</sup>. O escore de Gleason também é um fator preditivo independente de progressão tumoral<sup>29,30</sup>. A presença de invasão de vesícula seminal e comprometimento linfonodal determinam alta taxa de recorrência tumoral à distância<sup>10,31</sup>. Esses dados realçam a necessidade de terapias adjuvantes em pacientes com doença localmente avançada.

PCa metastático representa um contexto de doença de péssimo prognóstico. A sobrevida média destes pacientes é de 2 a 3 anos e  $\frac{2}{3}$  deles estarão mortos em 5 anos<sup>32</sup>. Embora a maioria dos pacientes com doença metastática responda a bloqueio hormonal inicialmente, praticamente todos apresentarão doença refratária a hormônios com o passar do tempo<sup>33</sup>. Uma vez desenvolvida insensibilidade hormonal pelo tumor, a sobrevida mediana é de menos de 1 ano<sup>34</sup>. Esta é, claramente, uma população que necessita urgentemente de novas e eficazes estratégias de tratamento.

## 1.2 Imunologia e imunoterapia

### 1.2.1 Imunologia

As células e moléculas responsáveis pela imunidade constituem o *sistema imune* e a resposta coletiva e coordenada à introdução de agentes estranhos é chamada *resposta imune*. A função fisiológica do sistema imune é a defesa contra agentes infecciosos. No entanto, substâncias estranhas não-infecciosas também podem estimular uma resposta imune. Além disso, os mecanismos que normalmente protegem contra infecção e agentes estranhos são capazes de causar dano tecidual e doença em certas circunstâncias. Portanto, uma definição mais abrangente de *imunidade* é a reação a substâncias estranhas, incluindo micróbios e macromoléculas (como proteínas e polissacarídeos), independentemente da consequência fisiológica ou patológica desta reação. *Imunologia* é o estudo da imunidade, neste sentido mais amplo, e dos eventos celulares e moleculares que ocorrem em resposta a micróbios e outras macromoléculas estranhas<sup>35</sup>.

Para fins de sistematização, imunidade pode ser dividida em inata e adaptativa. *Imunidade inata* (natural ou nativa) consiste de mecanismos constitucionais de defesa inespecífica contra agentes agressores externos, sendo constituída de barreiras físicas e químicas (epitélio e substâncias antimicrobianas epiteliais); células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos) e células natural killer (NK); proteínas sanguíneas (sistema complemento e mediadores de inflamação); e proteínas que regulam e coordenam as atividades das células da imunidade inata (citocinas). Os mecanismos da imunidade inata representam a primeira linha de defesa contra agentes estranhos e não distinguem diferenças sutis entre os agentes agressores. *Imunidade adaptativa* (específica ou adquirida) consiste de mecanismos mais evoluídos de defesa estimulados pela exposição a agentes estranhos, que aumentam em magnitude e capacidade de defesa com exposições subseqüentes ao mesmo agente, adaptando-se, portanto, ao agente agressor. Ela se caracteriza por ter especificidade peculiar ao agente agressor e capacidade de memória, respondendo de forma mais intensa a exposições repetidas ao mesmo agente. Os componentes da imunidade adaptativa são os linfócitos e seus produtos; as substâncias estranhas que induzem uma resposta adaptativa, ou são alvo desta resposta, são denominadas antígenos<sup>36</sup>.

Ambos os tipos de imunidade são componentes de um sistema coordenado de defesa, o que se demonstra pelas evidências de que a resposta inata estimula uma resposta adaptativa e influencia sua natureza, e de que a resposta adaptativa utiliza vários dos mecanismos efetores da resposta inata para eliminar o antígeno.

Existem dois tipos de resposta adaptativa: humoral e celular. *Imunidade humoral* é mediada por moléculas, chamadas anticorpos, produzidas pelos linfócitos B, e representa o mecanismo principal de defesa contra agentes extracelulares. *Imunidade celular* é mediada

pelos linfócitos T e combate agentes situados no meio intracelular, portanto, inacessíveis aos anticorpos circulantes<sup>35</sup>.

Imunidade pode ser induzida pela exposição a um antígeno com conseqüente ativação de uma resposta imune por parte do indivíduo, o que se denomina *imunidade ativa*, já que o indivíduo tem parte ativa na resposta ao antígeno. Por outro lado, a imunidade pode ser conferida ao indivíduo pela transferência de anticorpos ou linfócitos específicos contra o antígeno, o que se denomina *imunidade passiva* (ou transferência adotiva), já que não há resposta imune ativa contra o antígeno por parte do indivíduo.

Os anticorpos (antibody – Ab), moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (major histocompatibility complex – MHC), e receptores de antígenos das células T (T cell receptor – TCR) são as três classes de moléculas utilizadas pelo sistema imune adaptativo para reconhecer antígenos<sup>37-39</sup>.

Os linfócitos T são responsáveis pela defesa contra antígenos intracelulares, o que requer especificidade para antígenos expostos por células afetadas e por células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, que são células apresentadoras de antígenos (antigen-presenting cells – APCs). Isto contrasta com os linfócitos B e seus produtos secretados, os Abs, que podem reconhecer tanto antígenos solúveis no meio extracelular, quanto antígenos associados a células. A tarefa de expor antígenos intracelulares aos linfócitos T é realizada por um grupo especializado de proteínas, codificadas por genes de um locus denominado MHC (em humanos, também chamado HLA – human leukocyte antigen, por ter sido primeiramente identificado em leucócitos). As moléculas MHC desempenham papel importante no reconhecimento intercelular e na discriminação entre o próprio (do organismo – self) e o não-

próprio (não do organismo – non-self)<sup>36</sup>. Na realidade, os TCRs das células T só reconhecem um antígeno quando este é apresentado em complexo com uma molécula MHC. Há dois tipos de moléculas MHC, classe I e classe II, que discriminam tipos diferentes de antígenos protéicos e os apresentam a grupos distintos de células T. Peptídeos produzidos no citoplasma por proteólise de proteínas intracelulares são levados à membrana celular expostos em conjugação com moléculas MHC classe I, e são reconhecidos por linfócitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (cytotoxic T lymphocytes – CTLs). Já peptídeos produzidos no citoplasma por proteólise de proteínas extracelulares que sofreram endocitose são levados à membrana celular expostos em conjugação com moléculas MHC classe II, e são reconhecidos por linfócitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> (T helper lymphocytes – ThLs)<sup>38</sup>.

Moléculas MHC classe I são expressas na superfície de todas as células nucleadas, exceto os gametas, enquanto que moléculas MHC classe II (além de classe I) somente são expressas na superfície das APCs (células dendríticas, macrófagos e linfócitos B). Este padrão de expressão está ligado às funções efetoras distintas dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> classe I-restritos (CTL) e CD4<sup>+</sup> classe II-restritos (ThL). A função do CTL é combater células infectadas com micróbios intracelulares (como vírus) ou alteradas com proteínas intracelulares estranhas (como uma célula tumoral). Como isto pode ocorrer com qualquer célula nucleada, os CTLs devem reconhecer antígenos em toda e qualquer célula nucleada. Já os ThLs atuam principalmente para ativar macrófagos a eliminar micróbios extracelulares e ativar linfócitos B a produzir Abs que também eliminam micróbios extracelulares, portanto, devem interagir com somente alguns tipos selecionados de células.

Como vimos, os linfócitos B, com seus Abs de superfície celular, podem reconhecer um antígeno sem auxílio de outras moléculas. Os linfócitos T, com seus TCR de superfície

celular, só podem reconhecer um antígeno quando este está associado a uma molécula MHC na superfície de células próprias, alteradas ou não, ou na superfície de uma APC.

Um aspecto central ao entendimento da imunidade adaptativa se refere à especificidade e à diversidade dos linfócitos. Os linfócitos B, com seus Abs, e os linfócitos T, com seus TCRs, são específicos, isto é, cada linfócito reconhece somente um antígeno. Durante a fase de maturação dos linfócitos B na medula óssea e dos linfócitos T no timo, cada linfócito individual (ou clone individual) é carregado com seqüências únicas de aminoácidos nos seus Abs e TCRs, destinados a reconhecer seqüências de aminoácidos complementares também únicas dos antígenos, o que determina a característica de especificidade. Calcula-se que os clones linfocitários B e T sejam da ordem de  $10^9$  ou mais, o que garante a característica de diversidade. Este grande número de clones assegura o reconhecimento de praticamente qualquer antígeno e é chamado de repertório linfocitário. Os mecanismos moleculares de recombinação dos genes que codificam Abs e TCRs são essencialmente similares, embora genes funcionais de Ab sejam produzidos somente em linfócitos B e genes funcionais de TCR sejam produzidos somente em linfócitos T. O processo de produção dos receptores linfocitários (Ab e TCR) se dá por recombinação randômica de DNA que não é dependente da presença de antígenos, isto é, a expressão dos receptores ocorre antes da exposição a antígenos<sup>36,37,39</sup>.

### **Imunidade humoral**

A resposta imune humoral é mediada por linfócitos B que expressam Abs em sua superfície. Os Abs são uma família de glicoproteínas, chamadas imunoglobulinas (Ig), que possuem vários isotipos (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM). Ab e Ig representam a mesma estrutura molecular e, portanto, são sinônimos. Os Abs podem reconhecer qualquer tipo de molécula

biológica, mas somente macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, fosfolipídios, carboidratos complexos) podem iniciar uma resposta imune. Isto permite que antígenos expressos na superfície de bactérias ou partículas virais (antes da entrada na célula) ou proteínas e outros produtos solúveis produzidos por patógenos e presentes no meio extracelular possam ser reconhecidos e combatidos<sup>37</sup>.

O reconhecimento inicia com a ligação do antígeno protéico ao receptor de membrana celular da APC (no caso de linfócitos B, Ab; no caso de células dendríticas e macrófagos, outros receptores), o que representa o sinal 1 para ativação do linfócito B. O complexo antígeno-Ab estimula diretamente a proliferação e diferenciação do linfócito B específico por meio de ativação de proteínas do sistema complemento, o que constitui o sinal 2 para ativação do linfócito B<sup>36</sup>. Além disso, o complexo antígeno-receptor é internalizado na célula, sendo o antígeno degradado enzimaticamente em peptídeos, o que permite sua ligação com moléculas MHC classe II. O complexo antígeno-molécula MHC classe II é levado, então, à superfície celular para exposição aos CD4<sup>+</sup> ThLs. Os ThLs ativados, específicos para o antígeno exposto, estimulam a proliferação e diferenciação do linfócito B por meio de liberação de citocinas e co-estimuladores. Este processo resulta na expansão clonal do linfócito B específico e sua diferenciação em células efectoras (plasmócitos), as quais secretam Abs ativamente a fim de neutralizar o patógeno e suas toxinas, e em células memória, que persistem após o patógeno ser eliminado e são capazes de induzir respostas mais rápidas em exposições subseqüentes. Os mecanismos efetores incluem: neutralização do antígeno por ligação dos Abs aos micróbios e suas toxinas, impedindo a interação destes com outras células; opsonização do patógeno com estimulação da fagocitose por parte de fagócitos; e ativação do sistema complemento, que também estimula fagocitose, além de ativar células

inflamatórias (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, macrófagos, mastócitos, etc.), e lise osmótica do patógeno por dano a sua membrana celular<sup>40,41</sup>.

### **Imunidade celular**

A resposta imune celular inicia com o reconhecimento, pelos linfócitos T, do antígeno protéico exposto na superfície da célula afetada na forma de peptídeos ligados a moléculas MHC. Estes peptídeos são derivados da proteólise de proteínas intracelulares sintetizadas por micróbios intracelulares (como vírus), ou genes mutados ou oncogenes (no caso de células tumorais). Uma vez sintetizados, os peptídeos formam complexos com moléculas MHC classe I (expressas em todas as células nucleadas, inclusive APCs, exceto gametas) e são levados à superfície celular para exposição aos CD8<sup>+</sup> CTLs. Antígenos ligados a moléculas MHC classe II (expressas somente nas APCs) são reconhecidos por CD4<sup>+</sup> ThLs. O reconhecimento do antígeno induz a expansão clonal do linfócito T específico. É importante ressaltar que, assim como ocorre para a ativação do linfócito B, a ativação do linfócito T depende de dois sinais: interação do antígeno com o TCR (sinal 1), e expressão de co-estimuladores (moléculas que agem juntamente com o antígeno na estimulação dos linfócitos T) na superfície das células que expressam o antígeno (sinal 2)<sup>36,42</sup>.

No caso de CD4<sup>+</sup> ThL, a proliferação e diferenciação são dependentes de co-estimuladores (CD40) e de citocinas (interferon  $\gamma$  – IFN- $\gamma$ , interleucina 12 – IL-12). Os ThLs ativados sofrem expansão clonal e, através da liberação de outras citocinas (tumor necrosis factor – TNF, IFN- $\gamma$ , IL-1 e quimiocinas), estimulam a migração de leucócitos ao sítio envolvido e o combate às células afetadas. Os ThLs ativados também sofrem diferenciação em dois tipos celulares: Th1L, responsáveis pelas funções efetoras de ativação de CTL e outras células de combate (macrófagos), e Th2L que são células de memória, funcionalmente



inativas, que podem iniciar resposta rapidamente em caso de exposição subsequente ao mesmo antígeno, transformando-se em células efetoras<sup>43</sup>.

No caso de CD8+ CTL, a proliferação e diferenciação são induzidas pela exposição do complexo antígeno-MHC classe I na superfície da APC, auxiliadas por co-estimuladores (B7), e pela liberação de outros co-estimuladores (CD40) e citocinas (IL-2) por CD4+ ThLs ativadas pelo mesmo antígeno. Os CTLs ativados sofrem expansão clonal e adquirem capacidade de realizar lise celular, com destruição direta da célula afetada. Além disso, os CTLs ativados iniciam a secreção de citocinas (IFN- $\gamma$ , linfotóxica – LT, TNF) que ativam fagócitos e induzem inflamação. A destruição (lise) celular por CTLs é antígeno dependente e contato dependente, isto é, somente células afetadas (que expressam o antígeno) são destruídas e os mecanismos de lise celular são ativados por contato físico do CTL com a célula afetada. Estes aspectos protegem células adjacentes não afetadas de destruição. Os mecanismos de lise celular utilizados por CTLs consistem em transferência de proteínas citotóxicas (perforinas, que induzem dano à membrana celular e lise osmótica, e granzimas, que ativam caspases indutoras de apoptose) à célula-alvo, e em ativação da proteína Fas, existente em muitos tipos celulares, que também ativam caspases e induzem apoptose<sup>43</sup>.

A ativação de macrófagos pelas células T e o processo inflamatório decorrente podem ocasionar dano tissular, o qual é denominado reação de hipersensibilidade de tipo retardado (delayed-type hypersensitivity – DTH). A ocorrência de uma reação DTH pode ser usada como comprovação da presença de resposta imune celular<sup>43</sup>.

### **Citocinas**

Citocinas são proteínas (polipeptídeos) produzidas pelas células da imunidade inata e

adaptativa (macrófagos, linfócitos T) que medeiam muitas das funções destas células e, portanto, da resposta imune e da resposta inflamatória. Muitas delas são produzidas e atuam em leucócitos, sendo também chamadas interleucinas, apesar de diversas citocinas não serem produzidas por leucócitos, nem atuarem sobre os mesmos. Como são usadas em várias situações clínicas ou experimentais para modular inflamação, imunidade, e hematopoiese, são freqüentemente referidas como modificadores de resposta biológica. As citocinas servem como fatores de crescimento para muitos tipos celulares<sup>44</sup>.

Pode-se listar algumas propriedades gerais das citocinas, como: secreção breve e autolimitada; ação pleiotrópica (propriedade de agir em diferentes tipos de células) e redundante (propriedade de múltiplas citocinas terem o mesmo efeito funcional); a ação de uma citocina freqüentemente influencia a síntese e ação de outras citocinas; ação local e sistêmica (ação autócrina, quando age na mesma célula que a produz; ação parácrina, quando age em células próximas à célula que a produz; ação endócrina, quando produzida em grandes quantidades e distribuída pela circulação, agindo em sítios distantes); ação desencadeada por ligação a receptores específicos de membrana na célula-alvo; sinais externos regulam a expressão de receptores de citocinas e, portanto, a resposta a elas; a resposta celular à maioria das citocinas consiste de mudanças de expressão gênica, o que resulta em novas funções da célula-alvo e, eventualmente, em proliferação da mesma (as exceções são as quimiocinas e o TNF, que não induzem expressão gênica ou síntese protéica)<sup>44</sup>.

As citocinas podem ser classificadas em três categorias funcionais baseadas em suas principais ações biológicas: mediadores e reguladores da imunidade inata (TNF, IL-1, quimiocinas, IL-12, IFN- $\alpha$  e - $\beta$ , IL-10, IL-16, IL-15, IL-18); mediadores e reguladores da

imunidade adaptativa (IL-2, IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , LT, IL-13); e estimuladores da hematopoiese (IL-7, IL-3, GM-CSF, G-CSF, IL-19, IL-11)<sup>44</sup>.

Compreensão básica da fisiologia do sistema imune é necessária para que possamos entender os mecanismos envolvidos na imunologia tumoral e na imunoterapia tumoral.

### ***1.2.2 Imunologia tumoral***

A teoria da vigilância imune (“immune surveillance” ou “immunosurveillance”), idealizada por Burnet nos anos 60, atribui ao sistema imune uma função de reconhecimento e destruição de células mutadas antes que cheguem a se tornar tumores. Portanto, para um tumor se desenvolver deve haver falha no reconhecimento ou falha na ativação do sistema imune<sup>45</sup>. Complexas inter-relações parecem existir entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa que responderiam pelas funções de vigilância imune. Sinais de “perigo” (como produção de citocinas ou HSP – heat shock proteins) emitidos por células transformadas e por alterações em seu microambiente causariam ativação direta de células efetoras da imunidade inata, como células NK e macrófagos, para combater a célula alterada. Células dendríticas, funcionando como sentinelas de dano tecidual, incorporariam e processariam antígenos tumorais e os apresentariam em linfonodos, induzindo mobilização de células efetoras da imunidade adaptativa (linfócitos T e B), dirigida aos antígenos expostos<sup>46,47</sup>. Embora a importância, e mesmo a existência, da vigilância imune seja questionada, parece claro que o sistema imune pode reagir contra células tumorais<sup>48</sup>. A observação de ocasional regressão espontânea de tumores, a maior incidência de câncer em imunodeprimidos, a observação de rejeição de tumores transplantados em animais de laboratório, a presença de células imunitárias (linfócitos) em sítios tumorais, e a demonstração objetiva de resposta imune

antitumoral em pacientes com câncer são evidências fortes de que o sistema imunológico desempenha algum papel no controle de neoplasias<sup>46</sup>.

Sendo as células tumorais derivadas do indivíduo que as apresenta, suas macromoléculas são antígenos próprios (self) presentes em células normais, sendo estes antígenos ignorados pelo sistema imune ou tolerados pelo mesmo<sup>47</sup>. Além disso, boa parte destes antígenos não é expressa na superfície das células tumorais, sendo inacessível ao sistema imune<sup>49</sup>.

Uma gama ampla de antígenos tumorais tem sido identificada e tais antígenos são alvo preferencial de imunoterapia, já que podem ser reconhecidos por CTLs. Técnicas de biologia molecular permitem a identificação e clonagem de antígenos. Eles podem ser categorizados de acordo com sua expressão em tumores de mesmo tipo histológico ou de diferentes tipos histológicos, sua expressão simultânea em tecidos normais e tumorais, e segundo a gênese molecular de sua expressão alterada (produtos de mutação de oncogenes; produtos de mutação de genes não envolvidos na gênese tumoral; proteínas normais com expressão aberrante; e antígenos codificados por genomas de vírus oncogênicos)<sup>50</sup>. Os antígenos tumorais podem ter sua expressão limitada à neoplasia (TSA – tumor-specific antigen) ou ter sua expressão compartilhada com tecidos normais (TAA – tumor-associated antigen). A grande maioria dos antígenos é TAA.

As moléculas MHC funcionam como um sistema de vigilância interna que detecta proteínas intracelulares estranhas ou anormais. Amostras das proteínas produzidas dentro da célula são clivadas em peptídeos curtos que, após serem levados ao retículo endoplasmático, são fixadas a moléculas MHC classe I. O complexo MHC-peptídeo é levado à superfície

celular para reconhecimento pelos TCRs dos CD8<sup>+</sup> CTLs. Indução de CD4<sup>+</sup> ThLs, que reconhecem antígenos tumorais ligados a moléculas MHC classe II, também é importante, já que os mesmos auxiliam a resposta dos CTLs, ativam suas funções antitumorais e permitem sua sobrevivência<sup>36,51,52</sup>. Resposta imune humoral também poderia ser desencadeada por antígenos tumorais lançados no meio extracelular e reconhecidos por linfócitos B, com conseqüente ativação do sistema complemento, que estimula fagocitose, e/ou por citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity – ADCC), em que macrófagos e células NK reconhecem células recobertas por Abs como alvo de destruição celular<sup>46,53</sup>.

No entanto, a maioria das células neoplásicas não apresenta seus antígenos de maneira adequada, já que, apesar de apresentar moléculas MHC classe I (como qualquer célula nucleada), não apresenta moléculas co-estimuladoras necessárias para sensibilizar CD8<sup>+</sup> CTLs, nem apresentam moléculas MHC classe II (somente presentes em células dendríticas, macrófagos e linfócitos B), necessárias para ativar CD4<sup>+</sup> ThLs. A apresentação de antígenos é realizada com máxima eficiência por células profissionais nesta atividade, as APCs, cujo protótipo é a célula dendrítica. Esta célula se caracteriza por expressar altos níveis de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD 86) e pela secreção de citocinas críticas para a função (IL-12 e IL-15)<sup>49</sup>. Diversos estudos estão sendo realizados com o uso de células dendríticas, inclusive em PCa<sup>54</sup>.

Infelizmente, o mero reconhecimento de células tumorais por linfócitos T não é suficiente para desencadear resposta imune efetiva. Experimentos com animais transgênicos, que possuem TCRs que reconhecem antígenos tumorais e nos quais virtualmente todos os linfócitos T reconhecem células tumorais, demonstram que o crescimento tumoral pode,

mesmo assim, continuar<sup>55</sup>. Outros fatores podem influir no desenvolvimento de resposta imune adequada.

Diversos mecanismos de escape tumoral ao sistema imune, ou tolerância tumoral, têm sido descritos. Estes incluem sub-regulação das moléculas MHC ou dos antígenos tumorais, características eventualmente presentes em subclones celulares tumorais derivados da alta taxa mitótica e da instabilidade genética do tumor; secreção de citocinas imunossupressoras, como TGF- $\beta$  e IL-10; destruição de CTLs pela expressão de moléculas de superfície indutoras de apoptose, como FasL (Fas ligand); inadequada ativação de APCs por meio de ausência de sinais co-estimulatórios, levando a um estado de anergia; indução de células T supressoras, como CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>; ou simplesmente pela presença de uma grande massa tumoral, o que torna a resposta imune insuficiente para combater tal volume de células neoplásicas<sup>47,55,56</sup>. Especial atenção tem sido prestada a outros mecanismos de escape tumoral como inadequada avidéz linfocitária por células tumorais, inabilidade de ativação linfocitária, mecanismos de tolerância, e influências supressoras derivadas do tumor ou do próprio sistema imune<sup>55</sup>. Mecanismos celulares e moleculares moduladores da resposta imune, tanto inibitórios quanto estimulatórios, estão sendo desvendados e podem ser alvo de manipulação com vistas a imunoterapia. Certos subgrupos de células T, como células NKT (natural killer T cell), células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> e células T  $\gamma\delta$ , assim como algumas moléculas e citocinas, como CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4), TGF- $\beta$  e IL-13, influenciam negativamente a atividade citolítica de CTLs e células NK<sup>46,47,57</sup>. Mesmo a IL-2, que tem papel importante na ativação inicial de linfócitos T e células NK, pode, paradoxalmente, levar a morte celular induzida por ativação (activation-induced cell death – AICD), um processo que elimina linfócitos T reativos a antígenos próprios (self), como os antígenos tumorais, e auxilia na manutenção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, que suprimem resposta por CTLs<sup>58</sup>. No indivíduo normal, esse

delicado e complexo equilíbrio entre mecanismos estimulatórios e inibitórios de resposta imunológica é próprio do sistema imune e lhe permite selecionar ou modular respostas de maneira a evitar fenômenos auto-imunes. A imunologia tumoral procura encontrar caminhos que permitam efetivo combate específico a neoplasias sem causar dano a células normais.

Os principais desafios em imunoterapia tumoral envolvem a identificação de antígenos tumorais que permitam o reconhecimento e combate ao tumor, sem prejuízo para células normais; o desenvolvimento de métodos de indução de resposta imune suficiente para eliminar o tumor; e a superação dos mecanismos de evasão tumoral ao sistema imune. Especificamente, estudos devem ser realizados para indução de CD4<sup>+</sup> ThL antitumorais que reconheçam antígenos MHC classe II-restritos, já que ThLs amplificam reações antitumorais e promovem ativação e sobrevivência de CD8<sup>+</sup> CTLs efetores; identificação de antígenos tumorais essenciais para sobrevivência da célula tumoral, os quais podem ser alvos mais efetivos de terapia; criação de métodos para tornar o microambiente tumoral mais inflamatório, o que poderia ativar mais facilmente resposta imune; eliminação de mecanismos supressores, tanto tumorais quanto imunológicos, o que tornaria a resposta imune mais efetiva; e desenvolvimento de técnicas promissoras como transferência celular adotiva<sup>55</sup>.

### ***1.2.3 Imunoterapia tumoral***

Feito substancial no tratamento imunoterápico do câncer foi a identificação, nos anos 70, das propriedades antitumorais da IL-2, secretada pela interação de ThLs com antígenos, levando à expansão de células imunes e ao estabelecimento de imunidade. Após a clonagem de seu gene codificador, a IL-2 foi estudada experimentalmente e utilizada clinicamente, nos anos 80, em pacientes com melanoma metastático e câncer de rim metastático, demonstrando-

se respostas objetivas parciais e completas (regressão ou desaparecimento de lesões metastáticas) numa pequena fração de pacientes<sup>51</sup>. Esta foi a primeira demonstração concreta consistente de tratamento imunoterápico para neoplasias e o suficiente para estabelecer o princípio de que tumores sólidos invasivos poderiam responder a reações imunes em humanos.

De maneira geral, e para fins de sistematização, as estratégias imunoterapêuticas contra o câncer podem ser classificadas em passivas e ativas. *Imunoterapia passiva* se refere à administração de componentes ativos do sistema imune ao paciente, como anticorpos ou linfócitos, preparados ou expandidos ex vivo, não havendo, portanto, ativação do sistema imune do paciente. *Imunoterapia ativa* se baseia na sensibilização e ativação do sistema imune do paciente, com conseqüente produção própria de anticorpos ou linfócitos efetores pelo mesmo. Imunoterapia ativa pode ser classificada em inespecífica e específica. *Imunoterapia ativa inespecífica* consiste na administração de substâncias que estimulam, potencializam ou intensificam a resposta imune de maneira global, sendo exemplos a administração de interferon, interleucina ou BCG (bacille Calmette-Guérin). *Imunoterapia ativa específica* envolve a administração de produtos que induzem resposta imune específica contra determinado(s) antígeno(s), sendo exemplos as vacinas de células tumorais, de DNA, de RNA, ou de peptídeos.

Apesar de anticorpos monoclonais apresentarem eficácia em determinados tumores (imunoterapia passiva)<sup>58</sup>, o principal objetivo em imunoterapia antitumoral é estimular resposta imune celular por linfócitos T, já que esta apresenta o maior potencial de reconhecer especificamente e destruir seletivamente células neoplásicas (imunoterapia ativa específica)<sup>49</sup>. Portanto, o objetivo principal das estratégias de vacinação antitumoral é a expansão clonal de



CD8<sup>+</sup> CTLs, capazes de reconhecer e rejeitar células tumorais, e CD4<sup>+</sup> ThLs, que permitem a manutenção de uma adequada resposta celular<sup>59</sup>.

A fim de induzir este tipo de resposta, deve-se identificar as estruturas das moléculas que podem ser reconhecidas por estes linfócitos e especialmente de suas porções antigênicas (epitopos), o que se consegue por meio das modernas técnicas de biologia molecular<sup>50</sup>. A caracterização de antígenos definidos por seu reconhecimento por linfócitos T constitui avanço importante em imunologia e imunoterapia tumoral<sup>60,61</sup>.

Os antígenos podem ser *proteínas mutadas*, como a oncoproteína ras e proteínas supressoras tumorais p53 e von Hippel Lindau (VHL); *proteínas de fusão derivadas de translocações cromossômicas*, como BCR-ABL em leucemia mielocítica crônica e EWS-FL11 em sarcoma de Ewing; e *proteínas derivadas de modificações pós-translacionais*, como MUC-1, que têm glicosilação alterada em células neoplásicas. Proteínas mutadas e de fusão são necessárias para a geração e manutenção do fenótipo neoplásico, sendo, portanto, expressas por todas as células tumorais; proteínas pós-translacionais, apesar de não necessárias para a gênese tumoral, derivam de modificações pós-translacionais peculiares ao tumor, também sendo expressas por todas as células tumorais<sup>49</sup>. A imunoterapia, visando estes antígenos, obviamente, tem alta seletividade.

Antígenos também podem ser *proteínas não altamente expressas em tecidos normais*, como CEA (antígeno carcinoembriônico); *proteínas superexpressas em células tumorais*, como porções não mutadas do p53; ou *proteínas unicamente expressas em tecidos não-vitais*, como gp100, MART1, tirosinase em melanoma, e PSA e PSMA (prostate-specific membrane antigen) em PCa<sup>49</sup>. Sendo estas proteínas não essenciais para transformação maligna, sua

expressão pode ser perdida pelo tumor durante seu crescimento (evasão tumoral). Além disso, como são proteínas também expressas por tecidos normais, seu combate pode ocasionar fenômenos auto-ímmunes. De fato, a imunidade tumoral está intimamente relacionada à auto-imunidade<sup>47</sup>. Exemplo evidente é o aparecimento de vitiligo em pacientes com melanoma que apresentam resposta a imunoterapia<sup>51</sup>.

Os antígenos tumorais mais estranhos ao sistema imune e, portanto, com maior potencial imunogênico, são as *proteínas virais*, como as oncoproteínas E6 e E7 dos HPV-16 e 18 em câncer de colo de útero, proteínas do EBV em alguns linfomas, ou proteínas do HTLV-1 em leucemias<sup>49</sup>. A imunização contra estes antígenos poderia ser útil, tanto no combate aos tumores como, também, na prevenção destas neoplasias<sup>62</sup>.

Existem várias modalidades de exposição destes antígenos ao sistema imune e elas compreendem as diversas vacinas antitumorais existentes. O material antigênico pode ser utilizado na forma de células tumorais autólogas ou alogênicas, ou na forma de TAAs, ministrados como DNA, RNA, proteína total, ou peptídeos. Este material antigênico pode ser administrado diretamente, juntamente com citocinas imunoestimulatórias ou adjuvantes, ou utilizada *ex vivo* para sensibilizar APCs, usualmente células dendríticas. Independentemente da técnica utilizada, todas pretendem e dependem de apresentação dos antígenos tumorais aos linfócitos T, por células dendríticas no tecido linfático do paciente<sup>59</sup>.

Antes da identificação dos antígenos tumorais, as vacinas autólogas ou alogênicas de células totais ou lisados celulares constituíam a única forma de vacinação antitumoral<sup>62</sup>. Vacinas de células tumorais totais envolvem a administração de células tumorais desvitalizadas por irradiação, para que percam sua capacidade de replicação. A lise das

células injetadas por células fagocitárias e o processamento e apresentação das proteínas digeridas (antígenos) induziria uma resposta imune específica contra as mesmas<sup>63</sup>. A vacina derivada de células do próprio paciente é chamada autóloga ou singênica, sendo sua maior vantagem a potencial indução de resposta imune contra um painel de antígenos expostos exatamente igual ao do tumor original<sup>63</sup>. Entretanto, o uso de vacinas celulares autólogas é trabalhoso e exige a obtenção de tecido tumoral para estabelecer cultura celular primária, o que nem sempre é possível, além de despender um grande esforço laboratorial e de pessoal especializado<sup>49</sup>.

Neste contexto, o uso de vacina alogênica, derivada de células de linhagens tumorais imortalizadas, constitui uma alternativa ao uso de células autólogas. Neoplasias compartilham características genéticas e antígenos semelhantes e estes poderiam estimular resposta imunológica<sup>64</sup>. A vacina alogênica não apresenta o mesmo haplotipo MHC do paciente, o que determina rejeição e destruição das células enxertadas. Neste processo, os antígenos presentes, tumorais e não tumorais, seriam apresentados ao sistema imune, induzindo resposta imune celular<sup>63</sup>. É possível que células alogênicas induzam uma reação inflamatória semelhante à reação hospedeiro-versus-enxerto (host-versus-graft), propiciando um ambiente propício à estimulação imune<sup>65</sup>. A vantagem da vacina alogênica é a facilidade de obtenção pela disponibilidade de culturas tumorais perenes. De fato, diversas linhas tumorais de PCa estão disponíveis, tanto derivadas de tumores primários e de metástases não modificadas geneticamente<sup>66</sup>, quanto de tumores nos quais foi inserido um transgene<sup>67</sup>. A desvantagem reside no fato de não haver apresentação de todos os antígenos presentes no tumor específico do paciente afetado, apesar de tumores compartilharem antígenos semelhantes. Sendo uma estrutura extremamente instável geneticamente, a neoplasia pode conter subclones celulares de considerável diversidade fenotípica e mesmo lesões metastáticas podem apresentar

características diferentes do sítio tumoral primário<sup>53,68</sup>. Portanto, uma vacina alogênica sempre apresentará um leque de antígenos limitado em relação ao tumor do paciente.

A maior dificuldade em relação a vacinas de células totais é a sua limitada capacidade de estimulação imune<sup>61</sup>. Para otimizar a resposta imunológica é necessário apresentar os antígenos tumorais num contexto estimulatório do sistema imune, isto é, de maior imunogenicidade. Com essa finalidade são utilizados adjuvantes, os quais podem ser definidos como agentes de qualquer natureza que, associados a um antígeno, aumentam a resposta imune contra o mesmo<sup>57</sup>. Imunoestimulantes inespecíficos, como BCG, e haptenos (moléculas que induzem resposta imune quando conjugadas a um antígeno), como dinitrofenol (DNP) e lipídio monofosforil A (MPL), têm sido usados como adjuvantes de vacinas de células totais<sup>69,70</sup>. Proteínas de origem não-humana de alto poder imunogênico podem funcionar como carreadores de antígenos, como KLH (keyhole limpet hemocyanin), um potente imunoestimulador de origem marinha<sup>71,72</sup>. Elas também podem ser administradas juntamente com citocinas ou ser geneticamente modificadas para expressá-las, tais como TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IFN- $\gamma$  e IL-2<sup>73</sup>. Genes que expressam moléculas co-estimulatórias da ativação linfocitária (B7, CD40L) podem ser transfectados a células tumorais<sup>65</sup>. Das citocinas estudadas, GM-CSF parece ser uma das mais efetivas, já que sua expressão no local da inoculação aumenta a quantidade de células dendríticas e, conseqüentemente, a captação, processamento e apresentação de antígenos tumorais<sup>49</sup>.

Uma outra maneira de produzir uma vacina a partir de células autólogas é com o uso de HSP. As HSP são proteínas intracelulares (gp96, HSP70, calreticulina) que têm importantes funções imunológicas. Elas atuam como guias ou acompanhantes (“chaperones”) de peptídeos intracelulares a serem apresentados na superfície celular por moléculas MHC

classe I, assegurando seu correto processamento; providenciam a saída destes peptídeos, interagindo com receptores específicos em APCs; e promovem maturação e diferenciação de células dendríticas, uma vez em contato com elas. Complexos HSP-antígenos tumorais são liberados por células necróticas e podem ser isolados e purificados a partir de tumores operados ou amostras tumorais, e re-administrados ao indivíduo afetado<sup>74</sup>. Os complexos HSP-antígenos são um eficiente método de obtenção de antígenos tumorais, mesmo que não se conheça a identificação destes, e tem alto potencial de induzir resposta imune<sup>61</sup>.

Vacinas baseadas em proteínas totais (antígenos tumorais), usualmente conjugadas a adjuvantes, podem ser usadas para estimular resposta imune diretamente ou para sensibilizar células dendríticas *ex vivo*<sup>59</sup>. O uso de proteínas recombinantes é atrativo pela produção fácil com tecnologia recombinante. Sua utilização não depende do conhecimento da seqüência específica de epitopos imunogênicos, já que é apresentada ao sistema imune a sua molécula inteira<sup>48</sup>. Macromoléculas de carboidratos, como glicosfingolípídeos (gangliosídeos) e glicoproteínas (globoH), originárias de glicosilação alterada de mucinas, também podem servir de alvo imunoterápico, sendo acessíveis a anticorpos ou outras moléculas devido a sua expressão na superfície celular<sup>48</sup>.

A identificação das seqüências antigênicas (epitopos), presentes em proteínas tumorais e responsáveis pela ligação com a molécula MHC, permite a utilização destas seqüências peptídicas como vacina antitumoral<sup>59</sup>. Diversos peptídeos foram identificados a partir de proteínas anormalmente expressas em tumores. A maioria deles é apresentada em associação com moléculas MHC classe I e são reconhecidos por CTLs específicos, embora um número crescente de epitopos apresentados por moléculas MHC classe II e reconhecidos por ThLs esteja sendo disponibilizado<sup>50</sup>. Derivados de proteínas próprias, sua imunogenicidade é baixa,

conseqüentemente, são administrados com adjuvantes. Outra estratégia é modificar sua estrutura em alguns aminoácidos de sua seqüência, de maneira a aumentar sua afinidade ou ligação com moléculas MHC ou com receptores de células T, processo este denominado “epitope enhancement”<sup>49,61</sup>. O fato de vacinas baseadas em peptídeos serem sinteticamente manufaturadas representa uma vantagem em termos de disponibilidade para uso.

Vacinas baseadas em DNA são simplesmente seqüências de ácidos nucleicos que contêm o gene codificador para um antígeno específico, injetadas como plasmídeos. Plasmídeos são moléculas circulares de DNA extracromossômico, encontrados em bactérias, que tem capacidade de se duplicar e penetrar em outras bactérias, transferindo genes de uma bactéria a outra. É possível inserir um fragmento de DNA, com um gene de interesse, em um plasmídeo e este se encarrega de introduzi-lo na célula<sup>75</sup>. Após injeção intramuscular, o DNA codificador é transcrito e traduzido, levando à produção local do antígeno, captação por APCs e apresentação pelas mesmas em linfonodos<sup>59</sup>. Além de DNA codificador para o antígeno tumoral, pode-se introduzir conjuntamente DNA codificador para adjuvantes imunológicos, como citocinas ou moléculas co-estimulatórias, o que aumenta a eficiência desta estratégia<sup>48,61</sup>. Este tipo de vacinação é de fácil disponibilidade e produção em grandes quantidades, além de ter expressão antigênica prolongada pela incorporação permanente do DNA a células do indivíduo, propiciando memória imunológica<sup>63</sup>. Uma outra forma de transferência de genes, chamada “gene gun”, consiste na conjugação do plasmídeo com partículas de ouro, disparadas sobre a pele, sob pressão, por meio de um dispositivo à base de gás hélio, método que parece ter maior eficiência do que a injeção intramuscular<sup>76</sup>. Lipossomos, que são vesículas lipídicas artificiais que interagem com a membrana celular, representam outra maneira de transferência intracelular de genes<sup>77</sup>.

Transferência de genes codificadores de antígenos tumorais pode também ser realizada por meio de vacinas de vírus recombinantes. Infecções virais determinam apresentação de antígenos virais em associação com moléculas MHC classes I e II. Genes de interesse incorporados ao genoma viral também seriam apresentados, após entrada do vírus na célula, induzindo reação imune. Os agentes mais estudados são os poxvírus (incapazes de replicação em mamíferos), adenovírus, herpes vírus, entre outros (modificados para não se replicar). Uma explicação para a baixa imunogenicidade observada deste método é a presença ou indução de anticorpos neutralizantes contra as partículas virais, o que é especialmente comum para adenovírus<sup>48,59,61</sup>.

Uma estratégia denominada terapia gênica suicida (“suicide gene therapy”) envolve a inserção de genes codificadores de enzimas que convertem uma pró-droga em um metabólito tóxico à célula. Seguindo-se à inserção destes genes suicidas diretamente nas células tumorais, uma droga administrada por via sistêmica (pró-droga) é convertida em um metabólito nocivo às células tumorais transfectadas com o gene suicida, determinando sua destruição. Os sistemas mais estudados são o HSVtk/GCV (Herpes simplex virus thymidine kinase/Ganciclovir), que converte ganciclovir em uma forma trifosfato tóxica, levando à morte de células em divisão, e o CD/5-FC (cytosine deaminase/5-fluorocytosine), que converte 5-fluorocitosina em 5-fluorouracil mono e trifosfato, resultando em morte celular<sup>78,79</sup>. Interessante é o fato de que esta terapia pode resultar em morte de células tumorais adjacentes àquelas realmente transfectadas, um fenômeno chamado “bystander effect”, que pode ser devido à transferência do composto tóxico a células adjacentes ou indução de resposta imune pela morte de células transfectadas<sup>79</sup>.

Dentre as APCs, as células dendríticas são as mais eficientes por possuírem todo o

maquinário molecular (moléculas MHC classes I e II, moléculas co-estimulatórias e moléculas de adesão) necessário para o reconhecimento, processamento e apresentação de antígenos, e por serem as mais potentes estimuladoras de células T<sup>49</sup>. Na realidade, todas as estratégias imunoterápicas para câncer acima citadas dependem da sensibilização e ativação destas células para gerar adequada resposta imune. Assim sendo, é racional seu uso como vacina antitumoral. Células dendríticas podem ser geradas a partir de células precursoras por coleta de sangue periférico ou leucoafereze, e cultivadas com fatores de crescimento adequados<sup>61,73</sup>. Peptídeos, mRNA, DNA, lisados tumorais ou co-cultura com células tumorais são utilizados para sensibilizar células dendríticas para posterior administração ao paciente<sup>48</sup>. Mais recentemente, foi descrita fusão de células dendríticas com células tumorais, formando híbridos celulares imunogênicos<sup>62</sup>. A grande limitação ao uso destas vacinas é seu preparo trabalhoso e dispendioso, o que o restringe a alguns centros especializados<sup>73</sup>.

Independentemente da técnica utilizada em estudos de imunoterapia para câncer, grande parte dos mesmos utiliza substâncias adjuvantes para otimizar o estímulo imunológico, como citado anteriormente. BCG, um imunoestimulante inespecífico, tem sido utilizado como adjuvante conjugado a vacinas de células autólogas em diversos estudos<sup>69,80-82</sup>. Suas propriedades imunoestimuladoras parecem estar relacionadas ao aumento de secreção de IFN- $\gamma$  pelas células de linfonodos que drenam o sítio de inoculação, o que sugere presença de CD8+ CTLs, e também por aumento de CD4+ ThLs<sup>83</sup>.

Um aspecto importante em relação a estudos de tratamento de câncer diz respeito à avaliação da resposta a estes. Respostas a novas modalidades de tratamentos convencionais anticâncer (como cirurgia, radioterapia ou quimioterapia) devem estar relacionadas a algum fator preditivo intermediário de desfecho clínico (por exemplo, mudança objetiva do volume



de massas tumorais ou alteração nos níveis de um marcador sérico tumoral), pois intuímos que tais fatores se correlacionem fortemente com cura, melhora ou sobrevida. Em imunoterapia anticâncer (um novo tratamento ainda em escrutínio), um fator preditivo intermediário de desfecho clínico seria a demonstração de resposta imune a antígenos tumorais, pois intuímos que esta resposta seja pré-condição para alteração no status do tumor. Diversos ensaios existem para a determinação, monitoração e quantificação de resposta linfocitária e podem ser classificados em medidas funcionais *in vivo* (que sugerem presença ou ausência de resposta linfocitária), ensaios fenotípicos *in vitro* (que quantificam a resposta do linfócito específico imunoreativo) e ensaios funcionais *in vitro* (que quantificam indiretamente a resposta linfocitária)<sup>84</sup>. Os resultados de tais testes devem ser interpretados com a devida visão crítica, já que seu desempenho na detecção de resposta linfocitária está sujeito a aspectos de padronização, confiabilidade e reprodutibilidade. Um dos testes mais freqüentemente utilizados, por ser de fácil execução, é o teste de hipersensibilidade de tipo retardado (DTH), uma medida funcional *in vivo*. Neste teste, uma dose de antígeno é aplicada por via intradérmica, e a reação cutânea (diâmetro da endureção e/ou eritema) é mensurada em milímetros 48 a 72 h após a inoculação. Biópsias de sítios de reação DTH demonstram infiltração de linfócitos e outras células imunes, o que atestaria reação imunológica<sup>43</sup>. A reação DTH também se correlaciona com testes *in vitro* de resposta linfocitária, podendo ser considerada um preditor de imunidade por linfócitos T<sup>85</sup>. Adicionalmente, certos estudos sugerem que testes DTH sejam preditores de resposta e sobrevida em ensaios clínicos de imunoterapia anticâncer<sup>69,86,87</sup>.

Como se viu no início desta seção, esforços em terapia imunológica para câncer têm sido direcionados à imunoterapia ativa específica. No entanto, uma abordagem imunoterápica passiva, denominada transferência celular adotiva, abre algumas perspectivas em

imunoterapia antitumoral. Nesta técnica, linfócitos são retirados do paciente, expandidos *ex vivo* e sensibilizados contra um ou mais antígenos tumorais específicos; o paciente é submetido a linfodepleção com quimioterapia não mieoloablativa; e os linfócitos são readministrados juntamente com IL-2. Os resultados parecem ser melhores que os de qualquer outro tratamento imunoterápico para câncer, embora o método tenha sido utilizado somente em pacientes com melanoma metastático<sup>51,88</sup>.

É possível que técnicas semelhantes a esta preencham os três requisitos fundamentais para uma imunoterapia efetiva: um número suficiente de linfócitos tumor-reativos com ávido reconhecimento de antígenos tumorais deve estar presente no hospedeiro; os linfócitos devem ser capazes de alcançar e extravasar no sítio do tumor, infiltrando o estroma tumoral; e os linfócitos devem ser ativados no sítio tumoral e possuir mecanismos efetores apropriados para destruir células tumorais<sup>89</sup>.

Idealmente, uma vacina tumoral deve: 1) exibir toxicidade mínima; 2) induzir resposta imune específica contra o tumor primário e lesões metastáticas; 3) induzir memória imunológica para proteger contra recorrência tumoral; e 4) ser acessível<sup>73</sup>. Em geral, os estudos com vacinas tumorais têm demonstrado baixa ou nenhuma toxicidade, sendo os efeitos mais comuns reações locais no sítio de administração. Apesar de diversas delas demonstrarem reatividade imune, os pobres resultados conseguidos atestam que esta ainda não é de magnitude suficiente para combater neoplasias, especialmente no contexto em que a maioria é testada, isto é, em doença avançada com grande massa tumoral<sup>55</sup>. É provável que técnicas de imunização contra câncer sejam mais eficazes em pacientes com doença residual mínima, como, por exemplo, para prevenção de metástases após cirurgia<sup>90</sup>.

Uma revisão recente de diversos estudos sobre tratamento imunoterápico em pacientes com diversos tipos de câncer metastático, compreendendo 440 pacientes tratados com vacinas de diferentes tipos no Surgery Branch do National Cancer Institute, e 765 pacientes com características semelhantes de ensaios clínicos publicados na literatura, selecionados por possuírem adequada metodologia, revela taxas de resposta objetiva de somente 2,9% e 3,8%, respectivamente<sup>55</sup>. O mesmo artigo sugere que isto não significa o “fim-da-linha” para a imunoterapia tumoral, mas a necessidade de se redirecionar esforços na pesquisa de tratamentos imunoterápicos mais efetivos<sup>55</sup>.

Cirurgia, radioterapia e quimioterapia são os tratamentos aceitos para câncer. A cirurgia elimina ou reduz a massa tumoral. A radioterapia elimina células tumorais residuais no leito cirúrgico e em alguns locais selecionados. A quimioterapia pode eliminar doença residual local e micrometastática sistêmica. Contudo, tanto a radioterapia quanto a quimioterapia afetam células normais, levando a parafefeitos significativos, o que representa um fator limitador importante destas terapias. Imunoterapia, com sua habilidade de atingir alvos bastante específicos, pode representar uma quarta modalidade potencial de tratamento, visando células afetadas e poupando células normais<sup>49,73</sup>.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Imunoterapia em câncer de próstata**

Como qualquer neoplasia maligna, o PCa também possui mecanismos de evasão tumoral que dificultam a abordagem imunoterápica. A expressão de moléculas MHC classe I está ausente em 34%, diminuída em 26% e normal em apenas 40% de amostras de PCa, comparadas com expressão normal em 100% de amostras de HPB<sup>91</sup>. Quando analisadas amostras de PCa metastático a linfonodos, 80% destas demonstram ausência de expressão de moléculas MHC de classe I<sup>91</sup>. Estudos que avaliam o processamento de antígenos em linhas celulares perenes de PCa também identificam menor expressão de moléculas MHC classe I e de moléculas (TAP – transporter associated with antigen processing) que participam do processamento intracelular de antígenos<sup>92</sup>. Maior indiferenciação tumoral está relacionada a menor expressão destas moléculas<sup>93</sup>. Quando a expressão de moléculas MHC classe I em PCa é estudada por análise genômica e imunohistoquímica, verifica-se expressão diminuída ou ausente em cerca de 90% dos casos, mas não associada a deleção dos genes responsáveis pela expressão destas moléculas, sugerindo que mecanismos alterados de transcrição ou translação podem estar envolvidos<sup>94</sup>. Neoplasias podem aumentar a expressão de genes (Fas ligand) que

induzem apoptose de linfócitos ou impedir o correto trânsito de células imunes no microambiente tumoral pela mudança nos padrões de adesão molecular que regulam a quimiotaxia, impedindo o acesso de linfócitos e outras células nos sítios tumorais<sup>95</sup>. Além disso, defeitos nos mecanismos moleculares intracelulares de processamento e exposição de antígenos também podem ser responsáveis por expressão alterada de moléculas MHC classe I em PCa<sup>63</sup>.

Como relatado na seção anterior, a identificação de antígenos reconhecidos por linfócitos T é fundamental para tratamento imunoterápico. Estudos derivados de culturas primárias de células prostáticas normais e neoplásicas podem auxiliar na caracterização fenotípica e genotípica do PCa, e identificar genes alterados que possam servir como alvos potenciais de terapia<sup>96</sup>. Algumas características destes antígenos são desejáveis, tais como: 1) que sejam próstata-específicos, expressos em altos níveis em PCa e não-expressos em tecidos essenciais; 2) que sejam expressos na superfície celular, portanto, suscetíveis de reconhecimento por anticorpos; 3) que tenham papel no crescimento celular, de maneira que este possa ser inibido pela neutralização do antígeno; e 4) que sejam acessíveis a APCs para apresentação por moléculas MHC de classes I e II<sup>97</sup>. Infelizmente, não dispomos de antígenos que preencham todos os requisitos acima. Alguns antígenos que apresentam expressão alterada em PCa são PSMA, PSCA (prostate stem cell antigen), PSA, PAP (prostatic acid phosphatase), PCTA-1 (prostate carcinoma tumor antigen 1), PAGE, GAGE, HER-2/neu, entre outros<sup>97,98</sup>. PSA, PAP e PCTA-1 são proteínas secretórias; PSMA, PSCA e HER-2/neu são proteínas expressas na superfície celular; e PAGE e GAGE são proteínas nucleares intracelulares<sup>97</sup>. Todos eles podem ser utilizados em estratégias de vacinação, existindo uma tendência óbvia de uso de antígenos preferencialmente expressos por células prostáticas, como PSA, PSMA e PAP. A especificidade sugerida na denominação de alguns TAAs de PCa

não é verdadeira<sup>98</sup>. Uma potencial vantagem dos antígenos expressos na superfície celular, além de poder induzir resposta imune celular em estratégias de vacinação, é a possibilidade de terapia com anticorpos monoclonais (mAb – monoclonal antibody), a exemplo de mAbs utilizados em linfoma e câncer de mama<sup>97</sup>. Outros antígenos de carboidratos e glicoproteínas (Globo H, mucinas, gangliosídeos) também foram identificados em PCa<sup>99</sup>. A identificação de novos antígenos associados a PCa é contínua e permanente.

Relatos de imunoterapia em PCa foram descritos na década de 70 com injeção intraprostática de BCG, evidenciando formação de granulomas na próstata e granulomas metastáticos disseminados, além de complicações sérias (morte, fístula próstato-retal)<sup>100-102</sup>. Posteriormente, BCG foi utilizado em injeção intradérmica em PCa avançado, parecendo haver uma melhora na sobrevida de pacientes do grupo imunizado<sup>103,104</sup>. Estudos posteriores demonstraram aumento da atividade de células NK em pacientes com PCa que receberam BCG<sup>105</sup>. Em paralelo com o acúmulo crescente de conhecimentos em imunologia geral e tumoral, o interesse em imunologia do PCa aumentou, havendo sugestão de diminuição de imunidade celular em pacientes com doença avançada<sup>106,107</sup>.

Estudos experimentais em animais de laboratório demonstraram as bases pré-clínicas para estudos de imunoterapia de PCa em humanos, como transfecção de células tumorais com genes codificadores para citocinas, ativação ex vivo com citocinas de linfócitos autólogos para posterior administração, ou imunização com vírus recombinante com expressão de PSA<sup>108-111</sup>. Simultaneamente, estudos in vitro com células de pacientes com PCa evidenciavam a possibilidade de cultura de células dendríticas, sensibilização das mesmas com lisados tumorais, e estimulação de resposta por CTLs<sup>112,113</sup>, além de demonstrar transfecção efetiva com vetor viral de genes codificadores de citocinas nas células cultivadas

de tumor de próstata<sup>114</sup>. Relatos iniciais de imunoterapia em pacientes com PCa metastático se seguiram. Linfócitos autólogos ativados ex vivo (imunoterapia adotiva) foram utilizados em pacientes com estágio D2, demonstrando-se reduções transitórias de PSA<sup>115</sup>. O primeiro relato com células dendríticas sensibilizadas com PSMA sugeriu resposta bioquímica (diminuição do PSA sérico > 50%) em alguns pacientes (5 de 19) e um perfil de segurança satisfatório<sup>116</sup>. No estudo de seguimento mais longo de fase II, com a mesma vacina de células dendríticas, incluindo 107 pacientes com doença metastática (n=66; 33 destes remanescentes do estudo de fase I que aceitaram receber nova vacinação) e com recorrência bioquímica após tratamento local (cirurgia, radioterapia externa, braquiterapia) (n=41), identificaram-se 28 pacientes com resposta clínica (19 com redução de PSA > 50%, e 9 com PSA estabilizado)<sup>117</sup>.

Avanços no diagnóstico por imagem são feitos com o uso do mAb ProstaScint que interage com PSMA, para diagnóstico de lesões metastáticas ou recorrência local após tratamento de PCa<sup>118</sup>. Abordagens como radioimunoterapia também são estudadas, como o uso do mAb CC49, que reage com a glicoproteína associada a tumores TAG-72 (uma mucina), conjugado a um radioisótopo, em pacientes com PCa metastático, observando-se respostas mínimas em metástases e na diminuição da dor associada a estas<sup>119</sup>.

Em 1999, é publicado o primeiro estudo de terapia gênica humana em PCa aprovado pelo NIH Office of Recombinant DNA Activities<sup>120</sup>. Neste estudo, células tumorais foram coletadas de espécimes de prostatectomia radical, expandidas em cultura primária, transfectadas com gene codificador para GM-CSF por meio de um vetor viral, irradiadas letalmente, e inoculadas em 8 pacientes com linfonodos positivos e/ou invasão de vesículas seminais. O tratamento com a vacina (GVAX) se mostrou seguro e induziu resposta imune celular e humoral, além de demonstrar a eficiência da transferência genética retroviral<sup>120</sup>.

Uma vacina de PSA recombinante contida em lipossomos e administrada a 10 pacientes com PCa mostra induzir resposta por linfócitos T em 8 pacientes, apesar do número de células T induzidas ser baixo<sup>121</sup>. Estudo com esta vacina (OncoVax-P) é expandido para um número maior de pacientes (n=45), divididos em grupos de acordo com a via de administração (intramuscular, intravenosa, subcutânea, intradérmica) e o adjuvante utilizado (BCG, GM-CSF, ciclofosfamida, IL-2). Imunização foi observada pelo desenvolvimento de reação DTH e indução de anticorpos em diversos grupos, com um perfil de segurança satisfatório<sup>122</sup>. Outra vacina (APC8015) de células dendríticas, sensibilizadas com uma proteína de fusão de GM-CSF humano e PAP humano, foi testada em 13 pacientes com doença hormônio-refratária e revelou ser bem tolerada e induzir resposta por células T, com 3 destes pacientes apresentando diminuição dos níveis de PSA<sup>123</sup>. A mesma vacina, com nome comercial Provenge, foi testada em estudo mais amplo de fase I/II, em 31 pacientes com PCa hormônio-refratário, sendo que todos se mostraram imunizados contra a proteína de fusão e, destes pacientes, 3 apresentaram diminuição dos níveis de PSA de > 50% e outros 3 de 25 a 50%, com ótimas tolerância e segurança<sup>124</sup>.

O primeiro relato de terapia gênica suicida com o sistema HSVtk/GCV em PCa humano, por injeção direta intraprostática, em 18 pacientes com recorrência local pós-radioterapia, atesta a segurança do método, apesar da baixa taxa de resposta objetiva (3 pacientes)<sup>125</sup>. A aplicação intradérmica de uma vacina recombinante com vetor viral (vírus vaccinia), geneticamente modificado para incorporar o gene que codifica a produção de PSA (PROSTVAC), foi testada num estudo de fase I em 6 pacientes com recorrência bioquímica após prostatectomia radical, nos quais o bloqueio hormonal foi interrompido após aplicação da vacina. O tratamento se mostrou de baixa toxicidade e induziu alguma resposta: um paciente apresentou retardo inesperado na elevação do PSA e anticorpos anti-PSA foram



detectados em 5 pacientes (interessante notar que havia presença de anticorpos antes do tratamento em alguns pacientes)<sup>126</sup>. Outra forma de imunização com administração intradérmica de DNA de PSMA e CD86, em plasmídeos separados e em plasmídeo único, e DNA de PSMA conjugado a um vetor viral, aplicados a 26 pacientes, demonstrou que somente este último induziu reações DTH em todos os pacientes vacinados e que a associação de GM-CSF ao plasmídeo único com PSMA/CD86, também induziu resposta imune<sup>127</sup>. Novas contribuições à radioimunoterapia são realizadas com o mAb m170, que visa uma mucina associada a adenocarcinomas, conjugado a radioisótopos, tanto para detecção de depósitos metastáticos (diagnóstico) quanto para administração seletiva de radiação a estes (tratamento). O estudo realizado com 17 pacientes com PCa metastático demonstrou que o mAb identificou lesões metastáticas em todos os pacientes, e ocasionou resolução ou redução temporárias de dor óssea em 7 pacientes<sup>128</sup>. Um estudo é realizado com injeção intraprostática de lipossomos contendo gene codificador para IL-2 em pacientes a serem submetidos a prostatectomia radical e em pacientes com falha de terapia local prévia, evidenciando-se boa segurança e resposta transitória, diminuição dos níveis de PSA, além de ativação do sistema imune<sup>129</sup>.

Com base na observação de que antígenos tumorais prostáticos humanos são pouco imunogênicos e que homólogos destes antígenos em roedores apresentam um potencial maior de sensibilização imune, uma vacina de células dendríticas sensibilizada com PAP xenogênico (de camundongo) foi testada em 21 pacientes com PCa metastático, observando-se desenvolvimento de imunização por células T em todos os pacientes, desenvolvimento de resposta imune a PAP homólogo humano em 11, e estabilização da doença em 6 destes últimos, sugerindo que a vacinação com xenoantígenos pode induzir resposta contra seus antígenos homólogos humanos<sup>130</sup>. O uso de um vetor viral (vaccinia) com gene codificador

para PSA (rV-PSA) também foi testado em 42 pacientes com doença metastática avançada, verificando-se baixa toxicidade (somente no local da inoculação) e resposta imunológica em alguns pacientes<sup>131</sup>.

O primeiro estudo aprovado pelo FDA em que um vetor viral com replicação preservada foi utilizado para transfecção gênica em humanos é publicado em 2002. Neste ensaio, 16 pacientes com recorrência local pós-radioterapia foram tratados com injeção intraprostática de Ad5-CD/TKrep (adenovírus com replicação preservada, contendo o par de genes suicidas citosina deaminase e timidina kinase), seguida de administração de fluorocitosina via oral e ganciclovir intravenoso. Os efeitos adversos foram poucos e leves, não se observando disseminação viral a órgãos vitais. Cerca de metade dos pacientes apresentou diminuição dos níveis de PSA<sup>132</sup>. Um novo conceito de terapia gênica suicida ocorre com a associação de radioterapia externa de intensidade modulada, realizada logo após injeção intraprostática de vetor viral com o gene HSVtk em 45 pacientes, divididos em 3 grupos: PCa localizado (PSA < 10, Gleason < 7, cT1-T2a), localmente avançado (PSA > 10, Gleason > 7, cT2b-T3) e pacientes com metástases ganglionares. Verificou-se o baixo perfil de toxicidade do método, mas a eficácia não pode ser avaliada devido ao pouco tempo de seguimento<sup>133</sup>. Avaliação com maior tempo de seguimento de pacientes submetidos a este tipo de terapia gênica suicida demonstrou que a ativação sistêmica linfocitária ocorre e que a adição de radioterapia parece magnificar esta resposta<sup>134</sup>.

Uma vacina alogênica de células totais composta de linhas celulares de PCa imortalizadas é utilizada, em 2002, em 61 pacientes com PCa hormônio-refratário, num estudo de fase I/II, administrada juntamente com o imunoestimulante inespecífico *Mycobacterium vaccae*. Resposta celular por CTLs e ThLs e resposta humoral foram

verificadas em diversos pacientes, apesar de não haver mudanças nos níveis de PSA, e a segurança da vacina foi ótima<sup>135</sup>. Em estudo de fase I, com outra vacina de DNA de PSA, com vetor plasmídeo (pVAX/PSA), administrada com GM-CSF e IL-2, nove pacientes com PCa não responsivo a hormônios são vacinados com 3 doses diferentes, verificando-se resposta celular e humoral em 2 (de 8 pacientes avaliáveis) que receberam a dose mais alta, com diminuição da curva do PSA, não sendo observados efeitos adversos<sup>136</sup>. Uma reavaliação de fase II da vacina Provenge (células dendríticas sensibilizadas com proteína de fusão constituída de PAP e GM-CSF) é realizada em 21 pacientes (19 avaliáveis) com doença avançada hormônio-resistente, verificando-se 2 pacientes com diminuição transitória do PSA e 1 paciente com diminuição do PSA a níveis indetectáveis por mais de 4 anos, juntamente com resolução de sua adenopatia retroperitoneal metastática<sup>137</sup>. Uma vacina recombinante (VV/MUC-1/IL-2) com vetor viral (vaccinia) de genes codificadores para MUC-1 (uma mucina associada a adenocarcinomas) e para IL-2 foi testada, aplicada por via intramuscular, em estudo de fase 1, em pacientes com PCa avançado, e observou-se resposta celular e humoral em somente 1 paciente, sendo a vacina bem tolerada e segura<sup>138</sup>.

Com base na quase onipresença da transcriptase reversa da telomerase (hTERT) em cânceres humanos (>85%) e na necessidade de sua expressão para crescimento sustentado dos mesmos, este novo alvo terapêutico é avaliado, em um estudo de fase I, com uma vacina de células dendríticas sensibilizadas com hTERT e KLH. A vacina foi administrada a 7 pacientes (5 com PCa hormônio-resistente e 2 com câncer de mama metastático) e verificou-se indução de CTLs em 4 pacientes (2 com PCa e 2 com câncer de mama)<sup>139</sup>. A combinação de imunoterapia com peptídeos e quimioterapia com fosfato de estramustina também foi avaliada em pacientes com PCa metastático hormônio-resistente, observando-se resposta celular e humoral, mas às custas de toxicidade importante (arritmia, infarto cerebral, imunossupressão),

só diminuída com doses mais baixas do quimioterápico<sup>140</sup>.

A vacina denominada Provenge foi recentemente avaliada, desta vez em um estudo de fase III, prospectivo, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, em 127 pacientes (82-Provenge, 45-controle) com PCa assintomático, metastático, hormônio-refratário, tendo como objetivo primário o tempo para progressão objetiva da doença, e como objetivo secundário o tempo para início de dor relacionada à doença. Benefício do tratamento em relação ao grupo-controle só foi verificado em análise de subgrupo (pacientes com tumores  $\leq$  Gleason 7 tendo melhor desempenho), apesar de ativação imunológica ter sido verificada na maioria dos pacientes que receberam a vacina<sup>141</sup>.

O acúmulo crescente de conhecimentos em imunologia geral e tumoral certamente levará a uma otimização dos métodos de indução de resposta imune efetiva. Atenção especial recente tem sido dirigida ao microambiente tumoral, o que poderá auxiliar a desvendar mecanismos moleculares e bioquímicos que levam a alterações genóticas e fenóticas do PCa, determinando seu comportamento. Estas mesmas condições microambientais podem sinalizar novos alvos para tratamento imunoterápico<sup>142</sup>.

Como se viu nesta breve revisão cronológica de estudos de imunoterapia em PCa, diversas são as estratégias utilizadas para a ativação do sistema imunológico. Algumas observações podem ser feitas a partir destes estudos. As terapias imunoterápicas são normalmente bem toleradas e apresentam um perfil de segurança satisfatório. As reações adversas normalmente se limitam a reações cutâneas locais nos sítios de inoculação. Mesmo vacinas administradas por via intravenosa (como as que utilizam infusão de células dendríticas) ou aquelas que utilizam vetor viral com replicação preservada têm um perfil de

toxicidade baixo. Apesar da dificuldade de se demonstrar ou avaliar resposta imune<sup>84</sup>, os estudos parecem atestar a existência de ativação do sistema imune, tanto celular quanto humoral. É preciso ressaltar, entretanto, que resposta imune demonstrada não significa resposta clínica antitumoral, a qual só pode ser comprovada pela demonstração objetiva de critérios universalmente aceitos de resposta antineoplásica, como diminuição objetiva de lesões mensuráveis ou melhora da sobrevida. A maioria dos estudos clínicos é realizada em pacientes com doença avançada e com grande massa tumoral, uma população sabidamente de difícil tratamento e de sombria evolução. Este contexto pode explicar os pobres resultados clínicos obtidos até o momento com imunoterapia em PCa. É possível que terapias imunoterápicas para PCa possam apresentar melhores resultados em um contexto de doença mínima, como, por exemplo, em doença residual pós-cirurgia<sup>47,90</sup>.

De certa maneira, o PCa representa um contexto de doença favorável para a avaliação de tratamentos imunoterápicos investigacionais. Primeiramente, pela possibilidade de se monitorar a evolução da doença e avaliar a resposta a tratamento com um marcador tumoral confiável (PSA), mesmo em situações de pequeno volume tumoral<sup>143</sup>. Em segundo lugar, pelo fato de a próstata ser um órgão “dispensável”, no sentido de que sua presença, e mesmo suas funções, não são essenciais para a vida, especialmente na faixa etária em que o PCa se manifesta. Eventuais paraefeitos de auto-imunidade, com destruição de células prostáticas normais, não seriam, portanto, problemáticos.

Embora os resultados ainda pobres do tratamento imunoterápico para PCa, as sociedades urológicas reconhecem o potencial das novas terapias moleculares e procuram apontar terapias promissoras para pesquisa em PCa avançado<sup>144</sup>. Atualmente, existem 16

---

estudos clínicos em andamento com estratégias de imunoterapia ativa e passiva em PCa listados no NCI (National Cancer Institute) nos EUA<sup>145</sup>.

### **3 OBJETIVOS**

O objetivo principal deste estudo foi avaliar a segurança e a toxicidade de uma vacina celular autóloga, imunomodulada com interferon- $\alpha$ 2b e BCG, em pacientes com câncer de próstata localmente avançado submetidos a prostatectomia radical retropúbica, e pacientes com câncer de próstata metastático submetidos a ressecção transuretral de próstata.

Os objetivos secundários deste estudo foram avaliar o método de coleta de material para obtenção de cultura celular primária, conforme a cirurgia realizada; avaliar a resposta imunológica celular, de acordo com a reação de hipersensibilidade de tipo retardado; e avaliar o impacto sobre a doença, de acordo com a evolução dos níveis séricos pós-operatórios de antígeno prostático específico.

## 4 REFERÊNCIAS

1. WHO (World Health Organization) and IARC (International Association for Research on Cancer). GLOBOCAN 2002. Disponível em <http://www-dep.iarc.fr/> [acesso em março de 2005]
2. Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. *BJU Int*, 90(2): 174-84, 2002
3. Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW. Prostate specific antigen: a decade of discovery – what we have learned and where we are going. *J Urol*, 162(2): 293-306, 1999
4. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer Statistics, 2005. *CA Cancer J Clin*, 55(1): 10-30, 2005
5. INCA (Instituto Nacional do Câncer). Disponível em <http://inca.gov.br/> [acesso em março de 2005]
6. Cooperberg MR, Lubeck DP, Meng MV, Mehta SS, Carroll PR. The changing face of low-risk prostate cancer: trends in clinical presentation and primary management. *J Clin Oncol*, 22(11): 2141-9, 2004
7. Hoffman RM, Stone SN, Espey D, Potosky AL. Differences between men with screening-detected versus clinically diagnosed prostate cancers in the USA. *BMC Cancer*, 5(1): 27, 2005
8. Cooperberg MR, Broering JM, Litwin MS, Lubeck DP, Mehta SS, Henning JM, Carroll PR; CaPSURE Investigators. The contemporary management of prostate cancer in the United States: lessons from the cancer of the prostate strategic urologic research endeavour (CaPSURE), a national disease registry. *J Urol*, 171(4): 1393-401, 2004
9. Hull GW, Rabbani F, Abbas F, Wheller TM, Kattan MW, Scardino PT. Cancer control with radical prostatectomy alone in 1,000 consecutive patients. *J Urol*, 167(2 Pt 1): 528-34, 2002



10. Han M, Partin AW, Pound CR, Epstein JI, Walsh PC. Long-term biochemical disease-free and cancer-specific survival following anatomic radical retropubic prostatectomy. The 15-year Johns Hopkins experience. *Urol Clin North Am*, 28(3): 555-65, 2001
11. Catalona WJ, Smith DS. Cancer recurrence and survival rates after anatomic radical prostatectomy for prostate cancer: intermediate-term results. *J Urol*, 160(6 pt 2): 2428-34, 1998
12. Roehl KA, Han M, Ramos CG, Antenor JA, Catalona WJ. Cancer progression and survival rates following anatomical radical retropubic prostatectomy in 3,478 consecutive patients: long-term results. *J Urol*, 172(3): 910-4, 2004
13. Partin AW, Piantadosi S, Sanda MG, Epstein JI, Marshall FF, Mohler JL, Brendler CB, Walsh PC, Simons JW. Selection of men at high risk for disease recurrence for experimental adjuvant therapy following radical prostatectomy. *Urology*, 45(5): 831-8, 1995
14. Roberts WW, Bergstralh EJ, Blute ML, Slezak JM, Carducci M, Han M, Epstein JI, Eisenberger MA, Walsh PC, Partin AW. Contemporary identification of patients at high risk of early prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *Urology*, 57(6): 1033-7, 2001
15. Bauer JJ, Connelly RR, Seterhenn IA, Deausen J, Srivastava S, McLeod DG, Moul JW. Biostatistical modeling using traditional preoperative and pathological prognostic variables in the selection of men at high risk for disease recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. *J Urol*, 159(3): 929-33, 1998
16. Kattan MW, Wheeler TM, Scardino PT. Postoperative nomogram for disease recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. *J Clin Oncol*, 17(5): 1499-507, 1999
17. Stamey TA, Yemoto CM, McNeal JE, Sigal BM, Johnstone IM. Prostate cancer is highly predictable: a prognostic equation based on all morphological variables in radical prostatectomy specimens. *J Urol*, 163(4): 1155-60, 2000
18. Blute ML, Bergstralh EJ, Iocca A, Scherer B, Zincke H. Use of Gleason score, prostate specific antigen, seminal vesicle and margin status to predict biochemical failure after radical prostatectomy. *J Urol*, 165(1): 119-25, 2001
19. Veltri RW, Miller MC, Partin AW, Coffey DS, Epstein JI. Ability to predict biochemical progression using Gleason score and a computer-generated quantitative nuclear grade derived from cancer cell nuclei. *Urology*, 48(5): 685-91, 1996
20. Krupski T, Petroni GR, Frierson HF Jr, Theodorescu D. Microvessel density, p53, retinoblastoma, and chromogranin A immunohistochemistry as predictors of disease-specific survival following radical prostatectomy for carcinoma of the prostate. *Urology*, 55(5): 743-9, 2000
21. Han M, Partin AW, Zahurak M, Piantadosi S, Epstein JI, Walsh PC. Biochemical (prostate specific antigen) recurrence probability following radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *J Urol*, 169(2): 517-23, 2003

22. Moul JW. Prostate specific antigen only progression of prostate cancer. *J Urol*, 163(6): 1632-42, 2000
23. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA*, 281(5): 1591-7, 1999
24. Amling CL, Blute ML, Bergstralh EJ, Seay TM, Slezak J, Zincke H. Long-term hazard of progression after radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer: continued risk of biochemical failure after 5 years. *J Urol*, 164(1): 101-5, 2000
25. Kupelian PA, Potters L, Khuntia D, Ciezki JP, Reddy CA, Reuther AM, Carlson TP, Klein EA. Radical prostatectomy, external beam radiotherapy < 72 Gy, external beam radiotherapy > or = 72 Gy, permanent seed implantation, or combined seeds/external beam radiotherapy for T1-T2 prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 58(1): 25-33, 2004
26. Touma NJ, Izawa JJ, Chin JL. Current status of local salvage therapies following radiation failure for prostate cancer. *J Urol*, 173(2): 373-9, 2005
27. Coen JJ, Zietman AL, Thakral H, Shipley WU. Radical radiation for localized prostate cancer: local persistence of disease results in a late wave of metastases. *J Clin Oncol*, 20(15): 3199-205, 2002
28. Khan MA, Partin AW. Management of high-risk populations with locally advanced prostate cancer. *Oncologist*, 8(3): 259-69, 2003
29. Epstein JI, Carmichael MJ, Pizov G, Walsh PC. Influence of capsular penetration on progression following radical prostatectomy: a study of 196 cases with long-term follow-up. *J Urol*, 150(1): 135-41, 1993
30. Epstein JI, Pizov G, Walsh PC. Correlation of pathologic findings with progression after radical retropubic prostatectomy. *Cancer*, 71(11): 3582-93, 1993
31. Pound CR, Partin AW, Epstein JI, Walsh PC. Prostate-specific antigen after anatomic radical retropubic prostatectomy. Patterns of recurrence and cancer control. *Urol Clin North Am*, 24(2): 395-406, 1997
32. Tangen CM, Faulkner JR, Crawford ED, Thompson IM, Hirano D, Eisenberger M, Hussain M. Ten-year survival in patients with metastatic prostate cancer. *Clin Prostate Cancer*, 2(1): 41-5, 2003
33. Walsh PC, DeWeese TL, Eisenberger MA. A structured debate: immediate versus deferred androgen suppression in prostate cancer – evidence for deferred treatment. *J Urol*, 166(2): 508-15, 2001
34. Cho D, Di Blasio CJ, Rhee AC, Kattan MW. Prognostic factors for survival in patients with hormone-refractory prostate cancer (HRPC) after initial androgen deprivation therapy (ADT). *Urol Oncol*, 21(4): 282-91, 2003
35. General Properties of Immune Responses. In Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (eds), *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia, WB Saunders, pp. 3-16, 2000

36. Huston DP. The biology of the immune system. *JAMA*, 278(22): 1804-14, 1997
37. Antibodies and Antigens. In Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (eds), *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia, WB Saunders, pp. 41-62, 2000
38. The Major Histocompatibility Complex. In Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (eds), *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia, WB Saunders, pp. 63-78, 2000
39. Antigen Receptors and Accessory Molecules of T Lymphocytes. In Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (eds), *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia, WB Saunders, pp. 102-121, 2000
40. B Cell Activation and Antibody Production. In Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (eds), *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia, WB Saunders, pp. 182-207, 2000
41. Effector Mechanisms of Humoral Immunity. In Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (eds), *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia, WB Saunders, pp. 309-334, 2000
42. Antigen Processing and Presentation to Lymphocytes. In Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (eds), *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia, WB Saunders, pp. 79-101, 2000
43. Effector Mechanisms of Cell-Mediated Immunity. In Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (eds), *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia, WB Saunders, pp. 291-308, 2000
44. Cytokines. In Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (eds), *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia, PA, WB Saunders, pp. 235-269, 2000
45. Perry MJA, Hrouda D, Dalglish AG. Prospects for vaccination in prostate cancer. *Drugs & Aging*, 16(5): 321-7, 2000
46. Blattman JN, Greenberg PD. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science*, 305(5681): 200-5, 2004
47. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol*, 2(4): 293-9, 2001
48. Mocellin S, Mandruzzato S, Bronte V, Lise M, Nitti D. Part I: vaccines for solid tumors. *Lancet Oncol*, 5(11): 681-9, 2004
49. Berzofsky JA, Terabe M, Oh S, Belyakov IM, Ahlers JD, Janik JE, Morris JC. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J Clin Invest*, 113(11): 1515-25, 2004
50. Renkvist N, Castelli C, Robbins PF, Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother*, 50(1): 3-15, 2001
51. Rosenberg SA. Development of effective immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *J Am Coll Surg*, 198(5): 685-96, 2004

52. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med*, 188(12): 2357-68, 1998
53. Immunity to Tumors. In Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (eds), *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia, PA, WB Saunders, pp. 384-403, 2000
54. Ragde H, Cavanagh WA, Tjoa BA. Dendritic cell based vaccines: progress in immunotherapy studies for prostate cancer. *J Urol*, 172(6): 2532-8, 2004
55. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med*, 10(9): 909-15, 2004
56. Shu S, Plautz GE, Krauss JC, Chang AE. Tumor Immunology, *JAMA*, 278(22): 1972-81, 1997
57. Mocellin S, Rossi CR, Nitti D. Cancer vaccine development: on the way to break immune tolerance to malignant cells. *Exp Cell Res*, 299(2): 267-78, 2004
58. Waldmann TA. Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med*, 9(3): 269-77, 2003
59. Nencioni A, Grunebach F, Patrone F, Brossart P. Anticancer vaccination strategies. *Ann Oncol*, 15(suppl 4): iv153-60, 2004
60. Jager E, Jager D, Knuth A. CTL-defined cancer vaccines: perspectives for active immunotherapeutic interventions in minimal residual disease. *Cancer Metastasis Rev*, 18(1): 143-50, 1999
61. Ribas A, Butterfield LH, Glaspy JA, Economou JS. Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy. *J Clin Oncol*, 21(12): 2415-32, 2003
62. Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature*, 411(6835): 380-4, 2001
63. Havranek EG, Whelan MA, Greenhalgh R, Dalglish AG, Pandha H. Advances in prostate cancer immunotherapy. *Surg Oncol*, 11(1-2): 35-45, 2002
64. Hrouda D, Perry M, Dalglish AG. Gene therapy for prostate cancer. *Semin Oncol*, 26(4): 455-71, 1999
65. Ward S, Casey D, Labarthe MC, Whelan M, Dalglish A, Pandha H, Todryk S. Immunotherapeutic potential of whole tumour cells. *Cancer Immunol Immunother*, 51(7): 351-7, 2002
66. Sobel RE, Sadar MD. Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines – part 1. *J Urol*, 173(2): 342-59, 2005
67. Sobel RE, Sadar MD. Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines – part 2. *J Urol*, 173(2): 360-72, 2005

68. Szucs S, Zitzelsberger H, Breul J, Bauchinger M, Hofler H. Two-phase short-term culture method for cytogenetic investigations from human prostate carcinoma. *Prostate*, 25(5): 225-35, 1994
69. Berd D, Sato T, Maguire HC Jr, Kairys J, Mastrangelo MJ. Immunopharmacologic analysis of an autologous, hapten-modified human melanoma vaccine. *J Clin Oncol*, 22(3): 403-15, 2004
70. Henderson RA, Mossman S, Nairn N, Cheever MB. Cancer vaccines and immunotherapies: emerging perspectives. *Vaccine*, 23(17-18): 2359-62, 2005
71. Harris JR, Markl J. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron*, 30(6): 597-623, 1999
72. Musselli C, Livingston PO, Rapugathi G. Keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines against cancer: the Memorial Sloan Kettering experience. *J Cancer Res Clin Oncol*, 127 Suppl 2: R20-6, 2001
73. Yannelli JR, Wroblewski JM. On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy. *Vaccine*, 23(1): 97-113, 2004
74. Parmiani G, Pilla L, Castelli C, Rivoltini L. Vaccination of patients with solid tumours. *Ann Oncol*, 14(6) : 817-24, 2003
75. Construindo a molécula de DNA recombinante. in Farah SB (ed). *DNA Segredos e Mistérios*. São Paulo, SP, Sarvier, pp 37-55, 2000
76. Trimble C, Lin CT, Hung CF, Pai S, Juang J, He L, Gillison M, Pardoll D, Wu L, Wu TC. Comparison of the CD8+ T cell responses and antitumor effects generated by DNA vaccine administered through gene gun, biojector, and syringe. *Vaccine*, 21(25-26): 4036-42, 2003
77. Kim JV, Latouche JB, Riviere I, Sadelain M. The ABCs of artificial antigen presentation. *Nat Biotechnol*, 22(4): 403-10, 2004
78. Fillat C, Carrio M, Cascante A, Sangro B. Suicide gene therapy by the Herpes Simplex virus thymidine kinase/Ganciclovir system: fifteen years of application. *Curr Gene Ther*, 3(11): 13-26, 2003
79. Yazawa K, Fisher WE, Brunicardi FC. Current progress in suicide gene therapy for cancer. *World J Surg*, 26(7): 783-9, 2002
80. Harris JE, Ryan L, Hoover HC Jr, Stuart RK, Oken MM, Benson AB 3rd, Mansour E, Haller DG, Manola J, Hanna MG Jr. Adjuvant active specific immunotherapy for stage II and III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: Eastern Cooperative Oncology Group Study E5283. *J Clin Oncol*, 18(1): 148-57, 2000
81. Dillman RO, Barth NM, VanderMolen LA, Garfield DH, De Leon C, O'Connor AA, Mahdavi K, Nayak SK. Treatment of kidney cancer with autologous tumor cell vaccines of short-term cell lines derived from renal cell carcinoma. *Cancer Biother Radiopharm*, 16(1): 47-54, 2001

82. Vermorken JB, Claessen AM, van Tinteren H, Gall HE, Ezinga R, Meijer S, Scheper RJ, Meijer CJ, Bloemena E, Ransom JH, Hanna MG Jr, Pinedo HM. Active specific immunotherapy for stage II and III human colon cancer: a randomised trial. *Lancet*, 353(9150): 345-50, 1999
83. Li Q, Normolle DP, Sayre DM, Zeng X, Sun R, Jiang G, Redman BD, Chang AE. Immunological effects of BCG as an adjuvant in autologous tumor vaccines. *Clin Immunol*, 94(1): 64-72, 2000
84. Clay TM, Hobeika AC, Mosca PJ, Lyerly HK, Morse MA. Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer. *Clin Cancer Res*, 7(5): 1127-35, 2001
85. Disis ML, Schiffman K, Gooley TA, McNeel DG, Rinn K, Knutson KL. Delayed-type hypersensitivity response is a predictor of peripheral blood T-cell immunity after HER-2/neu peptide immunization. *Clin Cancer Res*, 6(4): 1347-50, 2000
86. Baars A, Claessen AM, van den Eertwegh AJ, Gall HE, Stam AG, Meijer S, Giaccone G, Meijer CJ, Scheper RJ, Wagstaff J, Vermorken JB, Pinedo HM. Skin tests predict survival after autologous tumor cell vaccination in metastatic melanoma: experience in 81 patients. *Ann Oncol*, 11(8): 965-70, 2000
87. Lotem M, Peretz T, Drize O, Gimmon Z, Ad El D, Weitzen R, Goldberg H, Ben David I, Prus D, Hamburger T, Shiloni E. Autologous cell vaccine as a post operative adjuvant treatment for high-risk melanoma patients (AJCC stages III and IV). *Br J Cancer*, 86(10): 1534-9, 2002
88. Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat Rev Cancer*, 3(9): 666-75, 2003
89. Rosenberg SA. Shedding light on immunotherapy for cancer. *N Engl J Med*, 350(14): 1461-3, 2004
90. Bocchia M, Bronte V, Colombo MP, de Vicentiis A, di Nicola M, Forni G, Lanata L, Lemoli RM, Massaia M, Rondelli D, Zanon P, Tura S. Antitumor vaccination : where we stand. *Haematologica*, 85(11): 1172-206, 2000
91. Blades RA, Keating PJ, McWilliam LJ, George NJ, Stern PL. Loss of HLA class I expression in prostate cancer: implications for immunotherapy. *Urology*, 46(5): 681-6, 1995
92. Sanda MG, Restifo NP, Walsh JC, Kawakami Y, Nelson WG, Pardoll DM, Simons JW. Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 87(4): 280-5, 1995
93. Levin I, Klein T, Kuperman O, Segal S, Shapira J, Gal R, Hart Y, Klein B. The expression of HLA class I antigen in prostate cancer in relation to tumor differentiation and patient survival. *Cancer Detect Prev*, 18(6): 443-5, 1994
94. Lu QL, Abel P, Mitchell S, Foster C, Lalani EN. Decreased HLA-A expression in prostate cancer is associated with normal allele dosage in the majority of cases. *J Pathol*, 190:169-76, 2000

95. Kaminski JM, Summers JB, Ward MB, Huber MR, Minev B. Immunotherapy and prostate cancer. *Cancer Treat Rev*, 29(3): 199-209, 2003
96. Peehl DM. Primary cell cultures as models of prostate cancer developments. *Endocr Relat Cancer*, 12(1): 19-47, 2005
97. Saffran DC, Reiter RE, Jakobovits A, Witte ON. Target antigens for prostate cancer immunotherapy. *Cancer Metastasis Rev*, 18(4): 437-49, 1999
98. Dannull J, Diener PA, Prikler L, Furstenberger G, Cerny T, Schmid U, Ackermann DK, Groettrup M. Prostate stem cell antigen is a promising candidate for immunotherapy of advanced prostate cancer. *Cancer Res*, 60(19): 5522-8, 2000
99. Slovin SF. Vaccines as treatment strategies for relapsed prostate cancer: approaches for induction of immunity. *Hematol Oncol Clin North Am*, 15(3): 477-96, 2001
100. Merrin C, Han T, Klein E, Murphy GP. Immunotherapy of prostatic cancer with bacillus Calmette-Guérin and purified protein derivative. *Urology*, 2(6): 651-4, 1973
101. Robinson MRG, Rigby CC, Pugh RCB, Dumonde DC. Adjuvant immunotherapy with BCG in carcinoma of the prostate. *Br J Urol*, 49(3): 221-6, 1977
102. Robinson MRG, Rigby CC, Pugh RCB, Dumonde DC. Prostate carcinoma: intratumor BCG immunotherapy. *Natl Cancer Inst Monogr*, 49: 351-3, 1978
103. Guinan P, Baumgartner G, Toronchi E, John T, Crispen R, Rao R, Ablin R. Adjuvant immunotherapy with bacillus Calmette-Guérin in prostatic cancer. *Urology*, 14(6): 561-5, 1979
104. Guinan P, Toronchi E, Shaw M, Crispin R, Sharifi R. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) adjuvant therapy in stage D prostate cancer. *Urology*, 20(4): 401-3, 1982
105. Schwemmer B, Lehmer A, Hofmann R, Braun J. Natural killer cell activity in patients with prostatic carcinoma and its in vivo boosting with bacillus Calmette-Guerin. *Urol Int*, 39(6): 321-6. 1984
106. Catalona WJ. Immunobiology of carcinoma of the prostate. *Invest Urol*, 17(5): 373-7, 1980
107. Herr HW. Suppressor cells in immunodepressed bladder and prostate cancer patients. *J Urol*, 123(5): 635-9, 1980
108. Tjota A, Zhang YQ, Piedmonte MR, Lee CL. Adoptive immunotherapy using lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 in preventing and treating spontaneous pulmonary metastases of syngeneic Dunning rat prostate cancer. *J Urol*, 146(1): 177-83, 1991
109. Moody DB, Robinson JC, Ewing CM, Lazenby AJ, Isaacs WB. Interleukin-2 transfected prostate cancer cells generate a local antitumor effect in vivo. *Prostate*, 24(5): 244-51, 1994

110. Sanda MG, Ayyagari SR, Jaffee EM, Epstein JI, Clift SL, Cohen LK, Dranoff G, Pardoll DM, Mulligan RC, Simons JW. Demonstration of a rational strategy for human prostate cancer gene therapy. *J Urol*, 151(3): 622-8, 1994
111. Hodge JW, Schlom J, Donohue SJ, Tomaszewski JE, Wheeler CW, Levine BS, Gritz L, Panicali D, Kantor JA. A recombinant vaccinia virus expressing human prostate-specific antigen (PSA): safety and immunogenicity in a non-human primate. *Int J Cancer*, 63(2): 231-7, 1995
112. Tjoa B, Erickson R, Barren R 3rd, Ragde H, Kenny G, Boynton A, Murphy G. In vitro propagated dendritic cells from prostate cancer patients as a component of prostate cancer immunotherapy. *Prostate*, 27(2): 63-9, 1995
113. Tjoa B, Boynton A, Kenny G, Ragde H, Misrock SL, Murphy G. Presentation of prostate tumor antigens by dendritic cells stimulates T-cell proliferation and cytotoxicity. *Prostate*, 28(1): 65-9, 1996
114. Vieweg J, Boczkowski D, Roberson KM, Edwards DW, Philip M, Philip R, Rudoll T, Smith C, Robertson C, Gilboa E. Efficient gene transfer with adeno-associated virus-based plasmids complexed to cationic liposomes for gene therapy of human prostate cancer. *Cancer Res*, 55(11): 2366-72, 1995
115. Ross S, Liu V, Abulafia R, Hogan C, Osband M. Adoptive immunotherapy of hormone-refractory, stage D2 prostate cancer using ex vivo activated autologous T cells (autolymphocyte therapy): results from a pilot study. *Biotechnol Ther*, 4(3-4): 197-211, 1993
116. Murphy G, Tjoa B, Ragde H, Kenny G, Boynton A. Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate*, 29(6): 371-80, 1996
117. Tjoa BA, Lodge PA, Salgaller ML, Boynton AL, Murphy GP. Dendritic cell-based immunotherapy for prostate cancer. *CA Cancer J Clin*, 49(2): 117-28, 1999
118. Petronis JD, Regan F, Lin K. Indium-111 capromab pendetide (ProstaScint) imaging to detect recurrent and metastatic prostate cancer. *Clin Nuc Med*, 23(10): 672-7, 1998
119. Meredith RF, Khazaeli MB, Macey DJ, Grizzle WE, Mayo M, Schlom J, Russell CD, LoBuglio AF. Phase II study of interferon-enhanced 131I-labeled high affinity CC49 monoclonal antibody therapy in patients with metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 5(10 Suppl): 3254s-3258s, 1999
120. Simons JW, Mikhak B, Chang JF, DeMarzo AM, Carducci MA, Lim M, Weber CE, Baccala AA, Goemann MA, Clift SM, Ando DG, Levitsky HI, Cohen LK, Sanda MG, Mulligan RC, Partin AW, Carter HB, Piantadosi S, Marshall FF, Nelson WG. Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer. *Cancer Res*, 59(20): 5160-8, 1999



121. Meidenbauer N, Harris DT, Spitler LE, Whiteside TL. Generation of PSA-reactive effector cells after vaccination with a PSA-based vaccine in patients with prostate cancer. *Prostate*, 43(2): 88-100, 2000
122. Harris TH, Matyas GR, Gomella LG, Talor E, Winship MD, Spitler LE, Mastrangelo MJ. Immunologic approaches to the treatment of prostate cancer. *Semin Oncol*, 26(4): 439-447, 1999
123. Burch PA, Breen JK, Buckner JC, Gastineau DA, Kaur JÁ, Laus RL, Padley DJ, Peshwa MV, Pitot HC, Richardson RL, Smits BJ, Sopapan P, Strang G, Valone FH, Vuk-Pavlovic S. Priming tissue-specific cellular immunity in a phase I trial of autologous dendritic cells for prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 6(6): 2175-82, 2000
124. Small EJ, Fratesi P, Reese DM, Strang G, Laus R, Peshwa MV, Valone FH. Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. *J Clin Oncol*, 18(23): 3879-82, 2000
125. Herman JR, Adker HL, Aguilar-Cordova E, Rojas-Martinez A, Woo S, Timme TL, Wheeler TM, Thompson TC, Scardino PT. In situ gene therapy for adenocarcinoma of the prostate: a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther*, 10(7): 1239-49, 1999
126. Sanda MG, Smith DC, Charles LG, Hwang C, Pienta KJ, Schlom J, Milenic D, Panicali D, Montie JE. Recombinant vaccinia-PSA (PROSTVAC) can induce a prostate-specific immune response in androgen-modulated human prostate cancer. *Urology*, 53(2): 260-6, 1999
127. Mincheff M, Tchakarov S, Zoubak S, Loukinov D, Botev C, Altankova I, Georgiev G, Petrov S, Meryman HT. Naked DNA and adenoviral immunizations for immunotherapy of prostate cancer: a phase I/II clinical trial. *Eur Urol*, 38(2): 208-17, 2000
128. O'Donnell RT, DeNardo SJ, Yuan A, Shen S, Richman CM, Lara PN, Griffith IJ, Goldstein DS, Kukis DL, Martinez GS, Mirick GR, DeNardo GL, Meyers FJ. Radioimmunotherapy with (111)In/(90)Y-2IT-BAD-m170 for metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 7(6): 1561-8, 2001
129. Beldegrun A, Tso CL, Zisman A, Naitoh J, Said J, Pantuck AJ, Hinkel A, deKernion J, Figlin R. Interleukin 2 gene therapy for prostate cancer: a phase I clinical trial and basic biology. *Hum Gene Ther*, 12(8): 883-92, 2001
130. Fong L, Brockstedt D, Benike C, Breen JK, Strang G, Ruegg CL, Engleman EG. Dendritic cell-based xenoantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy. *J Immunol*, 167(12): 7150-6, 2001
131. Gulley J, Chen AP, Dahut W, Arlen PM, Bastian A, Steinberg SM, Tsang K, Panicali D, Poole D, Schlom J, Michael Hamilton J. Phase I study of a vaccine using recombinant vaccinia virus expressing PSA (rV-PSA) in patients with metastatic androgen-independent prostate cancer. *Prostate*, 53(2): 109-17, 2002
132. Freytag SO, Khil M, Stricker H, Peabody J, Menon M, DePeralta-Venturina M, Nafziger D, Pegg J, Paielli D, Brown S, Barton K, Lu M, Aguilar-Cordova E, Kim JH. Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene

- therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer. *Cancer Res*, 62(17): 4968-76, 2002
133. Teh BS, Aguilar-Cordova E, Vlachaki MT, Aguilar L, Mai WY, Caillouet J, Davis M, Miles B, Kadmon D, Ayala G, Lu HH, Chiu JK, Carpenter LS, Woo SY, Grant WH 3rd, Wheeler T, Thompson TC, Butler EB. Combining radiotherapy with gene therapy (from the bench to the bedside): a novel treatment strategy for prostate cancer. *Oncologist*, 7(5): 458-66, 2002
  134. Satoh T, Teh BS, Timme TL, Mai WY, Gdor Y, Kusaka N, Fujita T, Pramudji CK, Vlachaki MT, Ayala G, Wheeler T, Amato R, Miles BJ, Kadmon D, Butler EB, Thompson TC. Enhanced systemic T-cell activation after in situ gene therapy with radiotherapy in prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 59(2): 562-71, 2004
  135. Eaton JD, Perry MJ, Nicholson S, Guckian M, Russell N, Whelan M, Kirby RS. Allogeneic whole-cell vaccine: a phase I/II study in men with hormone-refractory prostate cancer. *BJU Int*, 89(1): 19-26, 2002
  136. Pavlenko M, Roos AK, Lundqvist A, Palmborg A, Miller AM, Ozenci V, Bergman B, Egevad L, Hellstrom M, Kiessling R, Masucci G, Wersall P, Nilsson S, Pisa P. A phase I trial of DNA vaccination with a plasmid expressing prostate-specific antigen in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Br J Cancer*, 91(4): 688-94, 2004
  137. Burch PA, Croghan GA, Gastineau DA, Jones LA, Kaur JS, Kylstra JW, Richardson RL, Valone FH, Vuk-Pavlovic S. Immunotherapy (APC8015, Provenge) targeting prostatic acid phosphatase can induce durable remission of metastatic androgen-independent prostate cancer: a phase II trial. *Prostate*, 60(3): 197-204, 2004
  138. Pantuck AJ, van Ophoven A, Gitlitz BJ, Tso CL, Acres B, Squiban P, Ross ME, Beldegrun AS, Figlin RA. Phase I trial of antigen-specific gene therapy using a recombinant vaccinia virus encoding MUC-1 and IL-2 in MUC-1-positive patients with advanced prostate cancer. *J Immunother*, 27(3): 240-53, 2004
  139. Vonderheide RH, Domchek SM, Schultze JL, George DJ, Hoar KM, Chen DY, Stephans KF, Masutomi K, Loda M, Xia Z, Anderson KS, Hahn WC, Nadler LM. Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T lymphocytes. *Clin Cancer Res*, 10(3): 828-39, 2004
  140. Noguchi M, Itoh K, Suekane S, Morinaga A, Sukehiro A, Suetsugu N, Katagiri K, Yamada A, Noda S. Immunological monitoring during combination of patient-oriented peptide vaccination and estramustine phosphate in patients with metastatic hormone refractory prostate cancer. *Prostate*, 60(1): 32-45, 2004
  141. Schellhammer PF, Hershberg RM. Immunotherapy with autologous antigen presenting cells for the treatment of androgen independent prostate cancer. *World J Urol*, 23(1): 47-9, 2005
  142. Chung LW, Baseman A, Assikis V, Zhou HE. Molecular insights into prostate cancer progression: the missing link of tumor microenvironment. *J Urol*, 173(1): 10-20, 2005
  143. Lieberman R. Evidence-based medical perspectives: the evolving role of PSA for early detection, monitoring of treatment response, and as a surrogate end point of efficacy for

---

interventions in men with different clinical risk states for the prevention and progression of prostate cancer. *Am J Ther*, 11(6): 501-6, 2004

144. Beldegrun A, Bander NH, Lerner SP, Wood DP, Pantuck AJ. Society of Urologic Oncology Biotechnology Forum: new approaches and targets for advanced prostate cancer. *J Urol*, 166(4): 1316-21, 2001
145. NCI (National Cancer Institute). Disponível em <http://cancer.gov/clinicaltrials/> [acesso em abril de 2005]

**5 ARTIGO - ESTUDO DE FASE I COM VACINA CELULAR  
AUTÓLOGA IMUNOMODULADA PARA  
CÂNCER DE PRÓSTATA LOCALMENTE  
AVANÇADO OU METASTÁTICO**

# **ESTUDO DE FASE I COM VACINA CELULAR AUTÓLOGA IMUNOMODULADA PARA CÂNCER DE PRÓSTATA LOCALMENTE AVANÇADO OU METASTÁTICO**

**Milton Berger, Jorge L. Horst, Fernando T. Kreutz, Walter J. Koff**

Serviço de Urologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul e FK Biotecnologia SA, Porto Alegre – RS, Brasil.

## **RESUMO**

**Objetivo:** o objetivo principal do estudo foi avaliar a segurança e toxicidade de uma vacina celular autóloga, imunomodulada com IFN e BCG, em pacientes com PCa localmente avançado ( $\geq$  pT3) ou metastático (N+ e/ou M+). Os objetivos secundários foram a avaliação do método de coleta de material para produção de cultura e vacina, a avaliação da resposta imune celular e a avaliação do impacto sobre a doença.

**Materiais e Métodos:** em 50 pacientes com PCa clinicamente localizado e PSA  $\geq$  10 submetidos a prostatectomia radical retropúbica (grupo RRP) e 6 pacientes com PCa metastático submetidos a ressecção endoscópica da próstata por obstrução infravesical (grupo RTUP), foram coletados fragmentos de neoplasia para cultura celular. Após estabelecimento de cultura celular primária, as células tumorais foram incubadas com IFN, irradiadas e criopreservadas. As vacinas foram inoculadas em pacientes com estágio patológico  $\geq$  pT3 e/ou N+ e pacientes M+. O protocolo compreendeu sete vacinações em cada paciente, sendo as primeiras duas doses acompanhadas de BCG. O seguimento foi realizado com medição de reações de hipersensibilidade de tipo retardado (DTH), dosagens de PSA, provas de função

hepática e cintilografia óssea por cerca de um ano após aplicação da vacina. A avaliação da toxicidade foi realizada segundo CTC.

**Resultados:** não foi obtida cultura celular primária no grupo RTUP. De 50 pacientes do grupo RRP, foi obtida cultura primária e produção de vacina em 37 casos (74%). Destes, 12 pacientes  $\geq$  pT3 e/ou N+ foram vacinados. Um paciente foi excluído durante a vacinação por descoberta de outra neoplasia primária durante o tratamento. Toxicidade foi geralmente limitada aos sítios de inoculação (ulceração, eritema, endureção e prurido). Reações DTH  $\geq$  10 mm foram observadas em 2 pacientes e  $\geq$  5 mm em 6 pacientes. Neste grupo de alto risco para recorrência após cirurgia, 2 pacientes apresentaram PSA estabilizado próximo a zero no seguimento e 3 pacientes apresentaram estabilização do PSA em níveis  $\leq$  0,4 ng/ml.

**Conclusões:** a vacina celular autóloga imunomodulada com IFN e BCG se mostrou segura e parece induzir resposta imune celular medida por DTH. Cultura primária e produção de vacina são possíveis na maioria dos pacientes submetidos a RRP. Não é possível estabelecer cultura primária em pacientes submetidos a RTUP com esse método. Apesar de parecer haver alguma influência da vacina na evolução do PSA, o pequeno número de pacientes e o curto período de seguimento não permitem que se avalie o impacto sobre a doença.

**Palavras-chave:** câncer de próstata, imunoterapia ativa, vacinas tumorais, hipersensibilidade retardada.

## INTRODUÇÃO

Câncer de próstata (PCa) é importante problema de saúde pública. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) revelam que, em homens, o PCa é o segundo câncer de maior incidência, com 680.000 novos casos/ano (excluindo-se o câncer de pele não-melanoma), e a sexta causa de mortalidade por câncer, com 220.000 mortes/ano<sup>1</sup>. O

progressivo envelhecimento da população mundial agrava este panorama, já que  $\frac{3}{4}$  dos casos de PCa ocorrem em homens com mais de 65 anos<sup>2,3</sup>. No Brasil, o PCa é a segunda causa de mortalidade por câncer e estima-se em 46.330 o número de novos casos (51/100.000 homens) em 2005, o que o coloca como o câncer não-cutâneo de maior incidência em homens<sup>4</sup>. Nos EUA, o PCa também constitui o câncer não-cutâneo de maior incidência em homens e a segunda causa de mortalidade por câncer. Calcula-se que 232.090 homens serão diagnosticados com PCa e 30.350 morrerão devido ao tumor em 2005<sup>5</sup>. A grande maioria dos casos de PCa detectados atualmente encontra-se em estágios iniciais<sup>5</sup>, mas, mesmo assim, cerca de 25 a 33% dos homens com PCa, detectado por rastreamento ou não, morrerão devido à doença<sup>6</sup>.

Apesar dos bons resultados obtidos com tratamento cirúrgico ou radioterápico para a doença localizada<sup>7-11</sup>, uma significativa parcela de pacientes apresentará recorrência bioquímica, local ou sistêmica, e necessitará tratamentos adjuvantes<sup>12-15</sup>. Os pacientes que desenvolvem ou se apresentam com PCa metastático demonstram sobrevida média de 2 a 3 anos e 2/3 deles estarão mortos em 5 anos<sup>16</sup>, e aqueles que progridem para doença refratária à manipulação hormonal possuem sobrevida mediana de 1 ano<sup>17</sup>.

Avanços em imunologia tumoral e imunoterapia, derivados sobretudo de estudos em pacientes com melanoma e câncer de rim, levaram à incorporação desta estratégia ao armamentário terapêutico de alguns tipos de câncer<sup>18-20</sup>. A identificação de antígenos associados a tumores (TAAs), passíveis de reconhecimento por linfócitos T, proporcionou um alvo preferencial para tratamentos imunoterápicos<sup>21,22</sup>. Entretanto, a maioria destes antígenos está presente em tecidos normais, sendo necessário superar a tolerância imunológica natural a tais antígenos para um combate efetivo a tumores<sup>23</sup>. O objetivo da imunoterapia em câncer é

proporcionar a apresentação de antígenos tumorais ao sistema imune, induzir a mobilização de linfócitos que reconheçam especificamente tais antígenos, e promover a destruição seletiva das células que os apresentam<sup>18,24,25</sup>.

Avanços têm sido realizados em imunoterapia de PCa<sup>26-28</sup>. Uma série de estratégias baseadas em imunoterapia tem sido experimentada em PCa, a maioria delas em doença metastática e/ou refratária a manipulações hormonais e algumas em recorrência após tratamento primário como a radioterapia<sup>29-39</sup>. Boa parte destes estudos tem como alvo específico um ou mais antígenos identificados em PCa, como PSA (antígeno prostático específico), PSMA (antígeno de membrana prostático específico), PAP (fosfatase alcalina prostática), PSCA (antígeno de célula-tronco prostática), PCTA-1 (antígeno tumoral do carcinoma prostático), entre outros<sup>40</sup>. Alguns são expressos com maior frequência em PCa e outros são comuns a diversos tipos de tumores.

Uma neoplasia possui, no entanto, diversos antígenos expressos, muitos ainda não identificados<sup>41</sup>. O próprio tumor do indivíduo afetado possui um leque de antígenos únicos, potencialmente capaz de induzir resposta imune e, teoricamente, é a melhor fonte antigênica para indução de uma reação deste tipo<sup>42-44</sup>. Poucos estudos, entretanto, são realizados com células tumorais autólogas, pela complexidade de estabelecimento de culturas primárias de células tumorais, pelo custo, pelo dispêndio de tempo requerido e pela infra-estrutura material e pessoal envolvida<sup>45</sup>.

Para uma adequada apresentação de antígenos ao sistema imune, é necessário que esta se desenvolva num contexto imunogênico, isto é, que além da presença de antígenos expostos pela célula tumoral, as células responsáveis pelo reconhecimento e combate ao tumor



(linfócitos) sejam ativadas. Procura-se obter este contexto estimulatório do sistema imune com o uso de adjuvantes imunológicos<sup>43,46</sup>. Imunoestimulantes inespecíficos, como BCG (bacille Calmette-Guérin), e citocinas, como interferon (IFN) e interleucina (IL), podem ser usados com esta finalidade.

Este trabalho visou avaliar a segurança e a toxicidade de uma vacina celular autóloga, imunomodulada com IFN e BCG, em pacientes com PCa localmente avançado ou metastático. Em relação aos objetivos secundários, visou avaliar o método de coleta e cultura celular primária, avaliar a resposta imunológica, e avaliar o impacto sobre a doença.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Desenho do estudo*

O estudo se desenvolveu em duas etapas. Na primeira etapa, pacientes com PCa clinicamente localizado submetidos a prostatectomia radical retropúbica (RRP) e pacientes com PCa metastático submetidos à ressecção transuretral de próstata (RTUP) por obstrução infravesical consentiram em que o material do espécime cirúrgico (amostras de tumor) fosse coletado para processamento e estabelecimento de cultura celular primária. Na segunda etapa, pacientes submetidos a RRP, cujo exame anatomopatológico demonstrou extensão extracapsular, limites cirúrgicos comprometidos, invasão de vesículas seminais e/ou metástases ganglionares ( $\geq$  pT3 e/ou N+), e pacientes M+ submetidos a RTUP consentiram em receber a vacina de células autólogas.

Os pacientes assinaram um termo de consentimento informado para cada uma das etapas do estudo (um para coleta de material e outro para aplicação da vacina). A coleta de material foi realizada nas dependências do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O

processamento do material coletado, a cultura celular e a preparação das vacinas foram realizados no Laboratório de Biologia Tumoral da FK Biotecnologia SA. O estudo foi aprovado pela Comissão Científica de Pesquisa e Ética em Saúde do HCPA, a qual é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS e pelo Office for Human Research Protections (OHRP)/USDHHS.

### *Seleção de pacientes*

Para a primeira etapa do estudo (coleta de material), os prontuários de pacientes com PCa clinicamente localizado e com RRP agendada foram revisados e, tendo o PSA pré-operatório  $\geq 10$  ng/ml, os pacientes foram convidados a participar desta primeira etapa. Os pacientes com PCa metastático a serem submetidos a RTUP também foram selecionados com base na agenda de cirurgias; todos eles eram portadores de doença hormônio-refratária e apresentavam obstrução infravesical por evolução local do tumor.

A seleção de pacientes para a segunda etapa do estudo (aplicação da vacina) foi realizada de acordo com o resultado anatomopatológico do espécime de RRP. Aqueles pacientes cujo laudo anatomopatológico demonstrou extensão extracapsular da doença, limites cirúrgicos comprometidos e/ou invasão de vesículas seminais ( $\geq$  pT3), isto é, doença localmente avançada, e/ou metástases ganglionares (N+) foram convidados a participar do programa de vacinação. Todos os pacientes submetidos a RTUP foram, desde o início, candidatos à segunda etapa do estudo. Ambos os grupos (RRP e RTUP) deviam preencher os critérios adicionais, descritos a seguir, para iniciar a segunda etapa.

Os critérios adicionais de elegibilidade considerados foram: contagem de leucócitos  $\geq 4000$ ; contagem de plaquetas  $\geq 100.000$ ; funções hepática e renal normais; performance

ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) 0-2; obtenção de cultura primária de células tumorais e obtenção de número suficiente de células tumorais para produzir o número programado de vacinas;e, para os pacientes submetidos a RTUP, expectativa de vida de ao menos 3 meses; confirmação da presença de metástases por métodos de imagem; intervalo de ao menos 4 semanas entre um eventual tratamento, como quimioterapia ou radioterapia, e o início do protocolo.

Os critérios de exclusão utilizados para o estudo foram: uso de corticosteróides em doses imunossupressoras; presença de doença auto-imune; presença de infecção ativa;e, para pacientes submetidos a RTUP, presença de doença metastática no sistema nervoso central.

Foi utilizada a classificação TNM 2002 para estadiamento pré e pós-operatório.

### ***Coleta de material***

No grupo RRP, fragmentos do tumor foram coletados imediatamente após a exérese do espécime cirúrgico, em condições assépticas, na própria sala de cirurgia. A próstata era pintada com tinta nanquim esterilizada e seccionada em fatias de cerca de 7 a 10 mm de espessura. O tumor era identificado visualmente e por palpação, com base nos dados de toque retal e da biópsia pré-operatória. Cerca de 1 a 2 cm<sup>3</sup> de tumor era retirado e colocado em meio de cultura dentro de tubos de ensaio. Os tubos de ensaio com meio de cultura e fragmentos de tumor eram resfriados por contato e acondicionados em caixas termicamente isoladas para transporte até o laboratório de cultura celular. Um pequeno fragmento do material a ser enviado para cultura era encaminhado para exame anatomopatológico.

No grupo RTUP, após ressecção das porções periuretrais da glândula, fragmentos de

tecido prostático mais próximos da periferia da glândula, onde se supunha encontrar tumor, eram coletados. Cerca de 1 a 2 cm<sup>3</sup> de material era processado da mesma maneira que o grupo RRP. Um pequeno fragmento do material a ser encaminhado para cultura era também separado para exame anatomopatológico.

O meio de cultura utilizado para a coleta de material foi o RPMI-1640 (Gibco), com soro fetal bovino a 20% e antibióticos (penicilina, estreptomicina e gentamicina).

#### ***Preparação da vacina***

O material coletado era processado no laboratório nas primeiras 24 até 72 h após a coleta. As amostras eram reduzidas mecanicamente a pequenos fragmentos de 1 a 2 mm de maior diâmetro e cultivadas em meio RPMI-1640, com soro fetal bovino a 10% e antibióticos (penicilina, estreptomicina e gentamicina), em frascos plásticos específicos para cultura celular de células aderidas. Os frascos de cultura eram mantidos em estufa a 37°C com controle de CO<sub>2</sub> a 5%. O estado das culturas era inspecionado diariamente e a troca do meio de cultura realizada semanalmente no início e, após, de acordo com o crescimento celular. Todas as manipulações foram realizadas em câmara de fluxo laminar (capela). O crescimento celular e eventual contaminação eram observados em microscópio invertido com aumento de 400x. A quantificação das células foi realizada em câmara de Neubauer.

Quando o crescimento celular era suficiente para preparar as sete doses de vacina (7 x 10<sup>7</sup> células), era adicionado à cultura IFN- $\alpha$ 2b (Blauferon B, Blaufiegel) por 72 h. Após este período, as células eram retiradas do meio de cultura por meio de tripsina associada a soro fetal bovino ou por meio de espátula celular, e então irradiadas com dose letal de 200 Gy.

Sete doses de vacina, cada uma contendo  $10^7$  células tumorais autólogas, irradiadas, previamente incubadas com IFN- $\alpha$ 2b, foram preparadas para cada paciente. A duas destas 7 doses, foram adicionadas  $10^7$  células viáveis de BCG (Fundação Ataulpho de Paiva) em cada uma. O volume de cada dose de vacina foi de 0,25 ml. As doses eram criopreservadas para as futuras inoculações.

### ***Programa de vacinações e acompanhamento***

As 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> doses (contendo BCG) e as 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> doses de vacina foram administradas semanalmente. A 5<sup>a</sup> e a 6<sup>a</sup> doses foram aplicadas mensalmente e a 7<sup>a</sup> dose foi aplicada três meses após a 6<sup>a</sup>. O período total de vacinação compreendeu, portanto, seis meses. As inoculações foram realizadas por via intradérmica nos membros superiores alternadamente (região do deltóide e face interna do antebraço), com pelo menos 5 a 10 cm de distância entre sítios de inoculação. A partir da 3<sup>a</sup> dose, os pacientes eram instruídos a retornar ao serviço dentro de 48 a 72 h para mensuração da reação de hipersensibilidade de tipo retardado (DTH). Esta foi mensurada considerando-se o maior diâmetro em milímetros de endureção no sítio de inoculação com a utilização de paquímetro. A cada visita foram realizados exames físicos, história e registradas eventuais ocorrências de toxicidade de acordo com o CTC (Common Toxicity Criteria). Exames hematológicos, provas de função renal e hepática, e dosagem de PSA foram realizados logo antes da 1<sup>a</sup> inoculação, repetidos antes da 5<sup>a</sup>, da 6<sup>a</sup> e da 7<sup>a</sup> inoculações, e nos 8<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> meses de acompanhamento. Exames de imagem, como cintilografia óssea, foram realizados nos 6<sup>o</sup>, 9<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> meses de acompanhamento. Qualquer exame ou investigação poderia ser repetido a qualquer momento de acordo com o julgamento médico.

Deve-se deixar claro que a equipe responsável pelo estudo não era a mesma que decidia sobre as condutas rotineiras em relação aos pacientes (indicação de cirurgia, acompanhamento pós-operatório, manejo de complicações como disfunção erétil ou incontinência urinária, instituição de tratamentos complementares etc.). Assim sendo, não foi negada aos pacientes a instituição de qualquer tratamento adjuvante convencional para PCa (como hormonioterapia ou radioterapia) que a equipe responsável pela cirurgia julgasse apropriado, fosse antes, durante, ou após o período de vacinação.

### *Análise estatística*

Foram utilizados os programas Epi Info versão 3.2.2 para a estatística descritiva e SPSS versão 8.0 para as análises de regressão logística.

## **RESULTADOS**

### *Coleta de material*

Ao todo, 56 pacientes foram incluídos na primeira parte do estudo no período de dezembro/2001 a julho/2004.. Destes, 6 foram submetidos a RTUP (grupo RTUP) e 50 pacientes foram submetidos a RRP (grupo RRP).

Grupo RTUP: a média de idade foi 73 anos e a mediana 73 anos (67-78). A média do PSA pré-operatório foi 269 ng/ml e a mediana 195 ng/ml (109-500). O escore de Gleason variou de 8 a 10 (média = 9 e mediana = 9). Todos os pacientes apresentavam tumores palpáveis ao toque retal, alguns com sinais de doença localmente avançada, e metástases ósseas (estadiamento clínico T2-4 Nx M1) (ver Tabela 1). Todos os pacientes deste grupo apresentavam doença refratária a bloqueio hormonal e obstrução infravesical.

Grupo RRP: a média de idade foi 66 anos e a mediana 67 anos (43-79). A média do PSA pré-operatório foi 18,1 ng/ml e a mediana 15,6 ng/ml (8,05-52,5). Alguns poucos pacientes com dosagens de PSA  $\geq 10$  ng/ml realizados em outros laboratórios tiveram novas dosagens realizadas na véspera da cirurgia no laboratório local, sendo esta a razão para alguns pacientes registrarem dosagens levemente inferiores a 10, já que decidiu-se computar os valores obtidos no próprio hospital. O escore de Gleason variou de 6 a 9, sendo a média e a mediana 7. O estadiamento clínico foi T1c em 19 pacientes e T2 em 31 pacientes. O estadiamento patológico foi T2 em 16 casos, T3 em 30 casos e T4 em 2 casos. Portanto, de 50 pacientes com doença clinicamente localizada, 32 (64%) demonstraram doença extraprostática no exame anatomopatológico. Em 2 pacientes não se evidenciou adenocarcinoma no espécime cirúrgico (pT0); em um, verificou-se hiperplasia benigna, e, no outro, verificou-se PIN (neoplasia intra-epitelial prostática) de alto grau, difusamente, na glândula. Em 5 pacientes demonstrou-se comprometimento ganglionar (N+); todos apresentavam estágio patológico T3 (Tabela 1).

### ***Cultura celular e produção de vacina***

No grupo RTUP (n = 6), não foi possível estabelecer cultura primária em nenhum paciente. Em 2 casos, houve crescimento de fibroblastos na cultura, e, em 4 casos, não houve crescimento celular. Destes 4 casos sem crescimento, em 2, o material enviado ao laboratório não apresentava células tumorais (Figura 1).

No grupo RRP (n = 50), em 13 casos (26%) não se estabeleceu cultura primária. Houve contaminação da cultura em 8 destes casos e ausência de crescimento celular em 5 casos. Destes 5 casos sem crescimento celular, em 4 o material enviado para o laboratório não continha tumor (um deles era um paciente pT0) e em 1 havia células tumorais, mas não houve

crescimento. Em 37 casos (74%) coletados por RRP foi possível estabelecer cultura primária de células tumorais, incluindo o caso pT0 em que se encontrou somente PIN no espécime cirúrgico. Dos outros 36 casos com crescimento de cultura, 13 pacientes apresentaram estágio patológico T2, 21 pacientes eram pT3 (sendo 5 N+) e 2 pacientes eram pT4. Portanto, dos 37 casos de cultura primária estabelecida, 14 não apresentavam critérios de inclusão para receber a vacina (1 pT0 e 13 pT2). Dos 23 casos restantes com critério para a vacinação ( $\geq$  pT3), 11 pacientes não aceitaram participar do estudo e 12 pacientes foram vacinados. Um paciente vacinado foi excluído durante a vacinação por ter sido diagnosticado com outra neoplasia primária (câncer de laringe) (Figura 1).

Nos pacientes submetidos a RRP, foram avaliados o escore de Gleason da peça cirúrgica e o valor do PSA pré-operatório e sua associação com obtenção de cultura celular primária, num modelo de regressão logística multivariada. Não foram verificadas associações entre as variáveis (escore Gleason e PSA pré-op) e obtenção de cultura primária [para escore Gleason, OR = 0,81, IC95% (0,18;3,57); para PSA pré-op, OR = 0,94, IC95% (0,88;1,02)].

### ***Vacinação***

As características dos 11 pacientes submetidos à vacinação estão descritas na Tabela 2. A média de idade foi 65 anos e a mediana 68 anos (47-70). A média do PSA pré-operatório foi 24,0 e a mediana 22,0 (13,0-52,5). Três pacientes eram pT3a (PPL, MRS, JoB), 7 eram pT3b (JaB, OAC, AAS, AI, APS, ASO, RG) e 1 era pT4a (RC). Os 4 pacientes N+ (JaB, OAC, AAS, APS) eram pT3b e 3 deles apresentavam tumor com escore de Gleason 9 (JaB, OAC, AAS). Somente 1 outro paciente apresentava tumor Gleason 9 (MRS). Os pacientes restantes apresentavam tumor Gleason 6 (AI, ASO) e Gleason 7 (PPL, JoB, APS, RC, RG).



Os registros de reações DTH (maior diâmetro da endureção nos sítios de inoculação) estão apresentados na Tabela 3. Em pelo menos um dos 5 episódios de vacinação sem BCG, 6 pacientes apresentaram reações  $\geq 5$  mm e 2 pacientes apresentaram reações  $\geq 10$  mm. Dois pacientes tiveram reações  $< 5$  mm e 1 paciente não apresentou qualquer reação em nenhum dos episódios de vacinação sem BCG.

A toxicidade da vacina está registrada na Tabela 4. Todos os pacientes apresentaram algum grau de eritema, endureção e prurido após a inoculação das duas primeiras doses de vacina, que continham BCG. Um paciente apresentou ulceração que regrediu com cuidados locais. Dois pacientes apresentaram adenopatia regional e febre baixa de pequena duração, também após aplicação das doses de vacina com BCG. Não foi registrado qualquer outro efeito adverso durante ou após o período de vacinação.

A evolução temporal dos níveis de PSA de cada paciente, com registro das intervenções realizadas (cirurgia, vacina, bloqueio hormonal), está demonstrada nas Figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12. Os gráficos estão formatados em escala logarítmica para que pequenas variações nos níveis de PSA possam ser bem apreciadas. Cinco pacientes (MRS, JaB, OAC, AAS, APS) iniciaram bloqueio hormonal durante o estudo (Figuras 3, 4, 5, 6 e 9). Quatro deles (JaB, OAC, AAS, APS) são os pacientes que apresentaram comprometimento ganglionar ao anatomopatológico (Tabela 2 e Figuras 4, 5, 6 e 9) e o quinto (MRS) é o paciente pT3a que apresentava tumor Gleason 9 (Tabela 2 e Figura 3). Seis pacientes (PPL, AI, JoB, ASO, RC, RG) receberam somente a vacina após a cirurgia. Dois deles (AI, RC) demonstraram níveis de PSA próximos a zero (Figuras 7 e 11), três (PPL, ASO, RG) apresentaram valores de PSA  $\leq 0,4$  (Figuras 2, 10 e 12), e um (JoB) demonstrou elevação progressiva do PSA até cerca de 4,0 no último seguimento (Figura 8).

## DISCUSSÃO

Imunoterapia para câncer tem evoluído com avanços no conhecimento em imunologia geral e tumoral. Diversas estratégias imunoterápicas vêm sendo testadas. A atenção aos detalhes de cada uma delas é importante para que se possa compreender seus eventuais efeitos. Sendo assim, diversos aspectos deste estudo merecem comentário.

A escolha de um limite inferior de PSA pré-operatório  $\geq 10$  deriva de diversas observações. O nível sérico pré-operatório de PSA se correlaciona diretamente com estadiamento clínico e patológico<sup>47,48</sup>. Mesmo havendo esta correlação, o PSA não é um preditor acurado do estadiamento patológico<sup>3</sup>, mas, de modo geral, pacientes com PSA pré-operatório acima de 10 têm probabilidade em torno de 50% de apresentar doença extraprostática<sup>49</sup>. Este critério, portanto, proporcionou uma maior chance de selecionar pacientes para a segunda etapa do estudo (aplicação da vacina). Poder-se-ia utilizar os diversos nomogramas disponíveis para predizer mais acuradamente o estadiamento patológico, combinando PSA, estadiamento clínico e escore de Gleason da biópsia pré-operatória<sup>49,50</sup>, mas devido a inconsistências e falta de padronização dos exames anatomopatológicos das biópsias pré-operatórias (diversos pacientes apresentavam exames realizados em outros serviços), julgou-se que o uso de um dado único (PSA) facilitaria a seleção.

A adequada expressão de antígenos pelas células tumorais é fundamental para a indução de resposta imune. Sendo os antígenos tumorais intracelulares, sua exposição na superfície celular é realizada por moléculas MHC classe I<sup>51</sup>. Citocinas estão envolvidas neste processo<sup>23</sup>. IFN- $\alpha$ , uma citocina pertencente ao grupo de interferons tipo I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\omega$ ), apresenta uma série de ações no microambiente tumoral e funciona como uma ponte

entre a imunidade inata e adaptativa, através da indução de diferenciação de linfócitos T auxiliares e citolíticos (ThL e CTL) e diferenciação e maturação de células dendríticas (as mais eficientes células apresentadoras de antígenos)<sup>52</sup>. Simultaneamente, IFN- $\alpha$  estimula a expressão de moléculas MHC classe I, responsáveis pela exposição de antígenos intracelulares na superfície da célula tumoral, e também estimula a apoptose de células tumorais induzida por outros estímulos, facilitando a captação e processamento de antígenos tumorais por células dendríticas<sup>52,53</sup>. Estes mecanismos efetores do IFN- $\alpha$  justificaram a utilização desta citocina no preparo da vacina celular autóloga.

A mera apresentação de antígenos na superfície celular, entretanto, não é suficiente para desencadear uma resposta imune<sup>25</sup>. É necessária tal apresentação em um contexto estimulatório do sistema imune, isto é, de maior antigenicidade<sup>54</sup>. BCG é um imunoestimulante inespecífico, cujas propriedades parecem estar relacionadas ao aumento de secreção de IFN- $\gamma$  pelas células de linfonodos que drenam o sítio de inoculação, o que sugere a presença de linfócitos CD8+ CTLs e CD4+ ThLs, células envolvidas na geração de resposta imune celular, além de ativar células dendríticas a produzir citocinas, como TNF- $\alpha$ , que aumentam a sua eficiência de apresentação de antígenos a linfócitos T<sup>55</sup>. BCG tem sido usado com adjuvante de vacinas em tratamentos imunoterápicos para câncer, associado a vacinas autólogas de células tumorais, especialmente em câncer de cólon, de rim, e melanoma<sup>56-59</sup>. Alguns destes estudos sugerem uma maior sobrevida livre de doença e sobrevida total em pacientes que receberam vacina de células tumorais autólogas associada a BCG<sup>56,58,59</sup>. O potencial de otimização da apresentação de antígenos contidos nas células tumorais autólogas por células dendríticas, associado à mobilização de linfócitos T, levou à associação de BCG como adjuvante à vacina autóloga neste protocolo.

Estudos seminais experimentais em animais de laboratório procuraram definir alguns aspectos básicos de um protocolo de vacinação com células autólogas irradiadas associadas a BCG, a fim de induzir resposta imune, tais como o número necessário de células tumorais por dose, o número necessário de células viáveis de BCG como adjuvante, a dose de radiação necessária para esterilizar as células tumorais (evitar divisão celular após sua inoculação), mantendo sua viabilidade (atividade metabólica), e o programa ideal de inoculações (número e intervalo entre inoculações)<sup>60-62</sup>. A partir destes trabalhos, sugeriu-se que uma vacina deveria conter ao menos  $10^7$  células; que a dose de BCG deveria conter  $10^7$  organismos viáveis; que uma dose de radiação de 200 Gy interrompe o ciclo celular, mas mantém a atividade metabólica celular; que ao menos duas inoculações deveriam ser realizadas; e que seria necessária a presença de linfonodos regionais que drenem a área inoculada<sup>63</sup>. As linhas básicas destes estudos ainda são seguidas e evoluíram para estudos em humanos com pequenas modificações nas doses de radiação, esquema de inoculações, número de células por dose, e presença e tipo de adjuvante<sup>56,57,59,64,65</sup>. A via intradérmica para administração de vacinas autólogas, por sua vez, é favorecida pela presença abundante de células de Langerhans, que são as células dendríticas da pele, proporcionando uma população celular adequada para apresentação e processamento dos antígenos expostos pela vacina<sup>31,66</sup>. Estas evidências levaram aos procedimentos de preparo e administração da vacina adotados neste estudo.

Uma dificuldade relacionada a vacinas de células autólogas deriva da impossibilidade eventual de obtenção de tecido tumoral e do esforço pessoal, laboratorial e financeiro envolvidos<sup>45</sup>. Além disso, nem sempre é possível obter o número de células suficiente para produzir a quantidade de doses de vacina disponíveis para aplicação de acordo com o planejamento do estudo<sup>67</sup>. Por essas razões, estudos com o uso de vacinas produzidas a partir

de células alogênicas, derivadas de linhagens celulares de PCa imortalizadas, têm sido realizados<sup>68</sup>. Elas poderiam induzir resposta imune produzindo uma reação de tipo hospedeiro-versus-enxerto (host-versus-graft), já que não apresentam o mesmo haplotipo MHC do paciente, o que determinaria rejeição e destruição das células enxertadas e conseqüente exposição de antígenos tumorais presentes nas mesmas<sup>42,43</sup>. A preocupação quanto à possibilidade de produzir cultura celular primária e doses de vacina planejadas, portanto, é grande. Estudos sugerem que se pode obter cultura celular em cerca de 60% de casos coletados de tumores de diversas etiologias<sup>69</sup>. Em um estudo com vacina autóloga, modificada geneticamente, para carcinoma de pulmão não-pequenas células, produziu-se vacina para 34 de 35 pacientes, mas somente para 5 de 34 em número de  $10^7$  células/dose (o estudo projetava um mínimo de 3 doses)<sup>70</sup>. Com uma vacina autóloga associada a BCG, aplicada a pacientes com neoplasia de cólon, verificou-se produção factível de vacina em 89% dos pacientes (333 de 374) com  $10^7$  células/dose (3 doses)<sup>56</sup>. Em outro estudo com vacina autóloga, irradiada, transfectada com gene codificador de GM-CSF, em pacientes com PCa submetidos a RRP, demonstrou-se obtenção de cultura primária em 73% dos pacientes (8 de 11), mas a expansão celular nesta cultura não possibilitou produção de doses de vacina com número maior de células em alguns pacientes<sup>31</sup>. Finalmente, em um ensaio clínico muito semelhante ao empreendido neste estudo, pacientes com neoplasia de rim foram submetidos a vacinação com células autólogas, expandidas em cultura primária, irradiadas, associadas a adjuvantes (BCG, IFN- $\gamma$ , ou GM-CSF), alcançando-se sucesso na obtenção de cultura primária em 80% dos casos (55 de 69) e produção de vacina em 41 de 55 casos<sup>57</sup>. Neste estudo, produziu-se cultura celular primária em 66% de todos os pacientes (37 de 56). Excluindo-se o grupo RTUP, cujo material foi coletado por ressecção transuretral e no qual a cultura celular se mostrou infactível com o método utilizado, e considerando-se somente o grupo RRP, coletado por cirurgia aberta, obteve-se 74% de cultura celular bem sucedida (37

de 50) (Figura 1). Em todos os pacientes com cultura bem sucedida foi possível expansão celular suficiente para preparar as doses de vacina projetadas. É possível, portanto, obter cultura primária, expansão celular e número suficiente de células para produzir uma vacina de células autólogas, com razoável probabilidade de sucesso em pacientes submetidos a RRP. Curiosamente, foi possível estabelecer cultura primária em um paciente pT0, cujo anatomopatológico não apresentou adenocarcinoma, mas PIN de alto grau difusamente distribuído pela próstata, o que demonstra a possibilidade de cultivo nesta situação<sup>41</sup>.

É interessante citar que, nas primeiras quatro coletas de material por RRP deste estudo, o material foi coletado por um patologista, já que se supunha ser para ele mais fácil a identificação macroscópica do tumor no espécime cirúrgico. Curiosamente, apesar das coletas terem sido realizadas em condições adequadas, todas elas apresentaram contaminação da cultura primária. As coletas subseqüentes foram realizadas por cirurgiões e se obtiveram índices bem menores de contaminação da cultura primária (somente 4 dos 46 pacientes restantes submetidos a RRP). Teve-se, portanto, culturas celulares abortadas por contaminação em 8 de 50 pacientes (16%) submetidos a RRP (Figura 1).

Tinha-se a impressão, antes de iniciar este estudo, que se teria dificuldades em identificar as áreas de neoplasia nos espécimes cirúrgicos de RRP. Felizmente, isto não ocorreu. Em somente 4 dos 13 pacientes em que não houve cultura primária, não foi encontrado tumor no fragmento retirado do material coletado para cultura (Figura 1). Também em um paciente deste grupo de 13 não foi encontrado tumor no espécime cirúrgico ao exame anatomopatológico convencional (pT0), apesar de a revisão das lâminas da biópsia pré-operatória confirmar a presença de neoplasia. Com base nos dados de toque retal e biópsia pré-operatória, associados à palpação e cortes cuidadosos da peça cirúrgica, foi possível

identificar as porções da próstata afetadas por tumor, eventualmente com alguma dificuldade em próstatas com grande componente de hiperplasia, em 45 de 50 pacientes (90%). Acredita-se que a seleção dos pacientes ( $PSA \geq 10$ ) tenha favorecido este resultado.

Neste estudo, não foi possível estabelecer cultura primária em pacientes submetidos a RTUP. Nos 6 casos (100%), verificou-se que o método utilizado não foi bem sucedido e desistiu-se de continuar coletando amostras naquela situação. Em dois pacientes a coleta foi inadequada, pois não foi demonstrado tumor no fragmento encaminhado para exame anatomopatológico. As evidências visuais para localizar a neoplasia em espécimes de RRP, obviamente não podem ser utilizadas em amostras derivadas de RTUP. Nos outros 4 casos, a coleta foi adequada, já que foi evidenciada neoplasia no fragmento encaminhado para anatomopatológico retirado do material mandado para cultura, mas houve algum crescimento celular por somente sete a dez dias, seguido de morte celular. As dificuldades de coleta de material por RTUP são reconhecidas e podem ser explicadas pelo artefato causado pela corrente elétrica e pela freqüente coleta de tecido composto por estroma prostático e/ou hiperplasia benigna, que coexistem com o tecido neoplásico<sup>71</sup>. Entretanto, é possível cultivar material coletado por RTUP<sup>72</sup>. É provável que o uso de corrente de corte de menor voltagem, de cautério bipolar, e de soluções isosmóticas para irrigação, possa facilitar a manutenção da integridade tecidual para coleta de material, com a finalidade de estabelecer cultura celular primária. Não foi possível, portanto, avaliar esta vacina em pacientes com doença metastática volumosa (M+).

A avaliação da resposta a um tratamento antineoplásico é fundamental para que se associe o tratamento ministrado a algum desfecho clínico importante em oncologia, como diminuição de um marcador tumoral, regressão de lesões, ou aumento de sobrevida. No caso

de imunoterapia antineoplásica, um desfecho intermediário seria a demonstração de resposta imune a antígenos tumorais, pois intui-se que tal resposta deva ser pré-condição para desfechos clínicos como os citados acima<sup>73</sup>. Diversos ensaios existem para a determinação, monitoração e quantificação de resposta linfocitária, e podem ser classificados em medidas funcionais *in vivo* (que sugerem presença ou ausência de resposta linfocitária), ensaios fenotípicos *in vitro* (que quantificam a resposta do linfócito específico imunoreativo), e ensaios funcionais *in vitro* (que quantificam indiretamente a resposta linfocitária)<sup>74</sup>. Um teste funcional *in vivo*, a reação de hipersensibilidade de tipo retardado (DTH), é freqüentemente registrado em estudos com imunoterapia, apesar de suas subjetividade e falta de padronização. Reações DTH acima de 5 ou 10 mm são normalmente utilizadas para atestar a presença de resposta imune celular<sup>58</sup>. A presença de uma reação DTH também parece correlacionar com testes *in vitro* de resposta linfocitária, podendo ser considerada um preditor de imunidade periférica por linfócitos T<sup>75</sup>. De fato, biópsias dos sítios de reações DTH demonstram presença de infiltrado celular linfocitário (CTLs, ThLs, células dendríticas, eosinófilos e outros), o que denota mobilização e ativação imunológica<sup>31,67,76</sup>. Estudos também sugerem que testes DTH positivos sejam preditores de resposta e sobrevida em imunoterapia anticâncer, especialmente para melanoma<sup>58,77-79</sup>. Neste estudo, verificaram-se reações DTH  $\geq$  5 mm em 6 pacientes e  $\geq$  10 mm em 2 pacientes (Tabela 3). Acredita-se que tais reações sugiram mobilização imunológica nestes pacientes, baseados nos estudos referenciados acima. No entanto, seria importante avaliar tal resposta com testes mais objetivos de resposta imune. Em dois pacientes observaram-se reações DTH  $<$  5 mm e em um paciente não se observou resposta em nenhuma das inoculações (Tabela 3).

A imensa maioria dos estudos com imunoterapia ativa específica em PCa, utilizando as mais diversas estratégias de imunização, demonstra a adequada segurança e a baixa



toxicidade deste tipo de terapia. Isto deriva da própria natureza do tratamento, que procura induzir citotoxicidade específica para células tumorais por meio da mobilização de defesas próprias do organismo, isto é, destruição de células tumorais por CTLs que reconheçam especificamente células que expressem antígenos únicos<sup>80</sup>. Reações auto-imunes, no entanto, têm potencial de ocorrer, já que células normais, não tumorais, podem expressar antígenos semelhantes. Um exemplo claro deste fenômeno é o aparecimento de vitiligo em pacientes com melanoma que respondem a imunoterapia<sup>18</sup>. Este estudo corrobora as observações de baixa toxicidade de vacinas celulares<sup>58,64,67,68</sup>. Observaram-se reações cutâneas autolimitadas nos sítios de inoculação como eritema, endureção e prurido, em todos os 11 pacientes vacinados e em um paciente houve ulceração no sítio inoculado (Tabela 4). Dois pacientes apresentaram febre transitória e desenvolveram adenopatia que também regrediu em poucos dias (Tabela 4). Estas reações cutâneas mais intensas, como ulceração, e as reações sistêmicas, como adenopatia e febre, ocorreram nas aplicações das duas primeiras doses de vacina, as quais continham BCG. Tais reações foram observadas em outros estudos com vacina autóloga que utilizaram BCG como adjuvante e normalmente são autolimitadas, não impedindo a continuação do tratamento<sup>59</sup>. Não foi observada alteração em testes hematológicos, renais e hepáticos.

Diversos estudos de imunoterapia em PCa têm demonstrado diminuição transitória ou estabilização dos níveis de PSA<sup>34,36,38,81</sup>. Entretanto, é muitas vezes difícil atribuir estas respostas ao tratamento em si, já que a variabilidade nos níveis de PSA é observada freqüentemente no curso da história natural da doença.

Em cinco (MRS, JaB, OAC, AAS, APS) dos 11 pacientes vacinados, foi instituído bloqueio hormonal pela equipe responsável pela cirurgia (Figuras 3, 4, 5, 6 e 9). Em quatro

deles (JaB, OAC, AAS, APS), por possuírem metástases ganglionares detectadas após a cirurgia (Tabela 2) e em um (MRS), por apresentar nadir pós-operatório de 0,18, com elevação posterior (Figura 3), além de possuir um tumor agressivo Gleason 9 (Tabela 2). Dos quatro pacientes N+, todos apresentavam invasão das vesículas seminais e três apresentavam tumor Gleason 9 (JaB, OAC, AAS), o que atesta o prognóstico reservado associado a estes fatores<sup>82,83</sup>. De fato, um destes pacientes (OAC), desenvolveu metástases ósseas cerca de dois anos após a cirurgia e vacinação (Figura 5). Obviamente, é muito difícil analisar algum efeito do protocolo de vacinação sobre a evolução da doença nestes pacientes.

Seis pacientes vacinados receberam somente a vacina após a cirurgia (PPL, AI, JoB, ASO, RC, RG). Dois pacientes (AI e RC), um com invasão de vesículas seminais (pT3b) e outro com extensão tumoral ao esfíncter externo e limite cirúrgico comprometido neste nível (pT4a) (Tabela 2), apresentaram evolução do PSA com níveis próximos de zero (Figuras 7 e 11). É bastante provável que estes pacientes tenham sido adequadamente tratados somente com a cirurgia. Pode-se conjecturar, entretanto, alguma associação entre o tratamento com a negatificação do PSA, em vista de que certos estudos sugerem que a resposta a tratamento imunoterápico possa ser melhor em pacientes que apresentam tumores com escore de Gleason  $\leq 7$ , caso de ambos os pacientes<sup>39</sup>. Deve-se ressaltar que o paciente AI desenvolveu reações DTH  $\geq 5$  mm, enquanto que o paciente RC desenvolveu respostas  $< 5$  mm, o que sugere inadequada ativação imune (Tabela 3). Três pacientes (PPL, ASO, RG) evoluíram com valores de PSA  $\leq 0,4$ , o que, para alguns autores, constitui o valor de corte para definição de recidiva bioquímica<sup>84</sup>. Um deles (RG) apresentou curva estabilizada do PSA (Figura 12) e os outros dois evoluíram com discreta elevação (Figuras 2 e 10). Os pacientes PPL e ASO apresentaram reações DTH  $\geq 5$  mm, enquanto que o paciente RG não demonstrou qualquer resposta deste tipo (Tabela 3). O paciente JoB, que apresentava PSA pré-operatório  $> 50$ ,

apresentou evolução progressiva do PSA até 4,0 na última dosagem (Figura 8). Este paciente demonstrou reações DTH < 5 mm (Tabela 3). Não é possível estabelecer alguma associação entre a vacinação e a evolução da doença, medida pelo PSA, em um número tão pequeno de casos e com seguimento tão curto. Pensa-se, no entanto, que, em vista da geração de reações DTH na maior parte dos pacientes e da evolução aceitável dos níveis de PSA em alguns destes pacientes, que pertencem a um grupo de alto risco para progressão após cirurgia, seria interessante avaliar esta vacina em um número maior de casos.

Imunoterapia para PCa tem evoluído e, talvez, constitua parte do armamentário do tratamento deste tumor ao lado de cirurgia, radioterapia e quimioterapia. É possível que sua aplicação seja mais indicada em situações de baixo volume tumoral, como, por exemplo, em pacientes com fatores prognósticos adversos e com maiores chances de recorrência da doença<sup>23,85</sup>. De certo modo, o PCa representa um contexto de doença favorável para avaliação de tratamentos imunoterápicos experimentais, pela possibilidade de monitorização com um marcador confiável (PSA) e pelo fato da próstata ser um órgão “dispensável”, já que não é essencial à vida, não sendo problemáticos eventuais paraefeitos secundários a autoimunidade<sup>86</sup>.

## CONCLUSÃO

Imunoterapia para tratamento de PCa representa uma nova abordagem desta doença. Os resultados até o momento são pobres, mas podem ser explicados, em parte, pela realização da maioria dos estudos em pacientes com doença avançada, hormônio-refratária e de grande volume. O tratamento imunoterápico, num contexto de doença residual mínima, vem ao encontro de novas tendências em oncologia que procuram associar as diversas modalidades de tratamento antitumoral (cirurgia, radioterapia e quimioterapia)<sup>19,45</sup>. Apesar do pequeno

---

número de casos, este estudo sugere que a vacina com células tumorais autólogas expandidas em cultura primária, tratadas com IFN- $\alpha$ 2b, irradiadas e imunomodulada com BCG, é segura, apresentando efeitos adversos limitados aos sítios de inoculação, além de parecer induzir resposta imune celular, medida por DTH. Demonstra-se também a possibilidade de se estabelecer cultura primária de células tumorais na maioria dos pacientes submetidos a RRP, e a impossibilidade de se estabelecer cultura primária de amostras de pacientes submetidos a RTUP com o método utilizado. Estudos com maior número de pacientes e maior tempo de seguimento são necessários para comprovar estes achados e, especialmente, avaliar o impacto sobre a doença.

**REFERÊNCIAS**

1. WHO (World Health Organization) and IARC (International Association for Research on Cancer). GLOBOCAN 2002. Disponível em <http://www-dep.iarc.fr/> (acesso em março de 2005).
2. Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. *BJU Int*, 90(2): 174-84, 2002.
3. Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW. Prostate specific antigen: a decade of discovery – what we have learned and where we are going. *J Urol*, 162(2): 293-306, 1999.
4. INCA (Instituto Nacional do Câncer). Disponível em <http://inca.gov.br/> (acesso em março de 2005).
5. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer Statistics, 2005. *CA Cancer J Clin*, 55: 10-30, 2005.
6. Cooperberg MR, Lubeck DP, Meng MV, Mehta SS, Carroll PR. The changing face of low-risk prostate cancer: trends in clinical presentation and primary management. *J Clin Oncol*, 22(11): 2141-9, 2004.
7. Hull GW, Rabbani F, Abbas F, Wheller TM, Kattan MW, Scardino PT. Cancer control with radical prostatectomy alone in 1,000 consecutive patients. *J Urol*, 167: 528-534, 2002.
8. Han M, Partin AW, Pound CR, Epstein JI, Walsh PC. Long-term biochemical disease-free and cancer-specific survival following anatomic radical retropubic prostatectomy. The 15-year Johns Hopkins experience. *Urol Clin North Am*, 28(3): 555-65, 2001.
9. Catalona WJ, Smith DS. Cancer recurrence and survival rates after anatomic radical prostatectomy for prostate cancer: intermediate-term results. *J Urol*, 160(6 pt 2): 2428-34, 1998.
10. Roehl KA, Han M, Ramos CG, Antenor JAV, Catalona WJ. Cancer progression and survival rates following anatomical radical retropubic prostatectomy in 3,478 consecutive patients: long-term results. *J Urol*, 172(3): 910-4, 2004.
11. Kupelian PA, Potters L, Khuntia D, Ciezki JP, Reddy CA, Reuther AM, Carlson TP, Klein EA. Radical prostatectomy, external beam radiotherapy < 72 Gy, external beam radiotherapy > or = 72 Gy, permanent seed implantation, or combined seeds/external beam radiotherapy for T1-T2 prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 58(1): 25-33, 2004.
12. Han M, Partin AW, Zahurak M, Piantadosi S, Epstein JI, Walsh PC. Biochemical (prostate specific antigen) recurrence probability following radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *J Urol*, 169(2): 517-23, 2003.
13. Moul JW. Prostate specific antigen only progression of prostate cancer. *J Urol*, 163(6): 1632-42, 2000.

14. Touma NJ, Izawa JI, Chin JL. Current status of local salvage therapies following radiation failure for prostate cancer. *J Urol*, 173(2): 373-9, 2005.
15. Coen JJ, Zietman AL, Thakral H, Shipley WU. Radical radiation for localized prostate cancer: local persistence of disease results in a late wave of metastases. *J Clin Oncol*, 20(15): 3199-205, 2002.
16. Tangen CM, Faulkner JR, Crawford ED, Thompson IM, Hirano D, Eisenberger M, Hussain M. Ten-year survival in patients with metastatic prostate cancer. *Clin Prostate Cancer*, 2(1): 41-5, 2003.
17. Cho D, Di Blasio CJ, Rhee AC, Kattan MW. Prognostic factors for survival in patients with hormone-refractory prostate cancer (HRPC) after initial androgen deprivation therapy (ADT). *Urol Oncol*, 21(4): 282-91, 2003.
18. Rosenberg SA. Development of effective immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *J Am Coll Surg*, 198(5): 685-96, 2004.
19. Yannelli JR, Wroblewski JM. On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy. *Vaccine*, 23(1): 97-113, 2004.
20. Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature*, 411(6835): 380-4, 2001.
21. Jager E, Jager D, Knuth A. CTL-defined cancer vaccines: perspectives for active immunotherapeutic interventions in minimal residual disease. *Cancer Metastasis Rev*, 18(1): 143-50, 1999.
22. Renkvist N, Castelli C, Robbins PF, Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother*, 50(1): 3-15, 2001.
23. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol*, 2(4): 293-9, 2001.
24. Shu S, Plautz GE, Krauss JC, Chang AE. Tumor Immunology, *JAMA*, 278(22): 1972-81, 1997.
25. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med*, 10(9): 909-15, 2004.
26. Kaminski JM, Summers JB, Ward MB, Huber MR, Minev B. Immunotherapy and prostate cancer. *Cancer Treat Ver*, 29(3): 199-209, 2003.
27. Pantuck AJ, Zisman A, Henderson D, Wilson D, Schreiber A, Belldegrun A. New biologicals for prostate cancer prevention: genes, vaccines, and immune-based interventions. *Urology*, 57(4 Suppl 1): 95-9, 2001.
28. Rini BI, Small EJ. The potential for prostate cancer immunotherapy. *Crit Rev Oncol Hematol*, 46 Suppl: S117-25, 2003.

29. Murphy G, Tjoa B, Ragde H, Kenny G, Boynton A. Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate*, 29(6): 371-80, 1996.
30. Meredith RF, Khazaeli MB, Macey DJ, Grizzle WE, Mayo M, Schlom J, Russell CD, LoBuglio AF. Phase II study of interferon-enhanced <sup>131</sup>I-labeled high affinity CC49 monoclonal antibody therapy in patients with metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 5(10 Suppl): 3254s-3258s, 1999.
31. Simons JW, Mikhak B, Chang JF, DeMarzo AM, Carducci MA, Lim M, Weber CE, Baccala AA, Goemann MA, Clift SM, Ando DG, Levitsky HI, Cohen LK, Sanda MG, Mulligan RC, Partin AW, Carter HB, Piantadosi S, Marshall FF, Nelson WG. Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer. *Cancer Res*, 59(20): 5160-8, 1999.
32. Meidenbauer N, Harris DT, Spitler LE, Whiteside TL. Generation of PSA-reactive effector cells after vaccination with a PSA-based vaccine in patients with prostate cancer. *Prostate*, 43(2): 88-100, 2000.
33. Burch PA, Breen JK, Buckner JC, Gastineau DA, Kaur JA, Laus RL, Padley DJ, Peshwa MV, Pitot HC, Richardson RL, Smits BJ, Sopapan P, Strang G, Valone FH, Vuk-Pavlovic S. Priming tissue-specific cellular immunity in a phase I trial of autologous dendritic cells for prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 6(6): 2175-82, 2000.
34. Small EJ, Fratesi P, Reese DM, Strang G, Laus R, Peshwa MV, Valone FH. Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. *J Clin Oncol*, 18(23): 3879-82, 2000.
35. Mincheff M, Tchakarov S, Zoubak S, Loukinov D, Botev C, Altankova I, Georgiev G, Petrov S, Meryman HT. Naked DNA and adenoviral immunizations for immunotherapy of prostate cancer: a phase I/II clinical trial. *Eur Urol*, 38(2): 208-17, 2000.
36. Fong L, Brockstedt D, Benike C, Breen JK, Strang G, Ruegg CL, Engleman EG. Dendritic cell-based xenoantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy. *J Immunol*, 167(12): 7150-6, 2001.
37. Gulley J, Chen AP, Dahut W, Arlen PM, Bastian A, Steinberg SM, Tsang K, Panicali D, Poole D, Schlom J, Michael Hamilton J. Phase I study of a vaccine using recombinant vaccinia virus expressing PSA (rV-PSA) in patients with metastatic androgen-independent prostate cancer. *Prostate*, 53(2): 109-17, 2002.
38. Freytag SO, Khil M, Stricker H, Peabody J, Menon M, DePeralta-Venturina M, Nafziger D, Pegg J, Paielli D, Brown S, Barton K, Lu M, Aguilar-Cordova E, Kim JH. Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer. *Cancer Res*, 62(17): 4968-76, 2002.
39. Schellhammer PF, Hershberg RM. Immunotherapy with autologous antigen presenting cells for the treatment of androgen independent prostate cancer. *World J Urol*, 23(1): 47-9, 2005.

40. Saffran DC, Reiter RE, Jakobovits A, Witte ON. Target antigens for prostate cancer immunotherapy. *Cancer Metastasis Rev*, 18(4): 437-49, 1999.
41. Peehl DM. Primary cell cultures as models of prostate cancer developments. *Endocr Relat Cancer*, 12(1): 19-47, 2005.
42. Ward S, Casey D, Labarthe MC, Whelan M, Dalglish A, Pandha H, Todryk S. Immunotherapeutic potential of whole tumour cells. *Cancer Immunol Immunother*, 51(7): 351-7, 2002.
43. Havranek EG, Whelan MA, Greenhalgh R, Dalglish AG, Pandha H. Advances in prostate cancer immunotherapy. *Surg Oncol*, 11(1-2):35-45, 2002.
44. Mitchell MS. Cancer vaccines, a critical review – Part I. *Curr Opin Investig Drugs*, 3(1): 140-9, 2002.
45. Berzofsky JA, Terabe M, Oh S, Belyakov IM, Ahlers JD, Janik JE, Morris JC. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J Clin Invest*, 113(11): 1515-25, 2004.
46. Alving CR. Design and selection of vaccine adjuvants: animal models and human trials. *Vaccine*, 20 Suppl 3: S56-64, 2002.
47. Partin W, Oesterling JE. The clinical usefulness of prostate specific antigen: update 1994. *J Urol*, 152(5 Pt 1): 1358-68, 1994.
48. Partin AW, Carter HB, Chan DW, Epstein JI, Oesterling JE, Rock RC, Weber JP, Walsh PC. Prostate specific antigen in the staging of prostate cancer: influence of tumor differentiation, tumor volume and benign hyperplasia. *J Urol*, 143(4): 747-52, 1990.
49. Partin AW, Kattan MW, Subong EM, Walsh PC, Wojno KJ, Oesterling JE, Scardino PT, Pearson JD. Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. A multi-institutional update. *JAMA*, 277(18): 1445-51, 1997.
50. Kattan MW, Eastham JA, Stapleton AM, Wheeler TM, Scardino PT. A preoperative nomogram for disease recurrence following radical prostatectomy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 90(10): 766-71, 1998.
51. Huston DP. The biology of the immune system. *JAMA*, 278(22): 1804-14, 1997.
52. Belardelli F, Ferrantini M, Proietti E, Kirkwood JM. Interferon-alpha in tumor immunity and immunology. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13(2): 119-34, 2002.
53. Huber CH, Wolfel T. Immunotherapy of cancer: from vision to standard clinical practice. *J Cancer Res Clin Oncol*, 130(7): 367-74, 2004.
54. Mocellin S, Rossi CR, Nitti D. Cancer vaccine development: on the way to break immune tolerance to malignant cells. *Exp Cell Res*, 299(2): 267-78, 2004.



55. Li Q, Normolle DP, Sayre DM, Zeng X, Sun R, Jiang G, Redman BD, Chang AE. Immunological effects of BCG as an adjuvant in autologous tumor vaccines. *Clin Immunol*, 94(1): 64-72, 2000.
56. Harris JE, Ryan L, Hoover HC Jr, Stuart RK, Oken MM, Benson AB 3rd, Mansour E, Haller DG, Manola J, Hanna MG Jr. Adjuvant active specific immunotherapy for stage II and III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: Eastern Cooperative Oncology Group Study E5283. *J Clin Oncol*, 18(1): 148-57, 2000.
57. Dillman RO, Barth NM, VanderMolen LA, Garfield DH, De Leon C, O'Connor AA, Mahdavi K, Nayak SK. Treatment of kidney cancer with autologous tumor cell vaccines of short-term cell lines derived from renal cell carcinoma. *Cancer Biother Radiopharm*, 16(1): 47-54, 2001.
58. Berd D, Sato T, Maguire HC Jr, Kairys J, Mastrangelo MJ. Immunopharmacologic analysis of an autologous, hapten-modified human melanoma vaccine. *J Clin Oncol*, 22(3): 403-15, 2004.
59. Vermorken JB, Claessen AM, van Tinteren H, Gall HE, Ezinga R, Meijer S, Scheper RJ, Meijer CJ, Bloemena E, Ransom JH, Hanna MG Jr, Pinedo HM. Active specific immunotherapy for stage II and III human colon cancer: a randomised trial. *Lancet*, 353(9150): 345-50, 1999.
60. Peters LC, Brandhorst JS, Hanna MG Jr. Preparation of immunotherapeutic autologous tumor cell vaccines from solid tumors. *Cancer Res*, 39(4): 1353-60, 1979.
61. Hanna MG Jr, Brandhorst JS, Peters LC. Active specific immunotherapy of residual micrometastasis: an evaluation of sources, doses and ratios of BCG with tumor cells. *Cancer Immunol Immunother*, 7: 165-73, 1979.
62. Peters LC, Hanna MG Jr. Active specific immunotherapy of established micrometastasis: effect of cryopreservation procedures on tumor cell immunogenicity in guinea pigs. *J Natl Cancer Inst*, 64(6): 1521-5, 1980.
63. Hoover HC Jr, Surdyke MG, Dangel RB, Peters LC, Hanna MG Jr. Prospectively randomized trial of adjuvant active-specific immunotherapy for human colorectal cancer. *Cancer*, 55(6): 1236-43, 1985.
64. Galligioni E, Quaia M, Merlo A, Carbone A, Spada A, Favaro D, Santarosa M, Sacco C, Talamini R. Adjuvant immunotherapy treatment of renal carcinoma patients with autologous tumor cells and bacillus Calmette-Guerin: five-year results of a prospective randomized study. *Cancer*, 77(12): 2560-6, 1996.
65. Jocham D, Richter A, Hoffmann L, Iwig K, Fahlenkamp D, Zakrzewski G, Schmitt E, Dannenberg T, Lehmacher W, von Wietersheim J, Doehn C. Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial. *Lancet*, 363(9409): 594-9, 2004.
66. Hanna MG Jr, Hoover HC Jr, Vermorken JB, Harris JE, Pinedo HM. Adjuvant active specific immunotherapy of stage II and stage III colon cancer with an autologous tumor

- cell vaccine: first randomized phase III trials show promise. *Vaccine*, 19(17-19): 2576-82, 2001.
67. Nelson WG, Simons JW, Mikhak B, Chang JF, DeMarzo AM, Carducci MA, Kim M, Weber CE, Baccala AA, Goeman MA, Clift SM, Ando DG, Levitsky HI, Cohen LK, Sanda MG, Mulligan RC, Partin AW, Carter HB, Piantadosi S, Marshall FF. Cancer cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer as vaccines for the treatment of genitourinary malignancies. *Cancer Chemoter Pharmacol*, 46 Suppl: S67-72, 2000.
  68. Eaton JD, Perry MJ, Nicholson S, Guckian M, Russell N, Whelan M, Kirby RS. Allogeneic whole-cell vaccine: a phase I/II study in men with hormone-refractory prostate cancer. *BJU Int*, 89(1): 19-26, 2002.
  69. Dillman RO, Nayak SK, Beutel L. Establishing in vitro cultures of autologous tumor cells for use in active specific immunotherapy. *J Immunother*, 14(1): 65-9, 1993.
  70. Salgia R, Lynch T, Skarin A, Lucca J, Lynch C, Jung K, Hodi FS, Jaklitsch M, Mentzer S, Swanson S, Lukanich J, Bueno R, Wain J, Mathisen D, Wright C, Fidias P, Donahue D, Clift S, Hardy S, Neuberg D, Mulligan R, Webb I, Sugarbaker D, Mihm M, Dranoff G. Vaccination with irradiated autologous tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments antitumor immunity in some patients with metastatic non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol*, 21(4): 624-30, 2003.
  71. Clarke SM, Merchant DJ. Primary cultures of human prostatic epithelial cell from transurethral resection specimens. *Prostate*, 1(1): 87-94, 1980.
  72. Konig JJ, Teubel W, Karnst E, Romijn JC, Schroder FH, Hagemeyer A. Cytogenetic analysis of 39 prostate carcinomas and evaluation of short-term tissue culture techniques. *Cancer Genet Cytogenet*, 101(2): 116-22, 1998.
  73. Lodge PA, Jones LA, Bader RA, Murphy GP, Salgaller ML. Dendritic cell-based immunotherapy of prostate cancer: immune monitoring of a phase II clinical trial. *Cancer Res*, 60(4): 829-33, 2000.
  74. Clay TM, Hobeika AC, Mosca PJ, Lyerly HK, Morse MA. Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer. *Clin Cancer Res*, 7(5): 1127-35, 2001.
  75. Disis ML, Schiffman K, Gooley TA, McNeel DG, Rinn K, Knutson KL. Delayed-type hypersensitivity response is a predictor of peripheral blood T-cell immunity after HER-2/neu peptide immunization. *Clin Cancer Res*, 6(4): 1347-50, 2000.
  76. Pandha HS, John RJ, Hutchinson J, James N, Whelan M, Corbishley C, Dalglish AG. Dendritic cell immunotherapy for urological cancers using cryopreserved allogeneic tumour lysate-pulsed cells: a phase I/II study. *BJU Int*, 94(3): 412-8, 2004.
  77. Baars A, Claessen AM, van den Eertwegh AJ, Gall HE, Stam AG, Meijer S, Giaccone G, Meijer CJ, Scheper RJ, Wagstaff J, Vermorken JB, Pinedo HM. Skin tests predict survival after autologous tumor cell vaccination in metastatic melanoma: experience in 81 patients. *Ann Oncol*, 11(8): 965-70, 2000.

78. Lotem M, Peretz T, Drize O, Gimmon Z, Ad El D, Weitzen R, Goldberg H, Ben David I, Prus D, Hamburger T, Shiloni E. Autologous cell vaccine as a post operative adjuvant treatment for high-risk melanoma patients (AJCC stages III and IV). *Br J Cancer*, 86(10): 1534-9, 2002.
79. Hsueh EC, Gupta RK, Qi K, Morton DL. Correlation of specific immune responses with survival in melanoma patients with distant metastases receiving polyvalent melanoma cell vaccine. *J Clin Oncol*, 16(9): 2913-20, 1998.
80. Nencioni A, Grunebach F, Patrone F, Brossart P: Anticancer vaccination strategies. *Ann Oncol*, 15(suppl 4): iv153-60, 2004.
81. Tjoa BA, Lodge PA, Salgaller ML, Boynton AL, Murphy GP. Dendritic cell-based immunotherapy for prostate cancer. *CA Cancer J Clin*, 49(2): 117-28, 1999.
82. Kattan MW, Wheeler TM, Scardino PT. Postoperative nomogram for disease recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. *J Clin Oncol*, 17(5): 1499-507, 1999.
83. Blute ML, Bergstralh EJ, Iocca A, Scherer B, Zincke H. Use of Gleason score, prostate specific antigen, seminal vesicle and margin status to predict biochemical failure after radical prostatectomy. *J Urol*, 165(1): 119-25, 2001).
84. Amling CL, Bergstralh EJ, Blute ML, Slezak JM, Zincke H. Defining prostate specific antigen progression after radical prostatectomy: what is the most appropriate cut point? *J Urol*, 165(4): 1146-51, 2001.
85. Bocchia M, Bronte V, Colombo MP, de Vicentiis A, di Nicola M, Forni G, Lanata L, Lemoli RM, Massaia M, Rondelli D, Zanon P, Tura S. Antitumor vaccination : where we stand. *Haematologica*, 85(11): 1172-206, 2000.
86. Scardino PT, Eastham JA, Pollack A, Sartor AO. Treatment of organ confined, locally advanced and metastatic prostate cancer (course). AUA Annual Meeting, San Francisco, 2004.

Tabela 1: Características dos grupos TURP e RRP

		<i>Média</i>	<i>Mediana</i>	<i>Variação</i>
<b>RTUP</b> n = 6	<i>idade</i>	<b>73</b>	<b>73</b>	<b>67 - 78</b>
	<i>PSA pré-op</i>	<b>269</b>	<b>195</b>	<b>109 – 500</b>
	<i>escore Gleason</i>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>8 – 10</b>
	<i>TNM</i>	<b>T2-4 Nx M1</b>		
<b>RRP</b> n = 50	<i>idade</i>	<b>66</b>	<b>67</b>	<b>43 – 79</b>
	<i>PSA pré-op</i>	<b>18,1</b>	<b>15,6</b>	<b>8,05 – 52,5</b>
	<i>escore Gleason</i>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>6 – 9</b>
	<i>cTNM</i>	<b>T1c (19), T2 (31)</b>		
	<i>pTNM</i>	<b>T0 (2), T2 (16), T3 (30), T4 (2) N+ (5)</b>		

Tabela 2: Características relevantes dos pacientes vacinados

<b>Iniciais</b>	<b>Idade</b>	<b>PSA pre-op</b>	<b>pTNM</b>	<b>Escore Gleason</b>
<i>PPL</i>	68	15,8	T3a N0	7 (3+4)
<i>MRS</i>	70	27,9	T3a N0	9 (5+4)
<i>JaB</i>	68	22,0	T3b N1	9 (5+4)
<i>OAC</i>	63	19,5	T3b N1	9 (5+4)
<i>AAS</i>	68	18,4	T3b N1	9 (5+4)
<i>AI</i>	65	23,4	T3b N0	6 (3+3)
<i>JoB</i>	69	52,5	T3a N0	7 (3+4)
<i>APS</i>	68	13,0	T3b N1	7 (4+3)
<i>ASO</i>	68	20,0	T3b N0	6 (3+3)
<i>RC</i>	47	24,5	T4a N0	7 (3+4)
<i>RG</i>	66	27,1	T3b N0	7 (4+3)

Tabela 3: Medidas (mm) das reações DTH (enduração) obtidas nos 11 pacientes vacinados\*

<b>Iniciais</b>	<b>DTH 1<sup>a</sup></b>	<b>DTH 2<sup>a</sup></b>	<b>DTH 3<sup>a</sup></b>	<b>DTH 4<sup>a</sup></b>	<b>DTH 5<sup>a</sup></b>
<i>PPL</i>	6	6	5	7	5
<i>MRS</i>	6	5	6	6	5
<i>JaB</i>	7	6	7	6	6
<i>OAC</i>	4	5	6	6	6
<i>AAS</i>	15	4	0	2	4
<i>AI</i>	5	6	5	6	
<i>JoB</i>		0		4	2
<i>APS</i>	25	0	0	0	0
<i>ASO</i>	6	4	3		
<i>RC</i>	0	4	2	4	0
<i>RG</i>	0	0	0	0	0

\*Espaços em branco representam dados em falta.

Tabela 4: Efeitos adversos

<b>Efeitos adversos</b>	<b>Número de pacientes</b>
eritema	11
enduração	11
prurido	11
ulceração	1
Adenopatia regional	2
febre	2

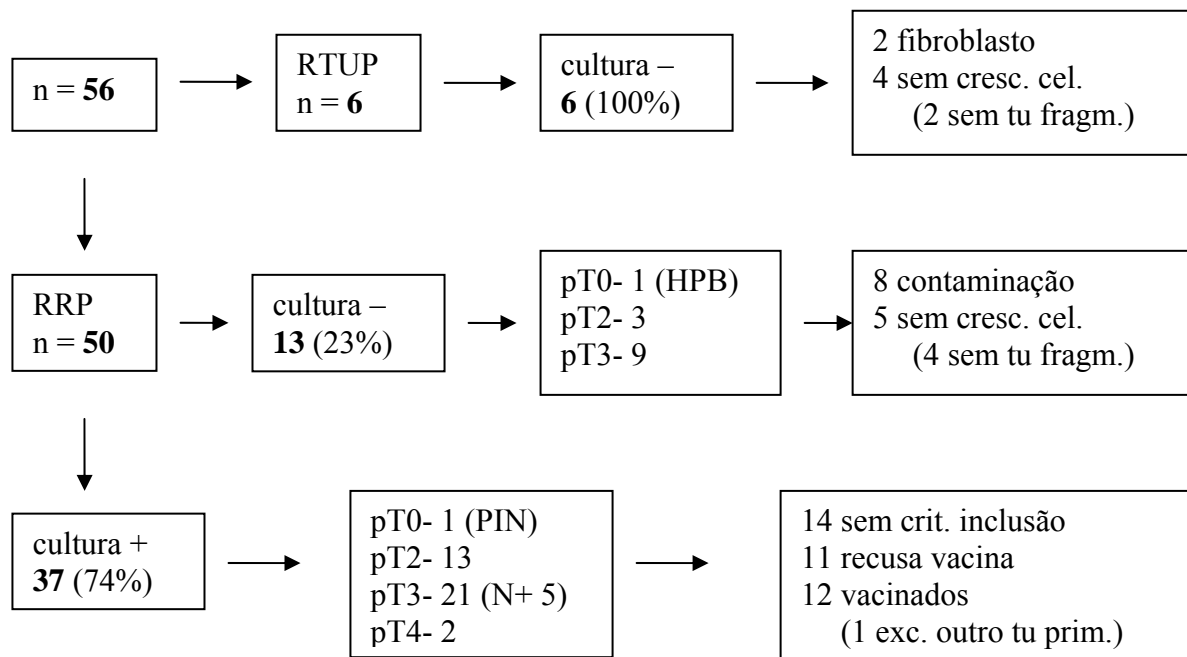


Figura 1: Resultados da cultura celular de acordo com o método de coleta

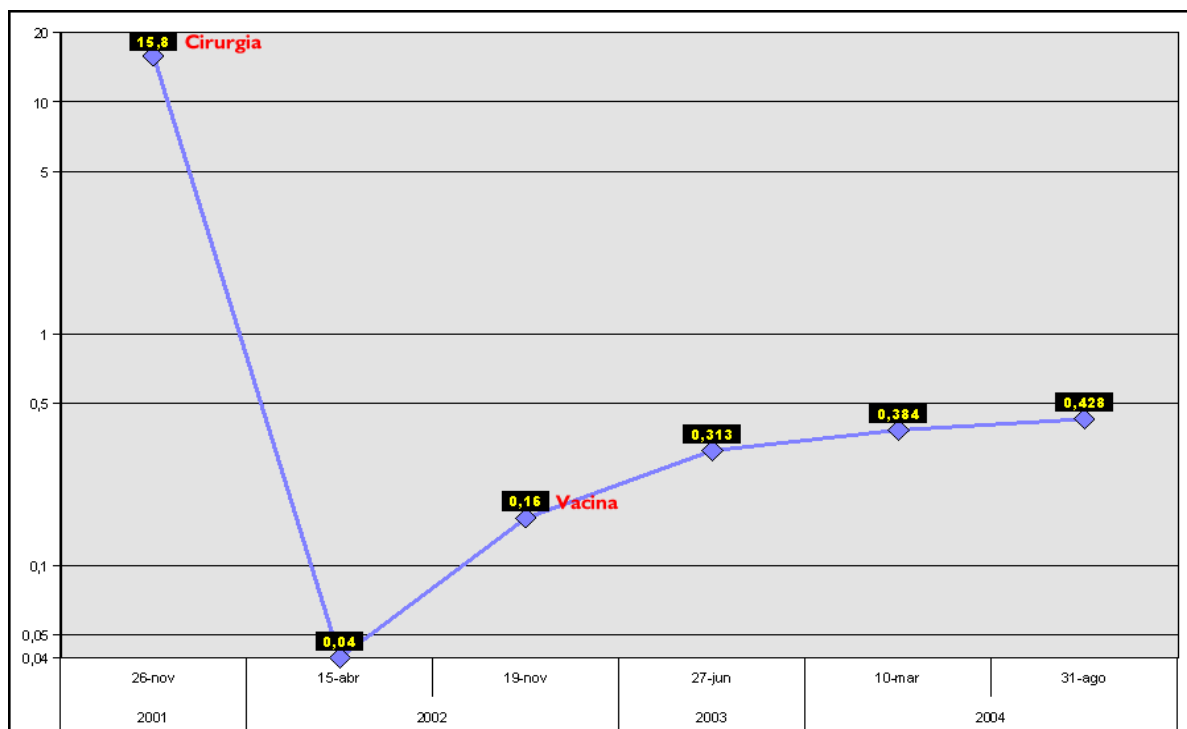
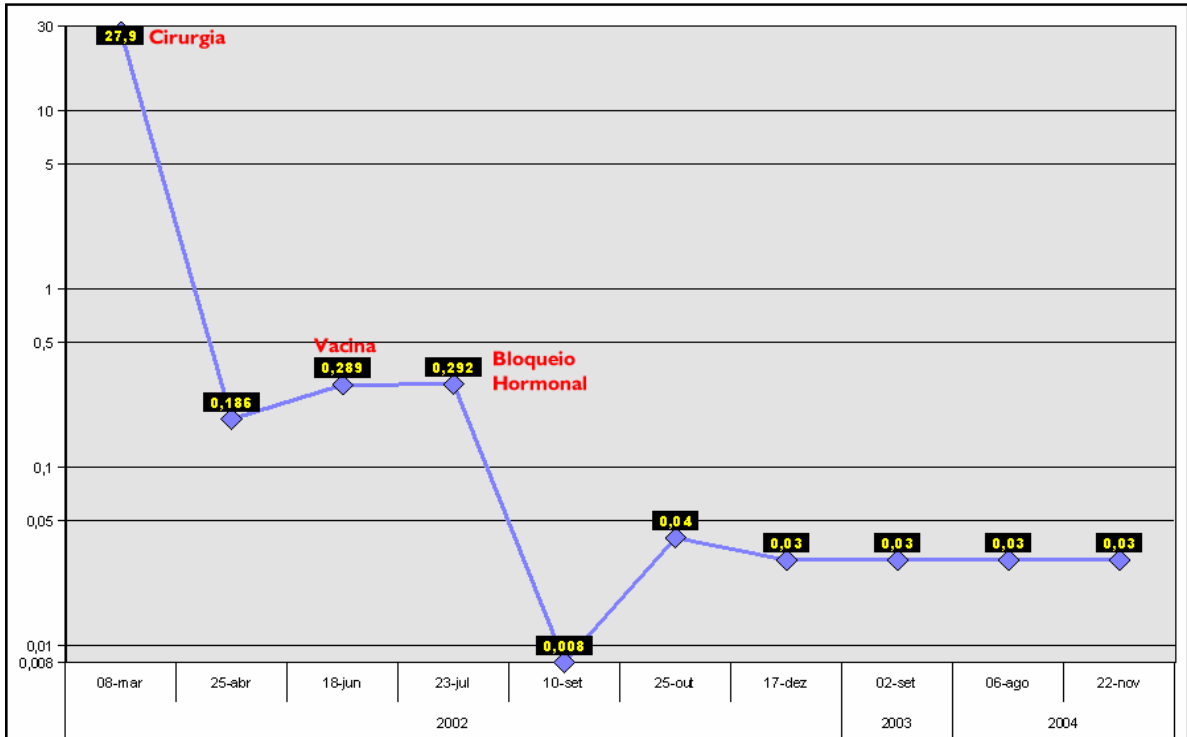


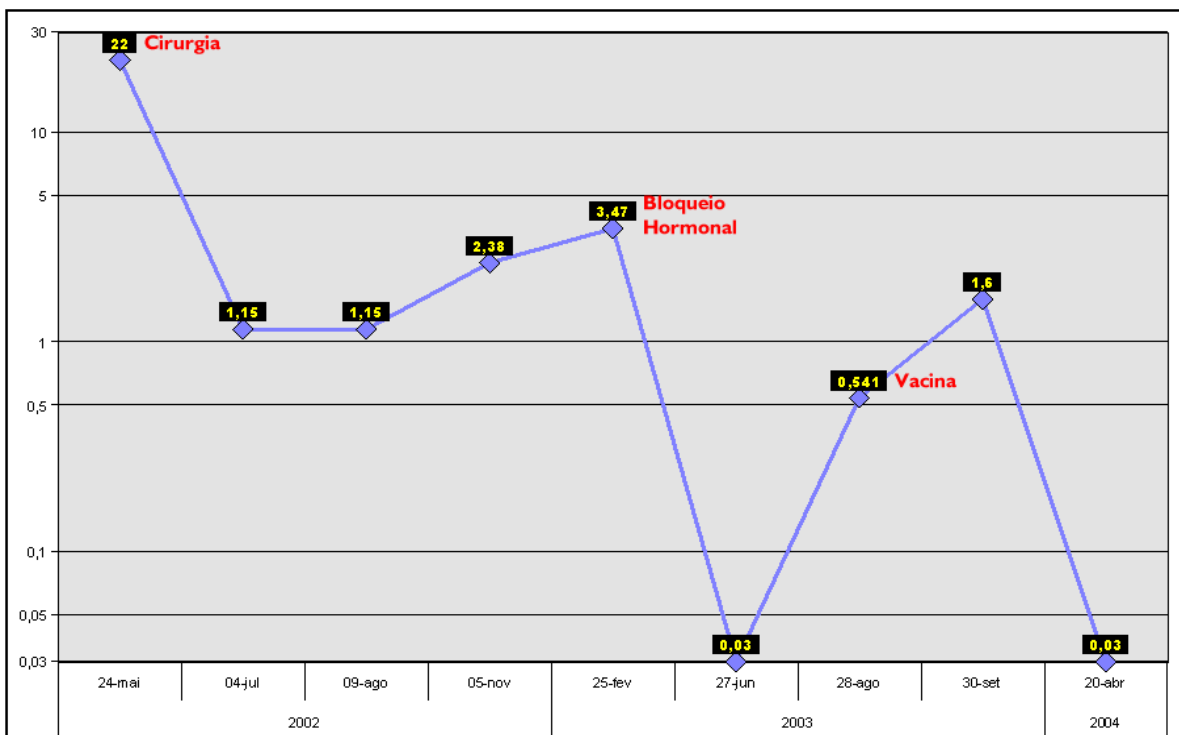
Figura 2: Evolução do PSA e intervenções realizadas (PPL)

(PPL - PSA pré 15,8; pT3a N0; G 7(3+4); DTH ≥ 5 mm)



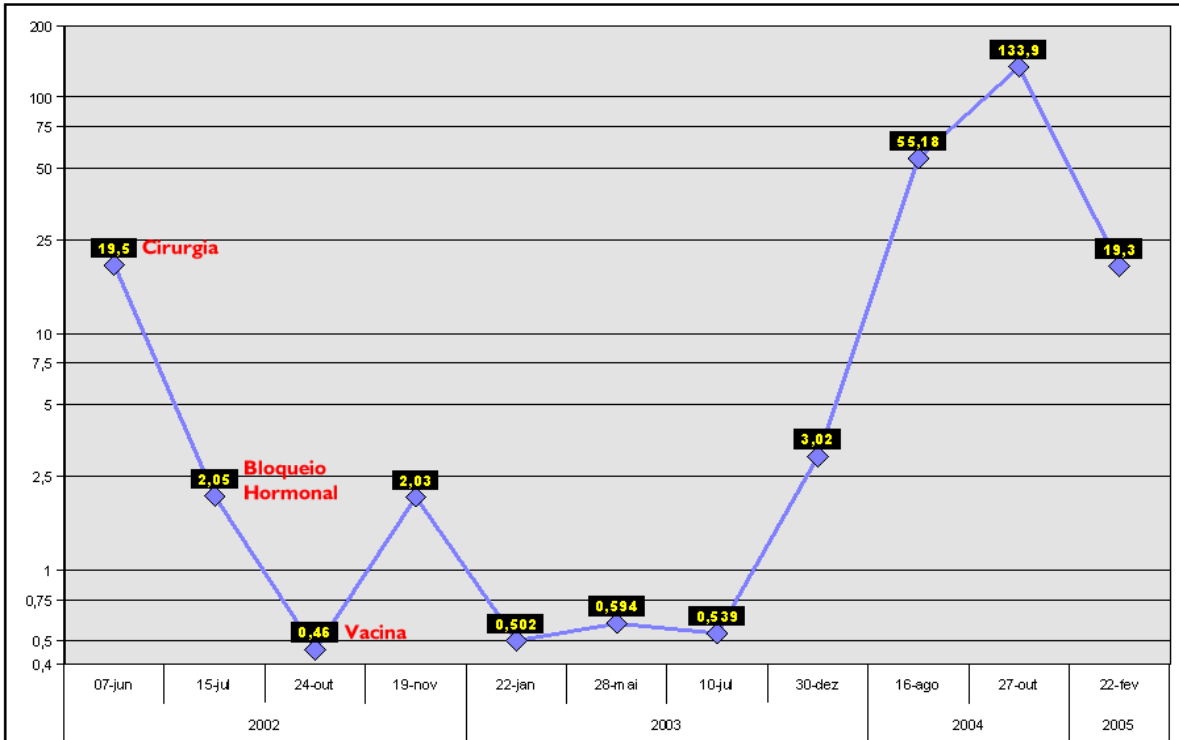
**Figura 3: Evolução do PSA e intervenções realizadas (MRS)**

*(MRS – PSA pré 27,9; pT3a N0; G 9(5+4); DTH ≥ 5 mm)*

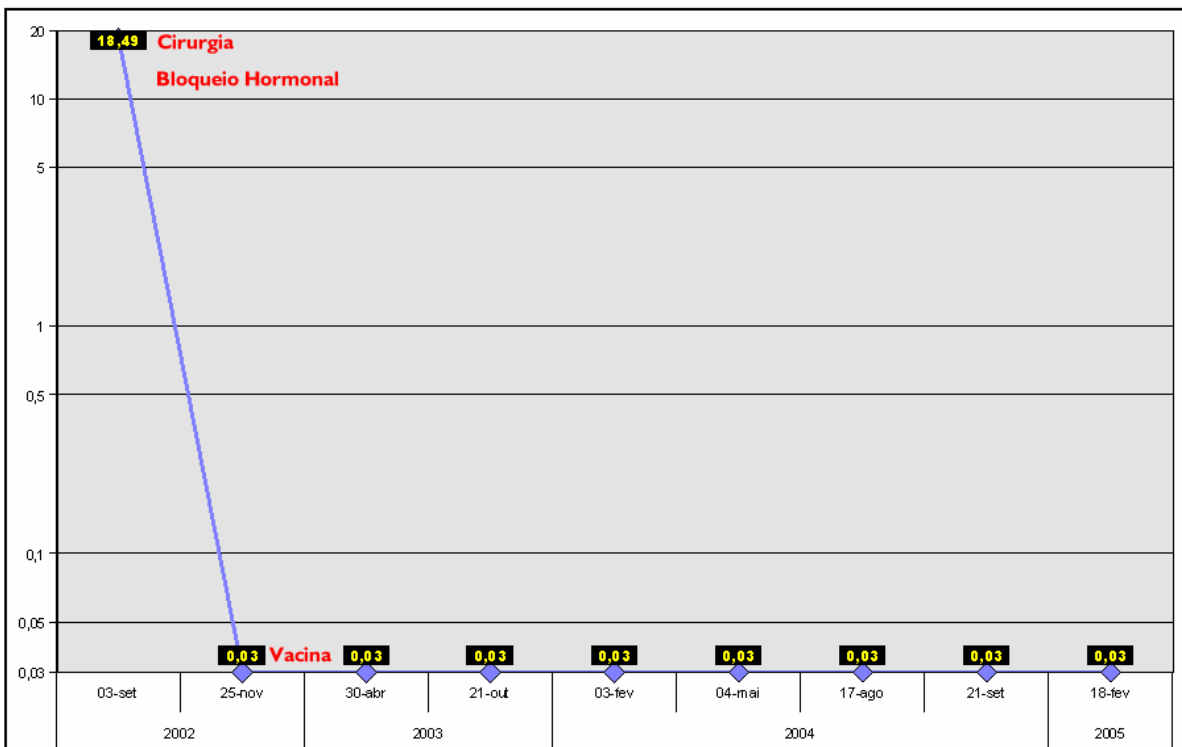


**Figura 4: Evolução do PSA e intervenções realizadas (JaB)**

*(JaB – PSA pré 22,0; pT3b N1; G 9(5+4); DTH ≥ 5 mm)*

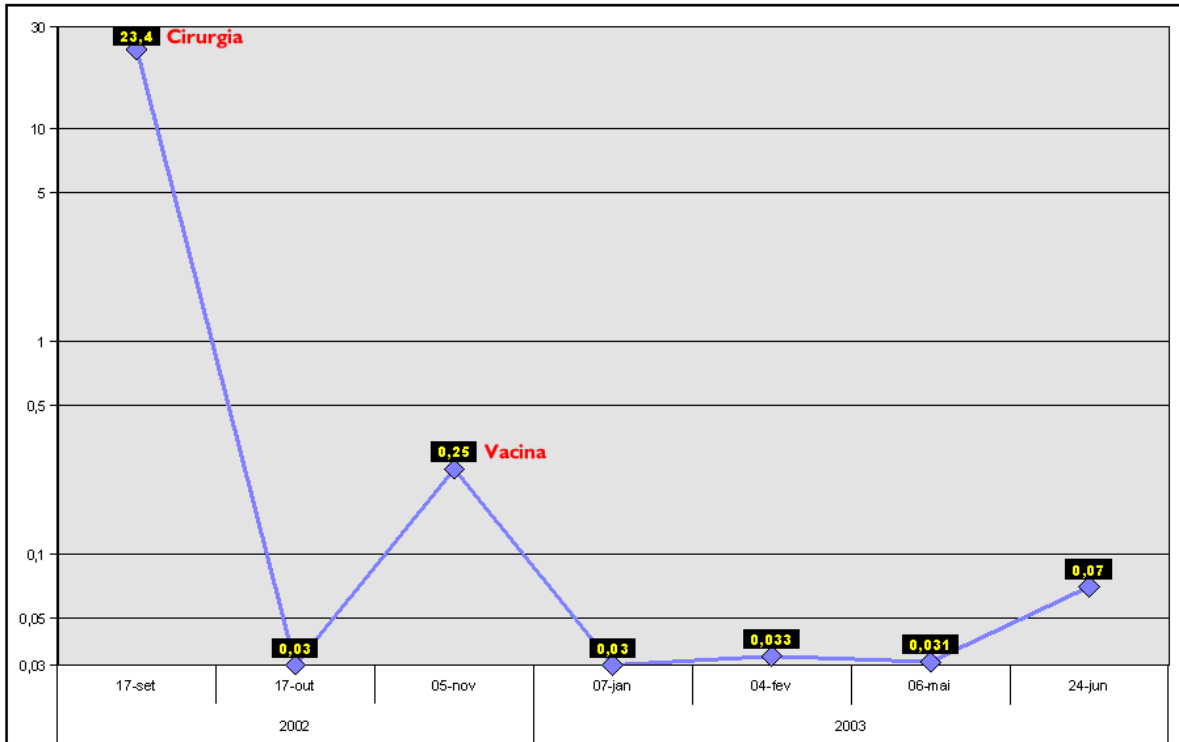


**Figura 5: Evolução do PSA e intervenções realizadas (OAC)**  
*(OAC – PSA pré 19,5; pT3b N1; G 9(5+4); DTH ≥ 5 mm)*

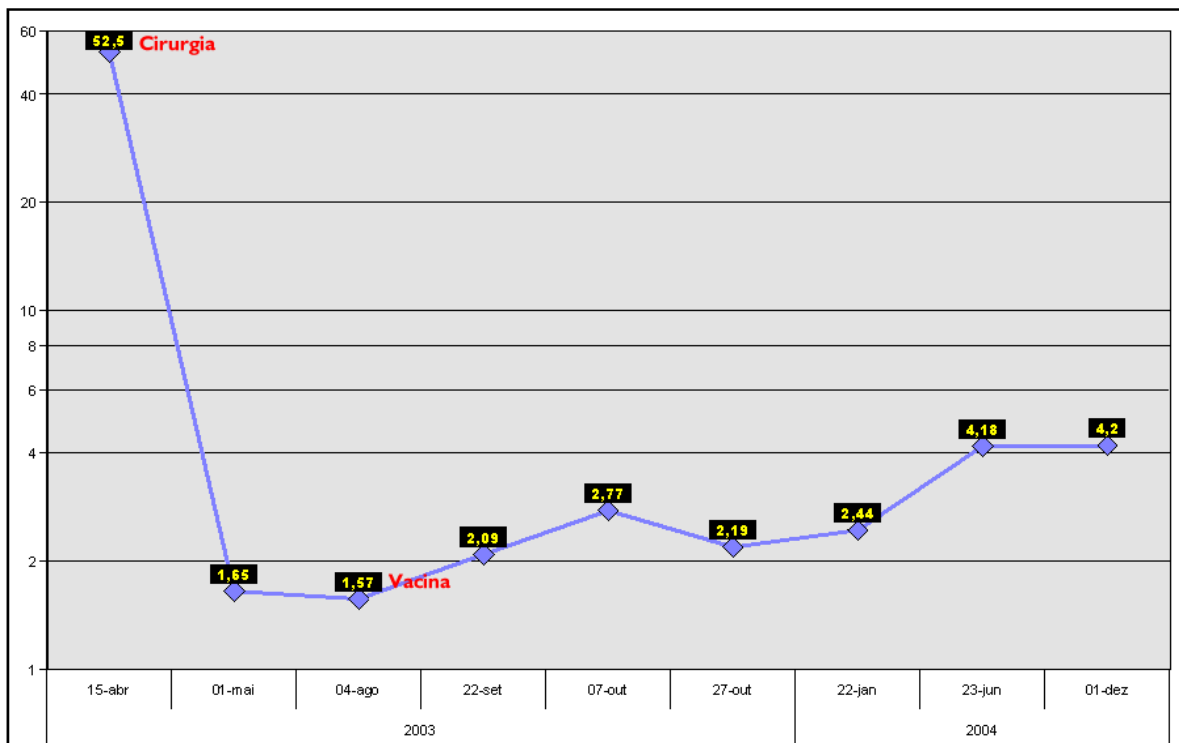


**Figura 6: Evolução do PSA e intervenções realizadas (AAS)**  
*(AAS – PSA pré 18,4; pT3b N1; G 9(5+4), DTH ≥ 10 mm)*

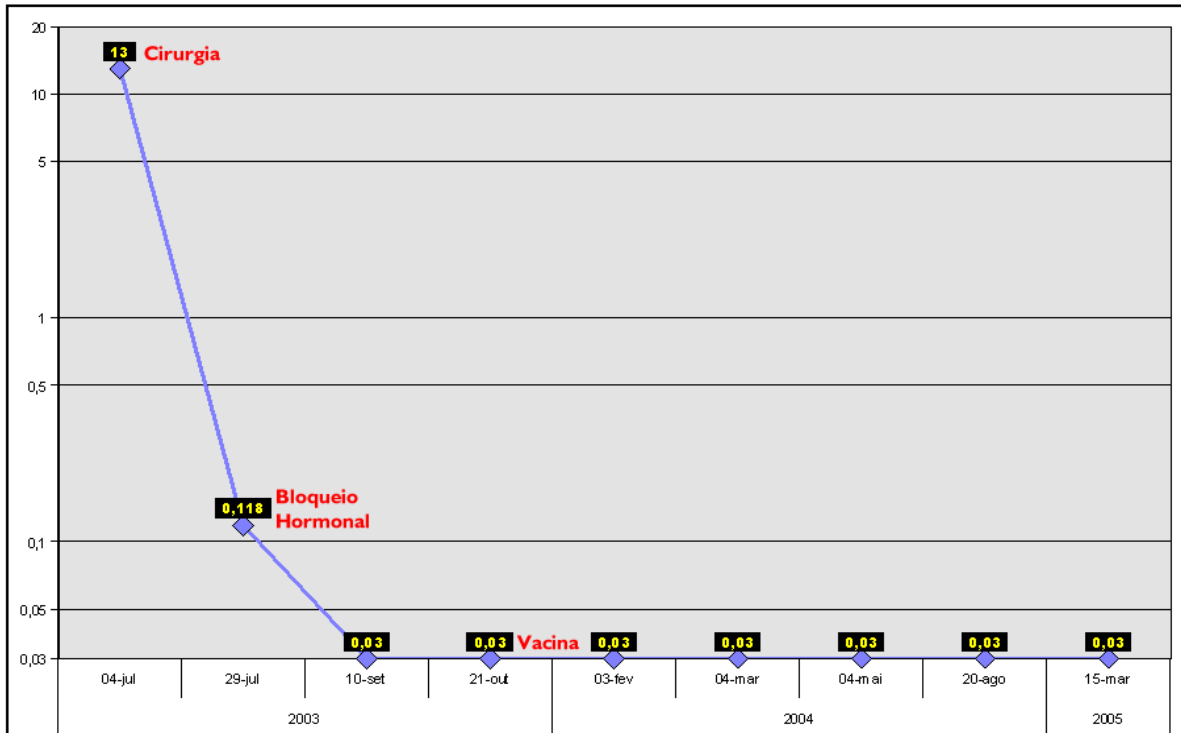




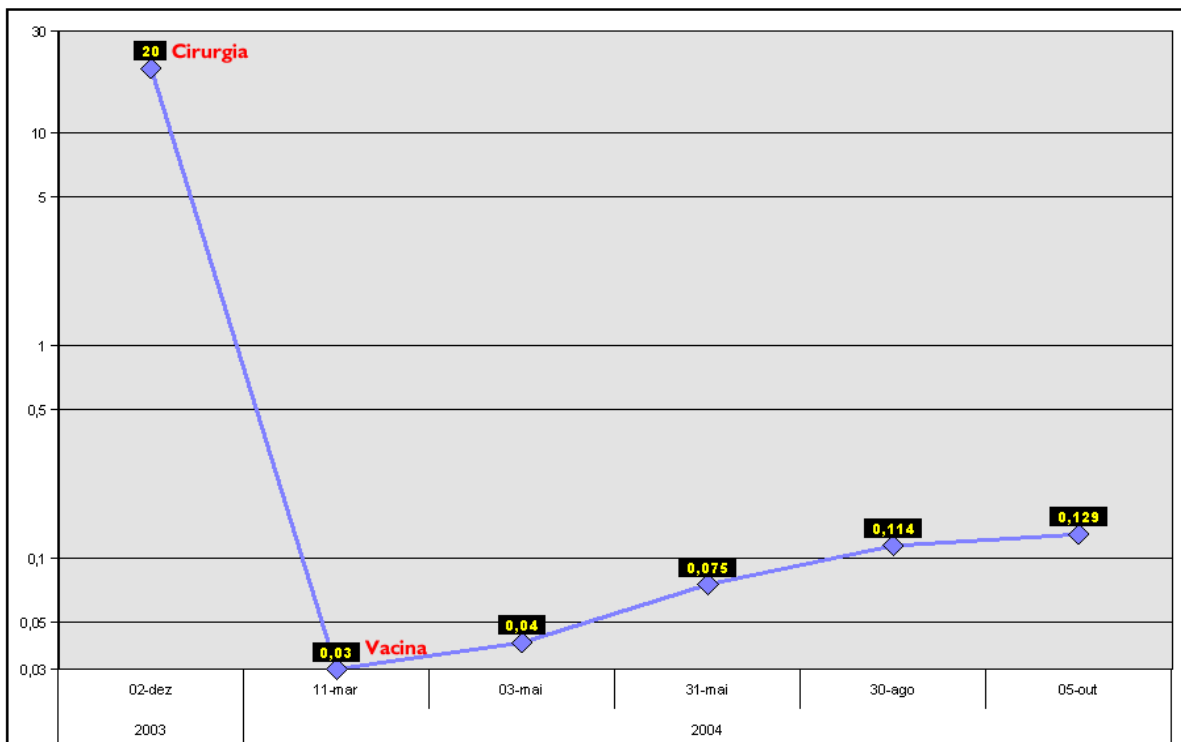
**Figura 7: Evolução do PSA e intervenções realizadas (AI)**  
*(AI – PSA pré 23,4; pT3b N0; G 6(3+3); DTH ≥ 5 mm)*



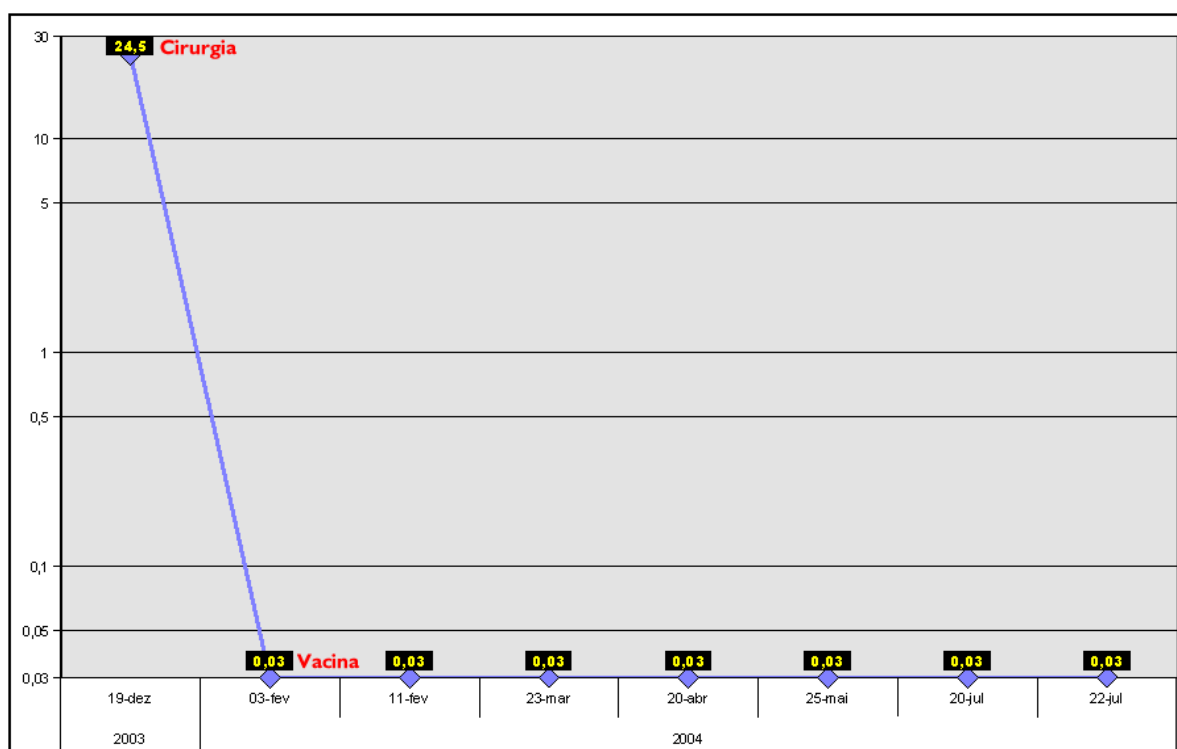
**Figura 8: Evolução do PSA e intervenções realizadas (JoB)**  
*(JoB – PSA pré 52,5; pT3a N0; G 7(3+4); DTH < 5 mm)*



**Figura 9: Evolução do PSA e intervenções realizadas (APS)**  
*(APS – PSA pré 13,0; pT3b N1; G 7(3+4); DTH ≥ 10 mm)*

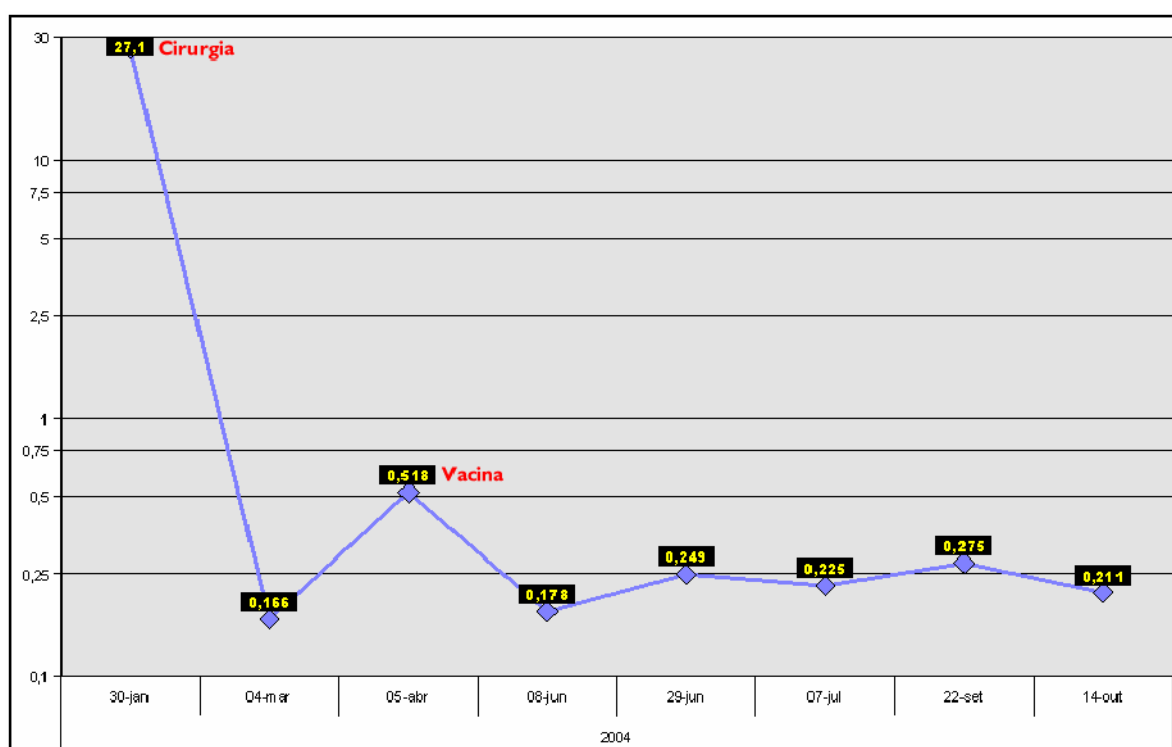


**Figura 10: Evolução do PSA e intervenções realizadas (ASO)**  
*(ASO – PSA pré 20,0; pT3b N0; G 6(3+3); DTH ≥ 5 mm)*



**Figura 11: Evolução do PSA e intervenções realizadas (RC)**

*(RC – PSA pré 24,5; pT4a N0; G 7(3+4); DTH < 5 mm)*



**Figura 12: Evolução do PSA e intervenções realizadas (RG)**

*(RG – PSA pré 27,1; pT3b N0; G 7(4+3); DTH < 5 mm)*

**6 PAPER – PHASE I STUDY WITH AN  
IMMUNOMODULATED AUTOLOGOUS CELL  
VACCINE FOR LOCALLY ADVANCED OR  
METASTATIC PROSTATE CANCER**

# **PHASE I STUDY WITH AN IMMUNOMODULATED AUTOLOGOUS CELL VACCINE FOR LOCALLY ADVANCED OR METASTATIC PROSTATE CANCER**

**Milton Berger, Jorge L. Horst, Fernando T. Kreutz, Walter J. Koff**

Urology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul and FK Biotecnologia SA, Porto Alegre – Rio Grande do Sul State, Brazil

## **ABSTRACT**

**Purpose:** The main purpose of this study was to assess the safety and toxicity of an autologous cell vaccine, immunomodulated with IFN and BCG, in patients with locally advanced ( $\geq$  pT3) or metastatic PCa (N+ and/or M+). The secondary goals were to assess the collection methods for the production of culture and vaccine, assess the cellular immune response and evaluate the impact on the disease.

**Materials and Methods:** Tumor fragments for cell culture were collected from 50 patients with clinically localized PCa and PSA  $\geq$  10 who underwent radical retropubic prostatectomy (RRP group) and 6 patients with metastatic PCa who underwent transurethral resection of the prostate due to infravesical obstruction (TURP group). After establishing primary cell culture, tumor cells were incubated with interferon, irradiated and cryopreserved. Vaccines were inoculated into patients with pathological stage  $\geq$  pT3 and/or N+ and M+ patients. The protocol included seven vaccinations in each patient, with the first two doses admixed with BCG. Follow-up was performed with measurement of delayed-type hypersensitivity (DTH) reactions, PSA levels, liver and renal function tests, and bone scans for around one year after vaccine administration. Toxicity was assessed according to CTC.

**Results:** No primary cell culture was obtained in the TURP group. Out of the 50 patients from the RRP group, primary culture and vaccine production were obtained in 37 cases (74%). Out of these, 12 patients  $\geq$  pT3 and/or N+ were vaccinated. One patient was

excluded during vaccination because of another primary neoplasm found during treatment. Toxicity was generally limited to the inoculation sites (ulceration, erythema, induration, pruritus). DTH reactions  $\geq 10$  mm were found in 2 patients and  $\geq 5$  mm in 6 patients. In this group of patients with high risk for recurrence after surgery, 2 patients had stabilized PSA close to zero in the follow-up and 3 patients had stabilized PSA  $\leq 0.4$  ng/ml.

**Conclusions:** The immunomodulated autologous cell vaccine was shown to be safe and seems to induce a positive immune cell response, as measured by DTH reactions. Primary culture and vaccine production can be achieved for most patients who undergo RRP. Primary cell culture cannot be established using our method in patients who undergo TURP. Although there seems to be some influence of the vaccine in PSA progress, the small number of patients and short follow-up time do not allow an assessment of the impact on the disease.

**Key words:** prostate cancer, active immunotherapy, cancer vaccines, delayed hypersensitivity.

## INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is an important public health problem. According to the World Health Organization (WHO), in men, PCa is the second most prevalent cancer, with 680,000 new cases/year (excluding non-melanoma skin cancer) and the sixth cause of death by cancer, with 220,000 deaths/year<sup>1</sup>. The progressive ageing of the world population worsens this picture, since  $\frac{3}{4}$  of PCa cases occur in men older than 65 years<sup>2,3</sup>. In Brazil, PCa is the second cause of death by cancer and 46,330 new PCa cases (51/100,000 men) are estimated for 2005, thus making it the most prevalent non-skin cancer among men<sup>4</sup>. In the USA, PCa is also the most prevalent non-skin cancer among men and the second cause of death by cancer. It is estimated that 232,090 men will be diagnosed with PCa and 30,350 will die of this tumor in 2005<sup>5</sup>. The vast majority of the PCa cases detected today are in their early stages<sup>5</sup>, but

nevertheless, around 25 to 33% of men with PCA, either detected by screening or not, will eventually die of the disease <sup>6</sup>.

Despite the good results achieved with surgery or radiotherapy for localized disease <sup>7-11</sup>, a significant number of patients will have biochemical, local or systemic recurrence, requiring adjuvant treatment <sup>12-15</sup>. Patients who develop or present with metastatic PCa have a mean survival of 2 to 3 years and 2/3 of them will die within 5 years<sup>16</sup>, and those who progress to hormone-refractory disease have a median survival of 1 year<sup>17</sup>.

Advances in tumor immunology and immunotherapy, particularly as a result of studies in patients with melanoma and kidney cancer, have led to the incorporation of this strategy to the treatment armamentarium for some types of cancer <sup>18-20</sup>. The identification of tumor-associated antigens (TAAs) that can be recognized by T lymphocytes provided a preferred target for immunotherapeutic interventions <sup>21,22</sup>. However, most of these antigens are present in normal tissues, and the natural immunological tolerance to these antigens has to be overcome for tumors to be effectively treated <sup>23</sup>. The goal of immunotherapy in cancer is to present tumor antigens to the immune system, induce mobilization of lymphocytes that specifically recognize such antigens, and promote the selective destruction of those cells that display them <sup>18,24,25</sup>.

Progress has been made in immunotherapy for PCa <sup>26-28</sup>. A number of immunotherapy-based strategies have been tried in PCa, most of them in metastatic and/or hormone-refractory disease and some in recurrent disease after primary treatment, like radiotherapy <sup>29-39</sup>. Many such studies have as the specific target one or more antigens identified in PCa, such as PSA (prostate-specific antigen), PSMA (prostate-specific

membrane antigen), PAP (prostate alkaline phosphatase), PSCA (prostate stem cell antigen), PCTA-1 (prostate carcinoma tumor antigen), among others<sup>40</sup>. Some of them are expressed more frequently in PCa and others are common to several types of tumor.

Neoplasms, however, have different expressed antigens and many of them remain unidentified<sup>41</sup>. The tumor of an affected individual may have a range of unique antigens potentially able to induce an immune response and, theoretically, is the best antigenic source to induce such a response<sup>42-44</sup>. Few studies, however, are conducted with autologous tumor cells due to the complexity of establishing tumor cell primary cultures and due to the cost, time required, and the material and labor infrastructure involved<sup>45</sup>.

In order to properly present antigens to the immune system, this has to be done in an immunogenic setting, that is, in addition to the presence of antigens exposed by tumor cells, the cells responsible for recognizing and fighting the tumor (lymphocytes) should be activated. The immune system can be stimulated with the use of immunological adjuvants<sup>43,46</sup>. Non-specific immunostimulants, such as BCG (bacille Calmette-Guérin), and cytokines, such as interferon (IFN) and interleukin (IL), can be used for this purpose.

This study was designed to assess the safety and toxicity of an autologous cell vaccine, immunomodulated with IFN and BCG, in patients with locally advanced or metastatic PCa. The secondary goals were to assess the collection and primary cell culturing methods, assess the immune response and evaluate the impact on the disease.



---

## MATERIALS AND METHODS

### *Study Design*

The study was conducted in two phases. In the first phase, patients with clinically localized PCa who underwent radical retropubic prostatectomy (RRP) and patients with metastatic PCa who underwent transurethral resection of the prostate (TURP) due to infravesical obstruction agreed with the collection of material from the surgical specimen (tumor samples) for processing and establishment of a primary cell culture. In the second phase, patients who underwent RRP whose pathological examination revealed extracapsular extension, positive surgical margins, seminal vesicle invasion and/or lymph node metastases ( $\geq$  pT3 and/or N+) and M+ patients who underwent TURP agreed to receive the autologous cell vaccine.

Patients signed an informed consent for each of the study phases (one for material collection and another one for the vaccine administration). Material collection was performed at the facilities of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). The collected material processing, cell culture and vaccine preparation were conducted at the Tumor Biology Laboratory at FK Biotecnologia SA. The study was approved by the Scientific Committee for Research and Ethics in Health of the HCPA, which is recognized by the National Committee of Ethics in Research (CONEP)/MS and by the Office for Human Research Protections (OHRP)/USDHHS.

### *Patient Selection*

For the first phase of the study (material collection), medical records of patients with clinically localized PCa and scheduled RRP were reviewed and if pre-operative PSA was  $\geq$  10

ng/ml, the patients were invited to join the first phase. Patients with metastatic PCa who were to undergo TURP were also selected based on the surgery schedule; all of them had hormone-refractory disease and infravesical obstruction caused by local progress of the tumor.

Patient selection for the second study phase (vaccine administration) was made according to the pathological result of the RRP specimen. Those patients whose pathological report showed extracapsular extension, positive surgical margins, and/or seminal vesicle invasion ( $\geq$  pT3), i.e. locally advanced disease, and/or lymph node metastases (N+) were invited to join the vaccination program. All patients who underwent TURP were already candidates to the second phase of the study. Both groups (RRP and TURP) should meet the following additional criteria to start the second phase: leukocyte count  $\geq$  4000; platelet count  $\geq$  100.000; normal liver and renal functions; ECOG performance (Eastern Cooperative Oncology Group) 0-2; successful establishment of primary tumor cell culture and enough cell expansion to produce the proposed number of vaccine doses; and, for TURP patients, life expectancy of at least 3 months; confirmation of the presence of metastases by imaging studies; and at least a 4-week interval between a treatment, such as chemotherapy or radiotherapy, and the beginning of the protocol.

Exclusion criteria were the following: use of immunosuppressive doses of steroids; presence of autoimmune disease; presence of active infection; and, for TURP patients, presence of metastatic disease in the central nervous system.

The TNM 2002 classification was used for pre-operative and post-operative staging.

### ***Material collection***

In the RRP group, tumor fragments were collected right after the excision of the surgical specimen under aseptic conditions in the operating room. The prostate was painted with sterilized China ink and cut in slices of around 7 to 10 mm in thickness. The tumor was identified visually and by palpation, based on digital rectal examination information and the pre-operative biopsy. Around 1 to 2 cm<sup>3</sup> of tumor was removed and placed in culture medium inside test tubes. Test tubes containing the culture medium and tumor fragments were cooled by contact and placed in thermally insulated boxes for transportation to the cell culture laboratory. A small fragment of the material to be sent for culturing was sent for pathological examination.

In the TURP group, after resection of the periurethral portions of the gland, fragments of prostate tissue closer to the periphery of the gland, where tumor was supposedly to be found, were collected. Around 1 to 2 cm<sup>3</sup> of the material was processed the same way as the material for the RRP group. A small fragment of the material to be sent for culture was also set aside for pathological examination.

The culture medium used for material collection was RPMI-1640 (Gibco), with 20% fetal bovine serum and antibiotics (penicillin, streptomycin and gentamycin).

### ***Vaccine preparation***

The material was processed at the laboratory in the first 24 hours up to 72 hours after collection. Samples were mechanically reduced to small 1 to 2 mm fragments and cultured in RPMI-1640 medium with 10% fetal bovine serum and antibiotics (penicillin, streptomycin and gentamycin) in plastic flasks specific for cell culture. Culture flasks were kept in a stove

at 37°C, with 5% CO<sub>2</sub>. Culture status was checked daily and the culture medium was changed on a weekly basis in the beginning, and afterwards, depending on cell growth. All handling was made in a laminar flow chamber. Cell growth and occasional contamination were observed under reverse microscope, with 400x magnification. Cell count was performed in a Neubauger chamber.

When cell growth was sufficient to prepare the seven vaccine doses ( $7 \times 10^7$  cells), IFN- $\alpha$ 2b (Blauferon B, Blaufiegel) was added to the culture for 72 hours. After this period, cells were removed from the culture medium by trypsin associated with fetal bovine serum or by cell spatula, and then irradiated with a lethal dose of 200 Gy.

Seven vaccine doses, each containing  $10^7$  irradiated autologous tumor cells, previously incubated with IFN- $\alpha$ 2b, were prepared for each patient. To two of these 7 doses,  $10^7$  organisms of BCG (Fundação Ataulpho de Paiva) were added to each dose. Each vaccine dose had a volume of 0.25 ml. Doses were cryopreserved for future inoculations.

#### ***Vaccination schedule and follow-up***

The 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> doses (containing BCG) and the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> vaccine doses were administered weekly. The 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> doses were administered monthly and the 7<sup>th</sup> dose was administered three months after the 6<sup>th</sup> dose. Therefore, the vaccine was administered over a period of six months. Inoculations were performed intradermally in the upper limbs, alternately (deltoid area and inner side of the forearm), with at least 5 to 10 cm between inoculation sites. After the 3<sup>rd</sup> dose, patients were instructed to return to the service within 48 to 72 hours to measure the delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction, which was measured as the largest diameter in millimeters of induration at the inoculation site with the

use of a caliper. At every visit, medical history and physical examination were performed and cases of toxicity were recorded according to CTC (Common Toxicity Criteria). Blood tests, renal and liver function tests, and PSA measurements were performed before the 1<sup>st</sup> inoculation, repeated before the 5<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> inoculation and at the 8<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> follow-up months. Imaging studies, such as bone scan were performed at the 6<sup>th</sup>, 9<sup>th</sup>, and 14<sup>th</sup> follow-up months. Any test or investigation could be repeated any time at the physician's discretion.

It should be stressed that the team in charge of the study did not make any decisions regarding routine management of the patients (surgery indication, post-operative follow-up, management of complications such as erectile dysfunction or urinary incontinence, provision of additional treatments etc.). Therefore, patients were not denied any conventional adjuvant treatment for PCa (such as hormone therapy or radiotherapy) that the team in charge of the surgery considered appropriate, either before, during or after the vaccination period.

### *Statistical analysis*

The following software was used: Epi Info version 3.2.2 for descriptive statistics and SPSS version 8.0 for logistic regression analyses.

## **RESULTS**

### *Material collection*

From december/2001 to july/2004, a total of 56 patients were enrolled in the first part of the study, out of whom 6 underwent TURP (TURP group) and 50 patients underwent RRP (RRP group).

TURP Group: mean age was 73 years with a median of 73 years (67-78). Mean pre-operative PSA was 269 ng/ml and the median was 195 ng/ml (109-500). Gleason score ranged from 8 to 10 (average = 9 and median = 9). All patients had palpable tumors, some of them with signs of locally advanced disease, and bone metastases (clinical staging T2-4 Nx M1) (see Table 1). All patients in this group had hormone-refractory disease and infravesical obstruction.

RRP Group: mean age was 66 years and median was 67 years (43-79). Mean pre-operative PSA was 18.1 ng/ml and the median was 15.6 ng/ml (8.05-52.5). A few patients with PSA levels  $\geq 10$  ng/ml performed in other laboratories had new measurements performed the day before surgery in our laboratory, and this is the reason why some of our patients had PSA levels slightly below 10, since we decided to take into account the values obtained in our hospital. Gleason score ranged from 6 to 9, with a mean and median of 7. Clinical staging was T1c in 19 patients and T2 in 31 patients. Pathological staging was T2 in 16 cases, T3 in 30 cases and T4 in 2 cases. Therefore, out of 50 patients with clinically localized disease, 32 (64%) had extraprostatic disease on the pathological examination. In 2 patients, no adenocarcinoma was found in the surgical specimen (pT0); in one patient, benign hyperplasia was found, and in another one, diffuse, high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) was found in the gland. Five patients showed lymph node involvement (N+); all of them had pathological stage T3 (Table 1).

#### ***Cell culture and vaccine production***

In the TURP group (n = 6), primary cell culture could not be established in none of the patients. In 2 cases, there was fibroblast growth in the culture, and in 4 cases, there was no

cell growth. Out of these 4 cases that did not present any growth, in 2 the material sent to the laboratory did not have tumor cells (Figure 1).

In the RRP group ( $n = 50$ ), in 13 cases (26%) primary culture could not be established. Contamination of the primary culture occurred in 8 of these cases, and in 5 cases there was no cell growth. Out of these 5 cases without cell growth, in 4 the material sent to the laboratory did not contain tumor cells (one of them was a pT0 patient). In 37 cases (74%) collected by RRP, tumor cell primary culture could be established, including the pT0 case in which only PIN was found in the surgical specimen. Out of the remaining 36 cases with successful culture growth, 13 patients were pathological stage T2, 21 patients were pT3 (with 5 N+) and 2 patients were pT4. Therefore, out of the 37 cases in which primary culture was established, 14 did not meet the inclusion criteria to receive the vaccine (1 pT0 and 13 pT2). Out of the 23 remaining cases who met the criteria for vaccination ( $\geq$  pT3), 11 patients did not agree to join the study and 12 patients were vaccinated. One patient was excluded from the study in the beginning of vaccination for being diagnosed with another primary neoplasm (laryngeal cancer) (Figure 1).

In patients who underwent RRP, the association between Gleason score of the surgical specimen and pre-operative PSA with the establishment of a primary cell culture was assessed using a multivariate logistic regression model. No associations were found between the variables (Gleason score and pre-operative PSA) and the establishment of a primary culture [for the Gleason score, OR = 0.81, IC95%(0.18;3.57); for pre-op PSA, OR = 0.94, IC95%(0.88;1.02)].

### *Vaccination*

The baseline characteristics of the 11 patients who were vaccinated are shown in Table 2. Mean age was 65 years and the median was 68 years (47-70). Mean pre-operative PSA was 24.0 and the median 22.0 (13.0-52.5). Three patients were pT3a (PPL, MRS, JoB), 7 were pT3b (JaB, OAC, AAS, AI, APS, ASO, RG), and 1 was pT4a (RC). The 4 N+ patients (JaB, OAC, AAS, APS) were pT3b, and 3 of them had Gleason 9 tumors (JaB, OAC, AAS). Only 1 other patient had a Gleason 9 tumor (MRS). The remaining patients had Gleason 6 (AI, ASO) and Gleason 7 tumors (PPL, JoB, APS, RC, RG).

DTH reaction measurements (greater diameter of induration at inoculation site) are shown in Table 3. In at least one of the 5 episodes of vaccination without BCG, 6 patients developed reactions  $\geq 5$  mm and 2 patients had reactions greater than 10 mm. Two patients had reactions  $< 5$  mm and 1 patient did not show any reaction in any of the episodes of vaccination without BCG.

Vaccine toxicity is shown in Table 4. All patients developed some degree of erythema, induration and pruritus after the inoculation of the first two vaccine doses containing BCG. One patient presented ulceration that regressed with local care. Two patients presented regional adenopathy and short duration low fever, also after the administration of the vaccine with BCG. No other adverse effect was seen during or after the vaccination period.

The evolution of PSA levels in every patient, with records of performed interventions (surgery, vaccine, hormonal blockade) is shown in Figures 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 and 12. The graphs are formatted in a logarithmic scale so that small changes in PSA levels can be better appreciated. Five patients (MRS, JaB, OAC, AAS, APS) started hormonal blockade



during the study (Figures 3, 4, 5, 6 and 9). Four of them (JaB, OAC, AAS, APS) had lymph node involvement on the pathological examination (Table 2 and Figures 4, 5, 6 and 9) and the fifth patient (MRS) is the pT3a patient with a Gleason 9 tumor (Table 2 and Figure 3). Six patients (PPL, AI, JoB, ASO, RC, RG) were given only vaccine after surgery. Two of them (AI, RC) showed PSA levels close to zero (Figures 7 and 11), three (PPL, ASO, RG) showed PSA values  $\leq 0.4$  (Figures 2, 10 and 12) and one (JoB) showed a progressive increase in PSA levels up to around 4.0 in the last follow-up (Figure 8).

## DISCUSSION

Immunotherapy for cancer has progressed with advances in the knowledge of both general immunology and tumor immunology. Several immunotherapeutic strategies have been evaluated. Attention to the details in each one of them is crucial in order to understand their potential effects. Therefore, several aspects of this study deserve comments.

The choice of a lower pre-operative PSA threshold of  $\geq 10$  derives from several observations. Pre-operative PSA serum level is directly related to clinical and pathological staging<sup>47,48</sup>. Despite that, PSA is not an accurate predictor of pathological staging<sup>3</sup>, but, in general, patients with a pre-operative PSA above 10 have a 50% chance of presenting extraprostatic disease<sup>49</sup>. This criterion, therefore, provided a greater chance of selecting patients for the second phase of the study (vaccine administration). We could have used the several nomograms available to more accurately predict the pathological staging, combining PSA, clinical staging and Gleason score of the pre-operative biopsy<sup>49,50</sup>, but due to inconsistencies and lack of standardization of the pathological examinations of the pre-operative biopsies (several patients had examinations done in other services), we concluded that the use of one single measurement (PSA) would make our selection easier.

Adequate antigen expression by tumor cells is essential to induce an immune response. Since tumor antigens are intracellular, their exposure on the cell surface is done by class I MHC molecules<sup>51</sup>. Cytokines are involved in this process<sup>23</sup>. IFN- $\alpha$ , a cytokine of the type I interferon group (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  and IFN- $\omega$ ), performs a number of actions in the tumor microenvironment, working as a bridge between the innate and adaptive immunity by inducing the differentiation of helper and cytotoxic T lymphocytes (ThL and CTL) and the differentiation and maturation of dendritic cells (the most efficient antigen-presenting cells)<sup>52</sup>. At the same time, IFN- $\alpha$  stimulates the expression of class I MHC molecules which are responsible for the exposure of intracellular antigens on the tumor cell surface, and the apoptosis of tumor cells induced by other stimuli, facilitating the uptake and processing of tumor antigens by dendritic cells<sup>52,53</sup>. These effector mechanisms of IFN- $\alpha$  justified the use of this cytokine in the preparation of the autologous cell vaccine.

The presentation of antigens on the cell surface alone, however, is not enough to trigger an immune response<sup>25</sup>. Antigens have to be presented in a setting where the immune system is stimulated, i.e. a setting of greater antigenicity<sup>54</sup>. BCG is a non-specific immunostimulant whose properties seem to be related to an increased IFN- $\gamma$  secretion by the cells of lymph nodes that drain the inoculation site, thus suggesting the presence of CD8+ CTLs and CD4+ ThLs (cells involved in the generation of a cellular immune response), in addition to activating dendritic cells to produce cytokines, such as TNF- $\alpha$ , which render the dendritic cell more effective in presenting antigens to T lymphocytes<sup>55</sup>. BCG has been used as a vaccine adjuvant in immunotherapeutic treatment of cancer in association with autologous tumor cell vaccines, particularly for colon and kidney cancer and melanoma<sup>56-59</sup>. Some of these studies suggest a longer disease-free survival and overall survival in patients given the autologous tumor cell vaccine in association with BCG<sup>56-59</sup>. The potential of

optimization of tumor antigen presentation by dendritic cells, along with the mobilization of T lymphocytes, led us to associate BCG as an adjuvant to the autologous vaccine in our protocol.

Seminal experimental studies with laboratory animal models tried to establish some basic aspects of a vaccination protocol using irradiated autologous tumor cells in association with BCG to induce an immune response, such as the required number of tumor cells by dose, the required number of viable BCG cells as an adjuvant, the required radiation to sterilize tumor cells (prevent cell division after inoculation) and at the same time keeping their viability (metabolic activity), and the optimal inoculation schedule (number of and interval between inoculations) <sup>60-62</sup>. Based on these studies, it was suggested that a vaccine should contain at least  $10^7$  cells; that the BCG dose should have  $10^7$  viable organisms; that a radiation dose of 200 Gy interrupts the cell cycle, at the same time keeping the cell metabolic activity; that at least two inoculations should be performed; and that there should be regional lymph nodes draining the inoculated area<sup>63</sup>. The basic lines of these studies are still followed and have progressed to studies in humans with small changes in radiation doses, inoculation schedule, number of cells per dose and presence and type of adjuvant <sup>56,57,59,64,65</sup>. The intradermal route for the administration of autologous vaccines is favored by the abundant presence of Langerhans cells, which are the skin dendritic cells, providing the proper cell population for the processing and presentation of the antigens exposed by the vaccine <sup>31,66</sup>. These pieces of evidence led us to the procedures for vaccine preparation and administration used in this study.

One difficulty related to autologous cell vaccines is the occasional impossibility to obtain tumor tissue and the labor, laboratory and financial effort involved <sup>45</sup>. Additionally, it

is not always possible to obtain enough cells to produce the necessary number of vaccine doses for administration according to the study plan <sup>67</sup>. For these reasons, studies using vaccine produced from allogeneic cells derived from immortalized PCa cell lines have been conducted <sup>68</sup>. These cells could induce an immune response by producing a host-versus-graft type response, since they do not have the same MHC haplotype as the patient's, which would lead to rejection and destruction of grafted cells and resulting exposure of tumor antigens they contain <sup>42,43</sup>. Therefore, there is a major concern regarding the possibility of producing primary cell culture and the planned vaccine doses. Studies suggest that cell culture can be established in about 60% of collected samples of tumors of various etiologies <sup>69</sup>. In one study with genetically modified autologous vaccine for non-small cell lung carcinoma, a vaccine was produced for 34 out of 35 patients, but only for 5 out of the 34 the number of  $10^7$  cells/dose could be achieved (the study projected at least 3 doses)<sup>70</sup>. With an autologous vaccine in association with BCG administered to patients with colon cancer, vaccine could be produced in 89% of patients (333 out of 374) with  $10^7$  cells/dose (3 doses) <sup>56</sup>. In another study with autologous, irradiated vaccine transfected with a GM-CSF coding gene in patients with PCa who underwent RRP, primary culture could be established in 73% of patients (8 out of 11), but cell expansion in this culture did not enable the production of vaccine doses with a greater number of cells for some patients <sup>31</sup>. Finally, in a clinical trial very similar to ours, patients with kidney cancer were administered a vaccine with autologous, irradiated cells expanded in primary culture in association with adjuvants (BCG, IFN- $\gamma$  or GM-CSF), with primary culture being obtained in 80% of cases (55 out of 69) and vaccine being produced in 41 out of 55 cases <sup>57</sup>. In our study, we were able to produce primary cell culture in 66% of all patients (37 out of 56). If we exclude the TURP group, whose material was collected by transurethral resection and in which cell culture showed to be unfeasible using our method, and considering only the RRP group, in which collection was made by open surgery, we

achieved 74% of successful cell culture (37 out of 50) (Figure 1). In all patients in whom culture was successful, enough cell expansion was achieved to prepare the planned doses. Therefore, primary culture and cell expansion can be achieved to produce an autologous cell vaccine with a reasonable probability of success in patients who undergo RRP. Curiously, primary culture could be obtained in a pT0 patient whose pathological examination did not show adenocarcinoma, but rather high-grade PIN diffusely distributed in the prostate, thus showing the possibility of culture in this situation <sup>41</sup>.

It would be interesting to mention that in the first four material collections by RRP in this study, the material was collected by a pathologist, since we assumed it would be easier for him to make the gross identification of the tumor in the surgical specimen. Curiously enough, although collection was performed under proper conditions, all of them showed contamination in the primary culture. Subsequent collections were made by surgeons and we had lower contamination rates in the primary culture (only 4 out of the 46 remaining patients who underwent RRP). Therefore, we had aborted cell cultures due to contamination in 8 out of the 50 patients (16%) who underwent RRP (Figure 1).

Before starting this study, we thought we would have difficulties in identifying neoplastic areas in the RRP surgical specimens. Fortunately, this was not the case. In only 4 out of 13 patients in whom there was no primary culture, no tumor was found in the fragment removed from the material collected for culture (Figure 1). Additionally, in one patient in this group of 14 no tumor was found in the surgical specimen on the conventional pathological examination (pT0), although a review of the pre-operative biopsy confirmed the presence of a neoplasm. Based on the digital rectal examination and the pre-operative biopsy, in association with palpation and careful cuts of the surgical specimen, the areas of the prostate affected by

the tumor could be identified, at times with a certain degree of difficulty in prostates that were very hyperplastic, in 45 out of 50 patients (90%). We believe that patient selection (PSA  $\geq$  10) has favored this result.

In this study, no primary culture could be established in patients who underwent TURP. In 6 cases (100%), we found that our method was not successful and we decided not to continue collecting samples in this situation. In two patients, collection was inadequate, because no tumor was found in the fragment sent for the pathological examination. The visual signs used to locate the neoplasm in RRP specimens obviously cannot be used in TURP-derived samples. In the other 4 cases, sample collection was properly performed, since neoplasm was found in the fragment removed from the culture material and sent for pathological examination, but some cell growth was found only for seven to ten days, followed by cell death. Difficulties in collecting TURP material are well recognized and can be explained by the artifact caused by electrical current and by the frequent harvesting of prostate stroma and/or benign hyperplasia tissues, which co-exist with neoplastic tissue <sup>71</sup>. However, material collected by TURP can be cultured <sup>72</sup>. It is probable that the use of lower voltage cutting current, bipolar cautery and isosmotic solutions for irrigation could maintain tissue integrity for material collection in order to establishing primary cell culture. Therefore, we could not assess this vaccine in patients with bulky metastatic disease (M+).

The assessment of the response to an antitumor treatment is fundamental in order to correlate a given treatment with some important clinical outcomes in oncology, such as decrease in a tumor marker, regression of established lesions or increased survival. In the case of antitumor immunotherapy, an intermediate outcome would be the presence of an immune response to tumor antigens, because we assume that this response should be a precondition for

the aforementioned clinical outcomes<sup>73</sup>. There are several tests to determine, monitor and quantify lymphocyte response. They can be classified into *in vivo* functional measurements (suggesting either the presence or absence of lymphocyte response), *in vitro* phenotypic tests (quantifying the response of the specific immune-reactive lymphocyte) and *in vitro* functional tests (indirectly quantifying lymphocyte response)<sup>74</sup>. One *in vivo* functional test, the delayed-type hypersensitivity reaction (DTH) is often recorded in immunotherapeutic studies, despite its subjectivity and non-standardization. DTH reactions greater than 5 or 10 mm are usually referred to attest the presence of cellular immune response<sup>58</sup>. Additionally, the presence of a DTH reaction seems to correlate with *in vitro* tests for lymphocyte response and can be considered a predictor of peripheral immunity by T lymphocytes<sup>75</sup>. In fact, biopsies of DTH reaction sites show the presence of lymphocyte infiltrate (CTLs, ThLs, dendritic cells, eosinophils and others), thus showing immunological mobilization and activation<sup>31,67,76</sup>. Studies have also suggested that positive DTH tests are predictors of response and survival in anticancer immunotherapy, particularly for melanoma<sup>58,77-79</sup>. In our study, DTH reactions  $\geq 5$  mm were found in 6 patients and  $\geq 10$  mm in 2 patients (Table 3). We believe that such reactions are suggestive of immunological mobilization in these patients based on the aforementioned studies. However, it would be important to assess such responses with more objective immune response tests. In two patients, DTH reactions  $< 5$  mm were found and in one patient no response was found in any of the inoculations (Table 3).

The vast majority of studies with specific active immunotherapy in PCa using various immunization strategies demonstrates adequate safety and low toxicity when this type of therapy is used. This is related to the nature of the treatment itself, which is designed to induce specific tumor cell cytotoxicity by mobilizing the body's self-defenses, i.e. destruction of tumor cells by CTLs that specifically recognize cells that express unique antigens<sup>80</sup>.

Autoimmune reactions, however, can happen, since normal, non-tumor cells can express similar antigens. One clear example of this phenomenon is the emergence of vitiligo in melanoma patients who respond to immunotherapy<sup>18</sup>. This study corroborates the statements made regarding the low toxicity of cell vaccines<sup>58,64,67,68</sup>. We found self-limited skin reactions on inoculation sites, such as erythema, induration and pruritus in all 11 vaccinated patients and one patient presented ulceration at the inoculation site (Table 4). Two patients had transient fever and developed adenopathy that also regressed in a few days (Table 4). These more intense skin reactions, such as ulceration, and systemic reactions, such as adenopathy and fever, occurred in the administration of the first two vaccine doses, which contained BCG. These reactions were found in other studies with autologous vaccines using BCG as an adjuvant, being usually self-limited, not preventing treatment continuation<sup>59</sup>. No changes were found in blood, renal and liver tests.

Several immunotherapy studies in PCa have shown a transient decrease or stabilization of PSA levels<sup>34,36,38,81</sup>. However, it is often difficult to attribute these responses to treatment itself, since variation in PSA levels is often found in the natural course of the disease.

In five (MRS, JaB, OAC, AAS, APS) out of the 11 vaccinated patients hormone therapy was initiated during the protocol by the team in charge of the surgery (Figures 3, 4, 5, 6 and 9). Four of them (JaB, OAC, AAS, APS) due to lymph node metastases found after the surgery (Table 2) and one (MRS) due to a post-operative nadir of 0.18 with later increase (Figure 3), in addition to having an aggressive Gleason 9 tumor (Table 2). Out of the four N+ patients, all had seminal vesicle invasion and three had Gleason 9 tumor (JaB, OAC, AAS), thus confirming the poor prognosis associated with these factors<sup>82,83</sup>. In fact, one of these



patients (OAC) developed bone metastases approximately two years after surgery and vaccination (Figure 5). Obviously, it is very difficult to analyze any effect of the vaccination protocol on the disease outcome in these patients.

Six vaccinated patients received only the vaccine after surgery (PPL, AI, JoB, ASO, RC, RG). Two patients (AI and RC), one of them with seminal vesicle invasion (pT3b) and another one with tumor extending to the external sphincter and surgical margin involvement at this level (pT4a) (Table 2), showed improvement in PSA with levels close to zero (Figures 7 and 11). Most likely, these patients had been properly treated with surgery alone. However, we can hypothesize some association between treatment and reduction of PSA levels to zero, since some studies suggest that response to immunotherapy could be better in patients with tumors with Gleason score  $\leq 7$ , which was the case of both patients<sup>39</sup>. It should be stressed that patient AI had DTH reactions  $\geq 5$  mm, while patient RC developed responses  $< 5$  mm, thus suggesting inadequate immune activation (Table 3). Three patients (PPL, ASO, RG) progressed to PSA levels  $\leq 0.4$ , which to some authors is the cutoff point to define biochemical recurrence<sup>84</sup>. One of them (RG) showed a stabilized PSA curve (Figure 12) and the remaining two had a slight increase (Figures 2 and 10). Patients PPL and ASO also had DTH reactions  $\geq 5$  mm, while patient RG did not show any such reaction (Table 3). Patient JoB, who had a pre-operative PSA  $> 50$ , had a slow and progressive increase in PSA levels until 4.0 in the last follow-up (Figure 8). This patient had DTH reactions  $< 5$  mm (Table 3). No correlation can be established between vaccination and disease outcome, as measured by PSA, in such a small number of cases and short follow-up. However, we think that considering the occurrence of DTH reactions in most patients and the acceptable improvement in PSA levels in some of these patients, who belong to a group of high risk of disease progression after surgery, it would be interesting to assess this vaccine in a larger

number of cases.

Progress has been made in immunotherapy for PCa and it may eventually become part of the armamentarium used to treat this tumor, in conjunction with surgery, radiotherapy and chemotherapy. Its administration may be more indicated for smaller tumors as, for example, in patients with adverse prognostic factors and with greater likelihood of disease recurrence<sup>23,85</sup>. In a way, PCa is a disease that could be appropriate for the assessment of experimental immunotherapeutic treatments due to the possibility of monitoring using a reliable serum marker (PSA) and due to the fact that the prostate is a “dispensable” organ, since it is not essential to life, with occasional secondary side effects and autoimmunity not being a problem<sup>86</sup>.

## CONCLUSION

Immunotherapy for the treatment of PCa is a new approach to this disease. Results so far are poor, which can be partly explained by the fact that most studies have included patients with advanced, hormone-refractory and bulky disease. Immunotherapeutic treatment in a setting of minimal residual disease is in agreement with the new trends in oncology that try to associate the various modes of anticancer treatment (surgery, radiotherapy and chemotherapy)<sup>19,45</sup>. In spite of the small number of cases, this study suggests that the autologous tumor cell vaccine expanded in primary culture, treated with IFN- $\alpha$ 2b, irradiated and immunomodulated with BCG, is safe, with adverse effects restricted to the inoculation sites. Additionally, it seems to induce cellular immune response, as measured by DTH reactions. Additionally, it has been shown that tumor cell primary culture can be established for most patients who undergo RRP and that such primary culture cannot be established from samples obtained from patients who undergo TURP using our method. Studies with a larger number of patients and

---

longer follow-up time are required to prove these findings and especially to assess the impact on disease.

---

**REFERENCES**

1. WHO (World Health Organization) and IARC (International Association for Research on Cancer). GLOBOCAN 2002. Disponível em <http://www-dep.iarc.fr/> (acesso em março de 2005).
2. Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. *BJU Int*, 90(2): 174-84, 2002.
3. Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW. Prostate specific antigen: a decade of discovery – what we have learned and where we are going. *J Urol*, 162(2): 293-306, 1999.
4. INCA (Instituto Nacional do Câncer). Disponível em <http://inca.gov.br/> (acesso em março de 2005).
5. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer Statistics, 2005. *CA Cancer J Clin*, 55: 10-30, 2005.
6. Cooperberg MR, Lubeck DP, Meng MV, Mehta SS, Carroll PR. The changing face of low-risk prostate cancer: trends in clinical presentation and primary management. *J Clin Oncol*, 22(11): 2141-9, 2004.
7. Hull GW, Rabbani F, Abbas F, Wheller TM, Kattan MW, Scardino PT. Cancer control with radical prostatectomy alone in 1,000 consecutive patients. *J Urol*, 167: 528-534, 2002.
8. Han M, Partin AW, Pound CR, Epstein JI, Walsh PC. Long-term biochemical disease-free and cancer-specific survival following anatomic radical retropubic prostatectomy. The 15-year Johns Hopkins experience. *Urol Clin North Am*, 28(3): 555-65, 2001.
9. Catalona WJ, Smith DS. Cancer recurrence and survival rates after anatomic radical prostatectomy for prostate cancer: intermediate-term results. *J Urol*, 160(6 pt 2): 2428-34, 1998.
10. Roehl KA, Han M, Ramos CG, Antenor JAV, Catalona WJ. Cancer progression and survival rates following anatomical radical retropubic prostatectomy in 3,478 consecutive patients: long-term results. *J Urol*, 172(3): 910-4, 2004.
11. Kupelian PA, Potters L, Khuntia D, Ciezki JP, Reddy CA, Reuther AM, Carlson TP, Klein EA. Radical prostatectomy, external beam radiotherapy < 72 Gy, external beam radiotherapy > or = 72 Gy, permanent seed implantation, or combined seeds/external beam radiotherapy for T1-T2 prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 58(1): 25-33, 2004.
12. Han M, Partin AW, Zahurak M, Piantadosi S, Epstein JI, Walsh PC. Biochemical (prostate specific antigen) recurrence probability following radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *J Urol*, 169(2): 517-23, 2003.
13. Moul JW. Prostate specific antigen only progression of prostate cancer. *J Urol*, 163(6): 1632-42, 2000.

14. Touma NJ, Izawa JI, Chin JL. Current status of local salvage therapies following radiation failure for prostate cancer. *J Urol*, 173(2): 373-9, 2005.
15. Coen JJ, Zietman AL, Thakral H, Shipley WU. Radical radiation for localized prostate cancer: local persistence of disease results in a late wave of metastases. *J Clin Oncol*, 20(15): 3199-205, 2002.
16. Tangen CM, Faulkner JR, Crawford ED, Thompson IM, Hirano D, Eisenberger M, Hussain M. Ten-year survival in patients with metastatic prostate cancer. *Clin Prostate Cancer*, 2(1): 41-5, 2003.
17. Cho D, Di Blasio CJ, Rhee AC, Kattan MW. Prognostic factors for survival in patients with hormone-refractory prostate cancer (HRPC) after initial androgen deprivation therapy (ADT). *Urol Oncol*, 21(4): 282-91, 2003.
18. Rosenberg SA. Development of effective immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *J Am Coll Surg*, 198(5): 685-96, 2004.
19. Yannelli JR, Wroblewski JM. On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy. *Vaccine*, 23(1): 97-113, 2004.
20. Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature*, 411(6835): 380-4, 2001.
21. Jager E, Jager D, Knuth A. CTL-defined cancer vaccines: perspectives for active immunotherapeutic interventions in minimal residual disease. *Cancer Metastasis Rev*, 18(1): 143-50, 1999.
22. Renkvist N, Castelli C, Robbins PF, Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother*, 50(1): 3-15, 2001.
23. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol*, 2(4): 293-9, 2001.
24. Shu S, Plautz GE, Krauss JC, Chang AE. Tumor Immunology, *JAMA*, 278(22): 1972-81, 1997.
25. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med*, 10(9): 909-15, 2004.
26. Kaminski JM, Summers JB, Ward MB, Huber MR, Minev B. Immunotherapy and prostate cancer. *Cancer Treat Ver*, 29(3): 199-209, 2003.
27. Pantuck AJ, Zisman A, Henderson D, Wilson D, Schreiber A, Belldegrun A. New biologicals for prostate cancer prevention: genes, vaccines, and immune-based interventions. *Urology*, 57(4 Suppl 1): 95-9, 2001.
28. Rini BI, Small EJ. The potential for prostate cancer immunotherapy. *Crit Rev Oncol Hematol*, 46 Suppl: S117-25, 2003.

29. Murphy G, Tjoa B, Ragde H, Kenny G, Boynton A. Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate*, 29(6): 371-80, 1996.
30. Meredith RF, Khazaeli MB, Macey DJ, Grizzle WE, Mayo M, Schlom J, Russell CD, LoBuglio AF. Phase II study of interferon-enhanced 131I-labeled high affinity CC49 monoclonal antibody therapy in patients with metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 5(10 Suppl): 3254s-3258s, 1999.
31. Simons JW, Mikhak B, Chang JF, DeMarzo AM, Carducci MA, Lim M, Weber CE, Baccala AA, Goemann MA, Clift SM, Ando DG, Levitsky HI, Cohen LK, Sanda MG, Mulligan RC, Partin AW, Carter HB, Piantadosi S, Marshall FF, Nelson WG. Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer. *Cancer Res*, 59(20): 5160-8, 1999.
32. Meidenbauer N, Harris DT, Spitler LE, Whiteside TL. Generation of PSA-reactive effector cells after vaccination with a PSA-based vaccine in patients with prostate cancer. *Prostate*, 43(2): 88-100, 2000.
33. Burch PA, Breen JK, Buckner JC, Gastineau DA, Kaur JA, Laus RL, Padley DJ, Peshwa MV, Pitot HC, Richardson RL, Smits BJ, Sopapan P, Strang G, Valone FH, Vuk-Pavlovic S. Priming tissue-specific cellular immunity in a phase I trial of autologous dendritic cells for prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 6(6): 2175-82, 2000.
34. Small EJ, Fratesi P, Reese DM, Strang G, Laus R, Peshwa MV, Valone FH. Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. *J Clin Oncol*, 18(23): 3879-82, 2000.
35. Mincheff M, Tchakarov S, Zoubak S, Loukinov D, Botev C, Altankova I, Georgiev G, Petrov S, Meryman HT. Naked DNA and adenoviral immunizations for immunotherapy of prostate cancer: a phase I/II clinical trial. *Eur Urol*, 38(2): 208-17, 2000.
36. Fong L, Brockstedt D, Benike C, Breen JK, Strang G, Ruegg CL, Engleman EG. Dendritic cell-based xenoantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy. *J Immunol*, 167(12): 7150-6, 2001.
37. Gulley J, Chen AP, Dahut W, Arlen PM, Bastian A, Steinberg SM, Tsang K, Panicali D, Poole D, Schlom J, Michael Hamilton J. Phase I study of a vaccine using recombinant vaccinia virus expressing PSA (rV-PSA) in patients with metastatic androgen-independent prostate cancer. *Prostate*, 53(2): 109-17, 2002.
38. Freytag SO, Khil M, Stricker H, Peabody J, Menon M, DePeralta-Venturina M, Nafziger D, Pegg J, Paielli D, Brown S, Barton K, Lu M, Aguilar-Cordova E, Kim JH. Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer. *Cancer Res*, 62(17): 4968-76, 2002.
39. Schellhammer PF, Hershberg RM. Immunotherapy with autologous antigen presenting cells for the treatment of androgen independent prostate cancer. *World J Urol*, 23(1): 47-9, 2005.

40. Saffran DC, Reiter RE, Jakobovits A, Witte ON. Target antigens for prostate cancer immunotherapy. *Cancer Metastasis Rev*, 18(4): 437-49, 1999.
41. Peehl DM. Primary cell cultures as models of prostate cancer developments. *Endocr Relat Cancer*, 12(1): 19-47, 2005.
42. Ward S, Casey D, Labarthe MC, Whelan M, Dalglish A, Pandha H, Todryk S. Immunotherapeutic potential of whole tumour cells. *Cancer Immunol Immunother*, 51(7): 351-7, 2002.
43. Havranek EG, Whelan MA, Greenhalgh R, Dalglish AG, Pandha H. Advances in prostate cancer immunotherapy. *Surg Oncol*, 11(1-2):35-45, 2002.
44. Mitchell MS. Cancer vaccines, a critical review – Part I. *Curr Opin Investig Drugs*, 3(1): 140-9, 2002.
45. Berzofsky JA, Terabe M, Oh S, Belyakov IM, Ahlers JD, Janik JE, Morris JC. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J Clin Invest*, 113(11): 1515-25, 2004.
46. Alving CR. Design and selection of vaccine adjuvants: animal models and human trials. *Vaccine*, 20 Suppl 3: S56-64, 2002.
47. Partin W, Oesterling JE. The clinical usefulness of prostate specific antigen: update 1994. *J Urol*, 152(5 Pt 1): 1358-68, 1994.
48. Partin AW, Carter HB, Chan DW, Epstein JI, Oesterling JE, Rock RC, Weber JP, Walsh PC. Prostate specific antigen in the staging of prostate cancer: influence of tumor differentiation, tumor volume and benign hyperplasia. *J Urol*, 143(4): 747-52, 1990.
49. Partin AW, Kattan MW, Subong EM, Walsh PC, Wojno KJ, Oesterling JE, Scardino PT, Pearson JD. Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. A multi-institutional update. *JAMA*, 277(18): 1445-51, 1997.
50. Kattan MW, Eastham JA, Stapleton AM, Wheeler TM, Scardino PT. A preoperative nomogram for disease recurrence following radical prostatectomy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 90(10): 766-71, 1998.
51. Huston DP. The biology of the immune system. *JAMA*, 278(22): 1804-14, 1997.
52. Belardelli F, Ferrantini M, Proietti E, Kirkwood JM. Interferon-alpha in tumor immunity and immunology. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13(2): 119-34, 2002.
53. Huber CH, Wolfel T. Immunotherapy of cancer: from vision to standard clinical practice. *J Cancer Res Clin Oncol*, 130(7): 367-74, 2004.
54. Mocellin S, Rossi CR, Nitti D. Cancer vaccine development: on the way to break immune tolerance to malignant cells. *Exp Cell Res*, 299(2): 267-78, 2004.

55. Li Q, Normolle DP, Sayre DM, Zeng X, Sun R, Jiang G, Redman BD, Chang AE. Immunological effects of BCG as an adjuvant in autologous tumor vaccines. *Clin Immunol*, 94(1): 64-72, 2000.
56. Harris JE, Ryan L, Hoover HC Jr, Stuart RK, Oken MM, Benson AB 3rd, Mansour E, Haller DG, Manola J, Hanna MG Jr. Adjuvant active specific immunotherapy for stage II and III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: Eastern Cooperative Oncology Group Study E5283. *J Clin Oncol*, 18(1): 148-57, 2000.
57. Dillman RO, Barth NM, VanderMolen LA, Garfield DH, De Leon C, O'Connor AA, Mahdavi K, Nayak SK. Treatment of kidney cancer with autologous tumor cell vaccines of short-term cell lines derived from renal cell carcinoma. *Cancer Biother Radiopharm*, 16(1): 47-54, 2001.
58. Berd D, Sato T, Maguire HC Jr, Kairys J, Mastrangelo MJ. Immunopharmacologic analysis of an autologous, hapten-modified human melanoma vaccine. *J Clin Oncol*, 22(3): 403-15, 2004.
59. Vermorken JB, Claessen AM, van Tinteren H, Gall HE, Ezinga R, Meijer S, Scheper RJ, Meijer CJ, Bloemena E, Ransom JH, Hanna MG Jr, Pinedo HM. Active specific immunotherapy for stage II and III human colon cancer: a randomised trial. *Lancet*, 353(9150): 345-50, 1999.
60. Peters LC, Brandhorst JS, Hanna MG Jr. Preparation of immunotherapeutic autologous tumor cell vaccines from solid tumors. *Cancer Res*, 39(4): 1353-60, 1979.
61. Hanna MG Jr, Brandhorst JS, Peters LC. Active specific immunotherapy of residual micrometastasis: an evaluation of sources, doses and ratios of BCG with tumor cells. *Cancer Immunol Immunother*, 7: 165-73, 1979.
62. Peters LC, Hanna MG Jr. Active specific immunotherapy of established micrometastasis: effect of cryopreservation procedures on tumor cell immunogenicity in guinea pigs. *J Natl Cancer Inst*, 64(6): 1521-5, 1980.
63. Hoover HC Jr, Surdyke MG, Dangel RB, Peters LC, Hanna MG Jr. Prospectively randomized trial of adjuvant active-specific immunotherapy for human colorectal cancer. *Cancer*, 55(6): 1236-43, 1985.
64. Galligioni E, Quaia M, Merlo A, Carbone A, Spada A, Favaro D, Santarosa M, Sacco C, Talamini R. Adjuvant immunotherapy treatment of renal carcinoma patients with autologous tumor cells and bacillus Calmette-Guerin: five-year results of a prospective randomized study. *Cancer*, 77(12): 2560-6, 1996.
65. Jocham D, Richter A, Hoffmann L, Iwig K, Fahlenkamp D, Zakrzewski G, Schmitt E, Dannenberg T, Lehmacher W, von Wietersheim J, Doehn C. Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial. *Lancet*, 363(9409): 594-9, 2004.
66. Hanna MG Jr, Hoover HC Jr, Vermorken JB, Harris JE, Pinedo HM. Adjuvant active specific immunotherapy of stage II and stage III colon cancer with an autologous tumor



- cell vaccine: first randomized phase III trials show promise. *Vaccine*, 19(17-19): 2576-82, 2001.
67. Nelson WG, Simons JW, Mikhak B, Chang JF, DeMarzo AM, Carducci MA, Kim M, Weber CE, Baccala AA, Goeman MA, Clift SM, Ando DG, Levitsky HI, Cohen LK, Sanda MG, Mulligan RC, Partin AW, Carter HB, Piantadosi S, Marshall FF. Cancer cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer as vaccines for the treatment of genitourinary malignancies. *Cancer Chemoter Pharmacol*, 46 Suppl: S67-72, 2000.
68. Eaton JD, Perry MJ, Nicholson S, Guckian M, Russell N, Whelan M, Kirby RS. Allogeneic whole-cell vaccine: a phase I/II study in men with hormone-refractory prostate cancer. *BJU Int*, 89(1): 19-26, 2002.
69. Dillman RO, Nayak SK, Beutel L. Establishing in vitro cultures of autologous tumor cells for use in active specific immunotherapy. *J Immunother*, 14(1): 65-9, 1993.
70. Salgia R, Lynch T, Skarin A, Lucca J, Lynch C, Jung K, Hodi FS, Jaklitsch M, Mentzer S, Swanson S, Lukanich J, Bueno R, Wain J, Mathisen D, Wright C, Fidias P, Donahue D, Clift S, Hardy S, Neuberg D, Mulligan R, Webb I, Sugarbaker D, Mihm M, Dranoff G. Vaccination with irradiated autologous tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments antitumor immunity in some patients with metastatic non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol*, 21(4): 624-30, 2003.
71. Clarke SM, Merchant DJ. Primary cultures of human prostatic epithelial cell from transurethral resection specimens. *Prostate*, 1(1): 87-94, 1980.
72. Konig JJ, Teubel W, Karnst E, Romijn JC, Schroder FH, Hagemeyer A. Cytogenetic analysis of 39 prostate carcinomas and evaluation of short-term tissue culture techniques. *Cancer Genet Cytogenet*, 101(2): 116-22, 1998.
73. Lodge PA, Jones LA, Bader RA, Murphy GP, Salgaller ML. Dendritic cell-based immunotherapy of prostate cancer: immune monitoring of a phase II clinical trial. *Cancer Res*, 60(4): 829-33, 2000.
74. Clay TM, Hobeika AC, Mosca PJ, Lyerly HK, Morse MA. Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer. *Clin Cancer Res*, 7(5): 1127-35, 2001.
75. Disis ML, Schiffman K, Gooley TA, McNeel DG, Rinn K, Knutson KL. Delayed-type hypersensitivity response is a predictor of peripheral blood T-cell immunity after HER-2/neu peptide immunization. *Clin Cancer Res*, 6(4): 1347-50, 2000.
76. Pandha HS, John RJ, Hutchinson J, James N, Whelan M, Corbishley C, Dalglish AG. Dendritic cell immunotherapy for urological cancers using cryopreserved allogeneic tumour lysate-pulsed cells: a phase I/II study. *BJU Int*, 94(3): 412-8, 2004.
77. Baars A, Claessen AM, van den Eertwegh AJ, Gall HE, Stam AG, Meijer S, Giaccone G, Meijer CJ, Scheper RJ, Wagstaff J, Vermorken JB, Pinedo HM. Skin tests predict survival after autologous tumor cell vaccination in metastatic melanoma: experience in 81 patients. *Ann Oncol*, 11(8): 965-70, 2000.

78. Lotem M, Peretz T, Drize O, Gimmon Z, Ad El D, Weitzen R, Goldberg H, Ben David I, Prus D, Hamburger T, Shiloni E. Autologous cell vaccine as a post operative adjuvant treatment for high-risk melanoma patients (AJCC stages III and IV). *Br J Cancer*, 86(10): 1534-9, 2002.
79. Hsueh EC, Gupta RK, Qi K, Morton DL. Correlation of specific immune responses with survival in melanoma patients with distant metastases receiving polyvalent melanoma cell vaccine. *J Clin Oncol*, 16(9): 2913-20, 1998.
80. Nencioni A, Grunebach F, Patrone F, Brossart P: Anticancer vaccination strategies. *Ann Oncol*, 15(suppl 4): iv153-60, 2004.
81. Tjoa BA, Lodge PA, Salgaller ML, Boynton AL, Murphy GP. Dendritic cell-based immunotherapy for prostate cancer. *CA Cancer J Clin*, 49(2): 117-28, 1999.
82. Kattan MW, Wheeler TM, Scardino PT. Postoperative nomogram for disease recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. *J Clin Oncol*, 17(5): 1499-507, 1999.
83. Blute ML, Bergstralh EJ, Iocca A, Scherer B, Zincke H. Use of Gleason score, prostate specific antigen, seminal vesicle and margin status to predict biochemical failure after radical prostatectomy. *J Urol*, 165(1): 119-25, 2001).
84. Amling CL, Bergstralh EJ, Blute ML, Slezak JM, Zincke H. Defining prostate specific antigen progression after radical prostatectomy: what is the most appropriate cut point? *J Urol*, 165(4): 1146-51, 2001.
85. Bocchia M, Bronte V, Colombo MP, de Vicentiis A, di Nicola M, Forni G, Lanata L, Lemoli RM, Massaia M, Rondelli D, Zanon P, Tura S. Antitumor vaccination : where we stand. *Haematologica*, 85(11): 1172-206, 2000.
86. Scardino PT, Eastham JA, Pollack A, Sartor AO. Treatment of organ confined, locally advanced and metastatic prostate cancer (course). AUA Annual Meeting, San Francisco, 2004.

**Table 1: Baseline characteristics of TURP and RRP groups**

		<i>Mean</i>	<i>Median</i>	<i>Range</i>
<b>RTUP</b> <b>n = 6</b>	<i>age</i>	<b>73</b>	<b>73</b>	<b>67 - 78</b>
	<i>Pre-op PSA</i>	<b>269</b>	<b>195</b>	<b>109 – 500</b>
	<i>Gleason score</i>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>8 – 10</b>
	<i>TNM</i>	<b>T2-4 Nx M1</b>		
<b>RRP</b> <b>n = 50</b>	<i>age</i>	<b>66</b>	<b>67</b>	<b>43 – 79</b>
	<i>Pre-op PSA</i>	<b>18.1</b>	<b>15.6</b>	<b>8.05 – 52.5</b>
	<i>Gleason score</i>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>6 – 9</b>
	<i>cTNM</i>	<b>T1c (19), T2 (31)</b>		
	<i>pTNM</i>	<b>T0 (2), T2 (16), T3 (30), T4 (2) N+ (5)</b>		

**Table 2: Relevant characteristics of the vaccinated patients**

<b>initials</b>	<b>age</b>	<b>pre-op PSA</b>	<b>pTNM</b>	<b>Gleason score</b>
<b><i>PPL</i></b>	68	15.8	T3a N0	7 (3+4)
<b><i>MRS</i></b>	70	27.9	T3a N0	9 (5+4)
<b><i>JaB</i></b>	68	22.0	T3b N1	9 (5+4)
<b><i>OAC</i></b>	63	19.5	T3b N1	9 (5+4)
<b><i>AAS</i></b>	68	18.4	T3b N1	9 (5+4)
<b><i>AI</i></b>	65	23.4	T3b N0	6 (3+3)
<b><i>JoB</i></b>	69	52.5	T3a N0	7 (3+4)
<b><i>APS</i></b>	68	13.0	T3b N1	7 (4+3)
<b><i>ASO</i></b>	68	20.0	T3b N0	6 (3+3)
<b><i>RC</i></b>	47	24.5	T4a N0	7 (3+4)
<b><i>RG</i></b>	66	27.1	T3b N0	7 (4+3)

**Table 3: Measures (mm) of DTH reactions (induration) in the 11 vaccinated patients (blanks represent missing data)**

<b>Initials</b>	<b>DTH 1<sup>st</sup></b>	<b>DTH 2<sup>nd</sup></b>	<b>DTH 3<sup>rd</sup></b>	<b>DTH 4<sup>th</sup></b>	<b>DTH 5<sup>th</sup></b>
<i>PPL</i>	6	6	5	7	5
<i>MRS</i>	6	5	6	6	5
<i>JaB</i>	7	6	7	6	6
<i>OAC</i>	4	5	6	6	6
<i>AAS</i>	15	4	0	2	4
<i>AI</i>	5	6	5	6	
<i>JoB</i>		0		4	2
<i>APS</i>	25	0	0	0	0
<i>ASO</i>	6	4	3		
<i>RC</i>	0	4	2	4	0
<i>RG</i>	0	0	0	0	0

**Table 4: Adverse effects**

<b>Adverse effects</b>	<b>Number of patients</b>
erythema	11
induration	11
pruritus	11
ulceration	1
Regional adenopathy	2
fever	2

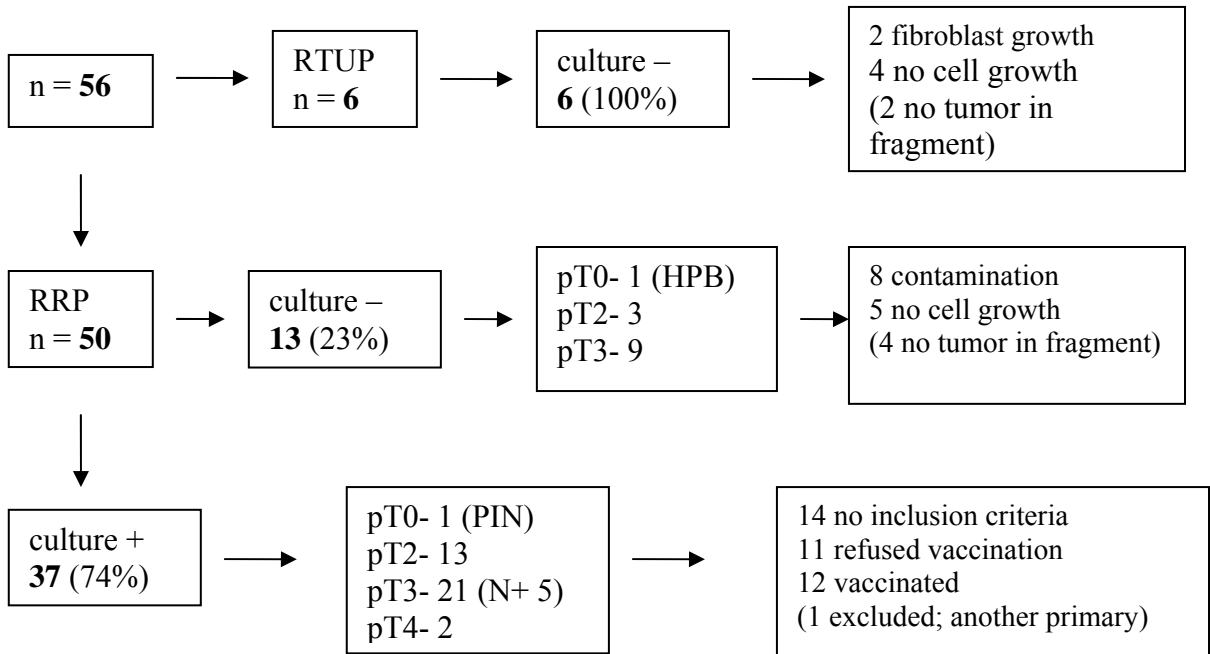


Figure 1: Cell culture results according to collection method

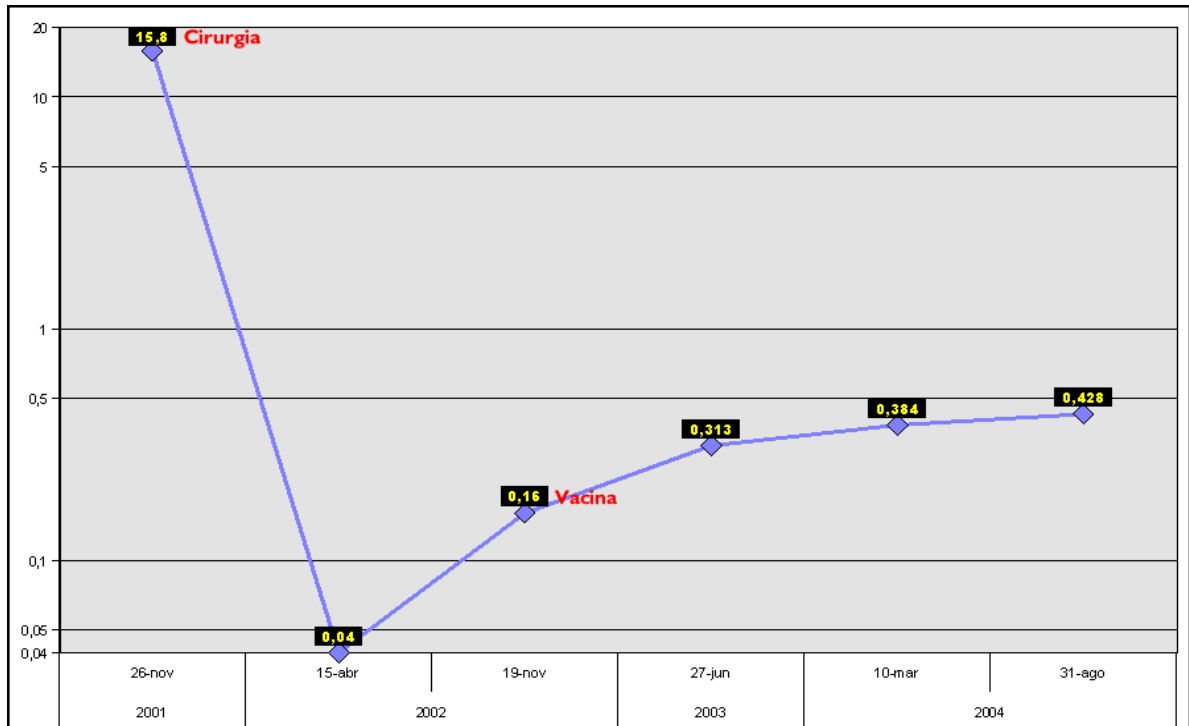
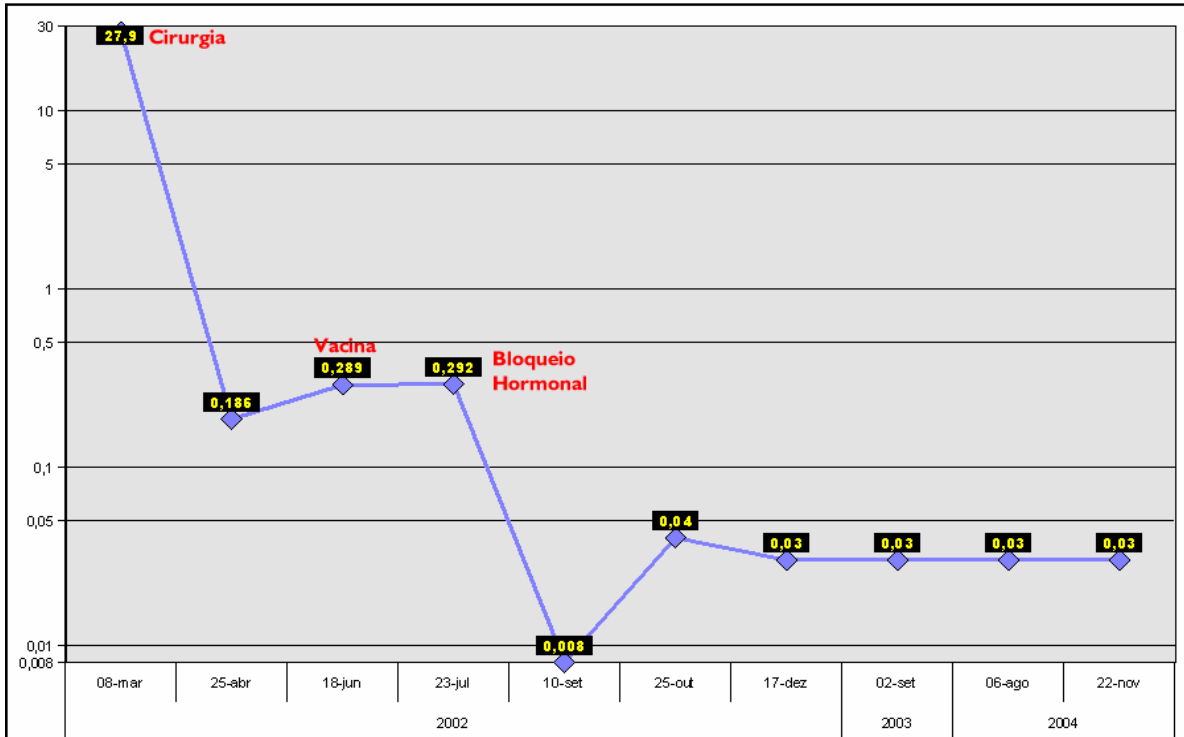
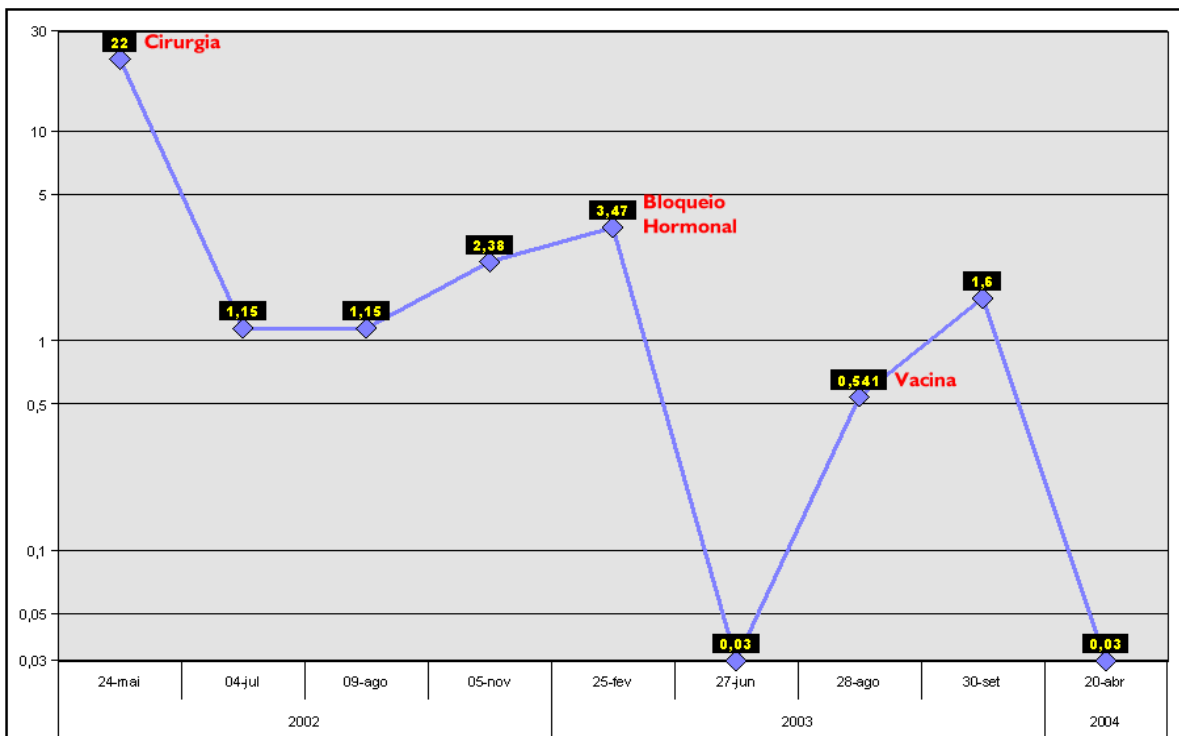


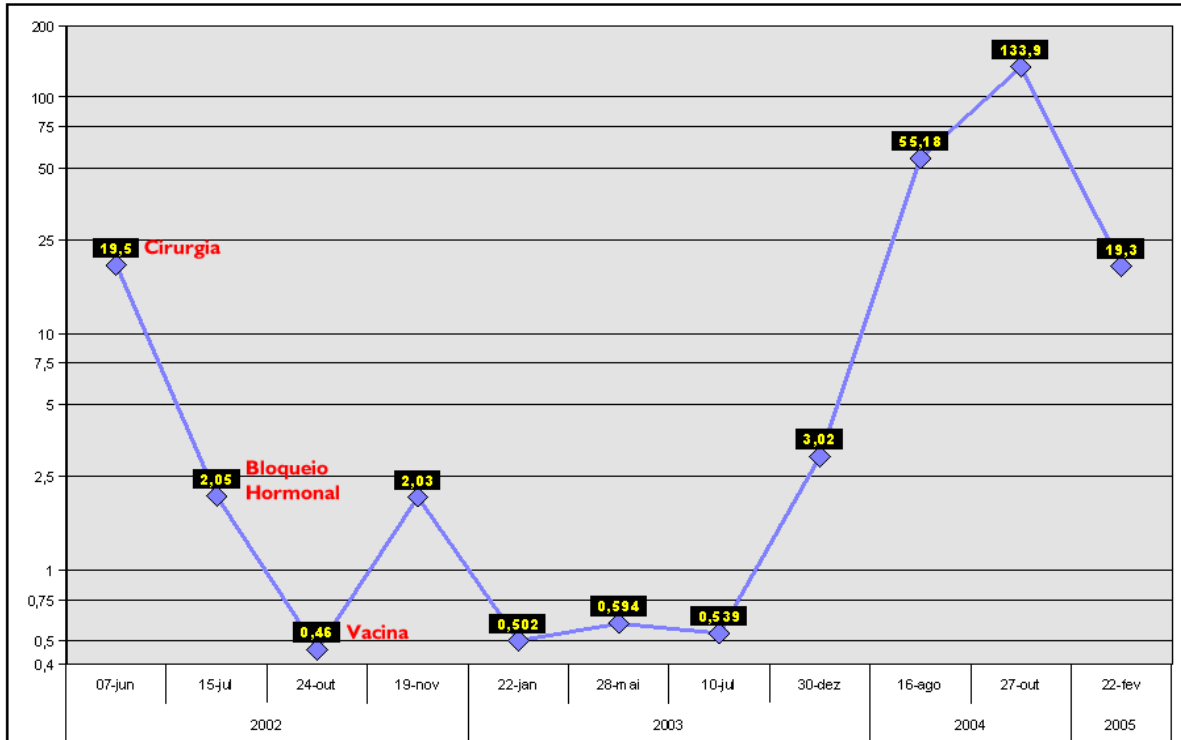
Figure 2: PSA progress and performed interventions (PPL)  
 (PPL – Pre-op PSA 15.8; pT3a N0; G 7(3+4); DTH ≥ 5 mm)



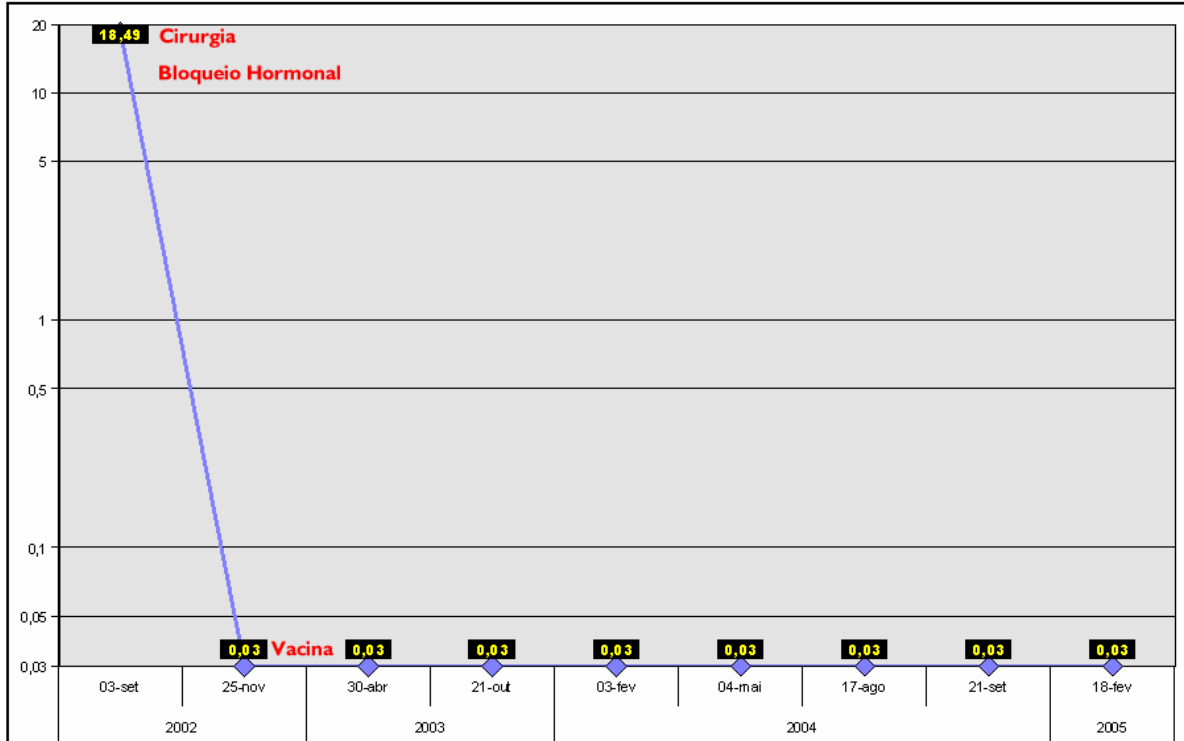
**Figure 3: PSA progress and performed interventions (MRS)**  
*(MRS – Pre-op PSA 27.9; pT3a N0; G 9(5+4); DTH ≥ 5 mm)*



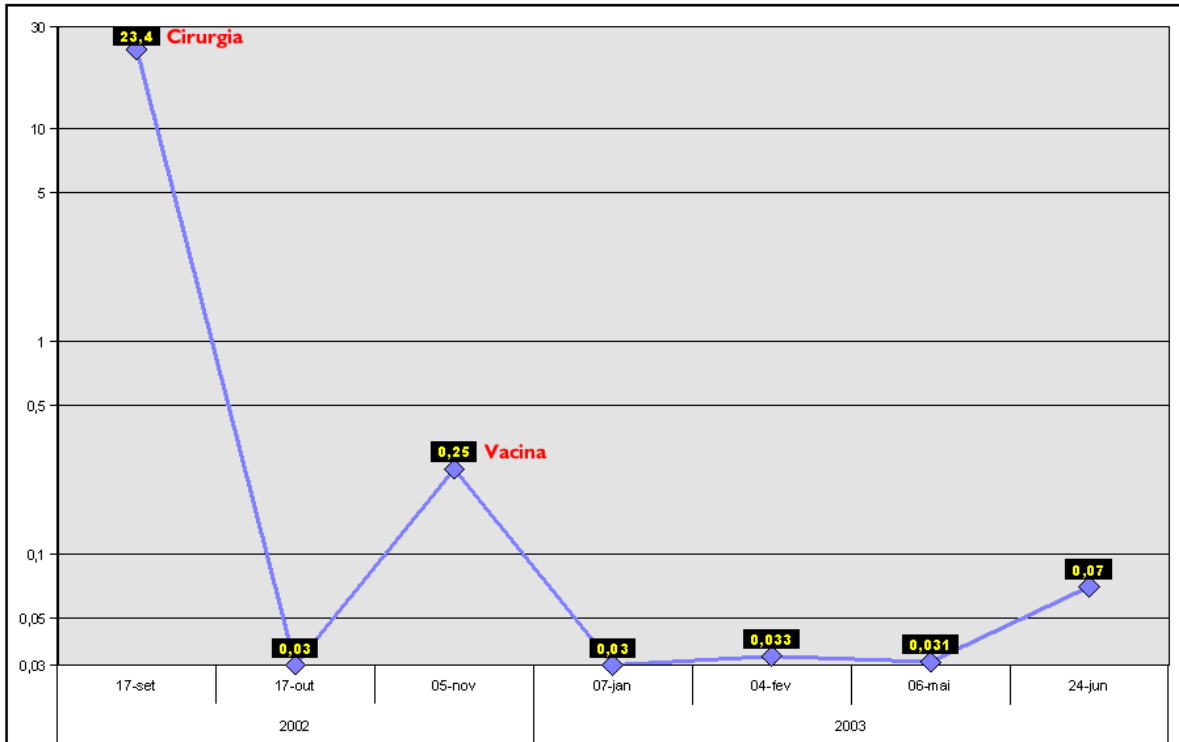
**Figure 4: PSA progress and performed interventions (JaB)**  
*(JaB – Pre-op PSA 22.0; pT3b N1; G 9(5+4); DTH ≥ 5 mm)*



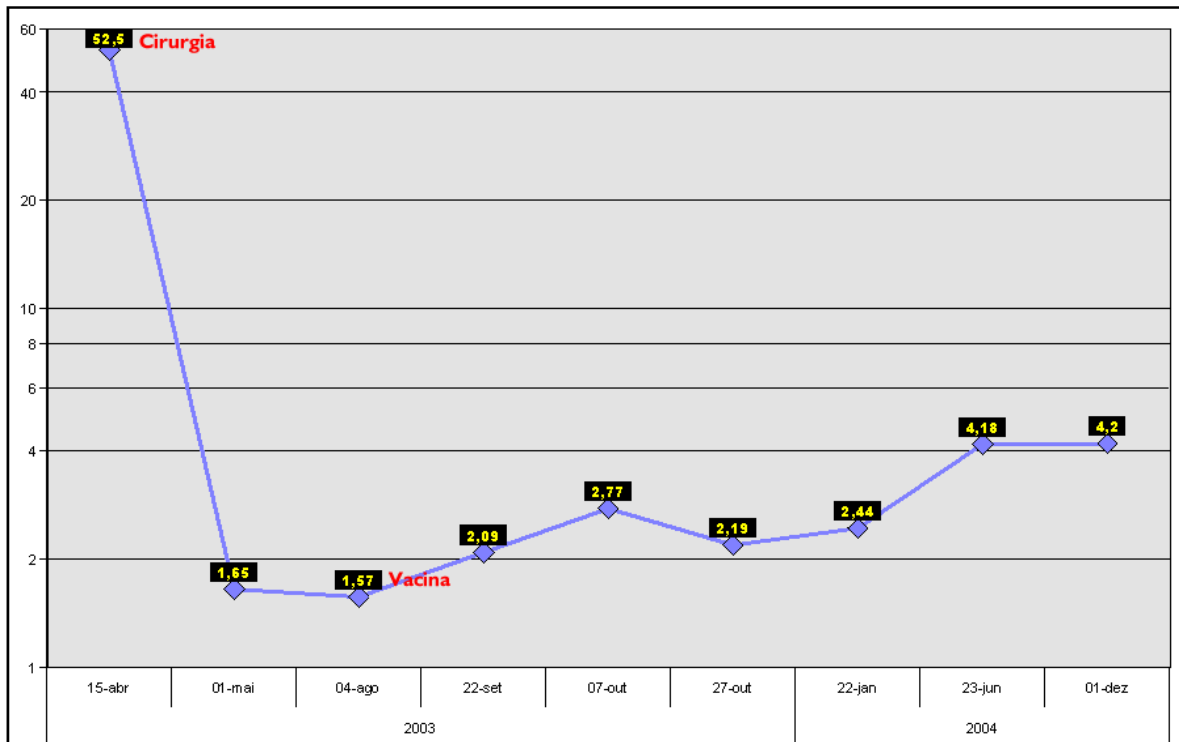
**Figure 5: PSA progress and performed interventions (OAC)**  
*(OAC – Pre-op PSA 19.5; pT3b N1; G 9(5+4); DTH ≥ 5 mm)*



**Figure 6: PSA progress and performed interventions (AAS)**  
*(AAS – Pre-op PSA 18.4; pT3b N1; G 9(5+4), DTH ≥ 10 mm)*

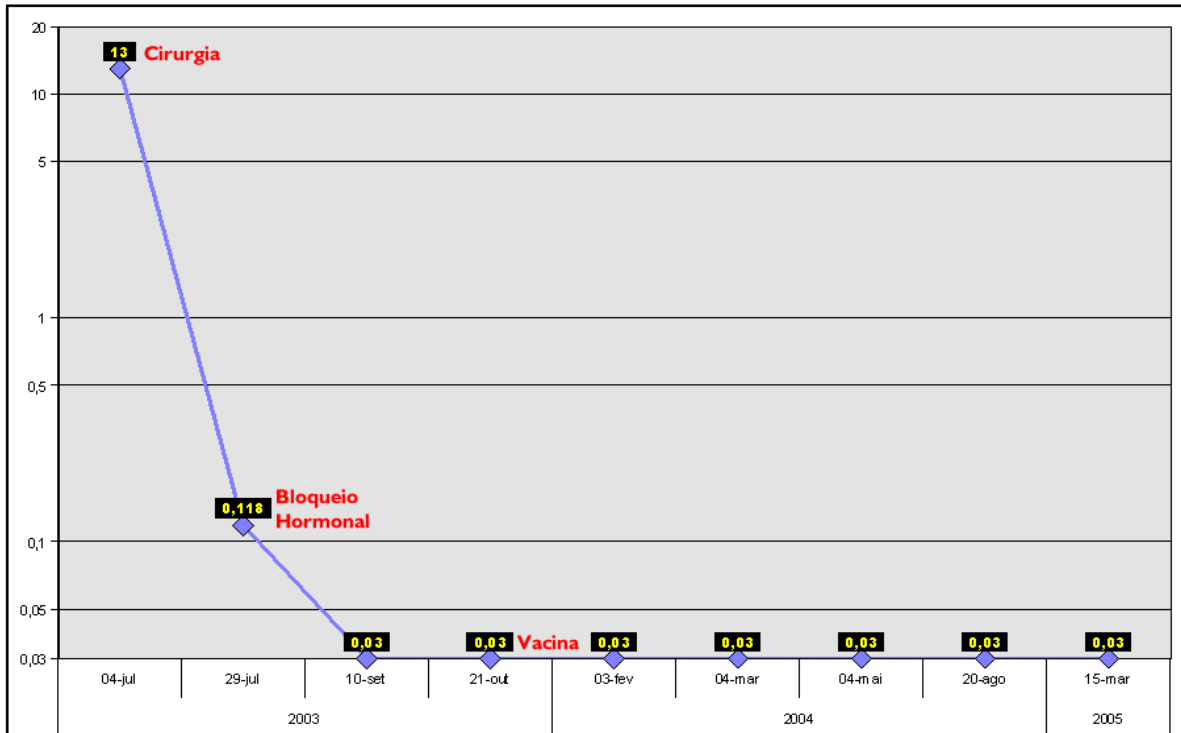


**Figure 7: PSA progress and performed interventions (AI)**  
*(AI – Pre-op PSA 23.4; pT3b N0; G 6(3+3); DTH ≥ 5 mm)*

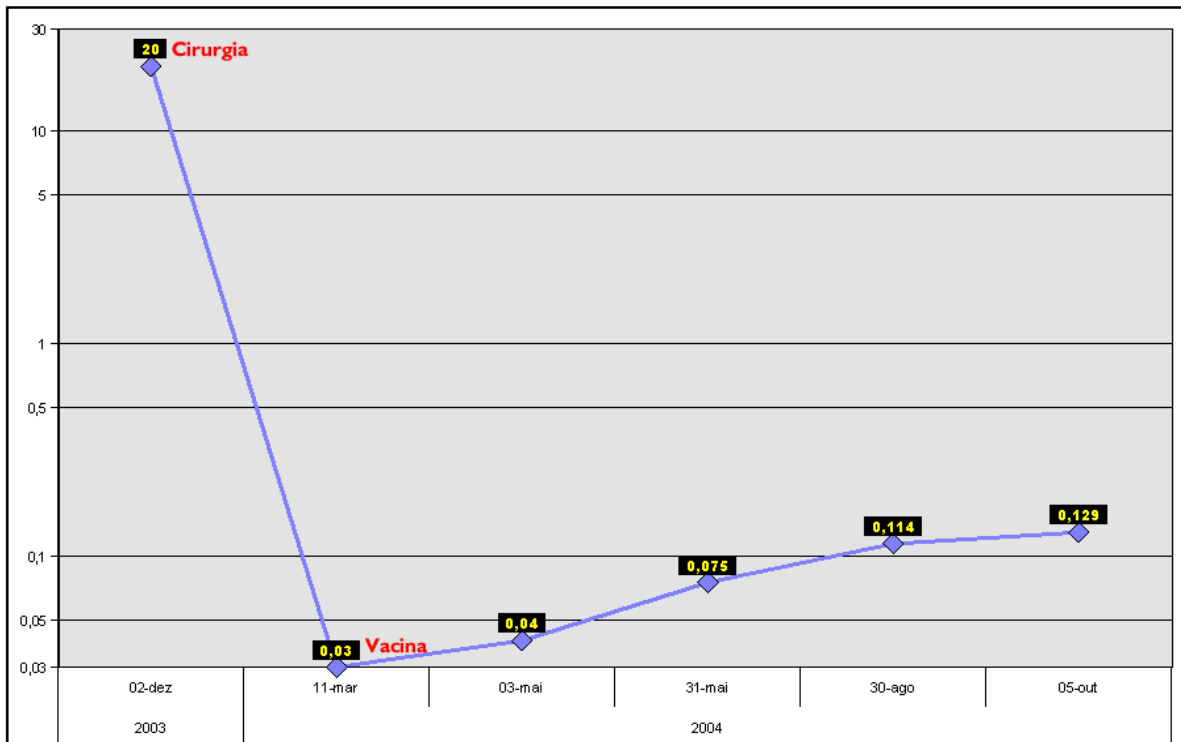


**Figure 8: PSA progress and performed interventions (JoB)**  
*(JoB – Pre-op PSA 52.5; pT3a N0; G 7(3+4); DTH < 5 mm)*

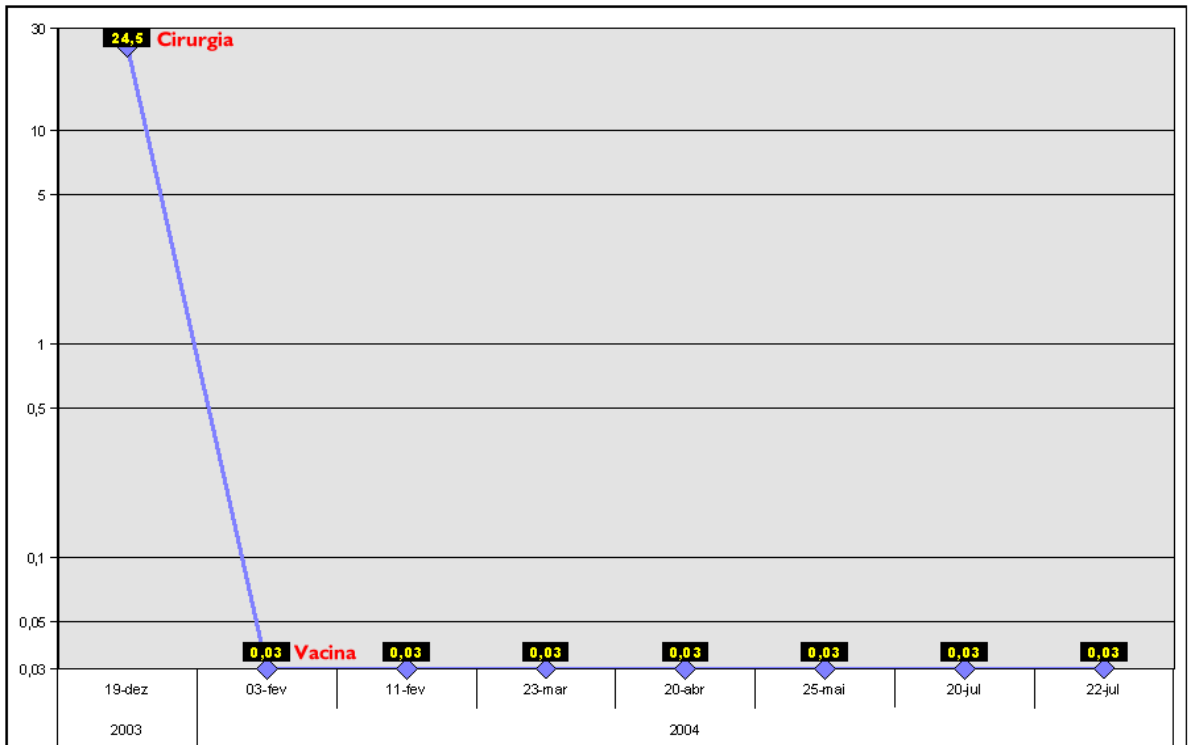




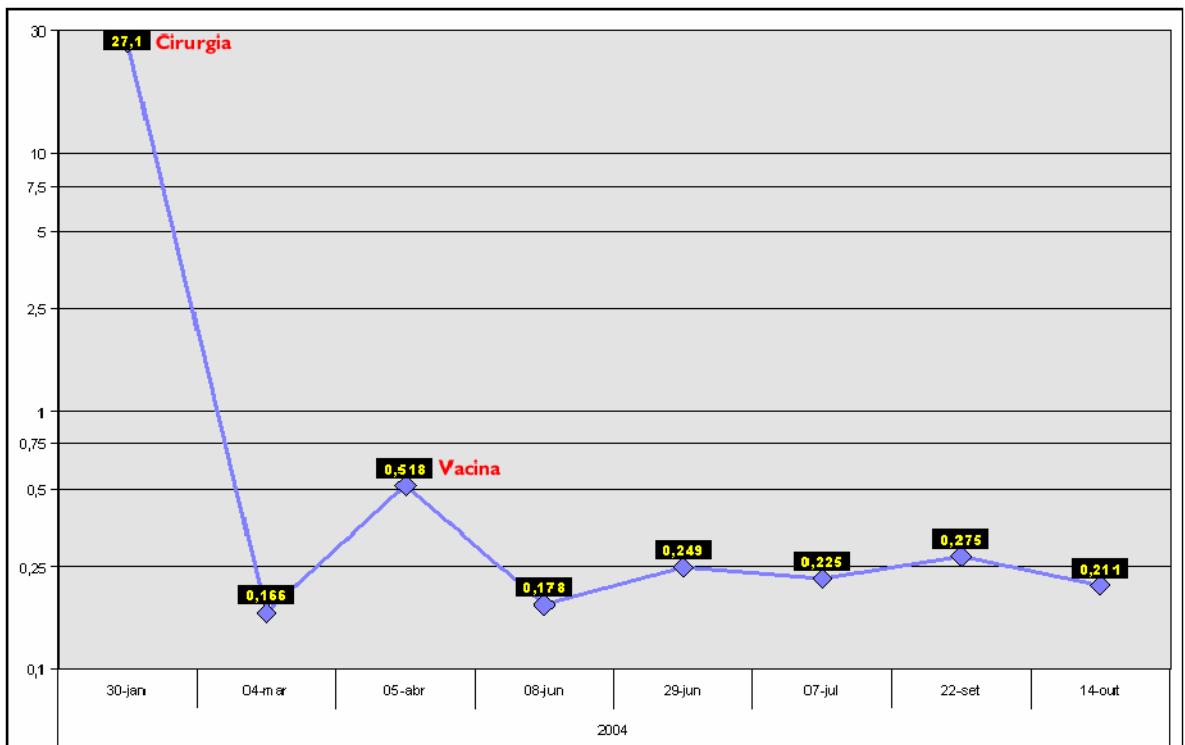
**Figure 9: PSA progress and performed interventions (APS)**  
 (APS – Pre-op PSA 13.0; pT3b N1; G 7(3+4); DTH ≥ 10 mm)



**Figure 10: PSA progress and performed interventions (ASO)**  
 (ASO – Pre-op PSA 20.0; pT3b N0; G 6(3+3); DTH ≥ 5 mm)



**Figure 11: PSA progress and performed interventions (RC)**  
*(RC – Pre-op PSA 24.5; pT4a N0; G 7(3+4); DTH < 5 mm)*



**Figure 12: PSA progress and performed interventions (RG)**  
*(RG – Pre-op PSA 27.1; pT3b N0; G 7(4+3); DTH < 5 mm)*