UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

HELEN FERNANDA MARCELINO PACHECO

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA VACINA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS SOBRE CÉLULAS TUMORAIS DE PRÓSTATA HUMANA (PC3) IN VITRO

Uberaba

2025

HELEN FERNANDA MARCELINO PACHECO

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA VACINA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS SOBRE CÉLULAS TUMORAIS DE PRÓSTATA HUMANA (PC3) IN VITRO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, área de concentração: Patologia Investigativa.
Orientador: Prof. Dr. Marcos de Lucca Moreira Gomes

Uberaba
2025

Catalogação na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

P119a

Pacheco, Helen Fernanda Marcelino
Avaliação da eficácia da vacina de células dendríticas sobre células tumorais de próstata humana (PC3) *in vitro* / Helen Fernanda Marcelino Pacheco. -- 2025.
119 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2025
Orientador: Prof. Dr. Marcos de Lucca Moreira Gomes
Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Carolina Ribeiro Dias

1. Neoplasias da próstata. 2. Imunoterapia. 3. Células dendríticas. 4. Antígeno prostático específico. I. Gomes, Marcos de Lucca Moreira. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III.Título.

CDU 616.65-006

Sônia Maria Rezende Paolinelli - Bibliotecária CRB-6/1191

HELEN FERNANDA MARCELINO PACHECO

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA VACINA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS SOBRE CÉLULAS TUMORAIS DE PRÓSTATA HUMANA (PC3) IN VITRO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, área de concentração: Patologia Investigativa.
Orientador: Prof. Dr. Marcos de Lucca Moreira Gomes

22 de maio de 2025

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Juliana Castro Monteiro-Pirovani
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dra. Márcia Antoniazi Michelin
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Marcos de Lucca Moreira Gomes
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Por isso, agora, eu o dedico ao Senhor por toda a sua vida, pois ele foi pedido ao Senhor.

Samuel 1:28

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por intercessão de N. S. Aparecida, por iluminar e sustentar o meu caminho.

Agradeço a minha família por não medir esforços para realização dos meus projetos e sonhos.

Ao meu orientador e coorientadora pela paciência e apoio durante a trajetória.

RESUMO

O câncer de próstata é o segundo tipo de câncer mais frequente em homens no mundo e, em muitos casos, após tratamentos convencionais, o tumor reincide de forma andrógeno independente, agressivo e resistente, o que diminui a expectativa de vida dos pacientes. Objetivou-se verificar através de uma revisão sistemática de estudos pré-clínicos os detalhes do tratamento de imunoterapia com célula dendrítica para câncer de próstata, além de realizar experimento *in vitro* para verificar a respostas das células prostáticas tumorais (PC3) em co cultura com Célula dendrítica (DCs). Para isso, realizou-se co cultura com combinações entre as células PC3, células dendríticas diferenciadas a partir de células obtidas do sangue periférico de doadores saudáveis e linfócitos também obtidos do sangue periférico dos doadores. A ativação dos linfócitos a partir da vacina de DC está relacionado a resultados clínicos satisfatórios em terapias combinadas ou não. A revisão sistemática foi produzida a partir da seleção dos artigos que incluíram critérios elegíveis como detalhes de publicação, preparo das DCs e detalhes e avaliação do tratamento. O estudo experimental avaliou as citocinas IL-12, IL-10, IL-4, IL,17, TNF-a e IFN-y, a partir do método ELISA juntamente com a avaliação da migração e viabilidade celular de PC3, DC e Linfócitos isoladas e suas possíveis combinações. Entre os resultados encontrados na revisão, os países de origem informados, a maioria dos estudos foi produzida nos Estados Unidos, a padronização dos pacientes foi feita, principalmente, pela confirmação histológica da doença, a avaliação geral dos pacientes, dentre os grupos analisados pelos artigos, apresentou diminuição de antígeno prostático específico (PSA) em grupos respondedores e aumento de células T citotóxicas e auxiliares após a administração da imunoterapia. Os resultados experimentais demonstram diversidade de produção de citocinas nos tempos de 24 horas e 48 horas, com uma produção não significativa de IFN-y, menor migração celular no grupo PC3+DC+Linfócitos e maior viabilidade celular no grupo PC3+DC+Linfócitos. Os resultados sugerem que a o tratamento de câncer de próstata com células do sistema imunológico pode diminuir a invasão das células cancerosas, entretanto, não tendem a induzir a morte celular.

Palavras-chave: Sistema Genital Masculino, Imunoterapia, Tumor, Antígeno Prostático.

ABSTRACT

Prostate cancer is the second most common type of cancer in men worldwide, and in many cases, after conventional treatments, the tumor recurs in an androgen-independent, aggressive, and resistant form, which reduces the life expectancy of patients. The aim of this study was to verify, through a systematic review of preclinical studies, the details of the treatment of dendritic cell immunotherapy for prostate cancer, in addition to performing an in vitro experiment to verify the responses of prostate tumor cells (PC3) in co-culture with dendritic cells. For this, co-culture was performed with combinations of PC-3 cells, dendritic cells (DCs) differentiated from cells obtained from the peripheral blood of healthy donors and lymphocytes also obtained from the peripheral blood of donors. The activation of lymphocytes from the DC vaccine is related to satisfactory clinical results in combined or non-combined therapies. The systematic review was produced from the selection of articles that included eligible criteria such as publication details, preparation of DCs and details and evaluation of the treatment. The experimental study evaluated the cytokines IL-12, IL-10, IL-4, IL-17, TNF-a and IFN-y, from the ELISA method together with the evaluation of the migration and cell viability of PC3, DC and isolated lymphocytes and their possible combinations. Among the results of the study, the countries of origin reported, the majority were produced in the United States, the standardization of patients was done mainly by histological confirmation of the disease, the general evaluation of the patients, among the groups analyzed by the articles, showed a decrease in prostate-specific antigen (PSA) in responder groups and an increase in cytotoxic and helper T cells after the administration of immunotherapy. The experimental results found demonstrate diversity of cytokine production at 24 hours and 48 hours, with a non-significant production of IFN-y, lower cell migration in the PC3 + DC + lymphocytes group and greater cell viability in the PC3 + DC + lymphocytes group. The results suggest that treatment of prostate cancer with immune cells may decrease the invasion of cancer cells, but do not tend to induce cell death.

Keywords: Male Genital System, Immunotherapy, Tumor, Prostate Antigen.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PRISMA flow diagram 44
FIGURA 2 - Main studied characteristics 45
FIGURA 3 - Main characteristics of the included studies 50
FIGURA 4 - Risk of bias summary 54
FIGURA 5 - Activation of T cells by dendritic cells in lymph nodes 62
FIGURA 6 - Valores de TNF-α 101
FIGURA 7 - Valores de INF- γ 102
FIGURA 8 - Valores de IL-14 103
FIGURA 9 - Valores de IL-10 104
FIGURA 10 - Valores de IL-12 105
FIGURA 11 - Valores de IL-17 106
FIGURA 12 - Viabilidade celular após 24 e 48 horas de co-cultura 107
FIGURA 13 - A migração celular 108
FIGURA 14 - Análise do componente principal 109

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Grupos experimentais e células cultivadas 31
TABELA 2 - *Main characteristics of obtaining and preparing the vaccine* 46
TABELA 3 - *Article's search results* 65
TABELA 4 - *Description of the main characteristics of the evaluated studies* 65
TABELA 5 - *Main features of the treatment* 78
TABELA 6 - Grupos experimentais e células cultivadas 99

LISTA DE SIGLAS

ADCC	Citotoxicidade Mediada por Células Dependente de Anticorpo
ADT	Terapia de Privação Androgência
AKT	Proteína Quinase B
ALCAR	Acetil L-Cartinina
ANTI-CD16	Anticorpo Monoclonal Anti-Cd16 Humano
ANTI-CD3	Anticorpo Monoclonal Anti-Cd3 Humano
ANTI-CD4	Anticorpo Monoclonal Anti-Cd4 Humano
ANTI-CD8	Anticorpo Monoclonal Anti-Cd8 Humano
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
AR	Receptor de Andrógeno
BATF3	Fator de Transcrição 3 do Tipo ATF
BCL-2	Linfoma de Células B 2
CAP	Câncer de Próstata
Cas7	Caspase 7
Cas3	Caspase 3
Cas8	Caspase 8
CCR7	Quimiocina C-C7
cDCs	Células Dendríticas Convencionais
CDc1	Células Dendríticas Convencionais do Tipo 1
CDc2	Células Dendríticas Convencionais do Tipo 2
CDP	Progenitor de Célula Dendrítica Comum
CDR3	Região Determinante Complementar 3
CMP	Produtor de Mieloide Comum
CPRM	Padrão para Câncer de Próstata Metástatico
CRPC	Câncer Primário de Próstata Resistente à Castração
CTLA 4	Protreína 4 Associada a Linfócitos T Citotóxicos
CXCR2	Receptor 2 de Quimiocina
CXCR3	Receptor 3 de Quimiocina
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
DC	Célula Dendrítica
DCPM	Meio de Propagação de Células Dendríticas

DCV	Vacina de Célula Dendritica
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DTH	Teste Cutâneo de Hipersensibilidade Retardada
ELISA	Ensaio Imunoabsorvente Associado
ERK	Via de Quinase Regulada por Sinal Extracelular
FADD	Proteína de Domínio De Morte Associada à FAS
FasL	Ligante Fas
FBS	Soro Bovino Fetal
FLT3L	Proteína Ligante a Tirosina Quinase 3 do Receptor Relacionado a Fms
fDC	Célula Dendrítica Folicular
GMC-SF	Fator Estimulador de Colonia de Granulocito e Macrofago
GSK-3B	Glicogênio Sintase Quinase 3 Beta
HIF-1α	Fator Induzível por Hipóxia 1a
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA-A2	Antígeno Leucocitário Humano subunidade A-2
HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano subunidade-DR
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1
IDO	Indoleamina2,3 -dioxigenase
IFN A	Interferon Alfa
IFN B	INTERFERON BETA
IFN-1	INTERFERON 1
IgG1	Imunoglobulina 1
IgG3	Imunoglobulina 3
IL	Interleucina
IL-1B	Interleucina -1B
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-16	Interleucina 16
IL-17	Interleucina 17
IL-20	Interleucina 20

IL-22	Interleucina 22
IL-23	Interleucina 23
ID2	Inibidor de Ligação ao DNA 2
IRF4	Fator Regulador de Interferon 4
IRF8	Fator Regulador de Interferon 8
IMDM	Meio Segundo ISCOVE
LAG 3	Gene de Ativação de Lincócitos 3
mCRPC	Câncer Primário de Próstata Resistente à Castração Metastático
mDC	Células Dendríticas Mielóides Circulantes
MD-DCs	Células Dendríticas Derivadas de Monócitos
MDSC	Células Dendríticas Derivadas de Mielóide
MHC	Molécula de Histocompatibilidade
MIP-1ª	Proteína 1 Alfa Inflamatória de Macrófago
MMP7	Metalopeptidase de Matriz 7
Mtor	Proteína Alvo de Rapamicina em Mamíferos
MTT	Meio de Tolerância ao Sal
NaCL	Cloreto de Sódio
NEPC	Carcinoma de Próstata de Pequenas Células
NK	Natural Killer
NRF2	Fator Nuclear Eritroide 2 Relacionado ao Fator 2
OMS	Organização Mundial Da Saúde
OPTIMEM	Meio Essencial Mínimo
PAP	Fosfatase Ácida Prostática
PAMPs	Padrões Moleculares Associados à Patógenos
PBMC	Célula Mononuclear de Sangue Periférico
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
pDCs	Células Dendríticas Plasmocitoides
PDGF	Fator de Crescimento Derivados de Plaquetas
PDL1	Ligante de Morte Programada 1
PDL2	Ligante de Morte Programada 2
PGE2	Prostaglandina E2
PIN	Neoplasia Intraepitelial Prostática
PRRs	Receptores de Reconhecimento

PSA	Antígeno Prostático Específico
PSCA	Célula Tronco de Próstata
PSMA	Antígeno de Membrana Específico da Próstata
PTEN	Homólogo de Fosfatase e Tensina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SIRPa	Proteína Reguladora de Sinal a
STAT 1	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 1
STAT 3	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3
TARV	Terapia Antirretroviral
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR B	Receptor de Células T Beta
TCR-	Receptores de Células T
TGF B	Fator de Crescimento Transformador Beta
TLR	Receptor Toll-Like
TLR 7	Receptor Toll-Like 7
TLR 9	Receptor Toll-Like 9
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF-a	Fator de Necrose Tumoral a
TPA	Terapia de Privação Androgênica
Treg	Células T Reguladoras
TSLP	Linfopoietina Estromal Tímica
VCAM-1	Molécula de Adesão Celular Vascular 1
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 18
2.1 A ESTRUTURA PROSTÁTICA 18
2.2 O CÂNCER DE PRÓSTATA 19
2.3 USO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS COMO ESTRATÉGIA DE IMUNOTERAPIA 20
2.4 FENÓTIPOS DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS 22
3. JUSTIFICATIVA 26
4. HIPÓTESE 26
5. OBJETIVOS 26
5.1 GERAL 26
5.2 ESPECÍFICOS 26
6. MATERIAL E MÉTODOS DA REVISÃO SISTEMÁTICA 28
6.1 PERGUNTA NORTEADORA E CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE 28
6.2 BUSCAS BIBLIOGRÁFICA 28
6.3 EXTRAÇÃO DE DADOS 29
6.4 RISCO DE VIÉS (ROB) 29
7. MATERIAL E MÉTODOS CAPÍTULO EXPERIMENTAL 30
7.1 CULTURA CÉLULAR 30
7.2 OBTENÇÃO DE LINFÓCITOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS 30
7.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 31
7.4 ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR 31
7.5 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR 31
7.6 ANÁLISE DE CITOCINAS 32
7.7 ANÁLISE ESTATÍSTICAS 33
REFERÊNCIAS 34
CAPÍTULO 1 - Eficácia e modulação imunológica da imunoterapia com células dendríticas no tratamento do câncer de próstata: uma revisão sistemática 38
8. INTRODUCION 40
9. MATERIALS AND METHODS 41

9.1 LITERATURE SEARCH 42
9.2 DATA EXTRACTION 42
9.3 RISK OF BIAS (ROB) 43
10. RESULTS 43
10.1 DESCRIPTION OF THE MAIN CHARACTERISTICS OF THE STUDIES 43
10.2 PATIENT CHARACTERISTICS 44
10.3 MAIN CHARACTERISTICS OF VACCINE ACQUISITION AND PREPARATION 45
10.4 MAIN CHARACTERISTICS OF TREATMENT 46
10.5 IMMUNE RESPONSE 51
10.6 QUALITY CONTROL 53
10.7 METHODOLOGICAL QUALITY ASSESSMENT 53
10.8 DISCUSSION 54
11. CONCLUSIONS 64
REFERNCES 84
CAPÍTULO 2 - Ação da imunoterapia com células dendríticas sobre células tumorais PC3 *in vitro* 96
12. INTRODUÇÃO 97
13. MATERIAL E MÉTODOS 98
13.1 CULTURA CELULAR 98
13.2 OBTENÇÃO DE LINFÓCITOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS 98
13.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 99
13.4 ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR 99
13.5 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR 99
13.6 ANÁLISE DE CITOCINAS 100
13.7 ANÁLISE ESTATÍSTICAS 101
14. RESULTADOS 101
14.1 CITOCINAS 101
14.2 VIABILIDADE CELULAR 106
14.3 MIGRAÇÃO CELULAR 107
14.4 ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL 107
15. DISCUSSÃO 109
15.1 PRODUÇÃO DE CITOCINAS 109
15.2 VIABILIDADE CELULAR 111

15.3 MIGRAÇÃO CELULAR 113
16. CONCLUSÃO 115
REFERÊNCIAS 116
APPENDIX A 65

1 INTRODUÇÃO

De forma geral, o câncer de próstata (CaP) é o segundo tipo de câncer mais comum, com alta incidência inclusive, na América do Sul (Bergengren et al., 2023). O câncer de próstata pode ser sensível ou não a andrógenos, o que é importante para definição do tratamento e a adequação de terapias existentes, podendo ser combinadas ou não. Tumores que tendem a invadir tecidos subjacentes e apresentam recorrência, comumente, são tratados com terapias de privação androgênica, podendo responder por um período ideal ao tratamento ou resistir à essa estratégia terapêutica, tornando-se resistentes à castração. O número de tumores resistentes à castração aumentou, o que interfere na eficiência das terapias (Sekhoacha et al., 2022).

A reprogramação do sistema imunológico tem sido alvo de estudos para a evolução de terapias no âmbito de doenças que escapam da vigilância imunológica ou estão associadas a alguma deficiência do sistema imune. As células dendríticas (DCs) como principais células apresentadoras de antígeno (APC), destacam-se no panorama do estudo de terapias que estimulam o sistema imunológico (Carenza et al., 2019). As APCs reconhecem, processam e apresentam antígenos exógenos às células T. DCs, macrófagos e células B são os três principais tipos de células APCs. Entretanto, somente as DCs possuem a característica de conduzir os antígenos para os linfonodos de drenagem para ativar as células T (Gardner et al., 2020).

As DCs surgem de precursores de mieloides comuns (CMPs), os quais na ausência do fator de transcrição Nur77, geram progenitores de células dendríticas comuns (CDP), que dão origem às DCs plasmocitoides (pDCs) e DCs convencionais (cDCs), compreendendo cDC1 e cDC2. As subpopulações de DCs apresentam características centrais díspares, como a expressão de marcadores, diferentes fatores de transcrição, funções específicas de iniciação e modulação para respostas efetoras de células T (Amon et al., 2020).

As pDCs atuam em resposta à infecção viral com produção de interferon do tipo I. Possuem morfologia de células secretoras e, no seu estado estacionário, não apresentam as características de DCs convencionais.

As DCs convencionais possuem ampla capacidade de apresentação de antígeno após sua maturação. Inicialmente, encontram-se em estado imaturo e após o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), padrões

moleculares associados a danos (DAMPs) ou citocinas inflamatórias entram em estado de ativação. Após a maturação e ativação, as DCs aumentam a expressão de MHC, moléculas coestimulatórias e a produção de citocinas e migram para os linfonodos para dar início às respostas imunes adaptativas (Gardner, et al., 2020).

As cDC1 são importantes para defesa de patógenos intracelulares devido sua capacidade especializada de apresentação cruzada. São especializadas em induzir respostas de Th1 e células T citotóxicas, que são importantes para defesa de patógenos intracelulares e células cancerosas, sendo por atividade citotóxica ou produção de citocinas. Essas células expressam receptor de lectina tipo C. As cDC2 estimulam a resposta de Th2 e Th17, atuando contra patógenos extracelulares. O desenvolvimento de Th17 é promovido por IL-23, TGF-B, IL-1B e IL-6. Também foram denominados como produtores de IL-2, promovendo imunidade com base em células T citotóxicas e Th1. Ainda, expressam alto nível de MHC classe II, CD11c, CD1c e proteína alfa reguladora de sinal (SIRPa) (Balan et al.,2019; Amon et al., 2020).

As características e propriedades das DCs têm sido alvo para desenvolvimento de vacinas que possam sensibilizar as células T contra antígenos tumorais e virais. As DCs em seu estado imaturo contribuem para não ativação da sinalização receptor de células T (TCR) e CD28 em células T, refletindo em anergia ou apoptose de células T e contribuindo para a diferenciação de células T reguladoras (Treg), um perfil importante para ser explorado no contexto de transplantes de órgãos. Por outro lado, DCs maduras liberam citocinas pró-inflamatórias que estimulam células T efetoras e, assim, conseguem promover um ambiente que reconhece antígenos estranhos com a destruição de células com fenótipos agressores, como no microambiente tumoral (El-Awayy et al., 2022).

A imunoterapia a partir de DCs tem sido visada como ferramenta terapêutica principalmente no campo da oncologia. A capacidade das DCs de modular o sistema imunológico de acordo com o estado adquirido desperta o interesse de explorar sua capacidade de atuação de intervenções terapêuticas combinadas ou isolada. Atualmente, pesquisas com Sipuleucel-T, imunoterapia baseada em DCs, tem mostrado resultados promissores em caso de câncer de próstata avançado (Sutherland et al., 2021; Hato et al., 2024). Nesse sentido, esse trabalho apresenta a importância de compreender a aplicabilidade e limitações da imunoterapia com DCs em doenças que escapam da vigilância imunológico, sobretudo, o câncer de próstata.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A ESTRUTURA PROSTÁTICA

A próstata se origina do seio urogenital, surgindo durante o segundo e terceiro trimestre do desenvolvimento, é a maior glândula acessória dos homens. Está localizada na porção posterior à sínfise púbica, abaixo da bexiga e anterior ao reto. É dividida em base, ápice, porções posterior, anterior e inferior-lateral. Em humanos, durante a infância, a próstata pesa cerca de 2g, e, ao longo da puberdade, passa por crescimento, pesando aproximadamente 20 g na fase adulta (Prins; Putz, 2008; Christine et al., 2011).

A próstata é composta por ductos revestidos com um epitélio colunar pseudoestratificado e as células colunares e secretoras com núcleos basais. Células epiteliais basais delimitam a membrana basal epitelial (You et al.,2024). A diferenciação do epitélio prostático acontece junto à maturação do estroma. Os andrógenos estimulam os receptores andrógenos (AR) no seio mesenquimal do seio urogenital e induzem a citodiferenciação em subtipos epiteliais basais e luminais. A brotação prostática também surge a partir da estimulação androgênica durante o desenvolvimento (Hammerer; Huland, 1989; You et al., 2024). O crescimento dos brotos se dá a partir de células epiteliais que se alongam e passam por morfogênese durante o fim do crescimento fetal no período pós-natal. Os ductos glandulares formam lúmens e ocorre a diferenciação do epitélio que reveste os ácinos, sobre a influência de andrógenos, sintetizando substâncias secretoras (Prins; Putz, 2008).

A próstata humana é dividida em 4 zonas anatômicas (McNeal, 1981), que fazem referência central com a uretra. A região periférica, que compõe cerca de 70% da próstata, forma um disco de tecido e os ductos irradiam de forma lateral à uretra e ramificam-se lateralmente próximos à base da próstata. A zona central, compõe 20% do tecido prostático, formada por tecido glandular, tendo seus ductos surgindo próximos do ducto ejaculatório e irradiam lateralmente. A borda lateral dessa zona se une à borda da zona periférica proximal. O tecido dos ácinos dessa região consiste em grandes irregularidades e espaços e as células possuem citoplasmas de cor mais opaca e granular e apresentam comprimento variável, ao contrário dos ácinos da zona periférica, que se ramificam em ductos pequenos, redondos e regulares. Ainda, é

composta por epitélio colunar simples composto por células claras com núcleos pequenos e escuros.

A região pré-prostática possui características semelhantes a zona periférica e sua diferenciação pode estar associada a estágios próximos no desenvolvimento embrionário. Existem nessa região, as glândulas periuretrais, que não possuem musculatura periglandular própria e estão embutidas no estroma periuretral se estendendo em direção ao colo da bexiga, paralelas ao eixo do lúmen uretral (You et al., 2024, Hammerer; Huland, 1989).

A região fribromuscular é totalmente não glandular. Consiste em uma camada espessa de tecido, formando a estrutura anterior da próstata e, posteriormente, se funde à região anteroposterior glandular. Esse tecido é aderente as outras 3 regiões (You et al., 2024).

2.2 O CÂNCER DE PRÓSTATA

O Câncer de próstata é uma doença de relevância global, em 2020, foram diagnosticados 1.414.000 novos casos de câncer e mais de 375.304 mortes (Mumuni et al.,2023). Em 2022, foram registrados 2,30 milhões de novos casos de câncer de próstata no mundo (Who, 2022). No Brasil, segundo dados do Datasus, até março de 2025 já foram diagnosticados 22.999 novos casos. Apesar disso, as taxas de novos casos de câncer de próstata têm caído nos últimos 10 anos, com taxas de mortalidade caindo em média 3,4% a cada ano, o que foi atribuído ao diagnóstico precoce e melhores opções de tratamento. As estatísticas mostram que 1 em cada 7 homens será diagnosticado com câncer de próstata durante sua vida e que 1 em cada 39 homens morrerá da doença (Schatten, 2018).

O câncer de próstata é caracterizado por conter células que se dividem anormalmente, resultando em crescimento anormal. A morte por câncer de próstata ocorre, principalmente, devido à metástase, ou seja, quando as células cancerosas se espalham para outras áreas, incluindo os linfonodos pélvicos e retroperitoneais, a medula espinhal, o reto, os ossos e o cérebro (Schatten, 2018). A transformação maligna da próstata segue um processo de várias etapas, iniciando como neoplasia intraepitelial prostática (PIN), seguida por câncer de próstata localizado e pelo adenocarcinoma de próstata avançado com invasão local, culminando em câncer de próstata metastático (Shen e Abate-Shen, 2010). Uma característica central do câncer

de próstata é sua resposta hormonal, reconhecida pela primeira vez por Huggins e Hodges (1941), que relataram que a castração levava à regressão do tumor em pacientes com câncer de próstata. A terapia de privação androgênica (ADT) usando agentes que bloqueiam a via androgênica é agora o padrão de tratamento para esta doença. A resistência à ADT pode se desenvolver, resultando em câncer primário de próstata resistente à castração (CRPC) ou CRPC metastático (mCRPC). Nos últimos anos, o câncer de próstata variante de baixo receptor de andrógeno (AR) ou AR negativo agressivo com características neuroendócrinas (NEPC) ou características de pequenas células (carcinoma de próstata de pequenas células) aumentou na clínica, o que pode estar relacionado ao uso de potentes antagonistas de AR. Além disso, um subconjunto de tumores independentes de AR não expressa marcadores de diferenciação neuroendócrina (Bluemn et al. 2017). Esses cânceres variantes, que não respondem completamente ao tratamento com ADT, podem surgir da seleção clonal de raros clones AR-baixo ou AR-pré-existentes ou ainda da transdiferenciação de adenocarcinoma AR+ em tumores AR-baixo e AR- (Zou et al. 2017).

Nosso sistema imunológico tem o potencial de eliminar as células neoplásicas. No entanto, as próprias células tumorais são fracas apresentadoras de antígenos (APCs), o que levanta a questão de como uma imunidade tão potente pode ser gerada. Modelos de camundongos demonstram que a geração de imunidade protetora antitumoral depende da apresentação de antígenos tumorais por células dendríticas (DCs) (Diamond et al., 2011; Fuertes et al., 2011).

2.3 USO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS COMO ESTRATÉGIA DE IMUNOTERAPIA

Estratégias de imunoterapia envolvendo DCs têm sido desenvolvidas devido às propriedades especiais dessas células na coordenação das respostas imunes inata e adaptativa. O objetivo da imunoterapia com DC é induzir a ativação e proliferação de células T efetoras específicas do tumor que podem reduzir a massa do tumor de forma específica e que podem induzir memória imunológica para controlar a recidiva do tumor. Neste processo, o primeiro passo é fornecer DCs com antígenos específicos do tumor. Isso pode ser obtido cultivando DCs *ex vivo* que foram derivadas de pacientes com um adjuvante (que induz a maturação de DC) e o antígeno específico do tumor e, em seguida, injetar essas células de volta no paciente ou induzir as DCs a absorver o antígeno específico do tumor *in vivo* (Palucka e Beauchereau, 2012).

As DCs, derivadas de células hematopoiéticas provenientes da medula óssea, podem ser encontradas por todo o corpo e são classicamente divididas em DCs convencionais (cDCs) e DCs plasmocitoides (pDCs). As cDCs são as células do sistema imune mais eficientes em apresentar antígenos às células T e induzir resposta imune adaptativa, enquanto as pDCs são mais eficazes em produzir rapidamente IFN-γ em comparação à função de apresentação de antígenos. Em contextos inflamatórios e/ou infecciosos, monócitos que se originam na medula óssea podem migrar para o tecido inflamado e se diferenciar em cDCs, embora já tenha sido descrita a presença dessas células no estado basal em órgãos como intestino e baço (Liu e Nussenzweig, 2010).

Células dendríticas são encontradas em dois estados funcionais diferentes, “maduro” e “imaturo”. Estes são diferenciados por muitas características, mas a capacidade de ativar células T virgens específicas para antígenos em órgãos linfoides secundários é característica de DC maduras (Hawiger et al., 2001). A maturação de DC é desencadeada por distúrbios da homeostase tecidual, detectados pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (Cerboni et al., 2013). A maturação ativa programas metabólicos, celulares e de transcrição gênica, permitindo que as DC migrem dos tecidos periféricos para zonas de células T em órgãos linfoides secundários, onde pode ocorrer a apresentação do antígeno aos linfócitos T, ativação e expansão clonal dessas células (Randolph et al., 2005). Após a maturação e ativação, as DCs regulam negativamente a fagocitose, aumentam a expressão do MHC e de moléculas co-estimuladoras, aumentam a produção de citocinas e migram para os linfonodos, direcionadas pelo receptor de quimiocina C-C 7 (CCR7) e seus ligantes CCL19 e CCL21, produzidos por células endoteliais linfáticas (Gardner e Ruffell, 2016). Como resultado das mudanças fenotípicas que ocorrem durante a ativação, DCs maduras são capazes de ativar células T virgens e iniciar a resposta imune adaptativa.

No contexto do câncer, há evidências que DCs infiltrantes no tumor possuem a capacidade de identificar antígenos tumorais, amadurecerem naquele microambiente e induzirem respostas antitumorais específicas. Além de liberarem citocinas que ativam células da imunidade inata e, essas, desencadearem a infiltração de células T e melhorar a imunidade geral. Entretanto, no microambiente tumoral, a liberação de citocinas, como IL-10 TGF-B, pode induzir a produção de células T reguladoras

(Tregs), adquirindo um perfil imunossupressor, tendendo ao escape imunológico. Desse modo, o mecanismo de DCs alogênicas, utilizados pelas imunoterapias, é uma alternativa importante para driblar a modificação e exaustão de DCs no microambiente tumoral, assim como a invasão de células cancerosas (Muenst et al., 2016).

2.4 FENÓTIPOS DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

As DCs possuem potencial de ativação de células T e orquestram a atividade efetora em tecidos não linfoides. As CDc1 são especializadas em ativar células T CD8, NK. Para o desenvolvimento de CDc1 é necessária a ativação de leucina básico ATF-Like transcription fator 3 (BATF3), fator regulador do interferon 8 (IRF8) e inibidor de ligação ao DNA 2 (ID2). Esse fenótipo possui marcadores de superfícies específicos, sendo receptor de quimiocina XC1 (XCR1), o domínio de lectina tipo c contendo 9A (CLEC9A) e trombomodulina (THBD também denominada BDCA3 ou CD141).

A capacidade de infiltração de CDC1 em tumores é importante para coordenar a imunogenicidade no local. O recrutamento desse subconjunto é mediado por fatores quimiotáticos produzidos no microambiente tumoral, por exemplo, quimiocinas como CCL5 e XCL1, e pode ser aumentado pela expressão transgênica nas células malignas de FLT3L e XCL1. Antígenos tumorais são liberados após a morte celular imunogênica. O CLEc9A expresso em CDC1 liga-se à F-actina presente nas superfícies de células necróticas, permitindo a apresentação cruzada de antígenos. A expressão de XCR1 e CCR5 pelo CDC1 tem a capacidade de recrutar CTL, NK e NKT, e consequentemente, produzir XCL1, CXCL9/10 e CCL4/5. Concomitantemente, CDC1 produz IL-12, IFN-B, e IL-15, promovendo a ativação e sobrevivência de CTLs e NK. Ocorre expansão de CTLs, que migram para o tumor devido também a atração de quimiocinas liberadas localmente por CDC1 (Cancel et al., 2019).

O escape imunológico pode acontecer por meio de prostaglandina E2 e gelsolina que interfere na função de CDC1 e reduz a ligação de CLEC9A a células mortas, reduzindo a apresentação cruzada (Liu et al., 2010). A infiltração de CDC1 e CTLs em tumores pode não impedir o escape imunológico. Os tumores denominados frios, que são poucos imunogênicos e infiltrados produzem pouca resposta adaptativa. Os tumores liberam fatores que induzem a não diferenciação de CDC1 ou promovem o fenótipo tolerogênico em vez de imunogênico, como a limitação da produção de IL-12 por CDC1. Os tumores quentes expressam neoantígenos tumorais e neles estão

presentes CDc1 e CTLs, mas não possuem funções controladas, contribuindo para imunoedição do câncer e escape imunológico. As CDC1 podem apresentar antígenos tumorais para as CTLs de forma que induza a exaustão através, por exemplo, de receptores de ponto de verificação, como PD-1 ou CTLA4A (Cancel et al.,2019; Bottcher; Sousa 2018).

Por outro lado, a ausência de CDc1 em tumores tem sido evidenciada como fator contribuinte para a evasão imunológica. A baixa abundância de CDC1 pode estar associada a limitação da produção de FLT3L e fatores de crescimento importantes para a expansão, supressão do recrutamento através de quimiocinas de CDC1. A produção de PGE2 produzida no microambiente tumoral inibe a produção de quimioatraentes de CDC1 e células NK. A perda do supressor de tumor TRP53 contribui para redução de produção CCL3, CCL4 e CCL5, citocinas que induzem o recrutamento de CDC1 (Bottcher; Sousa, 2018)

As DCs do tipo 2 são especializadas em apresentação de antígenos aos linfócitos T CD4 e comumente polarizam para o padrão Th1 ou Th17. CDC2 podem ser divididas, principalmente, em 2 subconjuntos: DC2, expressando CD5 e manifestando perfil de expressão clássico, e DC3 expressando CD14, CD36 e CD163. As DC2 expressam lectina tipo c e receptores que reconhecem fungos, bactérias e captam antígenos para apresenta-los a células T CD4+. Também expressam marcadores, como CD172a (SIRPa), CD11b e sua diferenciação e migração para linfonodos de drenagem depende de IRF4 (Ronchese et al, 2024). O subconjunto CD5 produz TNF-A, IL-6, IL-20 e IL-23 ao se ligar a TLR, e, ainda, são mais ativos na migração relacionada a CCR7, estimulando a proliferação de células T virgens e a polarização de células T, Th2, Th1, Th17, Th22 e T reguladoras**.** CDC2 com menor expressão de CD5 são menos ativos na proliferação celular e destacam na produção de Th1 (Collin; Bigley; 2018).

A linhagem CDC2 produz IL-12 e IL-23, que contribuem para o desenvolvimento dos fenótipos de células T virgens em padrões Th1 e Th17, além de produzirem também IL-1B, IL-6 e Activina A e TGF-B que induzem a diferenciação de células Th foliculares. As DC3 induzem a diferenciação de Th1 e secretam citocinas, como IL-1, TNF-a, IL-8 e IL-10 (Saito et al., 2022).

No microambiente tumoral, os CDC2s apresentam os antígenos associados a tumores a células TCD4+ e fazem apresentação cruzada de células CD8 no microambiente tumoral (TME), o que induz a atividade antitumoral mediada por CTLs.

O reconhecimento de antígenos associados a tumores associado a regulação positiva de moléculas coestimulatórias na superfície celular desencadeia a ativação de CDC2, consequentemente, a migração para os linfonodos de drenagem tumoral. As CDC2s migratórias apresentam os antígenos tumorais para as células TCD4+ através da transferência desses antígenos paras as DCs residentes, incluindo outras CDC2. As DCs residentes também secretam IL-12 e IL-23, induzindo a diferenciação de CD4 + virgens em padrões Th1 e Th17 efetoras. As CDC2s respondem de forma eficaz a lipossacarídeos, flagelina, poli IC e R848, sendo importantes contribuintes para ativação da resposta imune (Saito et al.,2022).

As células dendríticas plasmocitoides (pDC) expressam os marcadores GMPD, CD123 (IL-3R) e CD45RA, que na diferenciação de DC mieloides são regulados de forma negativa. Também possuem receptores necessários para ativação da produção de interferon I, como CD303 (CLEC4C; BDCA-2), CD304 (neuropilina; BDCA-4), CD85K (ILT3) e CD85g (ILT7). As pDCs são especializadas em produzir Interferon do tipo I, tipo III e produção de citocinas. Os receptores Tool-like 7 (TLR7) e TLR9 são os receptores fundamentais de reconhecimento de padrões que detectam RNA e DNA. A regulação da produção de Interferon e citocinas dependem de sinalizações diferentes, sendo o IRF7 importante par a produção de Interferon do tipo I e a produção de TNF-a e IL-6 dependentes da via de de fator nuclear k-B (Collin; Bigley, 2018). As pDCs também expressam IgTL37, CD4, CD68, ILT3 e CD123, que é receptor de IL-3, que caracteriza a sobrevivência de pDCs em ensaios *in vitro* (Swiecki; Colonna, 2015).

A capacidade das pDCs produzirem interferon frente às infecções virais promove a ativação de genes que induzem a apoptose de células infectadas. Com a produção de IFN-I, IL-12 e IL-18, essas células induzem a ativação de células NK, que liberam IFN-γ e provoca a lise de células alvos (Swiecki; Colonna, 2015).

As pDCs também possuem a capacidade de ativação de células T CD4, não tão eficiente quanto a cDCs, através da expressão de MHC de classe I e II junto ao CD40, CD80 e CD86, fazendo a apresentação cruzada de antígenos para as células TCD4 e a polarização para Th1. Na presença de sinais de ativação recebidos por TLRs e demais sinais de receptores de reconhecimento de padrões, elas assumem características imunogênicas. Quando as pDCs não são estimuladas ou expressam indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO), ICOSL, OX40L, ligante de morte programada (PD-L1) e granzimas B, elas induzem a tolerância de células tumorais e aloantígenos.

Através do receptor CCR9, as pDCs induzem fortemente a função de células T reg, promovendo a tolerância imunológica (Swiecki; Colonna, 2015).

As pDCs assumem características díspares na imunidade do tumor. Essas células são recrutadas para o microambiente tumoral através por quimiocinas, como CXCL12 e CCL20 e podem também serem liberadas por células tumorais ou pelo próprio microambiente tumoral. O estado tolerogênico pode ser ativado por citocinas imunossupressoras ou oncometabólicos. As pDCs com característica tolerogências têm uma baixa produção de IFN-I e tendem a diferenciação de Treg concomitantemente a expressão de moléculas imunomoduladoras, como IDO, estando relacionado a resultados ruins na clínica. As pDCs também podem induzir a maturação de DC1, que apresentam antígenos a células T CD8 e desempenha uma resposta imune efetora (Monti et al.,2024).

As células dendríticas foliculares (fDCs) são células importantes para a resposta imune humoral. Estão situadas nos órgãos linfoides secundários, nos folículos das células B. Essas células capturam, retêm e apresentam antígenos às células B e não possuem capacidade fagocítica. As funções imunes da fDC são mediadas por interações no centro germinativo dos folículos das células B. Através de CXCL13, as fDCs recrutam o receptor cxc 4 e os linfócitos B e T positivos CXCR5 para o interior dos folículos. A interação das fDCs com células B se dá através de VCAM1 e ICAM1 que ligam ITGA1 e ITGB2 nesses linfócitos. Essas modulações configuram a eficácia do sistema imune após a apresentação do antígeno como imunocomplexo, que são transportados pelas fDCs e, assim, ativam células B. Ao ligar o antígeno nas fDCs, as células B recebem sinais, como do fator de ativação de células B (BAFF) (Facchetti et al., 2021).

3 JUSTIFICATIVA

O câncer de próstata é um dos mais prevalentes na população masculina, sendo um dos mais relacionados à mortalidade masculina. Entretanto, os tratamentos convencionais como quimioterapia, radioterapia e cirurgias podem não ser possíveis ou efetivos. Assim, é necessário o desenvolvimento de novas terapias que possam promover a regressão total ou mesmo evitar metástases ou recidivas. A Imunoterapia com células dendríticas tem sido utilizada com sucesso em inúmeros tipos de tumor, mas é de extrema importância avaliar a proliferação e sobrevivência de células tumorais prostáticas frente a esta nova terapia com o objetivo de propor novas formas de tratamento.

4 HIPÓTESE

O uso da imunoterapia de células dendríticas é eficaz na redução da proliferação e da sobrevivência de células tumorais prostáticas em ensaios *in vitro*.

5 OBJETIVOS

5.1 GERAL

Compreender o mecanismo e efeitos da imunoterapia e utilizar as células dendríticas para diminuir a proliferação e viabilidade de células tumorais prostáticas *in vitro*.

5.2 ESPECÍFICOS

- Elaborar uma revisão sistemática a partir de artigos encontrados retratando a imunoterapia e sua aplicabilidade no contexto do câncer de próstata;
- Obter DCs a partir de células do sangue periférico humano;
- Produzir a vacina de célula dendríticas;
- Determinar a viabilidade das DCs
- Avaliar a produção das citocinas IFN-γ, IL-12, IL-4, IL-10, IL-17 e TNF-α;

- Avaliar a migração de PC3 solada ou em co cultura

6 MATERIAL E MÉTODOS DA REVISÃO SISTEMÁTICA

6.1 Pergunta norteadora e critérios de elegibilidade

A pergunta norteadora deste estudo foi “Quão eficaz é o uso de células dendríticas no combate ao câncer de próstata?” A revisão sistemática seguiu as diretrizes PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) [17]. O fluxograma PRISMA é apresentado na Figura 1. A estratégia metodológica foi registrada no International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) sob o número de registro CRD42024538296.

A seleção dos estudos foi baseada nos seguintes critérios de elegibilidade: (1) estudos avaliando células dendríticas como um método de imunoterapia, (2) estudos com um desenho metodológico incluindo estudos pré-clínicos e clínicos, e (3) estudos envolvendo tratamento de imunoterapia para câncer de próstata. Publicações fora do escopo de interesse ou não classificadas como artigos experimentais envolvendo humanos, bem como revisões de literatura, resumos indisponíveis online, comentários, notas, cartas ao editor, estudos de caso e experimentos com animais foram excluídas.

6.2 BUSCA BIBLIOGRÁFICA

A busca bibliográfica foi realizada em 28 de outubro de 2023, às 20h13, nas seguintes bases de dados: PubMed/Medline (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed), Scopus (https://www.scopus.com/home.uri), Web of Science (https://www.webofknowledge.com) e Embase (https://www.embase.com/landing?status=grey). Os descritores de busca foram organizados com base em filtros desenvolvidos para dois domínios: (i) células dendríticas e (ii) ensaios clínicos de câncer urogenital masculino. Os filtros para PubMed/Medline foram construídos seguindo a distribuição hierárquica de termos MeSH (www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh). Esses filtros foram então adaptados e aplicados aos bancos de dados Web of Science, Embase e Scopus. Descritores e palavras-chave foram combinados usando operadores booleanos (AND/OR), e o algoritmo

[TIAB] foi empregado para descritores não MeSH. Estudos disponíveis em inglês, português e espanhol foram considerados para inclusão.

6.3 EXTRAÇÃO DE DADOS

Dois revisores independentes (FCRD e JLFF) identificaram estudos elegíveis analisando seus títulos e resumos. A concordância entre eles foi avaliada usando o teste Kappa (kappa = 0,969). Quaisquer discrepâncias foram resolvidas por meio de consulta com um terceiro pesquisador (MLMG). Os dados registrados de cada estudo elegível incluíram: (i) detalhes da publicação e características do estudo (autores, país, tipo de estudo, total de participantes, idade; formulário de consentimento informado; aprovação do comitê de ética, análise estatística; critérios de tratamento; ablação de andrógeno, segurança, qualidade de vida e dor, resposta clínica e tratamento de acompanhamento em entrevistados); (ii) Preparação de células dendríticas (pré-estimulação, propagação, pulsação, maturação, geração e vacinação de DCs); (iii) Detalhes do tratamento (grupos experimentais, dose, via de administração, duração do tratamento, frequência do tratamento e adjuvantes sistêmicos); (iv) Avaliação geral do paciente (respostas imunes, resposta do PSA, toxicidade aguda, citotoxicidade e citólise); (v) Avaliação da resposta imune (citocinas anti e pró-inflamatórias, teste de hipersensibilidade do tipo retardado (DTH), capacidade estimulatória de células T e resposta imune contra antígenos tumorais); (vi) Efeitos colaterais; (vii) MoDCs (fenótipos de MoDC, capacidade de migração e proliferação).

6.4 RISCO DE VIÉS (ROB)

Para avaliar o risco de viés nos estudos selecionados, a ferramenta Cochrane Risk of Bias foi usada com uma abordagem específica baseada em resultados [18]. Dois membros da equipe avaliaram os estudos de forma independente (FCRD e JLFF), e quaisquer divergências foram resolvidas por um terceiro membro da equipe. Cada estudo foi analisado com base nas informações contidas no próprio estudo, sem fazer suposições. Os estudos foram avaliados quanto à geração de sequência e ocultação de alocação (viés de seleção), cegamento de participantes e profissionais (viés de desempenho), cegamento de avaliadores (viés de detecção), dados

incompletos (viés de atrito) e relato seletivo (viés de relato). Além disso, os pesquisadores deste estudo examinaram se os estudos abordaram o uso do consentimento informado, se foram submetidos à aprovação do comitê de ética, se avaliaram a segurança do tratamento e se relataram a ocorrência de efeitos adversos. Os itens na ferramenta RoB foram classificados como "baixo risco de viés", "alto risco de viés" ou "pouco claro" (sugerindo que o item não foi relatado, tornando assim o risco de viés incerto).

7 MATERIAL E MÉTODOS - CAPÍTULO EXPERIMENTAL

7.1 CULTURA CELULAR

A linhagem celular de câncer de próstata humano PC3 foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA) e cultivada em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), contendo 10% de soro bovino fetal (FBS), 1% de penicilina/estreptomicina, e 100 mg/dL de glicose (D5546, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em uma incubadora umidificada a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2. Antes e durante os procedimentos experimentais, as células foram verificadas para garantir que estivessem livres de contaminação.

7.2 OBTENÇÃO DE LINFÓCITOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS

Todos os procedimentos de obtenção de DCs e linfócitos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM (parecer 683). Brevemente, as células mononucleares do sangue periférico de doadores saudáveis foram obtidas por separação e densidade em gradiente de ficoll e após a contagem foram mantidas em condições ideais de cultura (37°C e 5% de CO_2) em meio IMDM completo. Após 24h de cultivo, as células não aderentes (linfócitos) foram separadas e as células aderentes foram submetidas à diferenciação. O processo de diferenciação de DCs foi realizado com GM-CSF e IL-4 (5ng/ml) durante 5 dias e maturadas com TNF-α (5ng/ml) adicionado ao antígeno prostático (obtido do lisado das células das linhagens tumorais) durante 2 dias.

7.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para responder aos objetivos descritos no item 5, realizamos o co-cultivo das células PC3 com DCs e/ou linfócitos de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Grupos experimentais e células cultivadas

Grupos	Células PC3	DCs	Linfócitos
PC3	+	-	-
PC3DC	+	+	-
PC3DCLinf	+	+	+
PC3Linf	+	-	+
DCLinf	-	+	+
DC	-	+	-
Linf	-	-	+

Nota: (+) indica a presença ou (-) ausência da linhagem no meio de cultura específico. PC3: células cancerosas da linhagem PC3, DC: célula dendrítica, Lin: linfócitos.
Fonte: Autores, 2024.

7.4 ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR

A citotoxicidade dos materiais foi medida utilizando resazurina (7-Hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido) (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA), que detecta a atividade metabólica celular. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicada de cada grupo experimental em placa de 24 poços com meio RPMI suplementado com 10% de SFB, mantidas em estufa a 37ºC com 5% de CO2 pelo tempo experimental estabelecido para co cultura, 24h e 48h. Após o tempo de emcubação, foi adicionado em cada poço 50µL da solução de resazurina (2,5 mg/ml). Após 2h de incubação a 37 °C, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 550 nm e 590 nm fluorescência EnSpire® (Perkin Elmer, Alemanha). O controle positivo foi feito a partir de células PC3, tendo-se controles para a leitura de fluorescência de poços contendo meio RPMI, sem células.

7.5 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

As células PC3 foram semeadas em placas de seis poços e incubadas a 37°C até que que atingiram 100% de confluência para formar uma monocamada. Após a confluência, a monocamada foi raspada em linha reta para criar um “risco” com uma

ponta de pipeta p200. Após esse procedimento, os detritos foram removidos lavando as células uma vez com 1 mL de PBS e, em seguida, adicionadas DCs, linfócitos ou DCs e linfócitos ao meio. Os campos microscópicos foram capturados com um microscópio de fluorescência invertido (TS100, Nikon) no tempo 0 e 48 h (o meio será atualizado após 24 h) após riscar e tratar as placas. O status da migração será determinado usando o software TScratch. Para cada imagem, a distância entre um lado e outro do arranhão será medida por meio de área e então comparando as imagens do tempo 0 até o último ponto de tempo, quando obtido o fechamento do "risco" na placa. Cinco imagens serão capturadas por poço, sendo avaliadas o total de 15 imagens por experimento (poço). A migração celular deve ser interpretada pela diferença na área de risco ao longo do tempo.

7.6 ANÁLISE DE CITOCINAS

As citocinas serão dosadas através do teste Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) com anticorpos monoclonais fabricados pela BD OptEIATM (BD Biosciences) conforme protocolo fornecido pelo fabricante.

Placas de 384 poços serão sensibilizadas com 25μL de anticorpos monoclonais específicos para a captura das citocinas estudadas, diluídos em solução tampão. Às fileiras 1 e 2 de cada placa serão adicionados 25μL da citocina padrão recombinante seguindo diluições seriadas 1:2 em "assay diluent" a partir das concentrações iniciais diluídas. Às outras fileiras serão adicionados 25μL/poço do sobrenadante obtido da cultura de células esplênicas contendo a citocina a ser dosada. As placas serão incubadas em temperatura ambiente por 2 horas e lavadas por seis vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) acrescido de Tween 20%. A seguir, serão adicionados 25μL/poço do anticorpo anti-citocina a ser dosada, marcado com biotina diluído 1:250 em "assay diluent". As placas serão reincubadas por 1 hora à temperatura ambiente e novamente lavadas por 6 vezes em PBS acrescido de Tween 20%.

Após esta etapa, serão adicionados 25μL/poço de avidina marcado com fosfatase alcalina, diluído 1:250 em "assay diluent". As placas serão incubadas por 1 hora e lavadas por 6 vezes com PBS acrescido de Tween 20%, quando então serão adicionados 25μL/poço de substrato TMB Substrate Reagent Set (BD OptEIATM) e após 30 minutos serão adicionados 12,5μL/poço de ácido fosfórico 1M.

A análise da absorbância será realizada no espectrofotômetro Spectramax 384 Plus, nas absorbâncias de 450 e 570nm. A concentração de cada citocina do sobrenadante de células dendríticas dos referidos grupos será dosada em pg/ml através da comparação com as absorbâncias obtidas da curva padrão da respectiva citocina, sendo realizada simultaneamente.

7.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram submetidos a uma análise de normalidade através do teste Shapiro-Wilk e, em seguida, submetidos a uma análise de variância ANOVA fatorial. As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism® (v.8.0). Os resultados foram expressão com média ± desvio padrão.

REFERÊNCIAS

AMON, L.; LEHMANN, C. H.; HEGER, L.; HEIDKAMP, G.F.; DUDZIAKI, D. Protocol for mapping the heterogeneous dendritic cell network across the murine tissue landscape via high-dimensional flow cytometry. **Molecular Immunology**, [*s. l.*], v. 120, p. 122-129, 2020. DOI 10.1016/j.molimm.2020.02.010. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589019309253?via%3Dihub. Acesso em: 23 dez. 2024.

BALAN, S.; SAXENA, M.; BHARDWAJ, N. Chapter One - Dendritic cell subsets and locations. **Int Rev Cell Mol Biol** , [*s. l.*], v. 348, p. 1-68, 2019. DOI 10.1016/bs.ircmb.2019.07.004. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S193764481930067X. Acesso em: 1 out. 2024.

BERGENGREN, O.; PEKALA, K.R.; MATSOUKAS, K.; FAINBERG, J.; MUNGOVAN, S.F.; BRATT, 0.; BRAY, F.; BRAWLLEY, O.; LUCKENBAUGH, A.N.; MUCCI, L.; MORGAN, T.M.; CARLSSON, S.V. 2022 Update on Prostate Cancer Epidemiology and Risk Factors-A Systematic Review. **European Urology**, USA, v. 84, n. 2, p. 191-206, 2023. DOI doi:10.1016/j.eururo.2023.04.021. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10851915/. Acesso em: 5 nov. 2024.

BLUEMN, E.G; COLEMAN, I.M; LUCAS, J.M; VASSELLA, R.L; MORRISSEY, C; NELSON, P.S. Androgen Receptor Pathway-Independent Prostate Cancer Is Sustained through FGF Signaling. **Cancer Cell**, [*s. l.*], v. 32, ed. 4, p. 474-489, 2017. DOI 10.1016/j.ccell.2017.09.003. Disponível em: https://www.cell.com/cancer-cell/supplemental/S1535-6108(17)30407-5. Acesso em: 29 jan. 2025.

BOTTCHER, J.P.; SOUSA, C.R. The Role of Type 1 Conventional Dendritic Cells in Cancer Immunity. **Trends Cancer**, [*s. l.*], v. 4, ed. 11, p. 784-792, 2018. DOI 10.1016/j.trecan.2018.09.001. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30352680/. Acesso em: 8 jan. 2025.

CANCEL , J.C.; CROZAT, K.; DALOD, M.; MATTIUZ, R. Are Conventional Type 1 Dendritic Cells Critical for Protective Antitumor Immunity and How?. **Frontiers in Immunology**, [*s. l.*], v. 10, p. 1-16, 2019. DOI https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00009. Disponível em: https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2019.00009/full. Acesso em: 15 jan. 2025.

CARENZA, C.; CALCATERRA , F.; ORIOLO , F.; VITO, C.D.; UBEZIO, M.; PORTA, M.G.D.; MAVILIO, D.; BELLA, S.D. Costimulatory Molecules and Immune Checkpoints Are Differentially Expressed on Different Subsets of Dendritic Cells. **Frontiers in Immunology**, [*s. l.*], v. 10, p. 1-15, 2019. DOI 10.3389/fimmu.2019.01325. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6579930/. Acesso em: 29 out. 2024.

CERBONI, S; GENTILI, M; MANEL, N. Diversity of pathogen sensors in dendritic cells. **Adv Immunol**, [*s. l.*], v. 120, p. 211-237, 2013. DOI 10.1016/B978-0-12-417028-

5.00008-9. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24070386/. Acesso em: 10 fev. 2025.

COLLIN, M; BIGLEY, V. Human dendritic cell subsets: an update. **Immunology**, [*s. l.*], v. 154, n. 1, p. 3-20, 2018. DOI 10.1111/imm.12888. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5904714/. Acesso em: 28 jan. 2025.

DIAMOND, M.S; KINDER, M; MATSUSHITA, H; MASHAYEKHI, M; DUNN, G.P; ARCHAMBAULT, J.M; LEE, H; ARTHUR, C.D; WHITE, J.M; KALINKE, U; MURPHY, K.M; SCHREIBER, R.D. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. **J Exp Med**, [*s. l.*], v. 208, ed. 10, p. 1889-2003, 2011. DOI 10.1084/jem.20101158. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21930769/. Acesso em: 20 fev. 2025.

Estatísticas Mundiais de Saúde 2022. **World Health Statistics**, [*s. l.*], 2022. Disponível em: https://www.who.int/news/item/20-05-2022-world-health-statistics-2022. Acesso em: 15 abr. 2025

FACCHETTI, F.; SIMBENI, M.; LORENZI, L. Follicular dendritic cell sarcoma. **Pathologica**, [*s. l.*], v. 113, n. 5, p. 316-329, 2021. DOI 10.32074/1591-951X-331. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8720404/. Acesso em: 11 mar. 2025.

FUERTES, M.B; KACHA, A.K; KLINE, J; WOO, S.R; KRANZ, D.M; MURPHY, K.M; GAJEWSKI, T.F. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8{alpha}+ dendritic cells. **J Exp Med**, [*s. l.*], v. 208, ed. 10, p. 2005-2016, 2011. DOI 10.1084/jem.20101159. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21930765/. Acesso em: 28 fev. 2025.

GARDNER, A.; PULIDO, A.M.; RUFFEL, B. Dendritic Cells and Their Role in Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, [*s. l.*], v. 11, p. 1-14, 2020. DOI 10.3389/fimmu.2020.00924. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7253577/. Acesso em: 4 fev. 2025.

GARDNER, A; RUFFELL, B. Dendritic Cells and Cancer Immunity. **Trends Immuno**, [*s. l.*], v. 37, ed. 12, p. 855-865, 2016. DOI 10.1016/j.it.2016.09.006. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27793569/. Acesso em: 16 dez. 2024.

HAMMERER, P.; HULAND, H. Anatomy and sonography of the prostate. **Urologe A**, [*s. l.*], v. 28, ed. 6, p. 311-316, 1989. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2481356/. Acesso em: 4 fev. 2025.

HATO, L.; VIZCAY, A.; EGUREN, I.; PÉRES-GRÁCIA, J.L.; RODRIGUEZ, J.; PÉRES-LARRAYA, J.G.; SAROBE, P.; INOGÉS, S.; CERIO, A.L.D.; SANTISTEBAN, M. Dendritic Cells in Cancer Immunology and Immunotherapy. **Cancers**, Espanha, v. 16, ed. 5, p. 1-23, 2024. DOI 10.3390/cancers16050981. Disponível em: https://www.mdpi.com/2072-6694/16/5/981. Acesso em: 3 fev. 2025.

HAWIGER, D; INABA, K; DORSETT, Y; GUO, M; MAHNKE, K; RAVETCH, J.V; RIVERA, M; STEINMAN, R.M; NUSSENZWEIG, M.C. Dendritic cells induce peripheral

T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. **J Exp Med**, [*s. l.*], v. 194, ed. 6, p. 769-779, 2001. DOI 10.1084/jem.194.6.769. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11560993/. Acesso em: 30 dez. 2024.

HUGGINS, M.D.C.; STEVENS, R.E.J.; CLARENCE, V.; HODGES, M.D. Studies in prostatic cancer II. The effects of castration on advanced carcinoma of the prostate gland. **Jama Internal Medicine**, [*s. l.*], v. 43, n. 2, p. 209-223, 1941. DOI 10.1001/archsurg.1941.01210140043004. Disponível em: https://jamanetwork.com/journals/jamasurgery/article-abstract/545269. Acesso em: 30 dez. 2024.

MCNEAL, J.E. The zonal anatomy of the prostate. **The Prostate**, California, v. 2, p. 35-49, 1981. DOI https://doi.org/10.1002/pros.2990020105. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pros.2990020105. Acesso em: 2 dez. 2024.

MUENST, S.; LAUBLI, H.; SOYSAL, S.D.; ZIPPELIUS, A.; TZANKOV, A.; HOELLER, S. The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. **Intern Med**, [*s. l.*], v. 279, n. 6, p. 541-562, 2016. DOI 10.1111/joim.12470. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26748421/. Acesso em: 7 abr. 2025.

MUMUNI, S; O'DONNELL, C.; DOODY, O. The Risk Factors and Screening Uptake for Prostate Cancer: A Scoping Review. **Healthcare**, [*s. l.*], v. 20, ed. 11, p. 1-15, 2023. DOI 10.3390/healthcare11202780. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10606491/. Acesso em: 4 jun. 2025.

NUSSENZWEIG, M.C; LIU, K. Origin and development of dendritic cells. **Immunol Rev .**, [*s. l.*], v. 234, ed. 1, p. 45-54, 2010. DOI 10.1111/j.0105-2896.2009.00879.x. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20193011/. Acesso em: 23 jan. 2025. PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells**. Nature Reviews Cancer**, [*s. l.*], vol. 12, n. 4, p. 265–277, 2012. DOI.org/10.1038/nrc3258. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3433802/. Acesso em : 10 jan.2025.

Painel Oncologia Brasil. **Datasus**, [*s. l.*], 2025. Disponível em: http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/dhdat.exe?PAINEL_ONCO/PAINEL_ONCOLOGIABR.def. Acesso em: 15 abr. 2025.

PRINS, G.S.; PUTZ, O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. **Differentiation.**, [*s. l.*], v. 76, n. 8, p. 641-649, 2008. DOI 10.1111/j.1432-0436.2008.00277.x. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2824174/. Acesso em: 9 out. 2024.

RABELLO, R.J; OING, C; KNUDSEN, K.E; LOEB, S; JOHNSON, D.C; REITER, R.E; GILLESSEN, S; VAN DE KWAST, T; BRISTOW, R.G. Prostate cancer. **Nat Rev Dis Primers**, [*s. l.*], v. 7, ed. 1, p. 9, 2021. DOI 10.1038/s41572-020-00243-0. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33542230/. Acesso em: 5 mar. 2025.

RANDOLPH, G.J; ANGELI, V; SWARTZ, M.A. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. **Nat Rev Immunol**, [*s. l.*], v. 5, ed. 8, p. 617-628, 2005. DOI

10.1038/nri1670. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16056255/. Acesso em: 18 jan. 2025.
RONCHESE, F.; WEBB, G.R.; OCHIAI, S.; LAMIABLE, O.; BREWERTON, M. How type-2 dendritic cells induce Th2 differentiation: Instruction, repression, or fostering T cell-T cell communication?. **Allergy**, Nova Zelândia, v. 80, n. 2, p. 395-407, 2024. DOI 10.1111/all.16337. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11804308/. Acesso em: 12 fev. 2025.

SCHATTEN, H. Brief Overview of Prostate Cancer Statistics, Grading, Diagnosis and Treatment Strategies Heide Schatten 1. **Adv Exp Med Biol**, [*s. l.*], v. 1095, p. 1-14, 2018. DOI 10.1007/978-3-319-95693-0_1. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30229546/. Acesso em: 27 mar. 2025.

SECKOACHA, M.; RIET, K.; MOUTLONG, P.; GUMENKU, L.; ADEGOKE, A.; MASHELE, S. Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. **Molecules**, [*s. l.*], v. 27, n. 17, p. 1-33, 2022. DOI 10.3390/molecules27175730. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9457814/. Acesso em: 6 ago. 2024.

SHEN, M.M; ABATE-SHEN, C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. **Genes Dev**, [*s. l.*], v. 24, ed. 18, p. 1967-2000, 2010. DOI 10.1101/gad.1965810. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20844012/. Acesso em: 3 mar. 2025.

SUTHERLAND, S.I.M.; JU, X.; HORVATH, L.G.; CLARK, G.J. Moving on From Sipuleucel-T: New Dendritic Cell Vaccine Strategies for Prostate Cancer. **Frontiers in Immunology**, Austrália, v. 12, p. 1-19, 2021. DOI 10.3389/fimmu.2021.641307. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8039370/. Acesso em: 9 abr. 2024.
SWIECKI, M.; COLONNA, M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. **Nat Rev Immunol**, [*s. l.*], v. 15, n. 8, p. 471-485, 2015. DOI 10.1038/nri3865. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26160613/. Acesso em: 30 jan. 2025.

YOU, X.D.; YAN, S.S.; LIU, R.J.; ZHANG, Y.S. Apparent differences in prostate zones: susceptibility to prostate cancer, benign prostatic hyperplasia and prostatitis. **Int Urol Nephrol**, [*s. l.*], v. 56, p. 2451–2458, 2024. DOI https://doi.org/10.1007/s11255-024-04012-w. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11255-024-04012-w. Acesso em: 4 fev. 2025.

ZOU, M; TOIVANEN, R; MITROFANOVA, A; FLOCH, N; HAYATI, S; SUN, Y; LE MAGNEN, C; CHESTER, D; MOSTAGHEL, E.A; CALIFANO, A; RUBIN, M.A; SHEN, M.M; ABATE-SHEN, C. Transdifferentiation as a Mechanism of Treatment Resistance in a Mouse Model of Castration-Resistant Prostate Cancer. **Cancer Discov**, [*s. l.*], v. 7, ed. 7, p. 736-749, 2017. DOI 10.1158/2159-8290.CD-16-1174. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28411207/. Acesso em: 12 abr. 2025.

CAPÍTULO I

Eficácia e modulação imunológica da imunoterapia com células dendríticas no tratamento do câncer de próstata: uma revisão sistemática

Efficacy of using dendritic cells in the treatment of prostate cancer: a systematic review

- Artigo submetido e aceito para publicação no periódico International Journal of Molecular Science.

Special edition: Prostate Diseases: Focus on Hormone Therapies and Targeted Interventions (Q1, FI= 4,9)

ABSTRACT

(1) Background: The primary prostate cancer treatment involves androgen deprivation therapy, with or without chemotherapy. Immunotherapy has emerged as a promising strategy against cancer due to its ability to modulate the immune system, overcome immune evasion, and stimulate the attack on tumor cells. Thus, this review urges to explore the underlying mechanisms to validate the efficacy and safety of dendritic cell immunotherapy for prostate cancer treatment (2) Methods: An extensive literature search identified 45 eligible studies in PubMed, Web of Science, SCOPUS, and Embase databases. Phase I and II clinical trials, and *in vitro* studies (PROSPERO registration number CRD42024538296), were analyzed to extract information on patient selection, vaccine preparation, treatment details, and disease progression.; (3) Results: Despite significant variability in vaccine development and treatment protocols, vaccines were shown to induce satisfactory immune responses, including T-cell activation, increased CD4 and CD8 cell populations, upregulated expression of HLA-A2 and HLA-DR, enhanced migratory capacity of dendritic cells, and elevated interferon levels. Cytokine responses, particularly involving IL-10 and IL-12, varied across studies. Immunotherapy has demonstrated potential by eliciting positive immune responses, reducing PSA levels, and showing an acceptable safety profile. However, side effects such as erythema and fever were observed; (4) Conclusions: The analyzed treatments were well-tolerated, but variability in clinical responses and side effects underscores the need for further research to optimize the efficacy and safety of this therapeutic approach.

Keywords: Immunotherapy; Cancer; Vaccine; Lymphocytes; Immune Response

8 INTRODUCION

Prostate cancer (PCa) is the second most common malignancy among men, with high incidence and mortality rates [1]. Brazil shows the highest absolute number of cases in South America in 2020 (32.8%), with a projected increase of 82.3% by 2040 [2]. Available treatment options for prostate cancer include active surveillance, prostatectomy, chemotherapy, radiotherapy, and hormonal or ablative therapies [3]. In cases of metastatic prostate cancer, androgen ablation therapy is highly effective and remains the most widely used treatment. However, castration resistance is an inevitable outcome for the majority of patients. Consequently, the incidence of metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) has increased in recent years, and the disease remains incurable despite continuous advances in treatment strategies that merely extend survival [4,5]. Each treatment option is associated with side effects, including toxicity, fatigue, hair loss, peripheral neuropathy, incontinence, erectile dysfunction, metastasis, and, ultimately, the development of resistance to the initial therapy. The discovery of new, cost-effective treatments with milder side effects and higher efficacy is urgently needed.

Immunotherapy and precision medicine have increasingly shaped oncology treatment, making new immunotherapeutic approaches part of the standard care in recent years [5]. The strategy behind cancer immunotherapy involves modulating the immune system to overcome immune evasion and stimulate the attack on tumor cells [6]. The goal is to target cancer cells through recognition by T cells or antibodies [7]. Dendritic cells (DCs) are professional promoters of immune responses against tumor antigens, with an exceptional ability to coordinate both innate and adaptive immune systems [6]. As antigen-presenting cells, DCs regulate adaptive immunity [8] by inducing the differentiation of cytotoxic effector cells or modulating immune system cells [9]. In this context, dendritic cell-based cancer immunotherapy offers clinical benefits. Studies have demonstrated a positive prognosis for prostate cancer cases with dendritic cell infiltration in tumors [10]. DC-based therapy has shown the ability to modify the tumor microenvironment into an immune-enriched state and enhance systemic immune responses as an active approach for treating cancer patients [6]. While DC-based immunotherapies have proven promising, it is crucial to note that the field of immunotherapy is rapidly evolving, and the effectiveness of these approaches

may vary depending on the disease type, patient characteristics, and other factors [11,12].

Although immunotherapy holds promise in oncology, it faces specific challenges when applied to prostate cancer. Prostate cancer is often classified as a "cold tumor" due to its immunosuppressive microenvironment [13]. This is characterized by reduced infiltration of lymphocytes, decreased activation of antigen-presenting cells, and a higher prevalence of immunosuppressive cells. Additionally, prostate cancer exhibits a low mutational burden, which limits the availability of neoantigens for immune recognition [13–15]. Despite these challenges, immunotherapy has demonstrated some success in treating prostate cancer. Studies involving Sipuleucel-T, a dendritic cell-based vaccine and the only FDA-approved immunotherapy for prostate cancer, have shown improved survival in cases of metastatic castration-resistant prostate cancer [16]

The use of dendritic cells in prostate cancer immunotherapy represents a promising therapeutic approach as it demonstrates the ability to activate antitumor T cells and promote immune responses, enhancing efficacy while minimizing the side effects of current therapies. Furthermore, the growing understanding of the nature and complexity of dendritic cells, with the development of targeted strategies, provides opportunities to optimize prostate cancer treatment. This systematic review aims to explore the underlying mechanisms through randomized controlled clinical trials to validate the large-scale efficacy and safety of dendritic cell immunotherapy for prostate cancer treatment.

9 MATERIALS AND METHODS

Guiding Question and Eligibility Criteria

This study's guiding question was “How effective is the use of dendritic cells in combating prostate cancer?” The systematic review adhered to the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) guidelines [17]. The PRISMA flowchart is presented in Figure 1. The methodological strategy was registered in the International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) under registration number CRD42024538296.

The selection of studies was based on the following eligibility criteria: (1) studies evaluating dendritic cells as a method of immunotherapy, (2) studies with a

methodological design including preclinical and clinical studies, and (3) studies involving immunotherapy treatment for prostate cancer. Publications outside the scope of interest or not classified as experimental articles involving humans, as well as literature reviews, abstracts unavailable online, commentaries, notes, letters to the editor, case studies, and animal experiments, were excluded.

9.1 *LITERATURE SEARCH*

The bibliographic search was conducted on October 28, 2023, at 8:13 PM, across the following databases: PubMed/Medline (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed), Scopus (https://www.scopus.com/home.uri), Web of Science (https://www.webofknowledge.com), and Embase (https://www.embase.com/landing?status=grey). The search descriptors were organized based on filters developed for two domains: (i) dendritic cells and (ii) male urogenital cancer clinical trials. Filters for PubMed/Medline were constructed following the hierarchical distribution of MeSH terms (www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh). These filters were then adapted and applied to the Web of Science, Embase, and Scopus databases. Descriptors and keywords were combined using Boolean operators (AND/OR), and the [TIAB] algorithm was employed for non-MeSH descriptors. Studies available in English, Portuguese, and Spanish were considered for inclusion.

9.2 *DATA EXTRACTION*

Two independent reviewers (FCRD and JLFF) identified eligible studies by analyzing their titles and abstracts. Agreement between them was assessed using the Kappa test (kappa = 0.969). Any discrepancies were resolved through consultation with a third researcher (MLMG). The data recorded from each eligible study included: (i) publication details and study characteristics (authors, country, study type, total participants, age; informed consent form; ethics committee approval, statistical analysis; treatment criteria; androgen ablation, safety, quality of life and pain, clinical response, and follow-up treatment in responders); (ii) Dendritic cell preparation (pre-stimulation, propagation, pulsation, maturation, generation, and vaccination of DCs); (iii) Treatment details (experimental groups, dose, route of administration, treatment duration, treatment frequency, and systemic adjuvants); (iv) Overall patient evaluation

(immune responses, PSA response, acute toxicity, cytotoxicity, and cytolysis); (v) Immune response evaluation (anti- and pro-inflammatory cytokines, delayed-type hypersensitivity (DTH) test, T cell stimulatory capacity, and immune response against tumor antigens); (vi) Side effects; (vii) MoDCs (MoDC phenotypes, migration and proliferation capacity).

9.3 *RISK OF BIAS (ROB)*

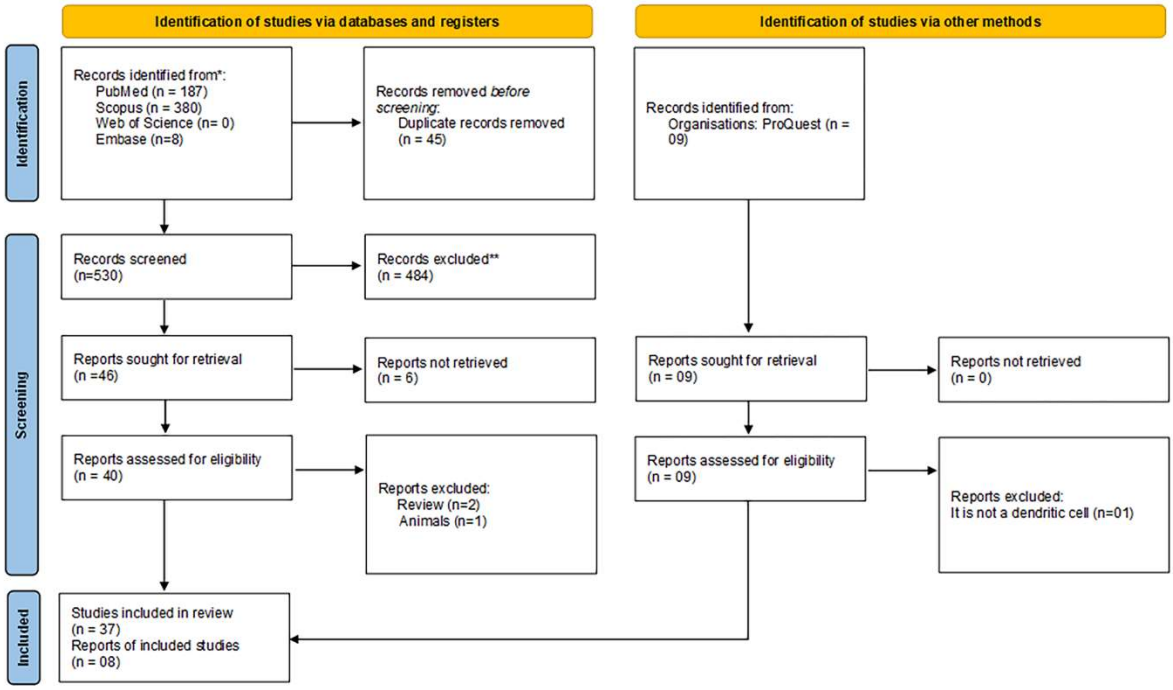
To assess the risk of bias in the selected studies, the Cochrane Risk of Bias tool was used with a specific outcome-based approach [18]. Two team members independently evaluated the studies (FCRD and JLFF), and any disagreements were resolved by a third team member. Each study was analyzed based on the information contained within the study itself, without making assumptions. The studies were evaluated for sequence generation and allocation concealment (selection bias), participant and professional blinding (performance bias), assessor blinding (detection bias), incomplete data (attrition bias), and selective reporting (reporting bias). Additionally, the researchers of this study examined whether the studies addressed the use of informed consent, whether they underwent ethics committee approval, whether they assessed treatment safety, and whether they reported the occurrence of adverse effects. The items in the RoB tool were classified as "low risk of bias," "high risk of bias," or "unclear" (suggesting that the item was not reported, thus making the risk of bias uncertain).

10 RESULTS

10.1 *DESCRIPTION OF THE MAIN CHARACTERISTICS OF THE STUDIES*

The initial search yielded 575 studies: 187 from "PubMed/Medline," 380 from Scopus, 0 from Web of Science, and 8 from Embase. Of these, 45 articles were excluded due to duplication. After reviewing titles and abstracts, 40 studies were selected for detailed examination, leaving 37 studies. The references of the eligible articles were examined, and 8 studies were added to the review, resulting in a total of 45 studies that met the inclusion criteria and were incorporated into the systematic review (Figure 1).

Figure 1 - PRISMA flow diagram



Source: Results of the bibliographic search. http://www.prisma-statement.org. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009).

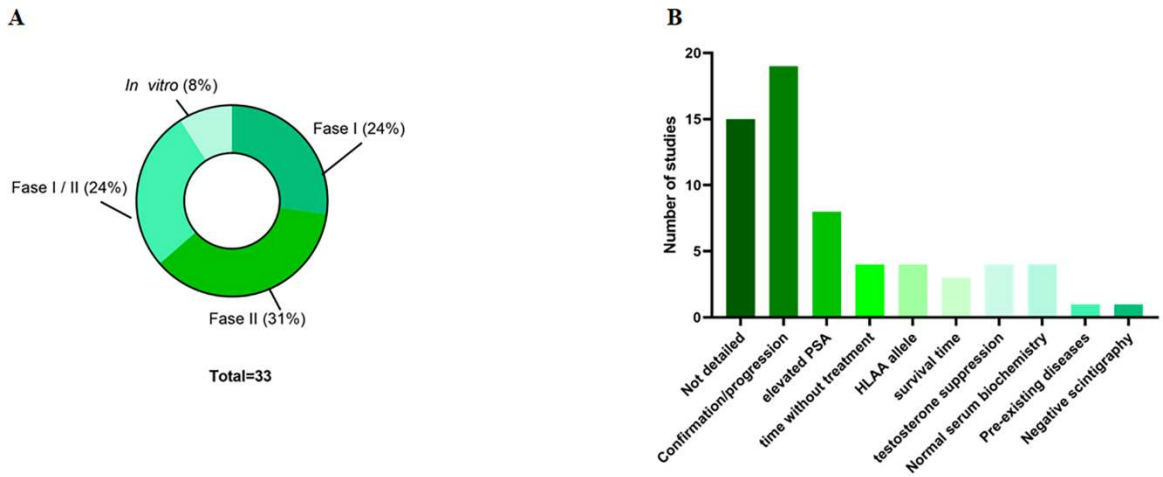
From the included studies, 98% (n=44) reported their country of origin, with 61% (n=27) produced in the United States, 7% (n=3) in the United Kingdom, and 7% (n=3) in Germany. The remaining studies were distributed between Switzerland and Norway, with two studies each (4.55%), and Australia, China, Denmark, Chile, the Netherlands, the Czech Republic, and Lebanon, with one study each (2.77%). The selected studies were conducted with humans and were distributed across phase I studies (24%; n=9), phase II studies (31%; n=12), or studies containing both phases (24%; n=9), with only 3 of these studies being in vitro (8%) (Figure 2A). Regarding the age of the patients, 22% (n=10) of the studies reported means and medians: the average age across all studies was 66.5 years (Table A2).

10.2 *PATIENT CHARACTERISTICS*

Ethics committee approval for the studies was reported in only 22% (n=10) of the studies (Table A2). Standardizing patient selection for clinical studies is important to allow comparison of results at the end of the study. Therefore, the inclusion criteria for patients in the research were detailed in 64% (n=29) of the studies (Figure 2B). The

most common criterion (38%, n=11 studies) was that the presence and progression of cancer be confirmed histologically and that the patient's biochemical parameters fall within normal ranges. Despite this, only 24% (n=7) of the studies indicated elevated or altered prostate-specific antigen (PSA) levels in patients for eligibility, and 3% (n=1) of the articles provided detailed information about the androgen ablation process.

Figure 2 - Main studied characteristics



Note: A – Types of studies; B- Inclusion criteria of the patients.
Source: own elaboration, 2024.

10.3 *MAIN CHARACTERISTICS OF VACCINE ACQUISITION AND PREPARATION*

Dendritic cell vaccines are primarily produced from the patient's cells (autologous), therefore, the methods of cell collection, differentiation, and vaccine preparation are of utmost importance. Only 33% (n=15) of the studies described how monoclonal cells were lysed: 6 studies (40%) used histopaque, 4 studies (26%) used lymphoprep, and 2 studies (13.3%) used leukapheresis. Only 38% (n=17) of the studies reported acquiring dendritic cells. In 26% (n=12) of the studies, DCs were obtained through the differentiation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The cell resuspension medium was reported in 55% (n=25) of the articles. AIM-V and OPTIMEM media were used in 28% (n=7 each) of the studies, 8% (n=2) used a 5% NaCl solution, 8% (n=2) used RPMI, and 4% (n=1) used a specific medium for myeloid dendritic cells—Cell-Growth-DC. The primary cell propagation medium described was DCPM (dendritic cell propagation medium, n=7), followed by AIM-V (n=2 studies).

The time spent in dendritic cell culture until their use in immunotherapy varies greatly, ranging from 2 to 16 days, with most studies describing times of 4 to 10 days (18%, n=10). Dendritic cell pulsation was cited as the most commonly used specific process to enhance the efficacy of the vaccines (n=6). Pulsation occurs with different peptides or combinations of peptides and prostate-specific membrane antigens (PSMA), androgen-sensitive human prostate adenocarcinoma cells (LNCaP), prostate acid phosphatase (PAP), or prostate stem cell antigen (PSCA). The culture of these mononuclear cells is supplemented with various substances to differentiate and mature them into fully mature dendritic cells for use in vaccines. This supplementation typically involves PSMA (HLA-A0201) (13%, n=6), followed by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) and interleukin 4 (IL-4) (11%, n=5), and smaller proportions of Prostaglandin E2 (PGE2), PSA, PSMA, or their combination (Table A3; Figure 3).

10.4 *MAIN CHARACTERISTICS OF TREATMENT*

Most articles provide detailed descriptions of the administered treatments (93% of studies, n=42), such as the route of vaccine administration (n=30). Among these, the subcutaneous route was used in 33% of the studies (n=9), followed by intravenous (23%, n=7), intradermal (13%, n=4), and intranodal (3%, n=1). Some studies combined doses or allowed for more than one of these routes. The volume administered was described in 33% (n=15) of the studies and varied considerably (Table 2).

Table 2 - Main characteristics of obtaining and preparing the vaccine

Cell separation	**Medium of resupply**	**Propagation médium**	**Time**	**DCs Pulsed**	**DC maturation**	**Supplementation**	**Ref.**
Leukapheresis	Cell Gro DC	-	6 days	Tumor cells	Poly I: C	-	[19]
-	-	-	-	-	-	-	[20]
Leukapheresis	-	-	-	-	-	-	[21]
Leukapheresis	AIM-V	-	-	-	GM-CSF/PA001 protein/ri	-	[22]

					mi-ducid and LPS		
-	-	-	-	-	IL-4; GM-CSF; rhTNF-a;	-	[21]
Leukapheresis	-	-	-	-	mRNA de PAP e PSA	-	[22]
His-topaque	AIM-V	-	7 days	-	-	IL-4 and GM-CSF.	[23]
His-topaque	AIM-V	-	-	-	-	IL-4 and GM-CSF	[23]
-	AIM-V	-	16 days	-	-	rhIL-4 and rhGM-CSF	[24]
-	AIM-V	-	-	-	-	-	[27]
-	Infusion medium made from Plasma - Lyte A	-	-	-	-	Lipopolysaccharide (LPS) and IFN-ÿ	[25]
Ficoll-Hypaque	Saline solution	-	-	-	-	-	[26]
Leukapheresis	RPMI	-	-	KLH	IL-4 e GM-CSF	-	[27]
-	-	-	-	-	-	GM-CSF and prostaglandin E2 (PGE2)	[28]
-	CliniMACS	-	-	-	GM LCR, IL-4 IL-1b, IL-6, TNF-a, PGE2.	HLA-A*0201 binding peptides	[29]
-	AIM-V	-	16 days	-	-	PSA Peptide Supplemented with rhIL-4 and rhGM-CSF	[30]

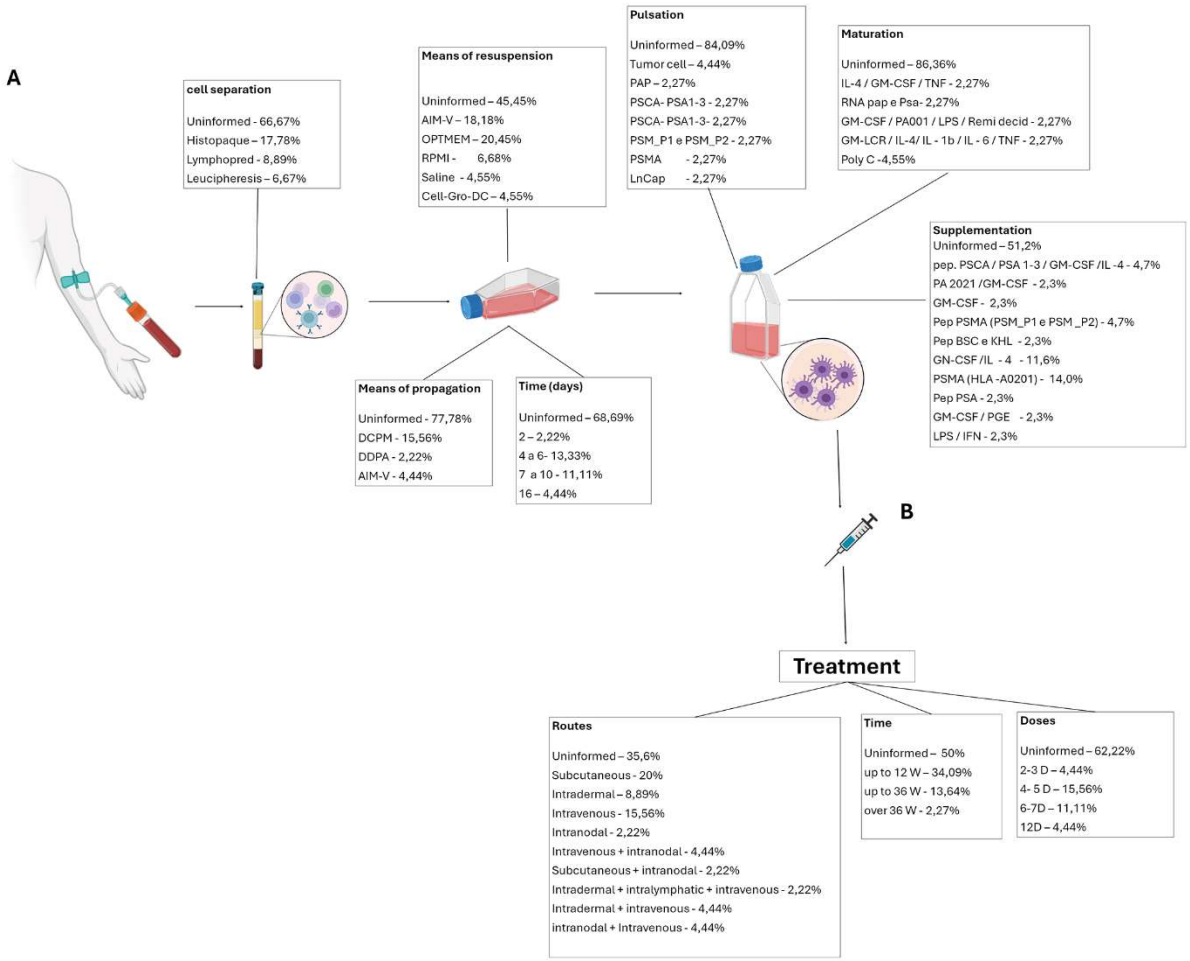
-	-	-	-	-	-	PSA peptide	[31]
-	-	-	-	-	-	-	[32]
Lympho prep ou Histopaque	-	-	-	-	-	PSMA, peptides with specific motif of HLA-A0201 and influenza matrix peptide M158-66	[33]
-	-	-	-	-	-	-	[33]
Lympho prep	OPTIMEM	DCPM	4-6 days	-	-	PSMA peptides with HLA-A0201 specific motif	[37]
Histopaque	OPTIMEM	DCPM	7 days	-	-	PSMA peptides with HLA-A0201 specific motif	[34]
Histopaque	OPTIMEM	-	-	-	-	PSMA peptides with HLA-A0201 specific motif	[35]
Histopaque 1077 Ficoll	OPTIMEM	-	-	-	-	PSMA peptides with HLA-A0201 specific motif	[36]
-	-	-	-	-	-	PSMA specific for HLA-A2 (PSM-P1)	[37]

Ficoll-Hypaque	-	-	4-6 days	-	-	GM-CSF and IL-4	[38]
-	RPMI	-	-	Allogeneic tumor lysates	-	GM-CSF e IL-4.	[39]
-	-	-	-	-	-	BDC and KLH peptide	[40]
-	OPTIMEM	DCPM	6 days	PSM-P1 and PSM-P2	-		[41]
-	-	DDPA	10 days	-	-	GM-CSF	[42]
-	Saline	DCPM	-	-	-	PSMA (PSM-P1 and PSM-P2)	[43]
-	AIM-V	-	-	PAP (Provenge)	-	PA2024 (PAP and GM-CSF)	[44]
-	-	AIM-V	-	-	-	-	[45]
-	-	-	2 days	PSCA, PSA1-3 and HIV	-	PSCA, PSA1-3 and HIV and IL-4 and GM-CSF	[50]
Lympho prep	OPTIMEM	DCPM	7 days	LNCaP lysate and tetanus toxoid	-	-	[51]
-	OPTIMEM	-	-	PSMA (AL132)	-	-	[37]
Lympho prep	OPTIMEM	DCPM	4-6 days	-	-	-	[52]
Histopaque	OPTIMEM	DCPM	7 days	-	-	-	[53]
-	-	-	-	-	-	-	[54]
-	-	-	-	-	-	-	[55]
-	-	-	-	-	-	-	[56]

-	AIM-V	AIM-V	-	-	-	-	[54]
-	-	-	-	-	-	-	[55]
Ficoll	RPMI	-	-	-	-	-	[56]
-	Cell-Gro DC	-	5 days	-	Poly I: C soluble	-	[57]

Source: own elaboration, 2024.

Figure 3 - Main characteristics of the included studies



Note: A – Data on the dendritic cells' differentiation, maturation, and harvesting. B- Immunotherapy details: treatment routes, time, and doses.
Source: own elaboration, 2024.

The treatment duration was reported in 49% (n=22) of the studies, ranging from 2 weeks to 96 weeks, with the most common treatment duration being up to 12 weeks

(66.67%, n=14). The number of doses was described in 38% (n=17) of the studies, varying from 2 to 14 doses, with the most common being 4 to 5 doses (43.75%, n=7). 51% (n=23) of the articles reported treatment frequency, which was quite variable, ranging from 1 to 4 doses per week. The dose was also highly variable, ranging from 1 x 10^6 to 10 x 10^6. Additionally, 24% (n=11) of the articles used systemic adjuvants in the cultures or patients during the treatment; within this percentage, 72% (n=8) used GM-CSF. The dose of the adjuvant was described in 45% (n=5) of the articles that used it, and its administration occurred along with the treatment using the same route (Table 3).

Immune response evaluation was reported in 24% (n=11) of the studies. Among these, 36% (n=4) indicated the assessment of T cell proliferation. In 31% (n=14) of the studies, patient monitoring was performed, with 50% (n=7) executing bone scintigraphy and 50% (n=7) conducting chest X-rays. The measurement of delayed-type hypersensitivity (DTH) reactions occurred in 18% (n=8) of the studies, carried out via the intradermal route. The assessment of T cell nonspecific response was carried out in 6% (n=3) of the studies, while T cell proliferation assays were carried out in 4% (n=2). The ELISA technique was utilized for supernatant analysis in 6% (n=3) of the studies, and the Elispot assay was executed in 11% (n=5) of the studies.

Regarding PSA response, 71% (n=32) of the studies evaluated it, all reported lower PSA levels in the responder group. Concerning toxicity following immunotherapy, 15% (n=7) reported it, indicating that there was no toxicity; local reactions at injection sites were noted in 11% (n=5), renal, hematological, and autoimmune diseases were reported in 2% (n=1), and other grade 1 and 2 toxicities were reported in 4% (n=2). Cytotoxicity was reported in 10% (n=4) of the articles, and 2% (n=1) conducted cytokine assays in microplates.

10.5 *IMMUNE RESPONSE*

Immunotherapy aims to activate the patient's immune system so that it can combat the established cancer. One aspect of this is the production (or lack thereof) of cytokines. TNF-α was evaluated in 4% (n=2) of the studies, with one showing an increase and the other a weak response. IFN-γ was assessed in 22% (n=10) of the studies, showing an increase in 60% (n=6) of the groups, with a reduction in the others.

IL-10 production decreased in 9% (n=4) of the studies; IL-6 increased in 2% (n=1), IL-1β increased in 2% (n=1), and IL-12 increased in 4% (n=2).

Another way to assess the immune response is by evaluating T cell response. CD4+ T cells were reported in 6% (n=3) of the studies, CD8+ T cells in 11% (n=5), with one study reporting no response and the others showing an increase. CD3, CD4, and CD8 T cells were reported in 2% (n=1) of the studies, associated with an increased effect after immunotherapy, as described in a single article. Some studies evaluated the CD4:CD8 ratio, reported in 2% (n=1) of the studies, showing an upward trend in the average values.

Regarding anti-CD69, anti-γ-IFN, anti-CD3, anti-CD3-PC5, anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE, and anti-CD16-FITC antibodies, 2% (n=1) of the articles reported on them but did not show a response. Concerning immune monitoring, 15% (n=7) of the studies reported on it.

The delayed-type hypersensitivity (DTH) test was performed in 40% (n=18) of the studies. Cytokine secretion was evaluated in 4% (n=2). The regulation of costimulatory molecules was assessed in 4% (n=2), with both showing positive results. The expression of cytokines stimulating prostate cancer cells was reported in 4% (n=2) of the studies. Immunostimulatory cytokines were reported in 2% (n=1) of the studies. Cytokine secretion in supernatants after various stimuli was reported in 2% (n=1). The T cell stimulatory capacity was reported in 11% (n=5) of the studies. Immune response against tumor antigens was reported in 26% (n=12) of the studies.

The evaluation of regulatory T cells (Treg) was reported in 4% (n=2) of the studies, while myeloid-derived suppressor cells (MDSC) were also analyzed in 4% (n=2). Circulating myeloid dendritic cells (mDC), plasmacytoid dendritic cells (pDC), microRNA-155, and microRNA-223 were analyzed in 2% (n=1) of the studies, all in the same article. The expression of HLA-A2 was analyzed in 6% (n=3) of the studies, with positive results. The expression of HLA-DR was reported in 15% (n=7). Gene expression profiles were described in 6% (n=3) of the studies.

Regarding the phenotype of monocyte-derived dendritic cells (MoDCs), 6% (n=3) of the studies reported on it. The migration capacity of MoDCs was reported in 2% (n=1) of the studies. MoDC proliferation was reported in 2% (n=1) of the studies. Concerning dendritic cells, the CMRF-56 antibody expression was reported in 2% (n=1) of the studies. The proliferation of allogeneic T cells was described in 6% (n=3) of the studies.

10.6 *QUALITY CONTROL*

Regarding the quality control of immunotherapy, 15% (n=7) of the articles reported on patient tolerance to administration, with all being well-tolerated. In 11% (n=5) of these studies, quality of life and pain were assessed, with the report indicating that disease progression was higher in individuals who did not develop an immune response.

Regarding clinical response, 12 studies (26%) addressed this, with 16% (n=1) reporting an unknown response, 18% (n=8) reporting follow-up of responders after treatment, and 8% (n=4) reporting the clinical response of patients who did not complete treatment.

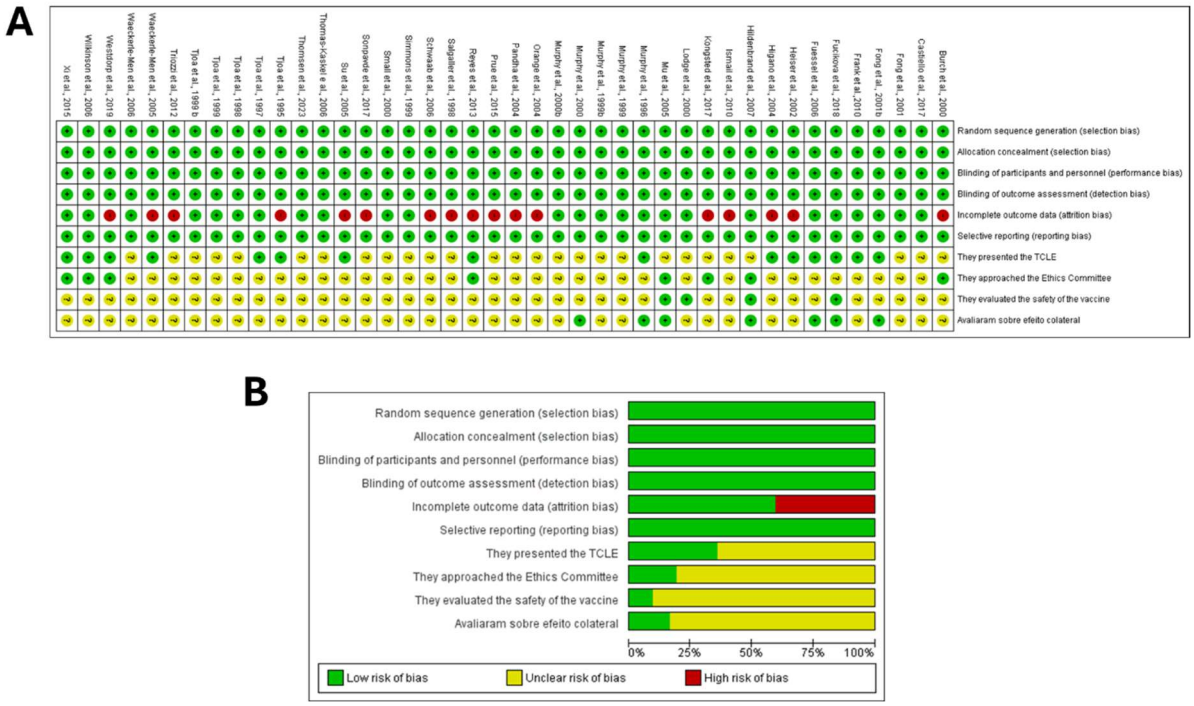
As for side effects, only 6 studies (15%) addressed these parameters, with the most common being erythema (12%; n=5), bone pain (9%; n=4), fever (8%; n=4), fatigue (4%; n=2), insomnia, and arthralgia (2%, n=1 each). Other effects were present but with lower frequency.

10.7 *METHODOLOGICAL QUALITY ASSESSMENT*

The bias analysis indicated that none of the studies met all of the methodological criteria assessed (Figure 4). All studies were clear about the selection criteria, regarding sequence concealment and blinding of participants; although the studies were not always clear, we believe that in this experimental context, blinding is inappropriate. In addition, the analyses performed also hinder bias due to the lack of blinding; therefore, we understand that this fact does not cause bias in the studies analyzed. Approximately 46% of the studies did not report attrition bias. None of the studies presented selective reporting or other factors that could potentially introduce bias in their findings.

Only 18 studies (40%) reported that participants received an informed consent term and 9 (20%) reported that the study was approved by an ethics committee. Only 4 studies (8.88%) analyzed and reported on vaccine safety, while 7 studies (15.55%) addressed the presence of side effects. Overall, all studies presented a methodology that was available, clear, comparable, and replicable (Figure 4).

Figure 4 - Risk of bias summary



Note: A. Methodology quality indicators for each included study (the review team's judgments on each domain of risk of bias) at the level of the individual study. B. All studies that evaluated dendritic cell immunotherapy for the treatment of prostate cancer. The Cochrane risk of bias tool was based on whether specific outcomes were marked as low risk of bias, high risk of bias, or 'unclear risk' (the item was not reported), resulting in an unknown risk of bias.
Source: own elaboration, 2024.

10.8 DISCUSSION

Androgen deprivation therapy (ADT), with or without chemotherapy, is the standard treatment for metastatic prostate cancer (mCRPC) [61]. Despite an initially favorable response to ADT, a significant proportion of patients experience relapse [62]. This relapse and progression are referred to as castration-resistant prostate cancer (CRPC), which becomes incurable and is associated with a poor prognosis [61]. In this context, interest in immune-based therapies, known as "immunotherapies," has increased. These therapies harness patients' immune systems to activate antigen-specific immune responses in a cascade, ultimately inducing tumor cell death [63,64].

The high incidence of prostate cancer in regions such as North America, Europe, and Australia compared to Asia and Africa [65] explains why most immunotherapy studies are conducted in countries like the United States and the United Kingdom, which account for 30 of the 45 studies included in this research. With the growing interest in immunotherapy techniques, advancements over recent

decades, and the improved capacity to culture DCs, DC-based cancer vaccines have become the focus of preclinical, Phase I, II, or III clinical trials [66]. The finding underscores this significance that 92% of the studies reviewed are Phase I, Phase II, or combined Phase I/II studies.

With advancing age, immunosenescence—a decline in immune function—occurs, leading to an increased incidence of the most common cancers associated with aging [67]. For this reason, the patients included in the studies reviewed had a mean age of 66 years, although age was not one of the inclusion criteria for these studies.

The primary criterion for patient inclusion in the studies reviewed was evidence of tumor progression, which could be confirmed through persistently elevated levels of PSA. PSA is the most widely used biomarker for prostate cancer [68]. As a blood-based marker, PSA is utilized across all major stages of prostate cancer management, including screening, risk stratification for recurrence, post-diagnosis surveillance, and therapy monitoring [68,69]. Despite its widespread use, histological confirmation remains the gold standard for diagnosis. However, prostate biopsy, being an invasive procedure, evaluates only a limited area of the prostate, potentially underestimating cancer aggressiveness compared to post-prostatectomy analyses [70]. While PSA testing and prostate biopsy are widely utilized techniques, emerging approaches aim to enhance the efficiency of these diagnostic tools, and additional methods can be integrated to improve their accuracy and diagnostic capabilities.

Unlike traditional vaccines, therapeutic vaccines rebuild or stimulate the body's immune system, which previously tolerated tumor antigens. They function as modulators to transform “cold” tumors into “hot” tumors, playing a critical role in preventing metastasis and tumor recurrence [71,72]. In this context, DCs emerge as immune cells specialized in promoting immune responses against antigens, which can include foreign pathogenic antigens or even self-tumor antigens [66]. DCs are capable of driving memory T-cell responses, but most importantly, they serve as effective initiators of naïve T-cell responses [66]. For many years, studies have focused on using DC-based vaccines against cancer to elicit and shape specific antitumor immune responses and/or enhance existing spontaneous immune responses. Since DCs are rare in circulation and tissues, the development of *ex vivo* culture methods has significantly increased their use in laboratory studies [66].

Most studies reviewed indicate that dendritic cells are obtained through the differentiation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), largely due to the accessibility of these cells from blood samples. Mononuclear cells are isolated and differentiated using various methods. The most common method was Ficoll-Hypaque, a density-gradient centrifugation technique used to enrich mononuclear cells, improving the recovery of rare stem cells from whole blood [73]. Additionally, some studies employed leukapheresis, a procedure similar to hemodialysis, designed for safer and more efficient collection of PBMCs. This technique is widely applied in cellular immunotherapy and vaccine research [74].

Various culture media have been described for cultivating isolated mononuclear cells, with AIM-V being the most commonly used. AIM-V is a serum-free culture medium specifically designed for the proliferation and/or manipulation of T cells and dendritic cells (Fisher Scientific User Guide). The second most utilized medium is OPTIMEM, which allows for the use of reduced amounts of fetal bovine serum (FBS). OPTIMEM contains insulin, transferrin, hypoxanthine, thymidine, and trace elements that compensate for the reduction in FBS supplementation without altering growth rate or cell morphology [75]. Together, AIM-V and OPTIMEM were used in over 50% of the studies reviewed. Other media, such as RPMI and Cell-Growth-DC, were also employed but in smaller proportions.

Once mononuclear cell cultures are established, differentiation and maturation into dendritic cells (DCs) are described using various protocols. The most common method involved the use of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-4 (IL-4). Many studies combined GM-CSF and IL-4 with tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), along with IL-1β, IL-6, prostaglandin E2 (PGE2), or monocyte-conditioned medium [76,77]. These approaches produced mature DCs with enhanced capacity to stimulate T cells [78] and improved migratory abilities [79].

Once differentiated, DC propagation predominantly occurs in the Dendritic Cell Propagation Medium (DCPM), followed by AIM-V (Fisher Scientific User Guide). Some studies employed the pulsing technique, where DCs are loaded with antigens and matured under favorable ex vivo conditions. Compared to in vivo targeting, ex vivo pulsing of DCs presents lower risks, higher efficiency, and fewer technical challenges. [80]. Pulsing was performed in various ways in the studies reviewed, utilizing different peptides or combinations depending on the vaccine's objective. Examples included prostate-specific membrane antigen (PSMA), androgen-sensitive human prostate

adenocarcinoma cells (LNCaP), prostatic acid phosphatase (PAP), and prostate stem cell antigen (PSCA).

The effectiveness of immunotherapy relies on the efficient migration of DCs to secondary lymphoid organs to stimulate the immune response, as well as on the route of administration. The main administration routes were subcutaneous, followed by intravenous and intradermal, with varying vaccination schedules (weekly, biweekly, or monthly). Subcutaneous and intradermal routes enhance DC migration to lymph nodes, whereas intravenous administration results in transient pulmonary uptake before redistribution to the liver, spleen, and bone marrow [81]. Combined administration routes have been employed to improve DC migration and induce a more systemic response, as noted in 18% of the studies [11]. Systemic adjuvants were used in conjunction with antigens to enhance the antigen's immunogenicity and provoke the desired immune response [82]]. The most commonly used adjuvant in the studies was GM-CSF, which facilitates the targeting of PAP antigens to antigen-presenting cells, leading to their activation [82].

A satisfactory immune response is closely tied to the successful migration of dendritic cells (DCs) to lymph nodes and the production of cytokines, which reflect changes in the gene expression of DCs. These changes result in the upregulation of MHC-II, CD80, CD86, and CD40 [83,84]. DC activation can trigger CD4+ T-cell responses, including T-helper or regulatory T-cell (Treg) activation, depending on the context [85]. The DC immune response operates through three primary mechanisms: (1) MHC-II-mediated antigen presentation, which is crucial for T-cell activation. (2) Upregulation of costimulatory molecules, such as CD80, CD86, and CD40, to engage and activate T cells. (3) Release of polarizing cytokines by DCs, including tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), interleukin-1 beta (IL-1β), transforming growth factor-beta (TGF-β), and interleukin-10 (IL-10). All these pathways are essential for a productive antigen presentation [86].

Post-treatment evaluations focus on disease progression, with analyses such as bone scintigraphy, chest X-rays, delayed-type hypersensitivity (DTH) testing, and PSA level measurements. Immunotherapy has been shown to reduce PSA levels by approximately 50% [87–90]. DTH testing provided the first experimental evidence of transferable immunity mediated solely by immune cells [91]. However, DTH should not be assessed in isolation but rather as a group of antigen-related responses. These responses include the tuberculin reaction, Jones-Mote reaction, contact

hypersensitivity, and graft-versus-host disease. These reactions can be categorized into CD4+ and CD8+ compartments and further subdivided based on the cytokine secretion patterns of T cells [92].

In this context, the immune responses involving secreted factors and cellular components within the tumor immune microenvironment of prostate cancer (PCa) can significantly influence the balance between tumor progression, elimination, and treatment response [93]. This microenvironment consists of tumor cells, immune cells, stromal cells, and the extracellular matrix. Cancer cells secrete inflammatory cytokines that reprogram surrounding healthy cells, promoting tumor growth and facilitating metastasis [94]. These cells interact with nearby tissues through the lymphatic and cardiovascular systems [95]. Various cytokines, chemokines, TNF-α, and IFN-γ play pivotal roles in PCa progression. For example, CCL2 promotes tumor progression by stimulating AKT phosphorylation, thereby enhancing invasion and metastasis. CXCL1 and CXCL2 sustain chronic inflammation and facilitate tumor development through their interaction with the CXCR2 receptor [96]]. Additionally, TNF-α and IFN-γ elevate levels of PDGF and VEGF via the NRF2-HIF-1α pathway and increase PDL1 and PDL2 expression in mesenchymal cells, which supports PCa growth. Polyphilin I induces p21 expression, causing cell cycle arrest at the G0/G1 phase via upregulation of IL-6. IL-8 and mTOR counter oxidative stress by inhibiting GSK-3β, while IL-17 stimulates matrix metalloproteinase 7 (MMP7) expression, driving tumor progression through epithelial-mesenchymal transition [96].

ALCAR inhibits the synthesis of pro-inflammatory chemokines, TNF-α, and IFN-γ, leading to reduced invasion, proliferation, and migration of cancer cells [96]. Additionally, IL-24 suppresses cellular growth, while the IL-18-607 C/A polymorphism is associated with a reduced risk of PCa. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), influenced by IL-23, contribute to resistance against androgen deprivation therapy. Furthermore, IFN-γ secreted by natural killer (NK) cells, along with high expression of IFN-γ, TNF-α, IL-5, IL-10, and macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1α), has been observed in castration-resistant prostate cancer. Among cytokines, IL-15 uniquely stimulates NK cells in the presence of PCa cells [96] .

Given the critical role of the immune environment in tumor progression, there is considerable interest in designing therapies that enhance immune infiltration by antigen-presenting cells (APCs) and effector T cells [97]. Consequently, assessing factors that characterize the tumor immune microenvironment is vital for understanding

treatment efficacy and predicting disease progression. On this basis, an "immunoscore" has been established as a standardized metric to evaluate the tumor's immunological context based on the density and location of CD3+ and CD8+ T cells [98]. Among the most commonly performed assessments is the analysis of T cell responses, subdivided into CD4+ and CD8+ T cells, with some studies also examining the CD4:CD8 ratio. This ratio serves as a parameter for altered immune function, often showing an increasing trend in average values. In many solid tumors, high infiltration of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), particularly activated CD8+ T cells, correlates with better prognoses due to their cytotoxic functions [99,100].

The use of dendritic cell (DC)-based immunotherapies is promising because these cells can regulate the type and quality of T cell responses through the production of IL-12 p70 for Th1, IL-4 for Th2, or IL-17 for Th17 responses [101–103]. Additionally, DCs secrete TNF, interferons, IL-10, thymic stromal lymphopoietin (TSLP), and CD40L, further influencing immune responses [[66]. For these reasons, studies have evaluated levels of TNF-α, IFN, IL-1β, IL-6, IL-10, and IL-12 as key indicators of immune activation and modulation.

IFN1 is crucial for an efficient antitumoral immune response, which is carried out through a variety of mechanisms, activating adaptive immune cells and facilitating the death of cytotoxic T lymphocytes [104]. The activation of the transcription factors STAT1 and STAT3 drives canonical IFN1 signaling, mediating the transcription of genes involved in stimulating and regulating both innate and adaptive immune responses [105]. Dysfunctional IFN1 signaling is directly associated with determining the characteristics of the immunoinflammatory tumor microenvironment in prostate cancer [93] (Figure 5C).

One such alteration is the loss of the PTEN protein, a lipid and protein phosphatase that antagonizes the PI3K pro-growth signaling pathway in PCa [106]. It is believed that the regulatory functions of this protein are mediated by activation of IFN1 cellular pathways [107]. Thus, PTEN is proposed to act as a tumor suppressor by regulating the PI3K-Akt-mTOR signaling network [93]. Mice deficient in both prostate-specific STAT3 and PTEN exhibit accelerated cancer progression and metastasis compared to mice deficient only in PTEN [108]. These effects are mediated through the ARF-MDM2-p53 axis, suggesting that PTEN-deficient tumors are unable to effectively activate this axis, resulting in tumor metastasis [108] (Figure 5C).

Another factor that the IFN signaling axis may impact, potentially related to tumor progression or regression, is the expression of MHC class I. The epigenetic silencing of MHC class I genes is significant in prostate cancer [109,110]. CD8+ T cells recognize antigens on the surface of cancer cells through MHC class I and, with the secretion of IFN-γ, sensitize cancer cells, inducing apoptosis via the release of perforin and granzymes [111]] (Figure 5C). CD4+ T cells, which can differentiate into Tregs (regulatory T cells), also contribute to the immune system's effectiveness in eliminating cancer cells; however, for this to occur, MHC II must be expressed on tumor cells [112]].

Within the MHC, there are proteins called human leukocyte antigens (HLA). HLA-DR, mentioned in 15% of studies, is the class II MHC protein that binds to the antigen peptide and, through MHC II, is recognized by the CD4 T cell receptor (TCR). HLA-A is the protein present in MHC class I, necessary for the activation of CD8 T cells. Tumor cells also express MHC class I, and at the onset of tumor formation, this expression is positive, which enhances the recognition of tumor cells by T cells. However, there is heterogeneity in MHC phenotypes, which can evolve into negative phenotypes, thus preventing T cell responses. Positive regulation of class I HLA in tumor cells suggests metastatic regression [113]].

Some studies evaluate the T cells themselves, with 6% of studies focusing on allogenic T cells, a strategy extensively explored in cellular immunotherapy interventions due to the potential to offer immune cells specifically directed against tumor cells. Autologous T cells are exposed to high levels of lactic acid, low glucose levels, and hypoxia in the tumor microenvironment, characteristics that can lead to intrinsic dysfunctions in these cells, associated with the inability to recognize tumor cells [112]]. Therefore, the transfer of allogenic T cells provides an immunological advantage in immunosuppressive environments [114]].

Another T cell type extensively studied is the Treg cell, evaluated in 4% of the articles. They are activated by TCR in the presence of IL-2 and co-stimulation via the CD28 pathway and are capable of inhibiting the activation and expansion of naïve conventional T cells and effector T cells, such as CD4+ and CD8+. A well-studied characteristic of Tregs is their ability to produce immunosuppressive cytokines, such as IL-10. IL-10 also contributes to the reduction of effector responses by inhibiting IL-12, decreasing IFN-γ and the Th1 pattern, and binding to antigen-presenting cells (APCs), which, through interaction with CD28 receptors, inhibits effector cell activation,

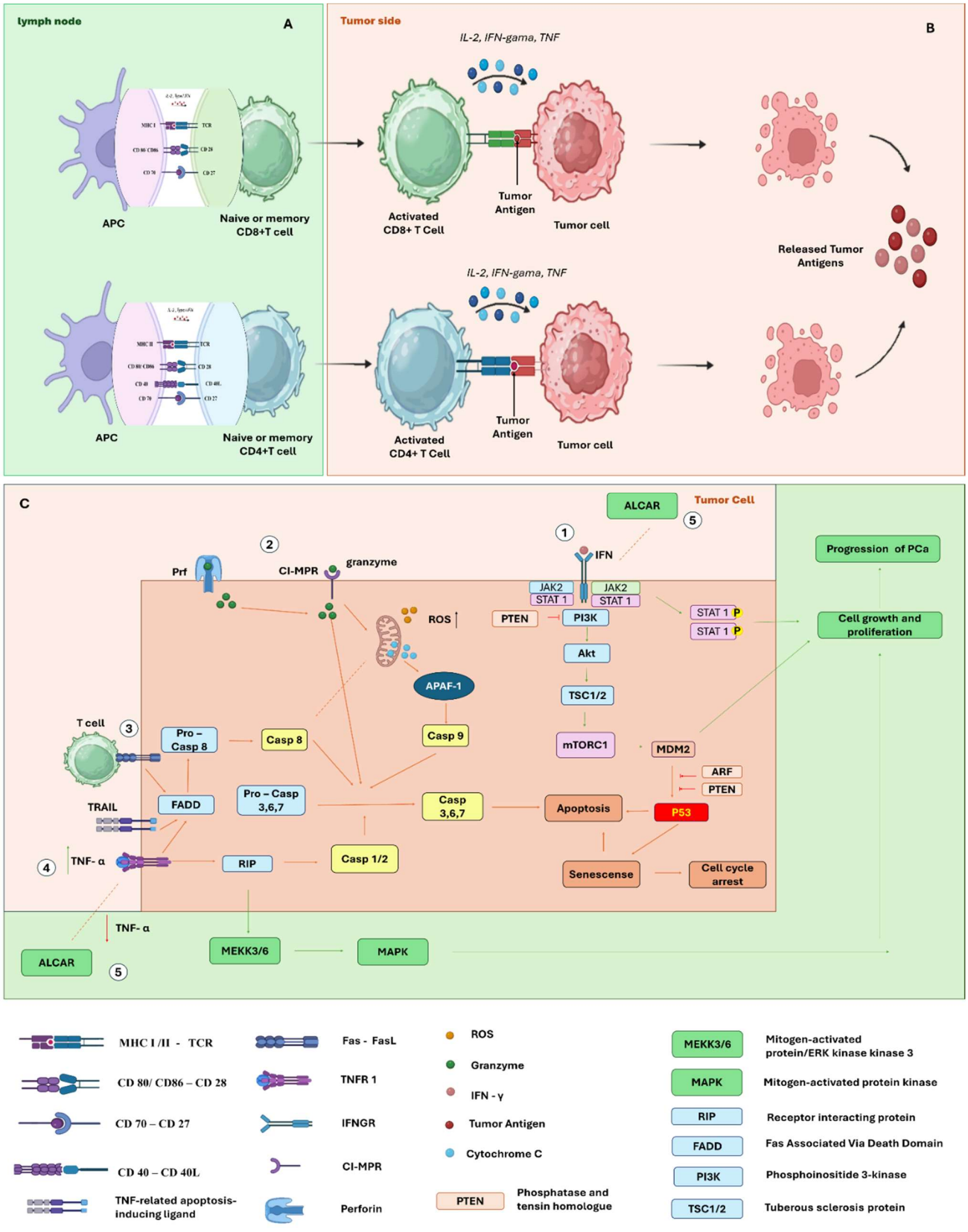
promoting a tolerogenic phenotype in dendritic cells (DCs). This inactivation of dendritic cells reduces the expression of CD80 and CD86 [[115]. The late expansion of Tregs induced by IL-2 after castration and immunization abolishes the initial antitumor response of CD8+ T cells [116].

One included study analyzed circulating myeloid-derived dendritic cells (mDCs) as plasmacytoid dendritic cells (pDCs). mDCs are present in peripheral organs and can recognize and present antigens. Through the expression of MHC molecules, they can recognize antigens on the surface of cells, establish immunological synapses by binding to T cell receptors, and stimulate effector T cell responses, a crucial factor in the tumor microenvironment [[114]]. It is believed that the overexpression of mDCs increases the production of IL-12 [118]]. On the other hand, pDCs express surface markers such as toll-like receptors, which are important for pathogen recognition. When resting, pDCs have a weak capacity to stimulate T cells; however, after activation, they acquire a dendritic shape and become more effective at stimulating T cells through the expression of co-stimulatory molecules and MHC. pDCs may not only lack the ability to induce antitumoral T cells but may also induce Tregs [[119,120]. These cells can transform into conventional dendritic cells upon activation and secrete type I interferon (IFN-I)[121]. Some studies also report the phagocytic capacity of pDCs. These cells appear capable of phagocytosing particulate antigens, such as apoptotic cells. Phagocytic efficiency depends on the tissue origin of activation, the antigen type, and the duration of activation. pDCs stimulate disparate T-cell responses depending on the activation stimulus, thus having the capacity to modulate the immune response of these cells [121]].

The toxicity associated with immunotherapy was evaluated in only 7 studies. In 2 of them, no toxicity was reported [[88,122], while the others reported associated effects, including local reactions from the injections, renal, hematological, and autoimmune diseases, as well as other grade 1-2 toxicities [123–126]. One study reported that the observed toxicity was not related to the administered treatment [127]. Only 6 studies discussed side effects, with the most frequent being bone pain, fever, fatigue, insomnia, and arthralgia. Mild and transient side effects, including fever, injection site reactions, lymphadenopathy, and fatigue, were reported[128,129]. Immunotherapy safety was addressed in 7 studies, 5 of which reported that it was well-tolerated, showing improvements in quality of life and pain. These studies suggested that disease progression was greater in individuals who did not develop an immune

response [[88,90,130–132]. Furthermore, 8 studies mentioned long-term follow-up (up to 3 years) of patients to assess their post-treatment response and ensure its efficacy.

Figure 5 - Activation of T cells by dendritic cells in lymph nodes



Note: A – Activation of T cells by dendritic cells in lymph nodes; B - Binding of T cells to tumor cells inducing apoptosis; C - Signaling pathways for activation of cell growth and proliferation or signaling pathways for cycle arrest or apoptosis. Pathway 1 - The binding of IFN-γ to the INF-γ receptor activates the JAK-STAT signaling cascade. Dysfunctional IFN-1 signaling is directly related to determining the characteristics of the immune inflammatory environment of PCa. However, Phosphatase and tensin homolog (PTEN) antagonize the pro-growth PI3K signaling pathway of PCa mediated through the ARF-MDM2-p53 axis. Pathway 2 – Granzymes and perforin are packaged into cytotoxic T lymphocytes and natural killer (NK) cells. When cells bind to target cells, these proteins are released where perforin mediates the influx of granzymes through the formation of pores in the target cell membrane. The granzyme causes increased production of reactive oxygen species and release of cytochrome C by mitochondria, which activate caspase-dependent apoptotic pathways including Cas3 and Cas8. Pathway 3 - Tumor recognition leads to activation of T cells and upregulation of Fas and FasL on the surface of T cells, activating the Cas8.3 cascade and ultimately apoptosis; pathway 4 - TNFR1 initiates an extracellular signal by binding to “death receptors”, FAS and TRAIL are examples of these messengers that trigger the extrinsic apoptosis pathway, they bind to the TRAILR or FASR receptors, causing changes in the intracellular domain of the receptor. With these alterations, an intracellular protein FADD (Fas-associated death domain protein) is activated. It then interacts with two additional proteins pro-caspase-8 and pro-caspase-10, which initiate the process of cell death.; pathway 5 - Acetyl-L-Carnitine (ALCAR) prevents the synthesis of pro-inflammatory chemokines and TNF-α and IFN-γ, leading to a reduction in invasion, proliferation and migration.
Source: own elaboration, 2024.

11 CONCLUSIONS

Although there is significant variability in the methods of obtaining, differentiating, propagating, and preparing dendritic cell-based vaccines, the immunotherapy strategy for prostate cancer shows promise. Patients generally exhibit positive responses, with T-cell activation evidenced by increased CD4 and CD8 cells. An increase in interferon levels and variation in IL-10, IL-6, IL-1B, and IL-12 levels were observed, suggesting that the immune response depends on the patient's context. Regulatory T cells, myeloid-derived suppressor cells (MDSC), dendritic cells, and positive HLA expression were also evident. These findings are essential to validate the efficacy of immunotherapy, demonstrating the safety of the vaccines, which, although they may cause some side effects, are generally mild and temporary. The variation in clinical and immunological responses indicates that more studies are needed to better standardize protocols, doses, and routes to personalize treatment based on individual immune profiles, aiming for a more robust and lasting antitumor response.

1- **Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Table A1: Article’s search results. Table A2: Description of the main characteristics of the evaluated studies. Table A3: Main features of the treatment.

2- **Author Contributions:** Conceptualization, Dias, F.C.R. and Gomes, M.L.M.; methodology, Dias, F.C.R., Gomes, M.L.M and Ribeiro, D. L.; validation, Gomes, M.L.M. and Michlein, M.A.; formal analysis, Pacheco, H.F.M., Fernandes, J.L.F., Deus, M. C., and Dias, F.C.R.; resources, Gomes, M.L.M.; data curation, Dias, F.C.R., Ribeiro, D.L. and Gomes, M.L.M.; writing—original draft preparation, Pacheco, H.F.M., Fernandes, J.L.F., and Dias, F.C.R.; writing—review and editing, Gomes, M.L.M., Ribeiro, D.L. and Michelin, MA.; supervision, Gomes, M.L.M; project administration, Gomes, M.L.M.; funding acquisition, Gomes, M.L.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

3- **Funding:** This research was funded by FAPEMIG, grant numbers BPD-00733-22 and APQ-02736-18.

4- **Data Availability Statement:** The data generated or analyzed during this study are provided in this review and supplemental information.

5- **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

APPENDIX A

Table 3 - Article's search results

Database	Descriptors	Items Found	Time	Date
PUBMED	Dendritic Cells	104,275	20:13:10	28/10/2023
	Male urogenital cancer clinical trial	21,023	20:12:43	28/10/2023
	#1 and #2	187	20:13:37	28/10/2023
SCOPUS	Dendritic Cells	785,09	21:16:10	28/10/2023
	Male urogenital cancer clinical trial	9,314	21:16:40	28/10/2023
	#1 and #2	380	21:16:58	28/10/2023
WEB OF SCIENCE	TS=Dendritic Cells	170,576	21:17:30	28/10/2023
	TS = male urogenital cancer clinical trial	14	21:17:06	28/10/2023
	#1 and #2	0	21:17:54	28/10/2023
EMBASE	Dendritic Cells	139,497	21:14:39	28/10/2023
	Male urogenital cancer clinical trial	2,103	21:15:23	28/10/2023
	#1 and #2	8	21:15:35	28/10/2023

Source: own elaboration, 2024.

Table 4 - Description of the main characteristics of the evaluated studies

Country	Type of Study	Participants	Participants per group	Age	Inclusion criteria	Ethics (humans)	Ethics (animals)	Ref.
Czech Republic	Phase I/II	25	-	73	Prostatic adenocarcinoma and progression of serum PSA levels and/or radiographic progression after failure of second-line hormonal manipulation in widespread metastatic disease. adequate	-	-	[19]

					hematologic, hepatic, and renal function and negative results.			
The Netherlands	Phase II	44	-		Histologically confirmed adenocarcinoma of the prostate. Have not received any immunotherapy, docetaxel, abazitaxel or treatment with the RANKL inhibitor denosumab. Absence of active autoimmune disease, absence of an active viral infection or allergy to shellfish or significant laboratory abnormalities	Y	Y	[20]
Norway	Phase I	18	-	-	mCRPC with metastases and an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status of 0–1, adequate organ function, no known hypersensitivity to vaccines or components	-	-	[21]

					of the cell therapy, and no contraindications to surgery			
United States of America	Phase I	-	-	72	Patients were required to have progressive mCRPC and exposure to no more than one prior chemotherapy, biologic, or combination treatment regimen for mCRPC. Visceral metastasis and narcotics for pain were allowed. Castrate testosterone level ÿ50 ng/dL.	-	-	[22]
Chile	Phase I	20			Histologically confirmed PC; progressive disease during combined ADT and androgen blockade (AB). Withdrawal of other oncological treatments for at least 4 weeks. Exclusion criteria included steroid	Y	Y	[23]

					therapy and second oncological disease.			
Denmark	Phase II	43		70	They have histologically confirmed metastatic adenocarcinoma of the prostate progressing despite treatment with surgical or medical castration. Exclusion criteria were a positive serological status for hepatitis B, C and/or HIV; use of immunosuppressive drugs (including prednisolone); and the presence of severe cardiac, pulmonary and/or autoimmune diseases.		Y	[24]
United States of America	*In vitro* study	14			Aggressive tumor characteristics	Y	-	[25]
United States of America	*In vitro* study	-	-	-	-	-	Y	[25]
United States of America	Phase I	16	3 - average dose and 6 - maxim	-	Patients were required to be free from the toxic effects of prior	Y	-	[26]

			um dose		therapies and not to have received any chemotherapy, radiotherapy or immunotherapy for at least 6 weeks prior to study entry. In patients treated with hormonal therapy, evidence of appropriate testosterone suppression was obtained before study entry.			
United States of America	Phase I	12	-	-	Histologically proven adenocarcinoma of the prostate that progressed despite primary hormonal therapy; negative serologic tests for HIV, human T-cell lymphotropic virus type I, hepatitis B, and hepatitis C; adequate hematologic parameters, total bilirubin equal to or less than two times the upper limit of normal; and aspartate	-	Y	[27]

					aminotransferase and alanine aminotransferase equal to or less than five times the upper limit of normal.			
United States of America	Clinical study	18	-	-	-	Y	-	[28]
United States of America	Clinic trial (pilot)	21	6	-	They were required to have histologically documented prostate cancer with recurrent or metastatic disease measurable by an abnormal and/or rising serum prostate-specific Ag level, detectable serum PAP levels, and no hormonal manipulation or other therapies, including immunosuppressive radiation or chemotherapy, were performed during the study.	Y	-	[29]
United States	Phase I	24	12	-	Patients who had biopsy-proven	Y	-	[30]

of America					prostate cancer and progressive disease: PSA documented as elevated on 3 occasions despite testosterone levels			
United States of America	Phase I/II	27	-	49 a 77	Histologically confirmed prostatic adenocarcinoma. Patients after radical prostatectomy, radiotherapy, and with elevated serum PSA concentration.	Y	-	[31]
Germany	Phase I	8	-	57 a 74	Patients with HLAA*0201 allele, life expectancy of at least 3 months, serum PSA between 5 and 150 ng/m	Y	-	[32]
United States of America	Phase II	21	-	70	Rising PSA while receiving androgen ablation therapy and must have had a negative bone scan at the time of study entry. Karnofsky's performance status of 60%, castrate	Y	-	[33]

					testosterone levels, adequate hematologic function, and adequate liver function.			
Germany	Clinical trial	15	12	>18	Histologically confirmed progressive prostate carcinoma expressing measurable serum PSA, HLA type A2, life expectancy of at least 3 months, at least one measurable and/or evaluable parameter, adequate vital organ function.	-	Y	[34]
United Kingdom	*in vitro*	-	-	-	-	-	-	[35]
United States of America	Phase II	107	-	-	-	-	-	[36]
Norway	Phase I /II	20	19	-	Histologically, prostate adenocarcinoma; increased PSA in three analyses. All had continued anti-hormonal treatment during the vaccination period and 3	-	Y	[36]

					months after therapy;			
United States of America	Phase I	51	-	-	-	Y	-	[37]
United States of America	Phase II	33	-	-	-	-	-	[38]
United States of America	Phase II	37	-	-	-	-	-	[39]
United States of America	Phase II	28	1st group: 17 2nd group: 11	-	-	-	-	[40]
United States of America	Phase II	63	26 - hormone-refractory metastatic disease 37 - suspected local recurrence	-	-	-	-	[41]
United States of America	Cohort	-	-	-	-	-	-	[42]
United Kingdom	Phase I/II	20	Patients with hormone-refractory prostate cancer = 15 Patient	-	-	-	-	[43]

			s with metastatic renal cell cancer = 5					
United States of America	Phase I	14	14	-	-	-	-	[44]
United States of America	Phase II	40	Phase I = 12 Post-treatments (PSA 1.5) = 28	-	-	-	-	[45]
Lebanon	Clinical trial	26	12	-	Documented PSA elevation on two measurements at least 2 weeks apart, a life expectancy greater than 6 months, and at least 4 weeks after surgery or radiation. Patients treated with androgen deprivation had to discontinue at least 6 weeks of all oral nonsteroidal antiandrogens and show evidence of progression.	-	-	[46]
United States	Phase I	107	Group AI = 33	AI - 72	-	-	-	[47]

of America			Group AII = 33 Group B = 41	AII - 62 B – 66				
United States of America	Phase I/II	31	Phase I = 12 Phase II= 19	-	Histologically confirmed adenocarcinoma of the prostate with evidence of disease progression despite androgen deprivation, serum testosterone less than 50 ng/mL, and an expected survival of at least 3 months	-	-	[48]
United Kingdom	Phase II	20	A = 12, B= 8	-	Patients with histologically confirmed metastatic adenocarcinoma of the prostate, have adequate hepatic, renal, and neurological function, a life expectancy of >6 months, and a Karnofsky's performance status of >70%.	Y	-	[49]
Germany	Phase I/II	12	-	-	HLA-A*0201-positive patients with histologically proven metastatic	-	-	[50]

					prostate carcinoma (PCa) and tumor progression under complete androgen deprivation			
United States of America	*in vitro*	10	-	-	Patients with histological confirmation of prostate cancer	Y	-	[51]
United States of America	*in vitro*	-	-	-	Patients with prostate cancer in the pre- and post-operative period of prostatectomy	Y	-	[37]
United States of America	Phase I	51	-	-	advanced, hormone-resistant cancer	Y	-	[52]
United States of America	Phase I/II	33	-	-	advanced prostate cancer			[53]
United States of America	Phase I/II	Phase II - 107	-	-	Phase I - patients with advanced hormone-refractory prostate cancer / Phase II - clinically progressive and hormone-refractory prostate cancer (group A) and locally recurrent prostate cancer (group B).			[54]

United States of America	Clinical trial - Phase II	107	-	-	group A (individuals with hormone-refractory metastatic prostate cancer) / group B (individuals admitted with recurrence of prostate cancer after primary treatment)		[55]
-	-	-	-	-	Patients with a histological diagnosis of adenocarcinoma of the prostate who had undergone prior definitive therapy for prostate cancer consisting of external beam radiotherapy and/or brachytherapy or radical prostatectomy, with or without adjuvant androgen ablation, were eligible.		[56]
China	-	-	-	-	Orchiectomy or LHRH analogue augmentation	Y	[57]
Switzerland	Clinical trial Phase I/II	6	-	58 - 74	Patients with hormone-refractory prostate		[58]

					cancer documented disease progression. In the case of antiandrogen therapy, these should have been stopped at least 6 weeks before enrollment.			
Australia	-	-	-	-	(i) clinically localized disease that was pre-treated or part of a watchful waiting regimen, (ii) hormone-sensitive, metastatic disease, rising PSA, and (iii) hormone-refractory metastatic disease	Y	Y	[59]
China	-	21	11	67.7	-	Y	Y	[60]

Source: own elaboration, 2024.

Table 5 - Main features of the treatment

Treatment	Dose	Route	olume	Time	Duration	Frequency	ystemic djuvant	Dose	Ref.
CVAC/PCa	× 10^7	ubcutaneous	.5 mL	8 veeks	2 days	day/week for the first two weeks then another 10 ays/6 weeks	-	-	19]
A – CD1c+ mDC accinations B – pDC accinations	– (2– × 10^6 – 1–3 × 10^6	ıtranodal	-	-	-	-	-	-	20]

C – combined CD1c+ mDC and pDC combiDC vaccinations	– 3–8 × 10^6								
-	-	-		-	-	-	-	-	21]
-	, 12.5 r 40 × 10^6 of DCs	ntraderm al	00 µL	-	5 – 8 days	1 day/ 2 weeks			22]
mixture of autologous TAPC cells and CCH	2x10^7 TAPC nd 150 mg CCH	ubcutan eous		-	-	On the 1st, 0th, 30th and 60th	Saline	50 mg f CCH	23]
Dcvac	× 10^6 nRNA DCs	ntraderm al	-	30 veeks	4 days	First 4 cycles n days 8 and 15. In the thers only on day 8	-	-	24]
DC transfected with mRNA encoding PSA	-	-	-	-	-	-	-	-	25]
DC transfected with mplifietumor RNA	-	-	-	-	-	-	-	-	25]
DCs transfected with mRNA encoding prostate-specific antigen (PSA)	× 10^7, × 10^7 or 5× 0^7 10^7	ntraveno us and ntraderm al	-	6 veeks	3 days	3 days /2 weeks	-	-	26]
Autologous endritic cells oaded with PAP antigen Autologous endritic cells exposed ex vivo to PA2024	.3, 0.6, nd 1.0 mg	ntraveno us and ubcutan eous	-	-	5 days	days/month	GM-CSF	-	27]

Autologous DC pulsed with TARP peptide.	-	ubcutan ous and ntraderm al	-	48 to 96 veeks	5 days	day/3 weeks	-	-	28]
DCs loaded with ecombinant PAP	112 x10^6	ntraveno us, ntraderm al and ntralinfáti co	– 100 ml II – 4 ml.	-	2 days	days/month	Enriched from mphocyt es	-	29]
DC/LNCaP; DC/ LNCaP-M1; DC/KLH; DC alone	2-0x10^6	-	-	8 veeks	4 days	-	upplemen ted with 1% utologous plasma, GM-CSF (180 ng/ml)	-	30]
Autologous DCs pulsed with the killed LNCaP cell line DCVAC/Pca)	1x10^7	ubcutan eous	5 ml	-	2 days	-	-	-	31]
DCs loaded with a PSA-erived HLA-A*0201-restricted peptide cocktail.	1x10^7	ntraderm al and ntraveno us	ml ID E 50 ml EV.	8 veeks	4 days	4 days/2 weeks	-	-	32]
endritic cell stimulating agent Flt3 ligand	5 g/kg	ubcutan eous	-	-	3 days	cycles of 28 days	-	-	33]
IFN-g and autologous DCs pulsed with PSA peptides	2x10^6 DCs	ubcutan eous	50 ng/m2 of body urfac e	12 veeks	-	4 days/3 weeks	-	-	34]
DC matured with opolysacch aride (LPS). umor lysate;	-	-	-	-	-	-	-	-	35]
Autologous DCs pulsed	-	ntraveno us	-	36 veeks	-	1 day/week	-	-	36]

with two HLA-A2-binding PSMA-derived peptides.									
DCs transfected with mRNA from allogeneic prostate cancer cell nes (DU145, LNCaP and PC-3)	-	ıtranodal or ıtraderm al	-	-	-	1 days/week	-	-	36]
DC pulsed with PSMA specific for HLA-A0201	-	ntraveno us	00 ml	6-12 veeks	-	-	-	-	37]
DC and two HLA-A2-specific PSMA peptides PSM-P1 and -P2	-	-	-	32 veeks	-	1day/week	-	-	38]
DC and two HLA-A2-specific prostate-specific membrane antigen (PSMA) peptides, PSM-P1 and -P2	-	-	-	32 veeks	-	1day/week	-	-	39]
DCs pulsed with PSMA peptides	-	-	-	6 veeks	-	1 day/week	-	-	40]
Autologous DCs mmobilized with PSM-P1 Peptides	-	-	-	-	-	1day/week	-	-	41]
Antigen-pulsed DC (MHC-	-	-	-	-	-	-	-	-	42]

peptide complexes)									
DC pulsed with allogeneic umor lysate HRPC and CCR)	1–3 × 10^6	ntranodal or ntraderm al	00 µL	12 veeks	-	day/2 weeks	-	-	43]
CD1c BDCA-1) + BDC	2edian o f 6.95×1 0^6	ntraderm al or ntraveno us	-	8 veeks	-	Days 10, 28 and 56	-	-	44]
Autologous DC pulsed with PSM-P1 nd PSM-P2	0^6 –2 × 0^7 DC e 2 x 0^7 DC	-	75 g/m^2 /day	36 veeks	-	-	GM-CSF	1000 U/ml	45]
GM-CSF	-	-	-	-	-	-	GM-CSF	= 125 ug/m^2 and 3 250 ug/m^2	46]
Autologous DC pulsed with PSMA peptides	-	ubcutan eous	5mcg m^2/da y	-	-	1 day/week	GM-CSF	75 g/m^2/d ay	47]
Pulsed DC with PAP (Provenge)	00x10^6	ntraveno us	250 mL	24 veeks	4 days	weeks 0, 4, and 8. A ourth infusion was administered on week 24	-	-	48]
-	1st ose= 3 × 10^7 DC 2nd ose= 6 × 10^7 DC	ntraderm al	00 µl	26 veeks	-	-	-	-	49]
Pulsed DC with PSCA	Mean global ose 27 3 10^6 DC	ubcutan eous	-	8 veeks	-	day/2 weeks	-	-	50]
DC with LNCaP lysate	-	-	-	-	-	-	-	-	51]
DC with PSMA lysate	-	-	-	-	-	-	-	-	37]

Autologous DC pulsed with a PSM-P1 and -P2 cocktail	, 5, 10 ou 20 $\times 10^6$	ntraveno us	g/ml	6-8 veeks	-5 days	-	-	-	52]
Autologous DC pulsed with a PSM-P1 and -P2 cocktail	-	ntraveno us	00ml	6 veeks	6 days	-	GM-CSF	75 $/m^2$/da y	53]
Autologous DC pulsed with a PSM-P1 and -P2 cocktail	laximu m ccepta ble dose	ntraveno us		7 veeks	7 days	-	GM-CSF	-	54]
Autologous DC pulsed with a PSM-P1 and -P2 cocktail	-	ntraveno us	00 ml	6 veeks	6 days	-	GM-CSF	-	55]
rhGM-CSF	250 µg/m^2 /day	ubcutan eous	-	4 veeks	14days	-	-	-	56]
-	-	-	-	-	-	-	-	-	57]
DC were ulsed with a set of peptides SCA14–22, PAP299–307, PSMA4–12 and SA154–163	$4 \cdot 10^6$ DC + 0 lg/ml from each eptide	ntraderm al	-	2 veeks	6 ays/we ek	-	-	-	58]
CD11cþCD1 cþ, CD11cþCD1 6þ and CD11cCD12 3 + BDC subsets in vhole blood	-	-	-	-	-	-	-	-	59]
DCs pulsed with PSMA+rSur vivin	$\times 10^6$	ubcutan eous	-	-	5 days	12 days /15 days days/month	-	-	60]

Source: own elaboration, 2024.

REFERENCES

92. Black, C. A. Delayed type hypersensitivity: Current theories with a historic perspective. *Dermatology online journal,* **1999,** 5, 1.

Adema, G.J.; De Vries, I.J.M.; Punt, C.J.A.; Figdor, C.G. Migration of Dendritic Cell Based Cancer Vaccines: In Vivo Veritas? *Curr Opin Immunol* **2005,** 17, 170–174.

Ahmed, H.U.; El-Shater Bosaily, A.; Brown, L.C.; Gabe, R.; Kaplan, R.; Parmar, M.K.; Collaco-Moraes, Y.; Ward, K.; Hindley, R.G.; Freeman, A.; et al. Diagnostic Accuracy of Multi-Parametric MRI and TRUS Biopsy in Prostate Cancer (PROMIS): A Paired Validating Confirmatory Study. *The Lancet* **2017,** 389, 815–822.

Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* **2006,** 124, 783–801.

Alcaide, E.G.; Krishnarajah, S.; Junker, F. Dendritic Cell Tumor Vaccination via Fc Gamma Receptor Targeting: Lessons Learned from Pre-Clinical and Translational Studies. *Vaccines (Basel)* **2021,** 409.

Arce-Sillas, A.; Álvarez-Luquín, D.D.; Tamaya-Domínguez, B.; Gomez-Fuentes, S.; Trejo-Garciá, A.; Melo-Salas, M.; Cárdenas, G.; Rodríguez-Ramírez, J.; Adalid-Peralta, L. Regulatory T Cells: Molecular Actions on Effector Cells in Immune Regulation. *J Immunol Res* **2016,** 1, 1720827.

Bergengren, O.; Pekala, K.R.; Matsoukas, K.; Fainberg, J.; Mungovan, S.F.; Bratt, O.; Bray, F.; Brawley, O.; Luckenbaugh, A.N.; Mucci, L.; et al. 2022 Update on Prostate Cancer Epidemiology and Risk Factors—A Systematic Review. *Eur Urol* **2023,** 84, 191–206.

Blanco, P.; Palucka, A.K.; Pascual, V.; Banchereau, J. Dendritic Cells and Cytokines in Human Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* **2008,** 19, 41–52.

Bol, K.F.; Aarntzen, E.H.J.G.; in ’t Hout, F.E.M.; Schreibelt, G.; Creemers, J.H.A.; Lesterhuis, W.J.; Gerritsen, W.R.; Grunhagen, D.J.; Verhoef, C.; Punt, C.J.A.; et al. Favorable Overall Survival in Stage III Melanoma Patients after Adjuvant Dendritic Cell Vaccination. *Oncoimmunology* **2016,** 5, doi:10.1080/2162402X.2015.1057673.
Bubendorf, L.; Schöpfer, A.; Wagner, U.; Sauter, G.; Moch, H.; Willi, N.; Gasser, T.C.; Mihatsch, M.J. Metastatic Patterns of Prostate Cancer: An Autopsy Study of 1,589 Patients. *Hum Pathol* **2000,** 31, 578–583.

Burch, P.A.; Breen, J.K.; Buckner, J.C.; Gastineau, D.A.; Kaur, J.A.; Laus, R.L.; Padley, D.J.; Peshwa, M. V; Pitot, H.C.; Richardson, R.L.; et al. Priming Tissue-Specific Cellular Immunity in a Phase I Trial of Autologous Dendritic Cells for Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research,* **2000,** 6(6), 2175-2182.

Cachot, A.; Bilous, M.; Liu, Y.-C.; Li, X.; Saillard, M.; Cenerenti, M.; Rockinger, G.A.; Wyss, T.; Guillaume, P.; Schmidt, J.; et al. Tumor-Specific Cytolytic CD4 T Cells Mediate Immunity against Human Cancer. *Science advances,* **2021,** 7(9), eabe3348.

Carreras, B.; Griffin, D.E.; Silverstein, A.M. Sindbis Virus - Induced Ocular Immunopathology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **1982,** 22, 571–578.

Castiello, L.; Sabatino, M.; Ren, J.; Terabe, M.; Khuu, H.; Wood, L. V.; Berzofsky, J.A.; Stroncek, D.F. Expression of CD14, IL10, and Tolerogenic Signature in Dendritic Cells Inversely Correlate with Clinical and Immunologic Response to TARP Vaccination in Prostate Cancer Patients. *Clinical Cancer Research* **2017,** 23, 3352–3364.
Chen, L.; Guo, D. The Functions of Tumor Suppressor PTEN in Innate and Adaptive Immunity. *Cell Mol Immunol* **2017,** 14, 581–589.

Dalod, M.; Chelbi, R.; Malissen, B.; Lawrence, T. Dendritic Cell Maturation: Functional Specialization through Signaling Specificity and Transcriptional Programming. *EMBO Journal* **2014,** 33, 1104–1116.

Dias, F.C.R.; Oliveira, J.B.; Pinheiro, B.S.S.; Pacheco, H.F.M.; Rodrigues, J.G.; Fernandes, J.L.F.; Gomes, M.L.M. Mechanism of Tumor Growth and Metastasis. In *Interdisciplinary Cancer Research*; Nima Rezaei, Ed.; 2024.
Fay, E.K.; Graff, J.N. Immunotherapy in Prostate Cancer. *Cancers (Basel)* **2020**, 12, 1–17.

Fong, L.; Brockstedt, D.; Benike, C.; Breen, J.K.; Strang, G.; Ruegg, C.L.; Engleman, E.G. Dendritic Cell-Based Xenoantigen Vaccination for Prostate Cancer Immunotherapy. *The Journal of Immunology*, **2001,** 167, 12, 7150-7156.

Foster, A.D.; Sivarapatna, A.; Gress, R.E. The Aging Immune System and Its Relationship with Cancer. *Aging health* **2011,** 7, 707–718.

Frank, M.O.; Kaufman, J.; Tian, S.; Suärez-Farïas, M.; Parveen, S.; Blachëre, N.E.; Morris, M.J.; Slovin, S.; Scher, H.I.; Albert, M.L.; et al. Harnessing Naturally Occurring Tumor Immunity: A Clinical Vaccine Trial in Prostate Cancer. *PLoS One* **2010,** 5, 1–12.

Fridman, W.H.; Zitvogel, L.; Sautès-Fridman, C.; Kroemer, G. The Immune Contexture in Cancer Prognosis and Treatment. *Nat Rev Clin Oncol* **2017,** 14, 717–734.

Fucikova, J.; Podrazil, M.; Jarolim, L.; Bilkova, P.; Hensler, M.; Becht, E.; Gasova, Z.; Klouckova, J.; Kayserova, J.; Horvath, R.; et al. Phase I/II Trial of Dendritic Cell-Based Active Cellular Immunotherapy with DCVAC/PCa in Patients with Rising PSA after Primary Prostatectomy or Salvage Radiotherapy for the Treatment of Prostate Cancer. Cancer Immunology. *Immunotherapy* **2018,** 67, 89–100.

Fucikova, J.; Podrazil, M.; Jarolim, L.; Bilkova, P.; Hensler, M.; Becht, E.; Gasova, Z.; Klouckova, J.; Kayserova, J.; Horvath, R.; et al. Phase I/II Trial of Dendritic Cell-Based Active Cellular Immunotherapy with DCVAC/PCa in Patients with Rising PSA after Primary Prostatectomy or Salvage Radiotherapy for the Treatment of Prostate Cancer. Cancer Immunology. *Immunotherapy* **2018,** 67, 89–100.

Fuessel, S.; Meye, A.; Schmitz, M.; Zastrow, S.; Linné, C.; Richter, K.; Löbel, B.; Hakenberg, O.W.; Hoelig, K.; Rieber, E.P.; et al. Vaccination of Hormone-Refractory

Prostate Cancer Patients with Peptide Cocktail-Loaded Dendritic Cells: Results of a Phase I Clinical Trial. *Prostate* **2006,** 66, 811–821.

Garrido, F.; Aptsiauri, N. Cancer Immune Escape: MHC Expression in Primary Tumours versus Metastases. *Immunology* **2019,** 158, 255–266.

Gu, Y. zhuo; Zhao, X.; Song, X. rong Ex Vivo Pulsed Dendritic Cell Vaccination against Cancer. *Acta Pharmacol Sin* **2020,** 41, 959–969.

Hato, L.; Vizcay, A.; Eguren, I.; Pérez-Gracia, J.L.; Rodríguez, J.; Gállego Pérez-Larraya, J.; Sarobe, P.; Inogés, S.; Díaz de Cerio, A.L.; Santisteban, M. Dendritic Cells in Cancer Immunology and Immunotherapy. *Cancers (Basel)* **2024,** 16.

He, H.; Tang, L.; Jiang, N.; Zheng, R.; Li, W.; Gu, Y.; Wang, M. Characterization of Peripheral Blood Mononuclear Cells Isolated Using Two Kinds of Leukocyte Filters. *Transfusion Clinique et Biologique* **2020,** 27, 10–17.

He, M.; Roussak, K.; Ma, F.; Borcherding, N.; Garin, V.; White, M.; Schutt, C.; Jensen, T.I.; Zhao, Y.; Iberg, C.A.; et al. CD5 Expression by Dendritic Cells Directs T Cell Immunity and Sustains Immunotherapy Responses. *Science* (1979) **2023,** 379(6633). Heiser, A.; Coleman, D.; Dannull, J.; Yancey, D.; Maurice, M.A.; Lallas, C.D.; Dahm, P.; Niedzwiecki, D.; Gilboa, E.; Vieweg, J. Autologous Dendritic Cells Transfected with Prostate-Specific Antigen RNA Stimulate CTL Responses against Metastatic Prostate Tumors. *Journal of Clinical Investigation* **2002,** 109, 409–417.

Heiser, A.; Maurice, M.A.; Yancey, D.R.; Wu, N.Z.; Dahm, P.; Pruitt, S.K.; Boczkowski, D.; Nair, S.K.; Ballo, M.S.; Gilboa, E.; et al. Induction of Polyclonal Prostate Cancer-Specific CTL Using Dendritic Cells Transfected with Amplified Tumor RNA. *The Journal of Immunology* **2001,** 166, 2953–2960.

Heninger, E.; Krueger, T.E.G.; Thiede, S.M.; Sperger, J.M.; Byers, B.L.; Kircher, M.R.; Kosoff, D.; Yang, B.; Jarrard, D.F.; Mcneel, D.G.; et al. Inducible Expression of Cancer-Testis Antigens in Human Prostate Cancer. *Oncotarget,* **2016,** 7(51), 84359.

Heras-Murillo, I.; Adán-Barrientos, I.; Galán, M.; Wculek, S.K.; Sancho, D. Dendritic Cells as Orchestrators of Anticancer Immunity and Immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* **2024,** 21, 257–277.

Higano, C.S.; Schellhammer, P.F.; Small, E.J.; Burch, P.A.; Nemunaitis, J.; Yuh, L.; Provost, N.; Frohlich, M.W. Integrated Data from 2 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trials of Active Cellular Immunotherapy with Sipuleucel-T in Advanced Prostate Cancer. *Cancer* **2009,** 115, 3670–3679.

Higano, C.S.; Vogelzang, N.J.; Sosman, J.A.; Feng, A.; Caron, D.; Small, E.J. Safety and Biological Activity of Repeated Doses of Recombinant Human Flt3 Ligand in Patients with Bone Scan-Negative Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Clinical cancer research,* **2004,** 10(4), 1219-1225.

Higano, C.S.; Vogelzang, N.J.; Sosman, J.A.; Feng, A.; Caron, D.; Small, E.J. Safety and Biological Activity of Repeated Doses of Recombinant Human Flt3 Ligand in

Patients with Bone Scan-Negative Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Clinical cancer research,* **2004,** 10(4), 1219-1225.

Higgins, J.P.T.; Savović, J.; Page, M.J.; Elbers, R.G.; Sterne, J.C.A. Assessing Risk of Bias in a Randomized Trial. In *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions version 6.2*; Higgins JPT, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ, W.V., Ed.; 2021.

Hildenbrand, B.; Sauer, B.; Kalis, O.; Stoll, C.; Freudenberg, M.A.; Niedermann, G.; Giesler, J.M.; Jüttner, E.; Peters, J.H.; Häring, B.; et al. Immunotherapy of Patients with Hormone-Refractory Prostate Carcinoma Pre-Treated with Interferon-Gamma and Vaccinated with Autologous PSA-Peptide Loaded Dendritic Cells - A Pilot Study. *Prostate* **2007,** 67, 500–508.

Hildenbrand, B.; Sauer, B.; Kalis, O.; Stoll, C.; Freudenberg, M.A.; Niedermann, G.; Giesler, J.M.; Jüttner, E.; Peters, J.H.; Häring, B.; et al. Immunotherapy of Patients with Hormone-Refractory Prostate Carcinoma Pre-Treated with Interferon-Gamma and Vaccinated with Autologous PSA-Peptide Loaded Dendritic Cells - A Pilot Study. *Prostate* **2007,** 67, 500–508.

Horn, L.; Spigel, D.R.; Vokes, E.E.; Holgado, E.; Ready, N.; Steins, M.; Poddubskaya, E.; Borghaei, H.; Felip, E.; Paz-Ares, L.; et al. Journal of clinical oncology Nivolumab Versus Docetaxel in Previously Treated Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Two-Year Outcomes From Two Randomized, Open-Label, Phase III Trials (CheckMate 017 and CheckMate 057). *J Clin Oncol* **2017,** 35, 3924–3933.

Hornero R. A.; Idoyaga J. Plasmacytoid Dendritic Cells: A Dendritic Cell in Disguise. *Mol Immunol* **2023,** 159, 38–45.

I. Jolanda M. de Vries; Eggert, A.A.O.; Scharenborg, N.M.; Vissers, J.L.M.; Lesterhuis, †w Joost; Boerman, C.; Punt, J.A.; Adema, G.J.; Figdor, C.G. Phenotypical and Functional Characterization of Clinical Grade Dendritic Cells. 2002.

Ismail, M.; Morgan, R.; Harrington, K.; Davies, J.; Pandha, H. Immunoregulatory Effects of Freeze Injured Whole Tumour Cells on Human Dendritic Cells Using an in Vitro Cryotherapy Model. *Cryobiology* **2010,** 61, 268–274.

Ivashkiv, L.B.; Donlin, L.T. Regulation of Type i Interferon Responses. *Nat Rev Immunol* **2014,** 14, 36–49.

Jaatinen, T.; Laine, J. Isolation of Mononuclear Cells from Human Cord Blood by Ficoll-Paque Density Gradient. *Current protocols in stem cell biology*, **2007,** 1(1), 2A-1.
Jonuleit, H., & Schmitt, E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *The Journal of Immunology,* **2003,** 171(12), 6323-6327.

Ju, H.; Xing, W.; Yang, J.; Zheng, Y.; Jia, X.; Zhang, B.; Ren, H. An Effective Cytokine Adjuvant Vaccine Induces Autologous T-Cell Response against Colon Cancer in an Animal Model. *BMC Immunol* **2016,** 17, 1-10.

Kongsted, P.; Borch, T.H.; Ellebaek, E.; Iversen, T.Z.; Andersen, R.; Met, Ö.; Hansen, M.; Lindberg, H.; Sengeløv, L.; Svane, I.M. Dendritic Cell Vaccination in Combination with Docetaxel for Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Randomized Phase II Study. *Cytotherapy* **2017,** 19, 500–513.

Kyrysyuk, O.; Wucherpfennig, K.W. Designing Cancer Immunotherapies That Engage T Cells and NK Cells. *Annu Rev Immunol* **2023,** 41, 17–38.

LeibundGut-Landmann, S.; Groß, O.; Robinson, M.J.; Osorio, F.; Slack, E.C.; Tsoni, S.V.; Schweighoffer, E.; Tybulewicz, V.; Brown, G.D.; Ruland, J.; et al. Syk- and CARD9-Dependent Coupling of Innate Immunity to the Induction of T Helper Cells That Produce Interleukin 17. *Nat Immunol* **2007,** 8, 630–638.

Loblaw, A.; Souter, L.H.; Canil, C.; Breau, R.H.; Haider, M.; Jamnicky, L.; Morash, R.; Surchin, M.; Matthew, A. Follow-up Care for Survivors of Prostate Cancer – Clinical Management: A Program in Evidence-Based Care Systematic Review and Clinical Practice Guideline. *Clin Oncol* **2017,** 29, 711–717.

Lu, C.; Huang, X.; Zhang, X.; Roensch, K.; Cao, Q.; Nakayama, K.I.; Blazar, B.R.; Zeng, Y.; Zhou, X. MiR-221 and MiR-155 Regulate Human Dendritic Cell Development, Apoptosis, and IL-12 Production through Targeting of P27 Kip1 , KPC1, and SOCS-1. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology,* **2011,** 117(16), 4293-4303.

Lubong-Sabado, R.; Bhardwaj, N. Directing Dendritic Cell Immunotherapy towards Successful Cancer Treatment. *Immunotherapy* **2010,** 2, 37–56.

Mahnke, K.; Qian, Y.; Knop, J.; Enk, A.H. Induction of CD4+/CD25+ Regulatory T Cells by Targeting of Antigens to Immature Dendritic Cells. *Blood* **2003,** 101, 4862–4869.
Martini, M.; Testi, M.G.; Pasetto, M.; Picchio, M.C.; Innamorati, G.; Mazzocco, M.; Ugel, S.; Cingarlini, S.; Bronte, V.; Zanovello, P.; et al. IFN-γ-Mediated Upmodulation of MHC Class I Expression Activates Tumor-Specific Immune Response in a Mouse Model of Prostate Cancer. *Vaccine* **2010,** 28, 3548–3557.

Melero, I.; Gaudernack, G.; Gerritsen, W.; Huber, C.; Parmiani, G.; Scholl, S.; Thatcher, N.; Wagstaff, J.; Zielinski, C.; Faulkner, I.; et al. Therapeutic Vaccines for Cancer: An Overview of Clinical Trials. *Nat Rev Clin Oncol* **2014,** 11, 509–524.

Melief, C.J.M.; Van Hall, T.; Arens, R.; Ossendorp, F.; Van Der Burg, S.H. Therapeutic Cancer Vaccines. *Journal of Clinical Investigation* **2015,** 125, 3401–3412.

Mellman, I.; Coukos, G.; Dranoff, G. Cancer Immunotherapy Comes of Age. *Nature* **2011,** 480, 480–489.

Mercader, M.; Bodner, B.K.; Moser, M.T.; Kwon, P.S.; Park, E.S.Y.; Manecke, R.G.; Ellis, T.M.; Wojcik, E.M.; Yang, D.; Flanigan, R.C.; et al. T Cell Infiltration of the Prostate Induced by Androgen Withdrawal in Patients with Prostate Cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001,** 98(25), 14565-14570.

Mu, L.J.; Kyte, J.A.; Kvalheim, G.; Aamdal, S.; Dueland, S.; Hauser, M.; Hammerstad, H.; Waehre, H.; Raabe, N.; Gaudernack, G. Immunotherapy with Allotumour MRNA-Transfected Dendritic Cells in Androgen-Resistant Prostate Cancer Patients. *Br J Cancer* **2005,** 93, 749–756.

Mughees, M.; Kaushal, J.B.; Sharma, G.; Wajid, S.; Batra, S.K.; Siddiqui, J.A. Chemokines and Cytokines: Axis and Allies in Prostate Cancer Pathogenesis. *Semin Cancer Biol* **2022,** 86, 497–512.

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-A020 l-Specific Peptides from Prostate-Specific Membrane Antigen. *The Prostate,* **1996,** 29(6), 371-380.

Murphy, G.P.; Snow, P.; Simmons, S.J.; Tjoa, B.A.; Rogers, M.K.; Brandt, J.; Healy, C.G.; Bolton, W.E.; Rodbold, D. Use of Artificial Neural Networks in Evaluating Prognostic Factors Determining the Response to Dendritic Cells Pulsed With PSMA Peptides in Prostate Cancer Patients. *The Prostate,* **2000,** 42(1), 67-72.

Murphy, G.P.; Tjoa, B.A.; Simmons, S.J.; Jarisch, J.; Bowes, V.A.; Ragde, H.; Rogers, M.; Elgamal, A.; Kenny, G.M.; Cobb, O.E.; et al. Rapid Communication Infusion of Dendritic Cells Pulsed With HLA-A2-Specific Prostate-Specific Membrane Antigen Peptides: A Phase II Prostate Cancer Vaccine Trial Involving Patients With Hormone-Refractory Metastatic Disease. *The Prostate,* **1999,** 38(1), 73-78.

Murphy, G.P.; Tjoa, B.A.; Simmons, S.J.; Ragde, H.; Rogers, M.; Elgamal, A.; Kenny, G.M.; Troychak, M.J.; Salgaller, M.L.; Boynton, A.L. Phase II Prostate Cancer Vaccine Trial: Report of a Study Involving 37 Patients With Disease Recurrence Following Primary Treatment. The prostate, 1999, 39(1), 54-59.

Murphy, G.P.; Tjoa, B.A.; Simmons, S.J.; Ragde, H.; Rogers, M.; Elgamal, A.; Kenny, G.M.; Troychak, M.J.; Salgaller, M.L.; Boynton, A.L. Phase II Prostate Cancer Vaccine Trial: Report of a Study Involving 37 Patients With Disease Recurrence Following Primary Treatment. *The prostate,* **1999,** 39(1), 54-59.

Murphy, G.P.; Tjoa, B.A.; Simmons, S.J.; Rogers, M.K.; Kenny, G.M.; Jarisch, J. Higher-Dose and Less Frequent Dendritic Cell Infusions With PSMA Peptides in Hormone-Refractory Metastatic Prostate Cancer Patients. *The Prostate*, **2000,** 43(1), 59-62.

Murphy, G.P.; Tjoa, B.A.; Simmons, S.J.; Rogers, M.K.; Kenny, G.M.; Jarisch, J. Higher-Dose and Less Frequent Dendritic Cell Infusions With PSMA Peptides in Hormone-Refractory Metastatic Prostate Cancer Patients. *The Prostate,* **2000,** 43(1), 59-62.

Orange, D.E.; Jegathesan, M.; Blachère, N.E.; Frank, M.O.; Scher, H.I.; Albert, M.L.; Darnell, R.B. Effective Antigen Cross-Presentation by Prostate Cancer Patients' Dendritic Cells: Implications for Prostate Cancer Immunotherapy. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **2004,** 7, 63–72.

Pacheco, H.F.M., Andrade, M.L.F.; Santana, B.P.; Rodrigues, J.G.; Gabiatti, B.; Fernandes, J.L.F.; Costa-Madeira, J.; et al. Dendritic cells as an immunotherapy tool as células dendríticas como ferramenta de imunoterapia. *Acta Biologica Brasiliensia* **2024,** 7(1), 6–19.

Page, M.J.; McKenzie, J.E.; Bossuyt, P.M.; Boutron, I.; Hoffmann, T.C.; Mulrow, C.D.; Shamseer, L.; Tetzlaff, J.M.; Akl, E.A.; Brennan, S.E.; et al. The PRISMA 2020 Statement: An Updated Guideline for Reporting Systematic Reviews. *The BMJ* **2021,** 372.

Palecki, J.; Bhasin, A.; Bernstein, A.; Mille, P.J.; Tester, W.J.; Kelly, W.K.; Zarrabi, K.K. T-Cell Redirecting Bispecific Antibodies: A Review of a Novel Class of Immuno-Oncology for Advanced Prostate Cancer. *Cancer Biol Ther* **2024,** 25, 2356820.

Pandha, H.S.; John, R.J.; Hutchinson, J.; James, N.; Whelan, M.; Corbishley, C.; Dalgleish, A.G. Dendritic Cell Immunotherapy for Urological Cancers Using Cryopreserved Allogeneic Tumour Lysate-Pulsed Cells: A Phase I/II Study. *BJU Int* **2004,** 94, 412–418.

Pandha, H.S.; John, R.J.; Hutchinson, J.; James, N.; Whelan, M.; Corbishley, C.; Dalgleish, A.G. Dendritic Cell Immunotherapy for Urological Cancers Using Cryopreserved Allogeneic Tumour Lysate-Pulsed Cells: A Phase I/II Study. *BJU Int* **2004,** 94, 412–418.

Pencik, J.; Schlederer, M.; Gruber, W.; Unger, C.; Walker, S.M.; Chalaris, A.; Marié, I.J.; Hassler, M.R.; Javaheri, T.; Aksoy, O.; et al. STAT3 Regulated ARF Expression Suppresses Prostate Cancer Metastasis. *Nat Commun* **2015,** 6, 7736.
Pinsky, P.F.; Prorok, P.C.; Kramer, B.S. Prostate Cancer Screening-A Perspective on the Current State of the Evidence. *New England Journal of Medicine,* **2017,** 376(13), 1285-1289.

Podrazil, M.; Horvath, R.; Becht, E.; Rozkova, D.; Bilkova, P.; Sochorova, K.; Hromadkova, H.; Kayserova, J.; Vavrova, K.; Lastovicka, J.; et al. Phase I/II Clinical Trial of Dendritic-Cell Based Immunotherapy (DCVAC/PCa) Combined with Chemotherapy in Patients with Metastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. *Oncotarget,* **2015,** 6(20), 18192.

Powles, T.; Csőszi, T.; Özgüroğlu, M.; Matsubara, N.; Géczi, L.; Cheng, S.Y.S.; Fradet, Y.; Oudard, S.; Vulsteke, C.; Morales Barrera, R.; et al. Pembrolizumab Alone or Combined with Chemotherapy versus Chemotherapy as First-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma (KEYNOTE-361): A Randomised, Open-Label, Phase 3 Trial. *Lancet Oncol* **2021,** 22, 931–945.

Prue, R.L.; Vari, F.; Radford, K.J.; Tong, H.; Hardy, M.Y.; Rozario, R.D.'; Waterhouse, N.J.; Rossetti, T.; Coleman, R.; Tracey, C.; et al. A Phase I Clinical Trial of CD1c (BDCA-1) + Dendritic Cells Pulsed With HLA-A*0201 Peptides for Immunotherapy of Metastatic Hormone Refractory Prostate Cancer. *Journal of Immunotherapy,* **2015,** 38(2), 71-76.

Prue, R.L.; Vari, F.; Radford, K.J.; Tong, H.; Hardy, M.Y.; Rozario, R.D.'; Waterhouse, N.J.; Rossetti, T.; Coleman, R.; Tracey, C.; et al. A Phase I Clinical Trial of CD1c (BDCA-1) + Dendritic Cells Pulsed With HLA-A*0201 Peptides for Immunotherapy of Metastatic Hormone Refractory Prostate Cancer. *Journal of Immunotherapy,* **2015,** 38, 2, 71-76.

Pulendran, B.; Smith, J.L.; Caspary, G.; Brasel, K.; Pettit, D.; Maraskovsky, E.; Maliszewski, C.R. Distinct Dendritic Cell Subsets Differentially Regulate the Class of Immune Response in Vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* **1999,** 96(3), 1036-1041.

Rashid, M. ur; Coombs, K.M. Serum-Reduced Media Impacts on Cell Viability and Protein Expression in Human Lung Epithelial Cells. *J Cell Physiol* **2019,** 234, 7718-7724.

Rawla, P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol* **2019,** 10, 63–89, doi:10.14740/wjon1191.

Reyes, D.; Salazar, L.; Espinoza, E.; Pereda, C.; Castellón, E.; Valdevenito, R.; Huidobro, C.; Inés Becker, M.; Lladser, A.; López, M.N.; et al. Tumour Cell Lysate-Loaded Dendritic Cell Vaccine Induces Biochemical and Memory Immune Response in Castration-Resistant Prostate Cancer Patients. *Br J Cancer* **2013,** 109, 1488–1497.
Salgaller, M.L.; Lodge, P.A.; Mclean, J.G.; Tjoa, B.A.; Loftus, D.J.; Ragde, H.; Kenny, G.M.; Rogers, M.; Boynton, A.L.; Murphy, G.P. Report of Immune Monitoring of Prostate Cancer Patients Undergoing T-Cell Therapy Using Dendritic Cells Pulsed With HLA-A2-Specific Peptides From Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA). *The Prostate,* **1998,** 35(2), 144-151.

Salgaller, M.L.; Tjoa, B.A.; Lodge, P.A.; Ragde, H.; Kenny, G.; Boynton, A.; Murphy, G.P. Dendritic Cell-Based Immunotherapy of Prostate Cancer. In *Proceedings of the Critical Reviews in Immunology*; 1997; Vol. 18, pp. 109–119.
Santos P.M, B.L.H. Dendritic Cell-Based Cancer Vaccines. *Folia Biol (Praha)* **2018,** 45, 71–74.

Schadendorf, D.; Ugurel, S.; Schuler-Thurner, B.; Nestles, F.O.; Enk, A.; Bröcker, E.B.; Grabbe, S.; Rittgen, W.; Sucker, A.; Zimpfer-Rechner, C.; et al. Dacarbazine (DTIC) versus Vaccination with Autologous Peptide-Pulsed Dendritic Cells (DC) in First-Line Treatment of Patients with Metastatic Melanoma: A Randomized Phase III Trial of the DC Study Group of the DeCOG. *Annals of Oncology* **2006,** 17, 563–570.

Schwaab, T.; Tretter, C.P.G.; Gibson, J.J.; Cole, B.F.; Schned, A.R.; Harris, R.; Fisher, J.L.; Crosby, N.; Stempkowski, L.M.; Heaney, J.A.; et al. Tumor-Related Immunity in Prostate Cancer Patients Treated with Human Recombinant Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor (GM-CSF). *Prostate* **2006,** 66, 667–674.

Schwaab, T.; Tretter, C.P.G.; Gibson, J.J.; Cole, B.F.; Schned, A.R.; Harris, R.; Fisher, J.L.; Crosby, N.; Stempkowski, L.M.; Heaney, J.A.; et al. Tumor-Related Immunity in Prostate Cancer Patients Treated with Human Recombinant Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor (GM-CSF). *Prostate* **2006,** 66, 667–674.

Seder, R.A.; Boulay, J.; Finkelman, F.; Barbier, S.; Gros, G. LE; Paul, W.E. Cd8+ t cells can be primed in vitro to produce IL-4. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950),* **1992,** 148(6), 1652-1656.

Sekhoacha, M.; Riet, K.; Motloung, P.; Gumenku, L.; Adegoke, A.; Mashele, S. Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. *Molecule**s*** **2022**, 27, 5030.
Sfanos, K.S.; Bruno, T.C.; Maris, C.H.; Xu, L.; Thoburn, C.J.; Demarzo, A.M.; Meeker, A.K.; Isaacs, W.B.; Drake, C.G. Phenotypic Analysis of Prostate-Infiltrating Lymphocytes Reveals T H17 and Treg Skewing. *Clinical Cancer Research* **2008,** 14, 3254–3261.

Shimizu, K.; Fields, R.C.; Giedlin, M.; Mulé, J.J. Systemic Administration of Interleukin 2 Enhances the Therapeutic Efficacy of Dendritic Cell-Based Tumor Vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* **1999,** 96(5), 2268-2273.

Simmons, S.J.; Tjoa, B.A.; Rogers, M.; Elgamal, A.; Kenny, G.M.; Ragde, H.; Troychak, M.J.; Boynton, A.L.; Murphy, G.P. GM-CSF as a Systemic Adjuvant in a Phase II Prostate Cancer Vaccine Trial. *The Prostate,* **1999,** 39(4), 291-297.

Small, E.; Fratesi, P.; Reese, D.M.; Strang, G.; Lous, R.; Peshwa, M.V.; Valone, F.H. Immunotherapy of Hormone-Refractory Prostate Cancer With Antigen-Loaded Dendritic Cells. *Journal of Clinical Oncology*, **2000,** 18, 3894–3903.

Sonpavde, G.; McMannis, J.D.; Bai, Y.; Seethammagari, M.R.; Bull, J.M.C.; Hawkins, V.; Dancsak, T.K.; Lapteva, N.; Levitt, J.M.; Moseley, A.; et al. Phase I Trial of Antigen-Targeted Autologous Dendritic Cell-Based Vaccine with in Vivo Activation of Inducible CD40 for Advanced Prostate Cancer. Cancer Immunology. *Immunotherapy* **2017,** 66, 1345–1357.

Stambolic V.; Auzuki A.; De La Pompa J. L.; Brothers G. M.; Mirtsos J.; Sasaki T.; Ruland J.; Penninger J. M.; Siderovski David P; Mak T. W. Negative Regulation of PKB/Akt-Dependent Cell Survival by the Tumor Suppressor PTEN. *Cell*, **1998,** 95(1), 29-39.

Steinbach, C.; Merchant, A.; Zaharie, A.T.; Horak, P.; Marhold, M.; Krainer, M. Current Developments in Cellular Therapy for Castration Resistant Prostate Cancer: A Systematic Review of Clinical Studies. *Cancers (Basel)* **2022,** 14(22), 5719.

Su, Z.; Dannull, J.; Yang, B.K.; Dahm, P.; Coleman, D.; Yancey, D.; Sichi, S.; Niedzwiecki, D.; Boczkowski, D.; Gilboa, E.; et al. Telomerase MRNA-Transfected Dendritic Cells Stimulate Antigen-Specific CD8+ and CD4+ T Cell Responses in Patients with Metastatic Prostate Cancer. *The Journal of Immunology* **2005,** 174, 3798–3807.

Su, Z.; Dannull, J.; Yang, B.K.; Dahm, P.; Coleman, D.; Yancey, D.; Sichi, S.; Niedzwiecki, D.; Boczkowski, D.; Gilboa, E.; et al. Telomerase MRNA-Transfected Dendritic Cells Stimulate Antigen-Specific CD8 and CD4 T Cell Responses in Patients with Metastatic Prostate Cancer. *The Journal of Immunology*, **2005,** 174(6), 3798-3807.

Sutherland, S.I.M.; Ju, X.; Horvath, L.G.; Clark, G.J. Moving on From Sipuleucel-T: New Dendritic Cell Vaccine Strategies for Prostate Cancer. *Front Immunol* **2021,** 12, 641307.

Tang, S.; Moore, M.L.; Grayson, J.M.; Dubey, P. Increased CD8 + T-Cell Function Following Castration and Immunization Is Countered by Parallel Expansion of Regulatory T Cells. *Cancer Res* **2012,** 72, 1975–1985.

Theofilopoulos, A.N.; Baccala, R.; Beutler, B.; Kono, D.H. Type I Interferons (α/β) in Immunity and Autoimmunity. *Annu Rev Immunol* **2005,** 23, 307–336.

Thomas-Kaskel, A.K.; Zeiser, R.; Jochim, R.; Robbel, C.; Schultze-Seemann, W.; Waller, C.F.; Veelken, H. Vaccination of Advanced Prostate Cancer Patients with PSCA and PSA Peptide-Loaded Dendritic Cells Induces DTH Responses That Correlate with Superior Overall Survival. *Int J Cancer* **2006,** 119, 2428–2434.

Thomsen, L.C.V.; Honoré, A.; Reisæter, L.A.R.; Almås, B.; Børretzen, A.; Helle, S.I.; Førde, K.; Kristoffersen, E.K.; Kaada, S.H.; Melve, G.K.; et al. A Phase I Prospective, Non-Randomized Trial of Autologous Dendritic Cell-Based Cryoimmunotherapy in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. Cancer Immunology. *Immunotherapy* **2023,** 72, 2357–2373.

Tjoa, B.; Erickson, S.; Barren, R.; Ragde, H.; Kenny, G.; Boynton, A.; Murphy, G. In Vitro Propagated Dendritic Cells From Prostate Cancer Patients as a Component of Prostate Cancer Lmmunotherapy. *The Prostate,* **1995,** 27(2), 63-69.

Tjoa, B.A.; Lodge, P.A.; Michael, L.S.; Boynton, A.L.; Murphy, G.P. Dendritic Cell-Based Immunotherapy for Prostate Cancer. *Critical Reviews™ in Immunology*, **1999,** 49, 117–128.

Tjoa, B.A.; Lodge, P.A.; Salgaller, M.L.; Boynton, A.; Gerald P.; Murphy, G.P. Dendritic Cell-Based Immunotherapy of Prostate Cancer. In *Proceedings of the Critical Reviews in Immunology*; 1997; Vol. 18, pp. 109–119.

Tjoa, B.A.; Simmons, S.J.; Bowes, V.A.; Ragde, H.; Rogers, M.; Elgamal, A.; Kenny, G.M.; Cobb, O.E.; Ireton, R.C.; Troychak, M.J.; et al. Rapid Communication Evaluation of Phase I/II Clinical Trials in Prostate Cancer With Dendritic Cells and PSMA Peptides. *The Prostate,* **1998,** 36(1), 39-44.

Tjoa, B.A.; Simmons, S.J.; Elgamal, A.; Rogers, M.; Ragde, H.; Kenny, G.M.; Troychak, M.J.; Boynton, A.L.; Murphy, G.P. Follow-Up Evaluation of a Phase II Prostate Cancer Vaccine Trial. *The Prostate,* **1999,** 40(2), 125-129.

Topalian, S.L.; Taube, J.M.; Anders, R.A.; Pardoll, D.M. Mechanism-Driven Biomarkers to Guide Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *Nat Rev Cancer* **2016,** 16, 275–287.

Tran, T.; Blanc, C.; Granier, C.; Saldmann, A.; Tanchot, C.; Tartour, E. Therapeutic Cancer Vaccine: Building the Future from Lessons of the Past. *Semin Immunopathol* **2019,** 41, 69–85.

Triozzi, P.L.; Achberger, S.; Aldrich, W.; Elson, P.; Garcia, J.; Dreicer, R. Differential Immunologic and MicroRNA Effects of 2 Dosing Regimens of Recombinant Human Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor. *Journal of Immunotherapy,* **2012,** 35(7), 587-594.

Triozzi, P.L.; Achberger, S.; Aldrich, W.; Elson, P.; Garcia, J.; Dreicer, R. Differential Immunologic and MicroRNA Effects of 2 Dosing Regimens of Recombinant Human Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor. *Journal of Immunotherapy*, **2012,** 35(7), 587-594.

Van Der Burg, S.H.; Arens, R.; Ossendorp, F.; Van Hall, T.; Melief, C.J.M. Vaccines for Established Cancer: Overcoming the Challenges Posed by Immune Evasion. *Nat Rev Cancer* **2016,** 16, 219–233.

Veglia, F.; Gabrilovich, D.I. Dendritic Cells in Cancer: The Role Revisited. *Curr Opin Immunol* **2017,** 45, 43–51.

Vicari, A.P.; Chiodoni, C.; Vaure, C.; Aït-Yahia, S.; Dercamp, C.; Matsos, F.; Reynard, O.; Taverne, C.; Merle, P.; Colombo, M.P.; et al. Reversal of Tumor-Induced Dendritic Cell Paralysis by CpG Immunostimulatory Oligonucleotide and Anti-Interleukin 10 Receptor Antibody. *Journal of Experimental Medicine* **2002,** 196, 541–549.

Vitkin, N.; Nersesian, S.; Siemens, D.R.; Koti, M. The Tumor Immune Contexture of Prostate Cancer. *Front Immunol* **2019,** 10, 603.

Waeckerle-Men, Y.; Uetz-Von Allmen, E.; Fopp, M.; Von Moos, R.; Böhme, C.; Schmid, H.P.; Ackermann, D.; Cerny, T.; Ludewig, B.; Groettrup, M.; et al. Dendritic Cell-Based Multi-Epitope Immunotherapy of Hormone-Refractory Prostate Carcinoma. Cancer Immunology, *Immunotherapy* **2006,** 55, 1524–1533, doi:10.1007/s00262-006-0157-3.
Waeckerle-Men, Y.; Uetz-Von Allmen, E.; Fopp, M.; Von Moos, R.; Böhme, C.; Schmid, H.P.; Ackermann, D.; Cerny, T.; Ludewig, B.; Groettrup, M.; et al. Dendritic Cell-Based Multi-Epitope Immunotherapy of Hormone-Refractory Prostate Carcinoma. Cancer Immunology, *Immunotherapy* **2006,** 55, 1524–1533.

Waeckerle-Men, Y.; Uetz-Von Allmen, E.; Von Moos, R.; Classon, B.J.; Scandella, E.; Schmid, H.P.; Ludewig, B.; Groettrup, M.; Gillessen, S. Dendritic Cells Generated from Patients with Androgen-Independent Prostate Cancer Are Not Impaired in Migration and T-Cell Stimulation. *Prostate* **2005,** 64, 323–331, doi:10.1002/pros.20231.

Wang, I.; Song, L.; Wang, B.Y.; Kalebasty, A.R.; Uchio, E.; Zi, X. Prostate Cancer Immunotherapy: A Review of Recent Advancements with Novel Treatment Methods and Efficacy. *American journal of clinical and experimental urology* **2022,** 10(4), 210.
Watson, P.A.; Arora, V.K.; Sawyers, C.L. Emerging Mechanisms of Resistance to Androgen Receptor Inhibitors in Prostate Cancer. *Nat Rev Cancer* **2015,** 15, 701–711.

Westdorp, H.; Creemers, J.H.A.; Van Oort, I.M.; Schreibelt, G.; Gorris, M.A.J.; Mehra, N.; Simons, M.; De Goede, A.L.; Van Rossum, M.M.; Croockewit, A.J.; et al. Blood-Derived Dendritic Cell Vaccinations Induce Immune Responses That Correlate with Clinical Outcome in Patients with Chemo-Naive Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Immunother Cancer* **2019,** 7, 1-15.

Wilkinson, R.; Kassianos, A.J.; Swindle, P.; Hart, D.N.J.; Radford, K.J. Numerical and Functional Assessment of Blood Dendritic Cells in Prostate Cancer Patients. *Prostate* **2006,** 66, 180–192, doi:10.1002/pros.20333.

World Health Organization Global Health Estimates 2022.

Xi, H.-B.; Wang, G.-X.; Fu, B.; Liu, W.-P.; Li, Y. Survivin and PSMA Loaded Dendritic Cell Vaccine for the Treatment of Prostate Cancer. *Biological and Pharmaceutical Bulletin,* **2015,** 38(6), 827-835.

Xi, H.-B.; Wang, G.-X.; Fu, B.; Liu, W.-P.; Li, Y. Survivin and PSMA Loaded Dendritic Cell Vaccine for the Treatment of Prostate Cancer. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **2015,** 38(6), 827-835.

Xu, Y.; Xiang, Z.; Alnaggar, M.; Kouakanou, L.; Li, J.; He, J.; Yang, J.; Hu, Y.; Chen, Y.; Lin, L.; et al. Allogeneic Vγ9Vδ2 T-Cell Immunotherapy Exhibits Promising Clinical Safety and Prolongs the Survival of Patients with Late-Stage Lung or Liver Cancer. *Cell Mol Immunol* **2021,** 18, 427–439.

Zeng, D.; Wu, J.; Luo, H.; Li, Y.; Xiao, J.; Peng, J.; Ye, Z.; Zhou, R.; Yu, Y.; Wang, G.; et al. Tumor Microenvironment Evaluation Promotes Precise Checkpoint Immunotherapy of Advanced Gastric Cancer. *J Immunother Cancer* **2021,** 9, 8, e002467.

CAPÍTULO II

Ação da imunoterapia com células dendríticas sobre células tumorais PC3 *in vitro*

12 INTRODUÇÃO

O câncer de próstata é o segundo tipo de câncer que mais acomete homens no mundo, podendo evoluir de doença localizada para doença metastática. As terapias convencionais podem responder de forma eficaz, sobretudo, em casos de carcinoma localizado, tendo como padrão ouro, a terapia de provação androgênica. Entretanto, observa-se limitações na eficácia das intervenções no cenário de carcinomas avançados (Almeeri et al., 2024). As imunoterapias surgem como ferramenta da intervenção complementar ou monoterapia no contexto do câncer de próstata, visto que apresentam poucos efeitos adversos e possuem características imunomoduladoras.

A imunoterapia com células dendríticas (DCs) autólogas tem sido foco dos ensaios clínicos. PBMCs extraídos e diferenciados *exvivo* e DCs pulsadas ou não com peptídeos tumorais são reintroduzidas em pacientes para que estimulem de forma eficiente respostas específicas de células T e erradicarem ou regredirem os tumores. A imunoterapia com DCs tem sido testada e concluído sua segurança e a expansão necessária de CD4+ e CD8+ (Palucka; Banchereau, 2012; Kang et al., 2022).

A partir das DCs utilizadas como imunoterapia, sendo apresentadoras de antígenos a células T, é possível identificar as interações no microambiente tumoral, seja pela produção de citocinas e quimiocinas ou estímulo de respostas citotóxicas através dos linfócitos (Palucka; Banchereau, 2012). Desse modo, técnicas experimentais com o intuito de compreender o comportamento celular no ambiente tumorigênico são cruciais para se observar fenótipos que podem contribuir ou escapar da vigilância imunológica.

As citocinas são essenciais para a regulação do sistema imune e adaptativo, permitindo a comunicação parácrina e autócrina com funções importantes proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. As características pleitotrópicas das citocinas estão relacionadas a determinadas células que expressam essas citocinas e os receptores de citocinas com atividades que podem ser diferentes, dependendo da célula e do ambiente. Determinadas citocinas estão associadas a imunidade antitumoral, entretanto, outras podem promover a oncogênese, podem afetar células presentes no microambiente e resultados em tratamentos oncológicos (Conlon et al., 2019; Kureshi; Dougan, 2024).

A viabilidade e migração celular determinam o metabolismo, capacidade de

sobrevivência e atividade celular. No contexto da oncologia, é possível identificar a atividade da célula tumoral frente a vigilância imunológica e compreender, mesmo que parcialmente, o comportamento celular diante das interações do microambiente. Através desses mecanismos experimentais, pretende-se identificar tendencias de sobrevivência celular e escapes de imunovigilância que contribuem para invasão celular (Trepat et al., 2015). Nesse sentido, objetivou-se avaliar a interação das células o papel de DCs e linfócitos na viabilidade e migração de células PC3 *in vitro.*

13 MATERIAL E MÉTODOS

13.1 CULTURA CELULAR

A linhagem celular de câncer de próstata humano PC3 foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA) e cultivada em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), contendo 10% de soro bovino fetal (FBS), 1% de penicilina/estreptomicina, e 100 mg/dL de glicose (D5546, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em uma incubadora umidificada a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2. Antes e durante os procedimentos experimentais, as células são verificadas para garantir que estivessem livres de contaminação.

13.2 OBTENÇÃO DE LINFÓCITOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS

Todos os procedimentos de obtenção de DCs e linfócitos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM (parecer 683). Brevemente, as células mononucleares do sangue periférico de doadores saudáveis foram obtidas por separação e densidade em gradiente de ficoll e após a contagem são mantidas em condições ideais de cultura (37°C e 5% de CO_2) em meio IMDM completo. Após 24h de cultivo, as células não aderentes (linfócitos) foram separadas e as células aderentes foram submetidas à diferenciação. O processo de diferenciação de DCs foi realizado com GM-CSF e IL-4 (5ng/ml) durante 5 dias e maturadas com TNF-α (5ng/ml) adicionado ao antígeno prostático (obtido do lisado das células das linhagens tumorais) durante 2 dias.

13.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O co-cultivo das células PC3 com DCs e/ou linfócitos foi realizado de acordo com a Tabela 6.

Tabela 6 - Grupos experimentais e células cultivadas.

Grupos	Células PC3	DCs	Linfócitos
Grupo PC3	+	-	-
Grupo PC3DC	+	+	-
Grupo PC3DCLinf	+	+	+
Grupo PC3Linf	+	-	+
Grupo DCLinf	-	+	+
Grupo DC	-	+	-
Grupo Linf	-	-	+

Nota: (+) indica a presença (-) ou ausência da linhagem no meio de cultura específico. PC3: células cancerosas da linhagem PC3, DC: células dendríticas, Lin: linfócitos.
Fonte: Autores, 2024.

13.4 ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR

A citotoxicidade dos materiais foi medida utilizando resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido) (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA), que detecta a atividade metabólica celular. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicada de cada grupo experimental em placa de 24 poços com meio RPMI suplementado com 10% de SFB, mantidas em estufa a 37ºC com 5% de CO2 pelo tempo experimental estabelecido para co cultura, 24h e 48h. Após o tempo de incubação, foi adicionado em cada poço 50µL da solução de resazurina (2,5 mg/ml) foi adicionado. Após 2h de incubação a 37 °C, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 550 nm e 590 nm fluorescência EnSpire® (Perkin Elmer, Alemanha). O controle positivo foi feito a partir de células PC3, tendo-se controles para a leitura de fluorescência de poços contendo meio RPMI, sem células.

13.5 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

As células PC3 foram semeadas em placas de seis poços e incubadas a 37°C até que atingiram 100% de confluência para formar uma monocamada. Após a confluência, a monocamada foi raspada em linha reta para criar um “risco” com uma

ponteira de pipeta. Após esse procedimento, os detritos foram removidos lavando as células uma vez com 1 mL de PBS e, em seguida, adicionadas DCs, linfócitos ou DCs e linfócitos ao meio. Os campos microscópicos foram capturados com um microscópio de fluorescência invertido (TS100, Nikon) no tempo 0, 24 e 48 h (o meio foi atualizado após 24 h) após riscar e tratar as placas. O status da migração foi determinado usando-se o software TScratch. Para cada imagem, a distância entre um lado e outro do arranhão foi medida por meio de área e, então, comparando as imagens do tempo 0 até o último ponto de tempo, quando obtido o fechamento do “risco” na placa. Cinco imagens foram capturadas por poço, sendo avaliadas o total de 15 imagens por experimento (poço). A migração celular deve ser interpretada pela diferença na área de risco ao longo do tempo.

13.6 ANÁLISE DE CITOCINAS

As citocinas foram dosadas através do teste Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) com anticorpos monoclonais fabricados pela BD OptEIATM (BD Biosciences) conforme protocolo fornecido pelo fabricante.

Placas de 384 poços foram sensibilizadas com 25µL de anticorpos monoclonais específicos para a captura das citocinas estudadas, diluídos em solução tampão. Às fileiras 1 e 2 de cada placa foram adicionados 25µL da citocina padrão recombinante seguindo diluições seriadas 1:2 em “assay diluent” a partir das concentrações iniciais diluídas. Às outras fileiras foram adicionados 25µL/poço do sobrenadante obtido da cultura de células esplênicas contendo a citocina a ser dosada. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 2 horas e lavadas por seis vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) acrescido de Tween 20%. A seguir, foram adicionados 25µL/poço do anticorpo anti-citocina a ser dosada, marcado com biotina diluído 1:250 em “assay diluent”. As placas foram reincubadas por 1 hora à temperatura ambiente e novamente lavadas por 6 vezes em PBS acrescido de Tween 20%.

Após esta etapa, foram adicionados 25µL/poço de avidina marcado com fosfatase alcalina, diluído 1:250 em “assay diluent”. As placas foram incubadas por 1 hora e lavadas por 6 vezes com PBS acrescido de Tween 20%, quando então foram adicionados 25µL/poço de substrato TMB Substrate Reagent Set (BD OptEIATM) e após 30 minutos foram adicionados 12,5µL/poço de ácido fosfórico 1M.

A análise da absorbância foi realizada no espectrofotômetro Spectramax 384 Plus, nas absorbâncias de 450 e 570nm. A concentração de cada citocina do sobrenadante de células dendríticas dos referidos grupos foi dosada em pg/ml através da comparação com as absorbâncias obtidas da curva padrão da respectiva citocina, sendo realizada simultaneamente.

13.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram submetidos a uma análise de normalidade através do teste Shapiro-Wilk e, em seguida, submetidos a uma análise de variância ANOVA fatorial. As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism® (v.8.0). os resultados foram expressão com média ± desvio padrão.

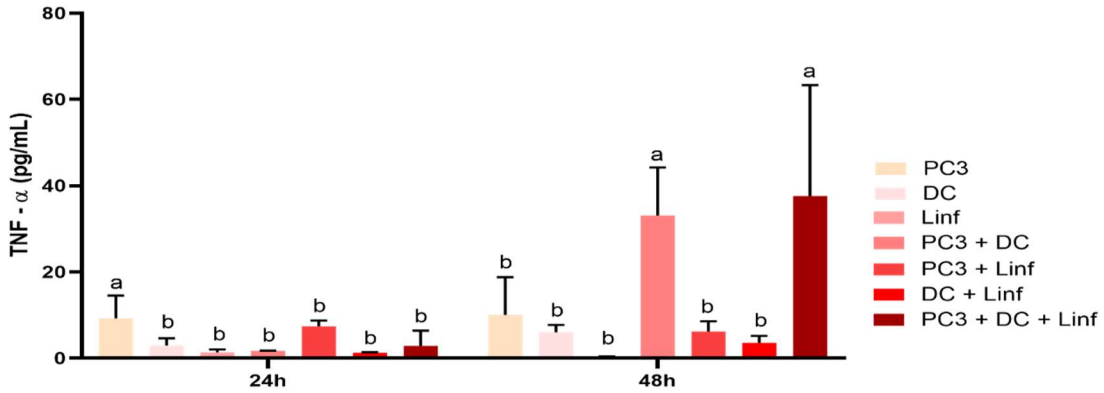
14 RESULTADOS

14.1 CITOCINAS

- *TNF-α:*

Após 24h de co-cultura a produção de TNF-α não apresentou diferença significativa entre os grupos testados (Figura 1). Já com 48h de co-cultura observou-se que a produção de TNF-α foi maior nos grupos DC + PC3 e DC+ PC3 + linfócitos, com relação aos demais grupos experimentais (Figura 6).

Figura 6 - Valores de TNF-α



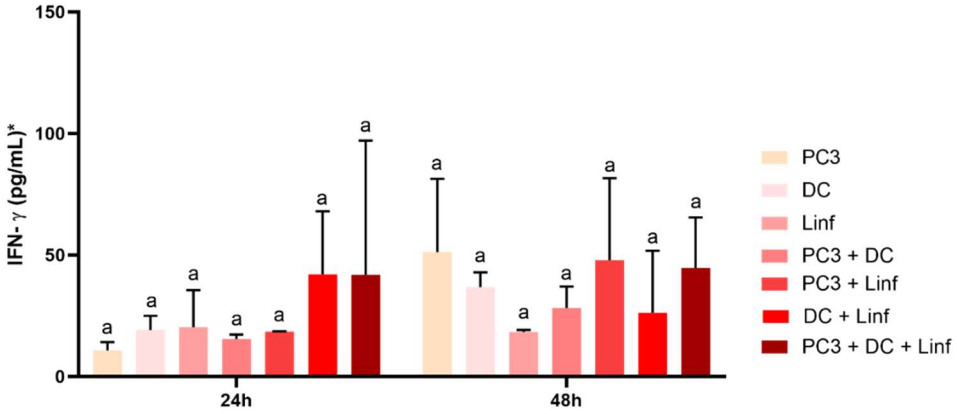
Nota: (Factor de necrose tumoral alfa) após 24 e 48 horas de co-cultura. Letras diferentes significam diferença estatística (p<0,05) entre os grupos pelo teste Twoway ANOVA.
Fonte: Autores, 2024.

- *INF-γ:*

24h - a produção de IFN-γ não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figuras 7).

48h - A produção de IFN-γ não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais (Figura 7).

Figura 7 - Valores de INF- γ



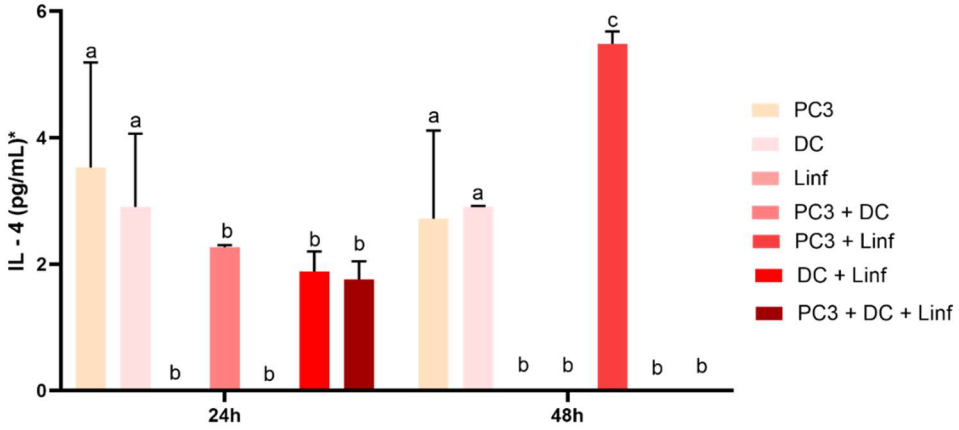
Nota: (Interferon gama), após 24 e 48 horas de co-cultura. Letras diferentes mostram diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos pelo teste Twoway ANOVA.

- *IL-4:*

24h - A produção de IL-4 foi reduzida em todos os grupos experimentais quando comparadas aos grupos PC3 e DC (Figura 8).

48h - A produção de IL-4 foi reduzida nos grupos Linf, DC + PC3, Linf + DC, PC3 + Linf + DC em relação aos grupos DC e PC3 e aumentou apenas no grupo PC3 e Linf em relação a todos os demais grupos (Figura 8).

Figura 8 - Valores de IL-14



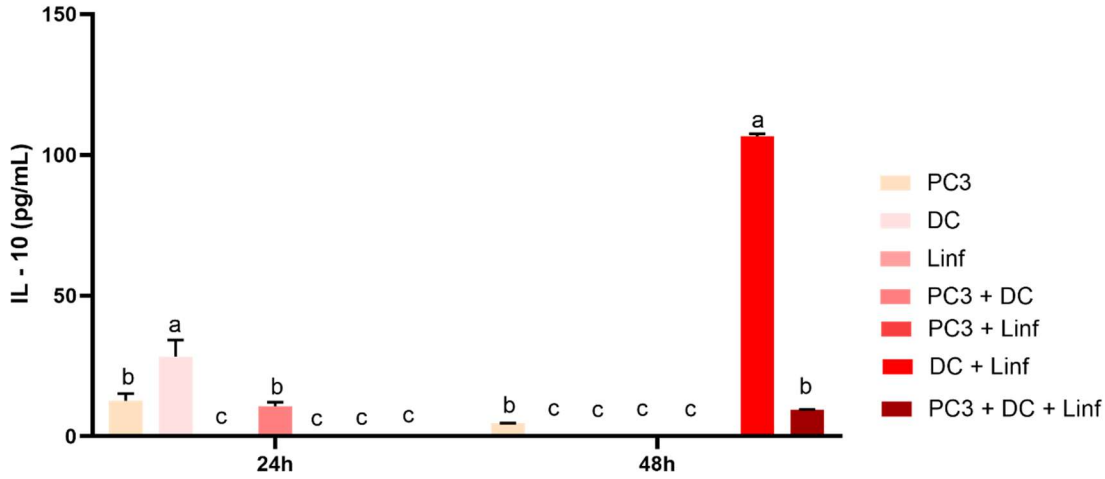
Nota: (Interleucina 4) após 24 e 48 horas de co-cultura. Letras diferentes mostram diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos pelo teste Two-way ANOVA.
Fonte: Autores, 2024.

- *IL-10:*

24h - A produção de IL-10 foi reduzida em todos os grupos experimentais quando comparadas ao grupo DC, porém os grupos que tinham apenas células PC3 e PC3 + DC não difeririam entre si. Os grupos Linf, Linf + PC3, DC + Linf e PC3 + DC + Linf foram iguais entre si. Neste caso, além de diferirem do grupo PC3 eles também foram menores que os grupos PC3 e PC3 + DC (Figura 9).

48h - A produção de IL-10 foi maior no grupo DC + Linf em relação a todos os demais grupos, porém os grupos DC + PC3 e PC3 + DC + Linf embora menor que o grupo DC + Linf foi maior que os demais grupos (Figura 9).

Figura 9 - Valores de IL-10



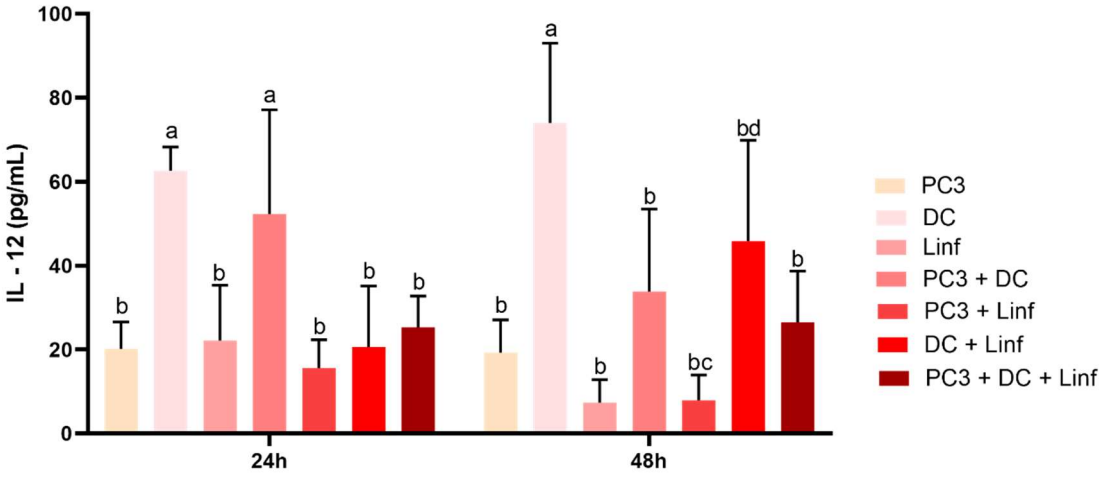
Nota: (Interleucina 10) após 24 e 48 horas de co-cultura. Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos pelo teste Twoway ANOVA.
Fonte: Autores, 2024.

- *IL-12:*

24h - A produção de IL-12 reduziu-se em todos os grupos experimentais quando comparadas ao grupo DC, exceto no grupo DC + PC3 (Figura 10).

48h - A produção de IL-12 reduziu-se em todos os grupos em relação ao grupo DC. No entanto, a produção do grupo DC + Linf foi maior que o grupo PC3 + Linf (Figura 10).

Figura 10 - Valores de IL-12



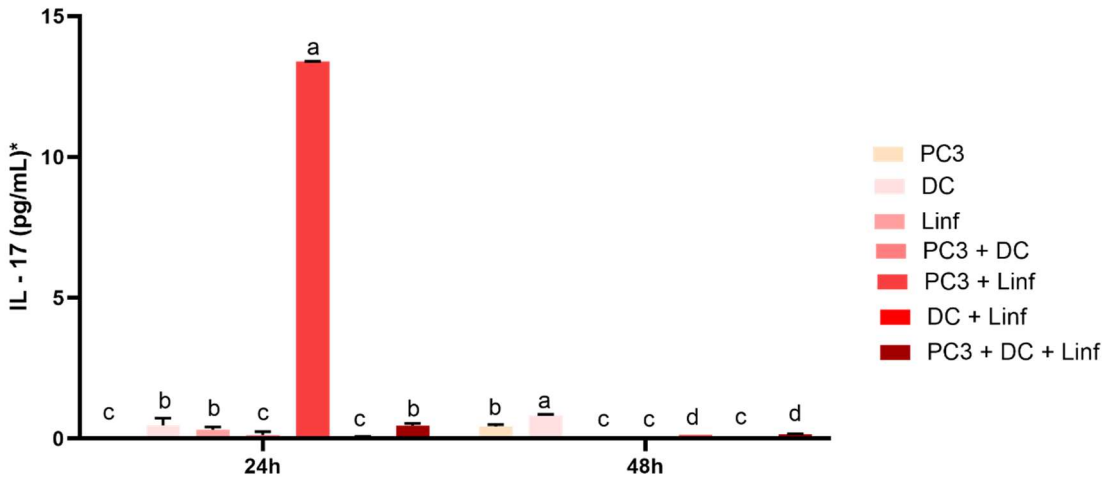
Nota: (Interleucina 12) após 24 e 48 horas de co-cultura. Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos pelo teste Twoway ANOVA.
Fonte: Autores, 2024.

- *IL-17:*

24h - A produção de IL-17 reduziu-se nos grupos PC3, PC3+ Linf e DC + Linf em relação aos grupos DC, Linf e PC3 + DC + Linf não diferiram do grupo DC. A produção do grupo PC3 + Linf aumentou em relação aos demais grupos (Figura 11).

48h - A produção de IL-17 reduziu-se em todos os grupos em relação ao grupo que contém apenas células dendríticas, embora reduzidos os grupos DC + PC3, Linf, Linf + PC3, DC + Linf e PC3 + DC + Linf apresentaram produção menor que o grupo PC3. Por fim, os grupos PC3 + DC + Linf e Linf + PC3 apresentaram produção pouco maior que os grupos DC + PC3, Linf, DC + Linf (Figura 11).

Figura 11 - Valores de IL-17

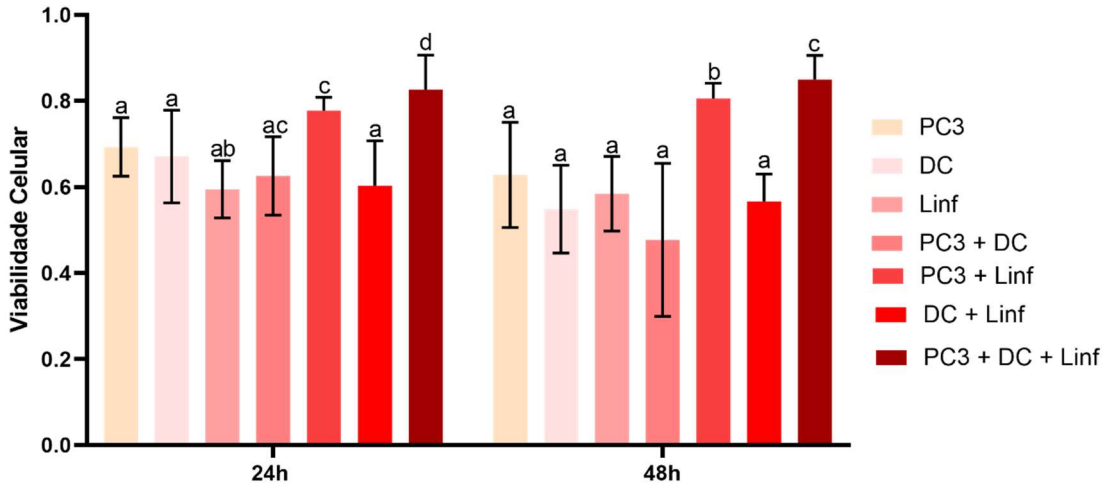


Nota: (Interleucina 17) após 24 e 48 horas de co-cultura. Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos pelo teste Twoway ANOVA.
Fonte: Autores, 2024.

14.2 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular no tempo de 24h dos grupos DC e DC+ Linf não tiveram diferenças estatísticas em relação a PC3. O grupo PC3+ DC é semelhante aos grupos PC3; DC; PC3+ Linf. O grupo PC3 + DC + Linf houve diferença estatística com uma maior viabilidade celular, sendo a maior viabilidade celular em relação aos demais grupos. No tempo de 48h, os grupos DC; Linf; PC3 + Linf e DC+Linf não apresentaram diferença estatística. O grupo PC3 + Linf houve diferença estatística sendo o segundo grupo com maior viabilidade. O grupo PC3 + DC + Linf houve diferença estatística, sendo o grupo com maior viabilidade celular (Figura 12).

Figura 12 - Viabilidade celular após 24 e 48 horas de co-cultura



Nota: Letras diferentes significa diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos pelo teste Twoway ANOVA.
Fonte: Autores, 2024.

14.3 MIGRAÇÃO CELULAR

Após 24h, a maior distância entre as bordas celulares foi observada no grupo PC3 + DC + Linf, indicando menor migração. Em 48h, houve menor migração em todos os grupos, com o grupo PC3+DC+Lin apresentando maior distância entre as bordas celulares em comparação ao grupo somente com PC3 (Figura 13).

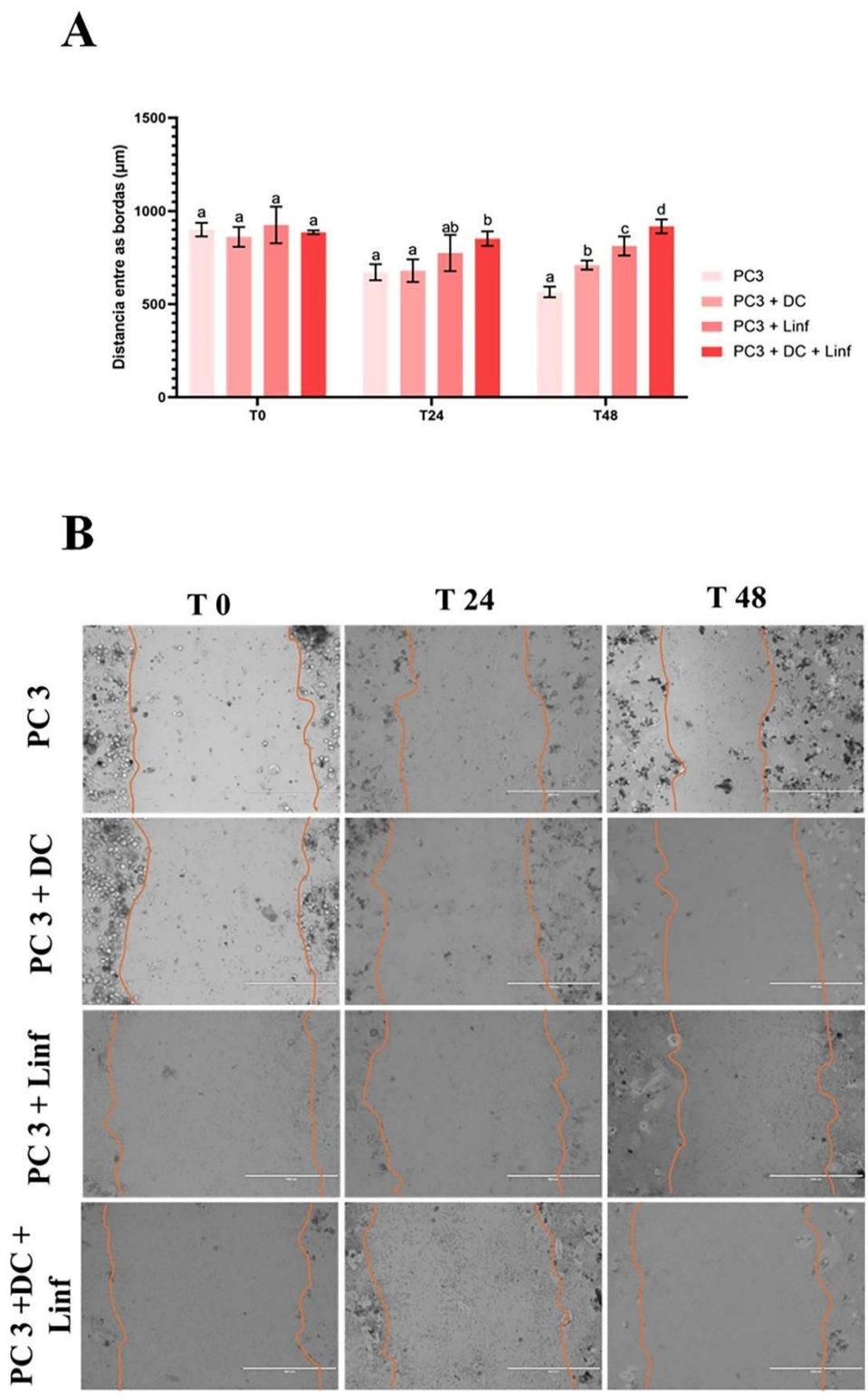
14.4 ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL

A variação total dos dados foi de 52,62% sendo que os atributos mais importantes na distinção do grupo apresentaram valores de correlação > 0,6 (Figura 10). Para PC1 (eixo horizontal) os atributos mais relevantes e seus respectivos valores de correlação foram IL-4 (24h) (0,4566), IL -10 (24h)(0,4793), Il – 12 (24h)(0,3320), Il – 12 (48h)(0,3647), Il -17 (48h)(0,4809).

No PC2 (eixo vertical), os tratamentos foram separados principalmente por Il -17 (24h) (-0,4753), TNF (24h) (-0,3977), IL-4 (48h) (-0,5146), IL -10 (48h) (0,3107). Ficaram evidentes quatro conjuntos separados, o primeiro contendo apenas o grupo DC, o segundo contendo o grupo PC3, o terceiro contendo os grupos PC3 + Linf, e o

quatro conjunto contendo os grupos de DC + Linf, PC3 + Linf + DC e o grupo Linf (Figura 14).

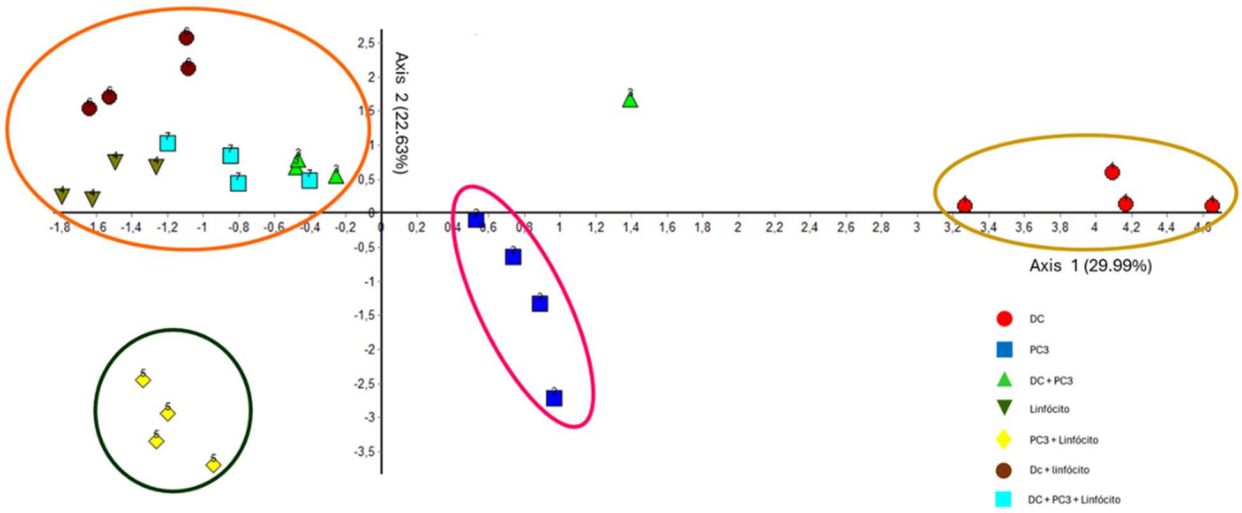
Figura 13 - A migração celular



Nota: foi avaliada por (a) distância da linha vazia de células e (b) co cultura em 24 e 48 h após o

estabelecimento da co-cultura. Letras diferentes significam diferença estatística (p<0,05) entre os grupos pelo teste Twoway ANOVA; * significa interação entre PC3, Célula dendrítica e Linfócito.
Fonte: Autores, 2024.

Figura 14 - Análise do componente principal



Nota: Círculos evidenciam o agrupamento entre os grupos experimentais.
Fonte: Autores, 2024.

15 DISCUSSÃO

15.1 PRODUÇÃO DE CITOCINAS

As citocinas podem ser produzidas e secretadas por diferentes células, inclusive células do sistema imune. A secreção de citocinas ativa e modula células imunes e desempenha efeitos citotóxicos nas células tumorais (Burke; Youg, 2019).

O TNF-α é uma citocina multifuncional capaz de induzir necrose em tumores. Os tumores são classificados em quentes, frios e intermediários. Clinicamente, os tumores quentes respondem melhor que os tumores frios aos efeitos do TNF-α. A atividade antitumoral pode ser estabelecida pela ligação dos receptores dessa citocina às células tumorais, promovendo a apoptose, pelo bloqueio de células imunossupressoras, inclusive Treg, e pela interrupção da neoangiogênese (Horsen et al., 2006). Entretanto, em níveis exacerbados e períodos prolongados pode promover a inflamação crônica (Holbrook et al., 2019). Nossos resultados não indicam alteração da produção de TNF-α após 24h de incubação com DC e/ou Linf porém, em 48h, DC+ PC3 e DC + PC3 + Linf apresentaram maior produção desta citocina, indicando que a

ação concomitante de DC e Linf pode induzir a morte de PC3.

O IFN-γ desempenha atividades imunes nas imunidades inata e adaptativa, demonstrando a atividade por linfócitos T ativados, células NK, células B e APCs. Os efeitos de IFN-γ incluem apresentação de antígeno, promoção de sinais inflamatórios, efeitos antagônicos a expressão de citocinas como TGF-β e IL-10, que possuem comportamento supressor. A capacidade de induzir apoptose em células tumorais por caspases pró-inflamatórias na presença de IFN-γ também é uma característica promissora (Burke; Young, 2019). Entretanto, as células cancerosas podem sobreviver através de estratégias de evasão imune, inclusive na dependência IFN-γ. O IFN-γ aumenta a efetividade de MHC classe I e respostas relacionadas à citotoxicidade dos linfócitos. De acordo com a hipótese de tolerância celular das células cancerosas ao IFN-γ, pode acontecer durante a tumorigênese a perda da proteína de MHC I. resultando em uma via de escape alternativa para as células tumorais (Lin et al., 2017). Desse modo, a diferença a produção de IFN-Y não significativa entre os grupos pode estar associada a esse comportamento anti e pró-inflamatório em diferentes ambientes.

A IL-4 é uma citocina imunomoduladora, produzida principalmente por células T, promove a expressão de MHC classe II e proliferação de célula B ativadas. A IL-4 também contribui para adesão e inflamação dos tecidos, induz a expressão da molécula de adesão celular vascular-1 e regula de forma positiva a expressão de E-selectina. A IL-4 pode assumir comportamento anti-inflamatório e pró-inflamatório dependendo do ambiente (Nelmsy et al. 1999). De acordo com os dados da análise das citocinas, no tempo de 24h houve menor produção de IL-4 em todos os grupos em relação ao grupo apenas com DC. Entretanto, não houve diferença significativa comparada aos demais grupos. No tempo de 48h, a produção de IL-4 foi menor nos grupos DC + PC3, Linf, Linf + DC, PC3 + Linf + DC e aumentou apenas no grupo PC3 + Linf em relação a todos os demais grupos. O aumento de IL-4 pode estar associado a alguma interação do ambiente na presença ou ausência de DC, já que houve aumento somente no grupo que não possui essa célula e grupos com a presença de DC diminuíram em relação ao grupo somente com DC.

Quando observada a secreção de IL-10 em 24 horas observou-se redução em todos os grupos experimentais, o que pode estar associado ao aumento da resposta imune adaptativa, inclusive, com a produção de INF-γ e células T CD4, promovendo um ambiente pró-inflamatório. No tempo de 48h, houve aumento somente no grupo

de DC + Linf, o que pode estar associado a interação não satisfatória de DC e linfócitos nesse tempo. A IL-10 é uma citocina com caracterísa anti-inflamatória e contribui para limitação do sistema imune, o que confere proteção aos patógenos e persistência da infecção. Entretanto, IL-10 torna-se importante para a regulação da inflamação exarcebada com efeitos negativos a longo prazo (Lyer; Cheng et al., 2013).

A IL-12, após 24 e 48 horas, reduziu em todos os grupos em relação ao grupo apenas com DC. Tal comportamento, pode estar associada à produção dessa citocina por DCs, já que a IL-12 é uma citocina pró-inflamatória secretada por APCs ativadas que conseguem induzir a produção de Th1, Th17 e IFN-γ e pode ser regulada pela presença de IL-10 e TGF-β1. A produção de IL-12 por APCs contribui para ativação e proliferação de células T e NK tornando-as efetoras pela indução de fatores citolíticos, como perforina e granzima B (Vignali; Kuchroo, 2014; Yan, Smyth,Teng, 2018).

A produção de IL-17 reduziu nos grupos apenas com PC3, PC3 + Linf e DC + Linf após 24h e, após 48h, reduziu em todos os grupos em relação ao grupo DC. A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória produzida pelas células T CD4 padrão Th17 e outras células, principalmente do sistema imune inato, em resposta à patógenos e lesões teciduais. Em condições fisiológicas ideias, a produção de IL-17 permanece baixa, por intermédio de TGF-β, a fim de manter a tolerância imunológica. No entanto, essa produção é aumentada na presença de patógenos (Gu; Wu; Li, 2013). O padrão Th17 comparado aos padrões convencionais apresenta menores níveis de granzima B e marcadores de ativação HLA-DR e CD25, limitando a atividade citotóxica. No cenário da oncologia, a compreensão do comportamento do fenótipo Th17 ainda é limitado, podendo atuar de forma heterogênea em diferentes ambientes (Morales et al., 2020). Dessa forma, o comportamento variado da IL-17 demonstrado neste estudo pode estar associado a essa condição.

15.2 VIABILIDADE CELULAR

O crescimento e a morte das células estão associados a regulação de receptores de morte, como TRAIL e Fas/CD95, citocinas e fatores presentes no microambiente tumoral. A viabilidade das células PC3 podem estar associadas às vias de sinalização que podem ser controladas por citocinas, como IL-1B que ativam MAPK p38 (ERK1/2) e (JNK) em tratamento dessa linhagem (Chondrogiannis et al., 2014).

Genes e marcadores podem ser expressos de forma que interfiram no metabolismo e proliferação das células. O mRNA NES1 pode ser regulado negativamente em linhagens de células de câncer de próstata, inclusive PC3. É sugestivo que ele funcione como supressor de tumor, aumentando sua expressão, pode controlar a proliferação das células PC3 e tumores, o que pode estar associado a menor migração, de acordo com os dados experimentais, mesmo com uma viabilidade não significativa, quando observada em co cultura com DC e linfócitos (Hu et al., 2015).

A regulação de Bc2 e BAX atuam na regulação da via mitocondrial importante para a viabilidade das células. A relação BAX/ Bcl2 determina a capacidade da célula sofrer apoptose. Bcl2 previne apoptose em estágio não avançado, regulando a morte celular programada, e impede a liberação de citocromo c pelas mitocôndrias. A proteína BAX é um ativador apoptótico, que pode levar a não liberação de citocromo c, quando forma o heterodímero com Bcl-2 (Hu et al., 2015).

A proteína p53 sofre mutações significativas em tumores de próstata e essas mutações são mais comuns em estados avançados do câncer de próstata. Células PC3 são disfuncionais em relação a p53, caracterizando potencial progressão por meio da replicação do DNA, continuando, assim, o ciclo celular mesmo com danos no DNA, o que configura a progressão dessas células ainda com mais mutações favoráveis a formação do tumor (Chappell et al., 2012).

As citocinas estão intrinsicamente relacionadas ao funcionamento das células do sistema imunológico. A viabilidade da DC encontrada na análise experimental pode estar associada a produção de citocinas nesse tempo, sendo que IL-12 não possui resultado significativo em relação a PC3, sendo importante para atividades das DCs, e quando produzida concomitantemente a IL-4, assume um comportamento inibitório (Hochrein et al.,2000). A produção de citocinas é uma interação importante para compreender os comportamentos, principalmente em ambientes com outras células.

A diferença significativa no grupo de PC3 + Linf após 24 e 48h pode estar associada a presença do linfócito no cenário tumoral. Pacientes com deficiência de células T tendem a maior malignidade (Melief, 2008). As células T reconhecem o antígeno tumoral e tendem a atacá-las. A presença de células APCs aceleram esse processo de início da efetividade da resposta imune adaptativa. A viabilidade das células PC3 pode não ser reduzida quando colocada juntamente aos linfócitos e a morte dessa linhagem não depende exclusivamente dos linfócitos. A presença de

citocinas como IL-2, IL-10 e TGF-β pode induzir o perfil tolerogênico dos linfócitos, induzindo a proliferação e invasão da célula tumoral (Wu et al., 2022). A produção de citocinas encontrada nos resultados, infere uma produção significativa de IL-10 pelo grupo DC+ Linfócitos.

O grupo PC3+DC+Linf teve resultado significativo com maior viabilidade entre os grupos nos tempos de 24 horas e 48 horas, que pode estar relacionado a inflamação crônica. A produção de citocinas e os fatores de crescimento podem induzir a inflamação exacerbada, modificando o ambiente que inicialmente teria características que impediria a atividade da célula cancerígena (Wu et al., 2019). As DCs são estimuladas a produzirem citocinas, como IL-12 e IL-15, que ativarão os linfócitos para o reconhecimento do antígeno tumoral e esses linfócitos produziram citocinas, como IL-12 e TNF-a, aumentando as funções antitumorais. Neste estudo foram obtidos resultados diversificados quanto a produção de IL-12 e TNF-a na co cultura de PC3+ DC+Linf em relação a grupos com as células isoladas ou em pares, o que pode relacionar à produção de citocinas de PC3 inibindo ou diminuindo a efetividade das atividades das células do sistema imune.

15.3 MIGRAÇÃO CELULAR

As células cancerígenas possuem uma sobrevida elevada e uma capacidade de invasão ativada. Alterações genéticas e produção de citocinas e quimiocinas podem interferir nos mecanismos de morte celular necessários com o surgimento de danos celulares (Wu et al., 2022).

As citocinas possuem características diferenciadas que podem influenciar no metabolismo celular. O IFN-γ é uma citocina importante para o controle da resposta imune, aumenta a antigenicidade das células tumorais devido a expressão aumentada de MHC de classe I, sugerindo que o IFN-γ pode diminuir o padrão de invasividade celular. A IL-10 é uma citocina pró-tumorigência no CaP, que ao ser aumentada, promove o crescimento de células cancerígenas. Nesse sentido, migração de células, nos tempos de 24h e 48h, pode ser associada também a produção das citocinas nesses tempos, sendo que houve diminuição de IL-10 e IL-4, que estão associadas a tumorigênese e aumento de IFN-γ com características antitumorigênicas. O pico de concentração das citocinas e o processo de ativação de DCs e linfócitos podem ser a

principal associação da migração da célula (Sanz et al., 2012; Chin et al., 2024; Kong et al., 2024; Pozenel et al., 2024).

A migração celular do grupo PC3 + DC foi maior no tempo de 24 horas em relação aos demais grupos, mas não significativo em relação a PC3. A produção de citocinas pelas células do grupo pode estar associada à migração nos tempos analisados, uma vez que a estimulação de citocinas através do ambiente pode interferir no comportamento celular. O início da produção de determinada citocina pode interferir no fenótipo assumido por outra através da interação no ambiente. Como efeito positivo de estimulação de IL-12 com a produção de IL-4 um dia antes, ao serem produzidas simultaneamente, IL-12 assume um comportamento inibitório, sendo a IL-12 importante para o desenvolvimento das funções das DCs (Hochrein et al.,2000). Desse modo, a produção concomitante de citocinas por essas células pode ser um fator determinante da distância de migração. Ademais, a ausência de linfócitos contribui com uma resposta imune menos efetiva.

As quimiocinas são responsáveis pelo trafego de linfócitos, suas concentrações são importantes para migração celular, seja pela influência nos rearranjos citoesqueléticos ou interações na matriz extracelular. A maioria das citocinas são reguladas em ambiente inflamatório. Células T em repouso de sangue periférico não expressam transcrições necessárias para receptores inflamatórios. Estudos *in vitro* demonstraram que a resposta das quimiocinas e a expressão de seus receptores estão relacionados à produção de IL-2, que está relacionada a expansão e migração de células T (Moser; Loetscher 2001).

O linfócito é uma célula importante do sistema imune adaptativo, nesse sentido não há resposta robusta imediata de reconhecimento de patógenos, sendo que essas células devem passar por expansão clonal para que desenvolvam respostas específicas para o antígeno, o que pode estar relacionado a resultados no grupo PC3 + Linf ausentes de células dendríticas no tempo de 24h (Vivier et al., 2018). As células dendríticas, como APCs profissionais, aumentam a atividade citotóxica através da apresentação cruzada de antígenos e a liberação do interferon do tipo I. A abundância de DCs associadas a tumores está frequentemente relacionada a bons resultados em pacientes com câncer e bons métodos de terapias (Plesca et al., 2022).

16 CONCLUSÃO

As citocinas são importantes para as atividades celulares e interações entre as células da cultura e, a partir dessas proteínas, associamos os resultados de migração e de viabilidade. A produção de cada citocina analisada nos tempos de 24 e 48 horas pode estar relacionada às interações com as outras células e os tempos analisados, visto os resultados díspares quando comparados ao grupo controle e ao mesmo grupo em tempos diferentes, o que torna necessário uma análise mais detalhada e em diferentes tempos. O ensaio de migração celular apresentou um resultado satisfatório quanto a migração da célula PC3 em conjunto com DC e Linfócitos, ressaltando que esse grupo de células proporcionam uma menor migração, o que pode ser associado a uma invasão celular menor, quando essas células PC3 são tratadas com as células DC + Linfócitos. Em contrapartida, a viabilidade celular da PC3 aumentou no grupo tratado PC3 + DC + Linf e PC3 + Linf, o que, a princípio, determina maior atividade da célula tumoral. Através dos experimentos, entende-se que o tratamento com DC+ Linf tende a diminuir o processo de proliferação tumoral, entretanto a atividade da célula PC3 não diminui, configurando a não morte celular e processo de apoptose. Compreende-se que mais estudos devem ser feitos para identificar a interação determinante das células do sistema imunológico como imunoterapia e utilizá-la como intervenção combinada ou isolada, para que se tenha resultados satisfatórios na clínica quanto a invasão e morte celular.

REFERÊNCIAS

ALMEERI, M.N.E.; AWIES, M.; CONSTANTINOU, C. Prostate Cancer, Pathophysiology and Recent Developments in Management: A Narrative Review. **Curr Oncol Rep**, [*s. l.*], v. 26, n. 11, p. 1511-1519, 2024. DOI 10.1007/s11912-024-01614-6. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s11912-024-01614-6. Acesso em: 14 jan. 2025.

BURKE, J.D.; YOUNG, HA. A cytokine at the right time, is in the right place. **Semin Immunol**, [*s. l.*], ano 1-19, v. 43, 2019. DOI 10.1016/j.smim.2019.05.002. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31221552/. Acesso em: 4 dez. 2024.

CHAPPELL, W.H.; LEHMANN, B.D.; TERRIAN, D.M.; ABRAMS, S.L.; STEELMAN, L.S.; MCCUBREY, J.A. P53 expression controls prostate cancer sensitivity to chemotherapy and the MDM2 inhibitor Nutlin-3. **Biomed Res Int.**, [*s. l.*], v. 11, ed. 24, p. 4579-4588, 2012. DOI 10.4161/cc.22852. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23187804/. Acesso em: 1 abr. 2025.

CHIN, Y.; TSAI, C.; MA, H.; CHENG, D.; TSAI, C.; WANG, Y.; SHIH, H.; CHANG, S.; GU, J.; CHANG, W.; BAU, D. Impacts of Interleukin-10 Promoter Genotypes on Prostate Cancer. **Mol Med Rep.**, [*s. l.*], v. 14, ed. 8, p. 1-14, 2024. DOI 10.3390/life14081035. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39202777/. Acesso em: 30 mar. 2025.

CHONDROGIANNIS, G.; KASTAMOULAS, M; KANAVAROS, P.; VARTHOLOMATOS, G.; BAI, M.; BALTOGIANNIS, D.; SOFIKITIS, N; ARVANITIS, D.; GALANI, V. Cytokine effects on cell viability and death of prostate carcinoma cells. **Biomed Res Int.**, [*s. l.*], v. 2014, p. 1-16, 2014. DOI 10.1155/2014/536049. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4058150/. Acesso em: 1 abr. 2025.

Conlon KC, Miljkovic MD, Waldmann TA. Cytokines in the Treatmenof Cancer. **J Interferon Cytokine Res**. *[s.l.]* Vol. 39. N. 1. P.6-21. 2019. DOI:10.1089/jir.2018.0019. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29889594/. Acesso em: 21 jan. 2025
KURESHI, C.T.; DOUGAN, S.K. Cytokines in cancer. **Cancer Cell.**, [*s. l.*], v. 43, n. 1, p. 15-35, 2025. DOI 10.1016/j.ccell.2024.11.011. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11841838/. Acesso em: 1 abr. 2025.

DANCESCU, M; TRUJILLO, M. R.; BIRON, G.; BRON, D.; DELESPESSE, G.; SARFATI, M. Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. **The Journal of experimental medicine**, [*s. l.*], v. 176, n. 5, p. 1319-1326, 1992. DOI 10.1084/jem.176.5.1319. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2119420/. Acesso em: 11 dez. 2024.

EL-AWAYY, A.R.; ELASHIRY, M.; MORANDINI, A.C.; MEGHIL, M.M.; CUTLER, C.W. Dendritic cells a critical link to alveolar bone loss and systemic disease risk in periodontitis: Immunotherapeutic implications. **Periodontol 2000**, [*s. l.*], v. 89, n. 1, p. 41-50, 2022. DOI 10.1111/prd.12428. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/prd.12428. Acesso em: 1 abr. 2025.
Gu C; Wu L; Li X. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. Cytokine, [s. l.], v. 64, ed. 2, p. 444-485, 2013. DOI 10.1016/j.cyto.2013.07.022. Epub 2013 Sep 3. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24011563/. Acesso em: 31 mar. 2025.

Holbrook J; Lara-Reyna S; Jarosz-Griffiths H; McDermott M.TUMOUR necrosis factor signalling in health and disease. Faculty Rev, [s. l.], v. 8, ed. 111, p. 1-12, 2019. DOI 10.12688/f1000research.17023.1. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6352924/. Acesso em: 3 fev. 2025.

HOCHREIN, H.; KEEF, M.O.; LUFT, T.; VANDEABEELE, S.; GRUMONT, R.J.; MARASKOVSKY, E.; SHORTMAN, K. Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells. **Biomed Res Int.**, [*s. l.*], v. 192, N. 6, p. 823-833, 2000. DOI 10.1084/jem.192.6.823. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2193283/. Acesso em: 1 abr. 2025.

HORSEN, R.V.; HAGEN, T.L.T.; EGGERMONT, A.M.M. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. **The Oncologist**, [*s. l.*], v. 11, n. 4, p. 397-408, 2006. DOI 10.1634/theoncologist.11-4-397. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16614236/. Acesso em: 5 nov. 2024.

LYER, S.S.; CHENG, G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. **Crit Rev Immunol**, [*s. l.*], v. 32, n. 1, p. 23-63, 2012. DOI 10.1615/critrevimunol.v32.i1.30. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3410706/pdf/nihms377104.pdf. Acesso em: 5 nov. 2024.

LAN, T; CHEN, L; WEI, X. Inflammatory Cytokines in Cancer: ComprehensiveUnderstanding and Clinical Progress in Gene Therapy. **Cells**, [*s. l.*], v. 10, n. 1, p. 1-16, 2021. DOI 10.3390/células10010100. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33429846/. Acesso em: 26 dez. 2024.

LIN, C.F; LIN, C..M; WU, S.Y; FENG, P.H; CHEN, K.Y; CHUANG, H.C; CHEN, C.L; WANG, Y.C; TSENG, P.C; TSAI, T.T. Escape from IFN-γ-dependent immunosurveillance in tumorigenesis. Journal of Biomedical Science, [s. l.], v. 24, ed. 10, p. 1-9, 2017. DOI 10.1186/s12929-017-0317-0. Disponível em: https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-017-0317-0. Acesso em: 6 jan. 2025.

JIANG, E; LI, E; ZHU, B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment.Cell Death Dis. **Cell Death and Disease**, [*s. l.*], v. 6, n. 6, p. 1-9, 2015. DOI 10.1038/cddis.2015.162. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4669840/. Acesso em: 1 out. 2024.

MCGARIGAL, K; CRUSHMAN, S; STANFFORD, S. Multivariate statistic for wildlife and ecology research. Stony Brook University, [s. l.], v. 76, ed. 2, p. 218, 2001. DOI 10.1086/393884. Disponível em: https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/393884. Acesso em: 10 mar. 2025.

MELIEF, C.J.M. Cancer immunotherapy by dendritic cells. **Immunity**, [*s. l.*], v. 29, n. 3, p. 372-383, 2008. DOI 10.1016/j.immuni.2008.08.004. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074-7613(08)00375-0. Acesso em: 1 abr. 2025.

MONTI, M.; FERRARI, G.; GAZZURELLI, L.; BUGATTI, M.; FACHETTI, F.; VERMI, W. Plasmacytoid dendritic cells at the forefront of anti-cancer immunity: rewiring strategies for tumor microenvironment remodeling. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, [*s. l.*], v. 43, ed. 1, p. 1-31, 2024. DOI 10.1186/s13046-024-03121-9. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11253500/. Acesso em: 1 abr. 2025.

MORALES, JMGR; PUIG, L.; DAUDÉN, E.; CÃNETE, JD; PABLOS, JL; MARTIN, AO; JUANATEY, CG; ADAN, A.; MONTALBÁN, X.; BORRUEL, N.; ORTÍ, G.; MARTIN, EH; VIDAL, CG; MORALES, CV; VÁRQUEZ, VM; GONZÁLEZ-GAY, MA Papel crítico da interleucina (IL)-17 em distúrbios inflamatórios e imunológicos: Uma revisão atualizada das evidências com foco em controvérsias. **Autoimmun Rev** , [*s/*], v. 1, p. 1-15, 2020. DOI 10.1016/j.autrev.2019.102429. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568997219302393?via%3Dihub. Acesso em: 8 out. 2024.

PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells**. Nature Reviews Cancer**, [*s. l.*], vol. 12, n. 4, p. 265–277, 2012. DOI.org/10.1038/nrc3258. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3433802/. Acesso em : 10 jan.2025.

PLESCA, I.; BENESOVA , I.; BEER, C.; SOMMER, U.; MULLER, L.; WEHNER, R.; HEIDUK, M.; AUST, D.; BARETTON, G.; BACHMANN, M.P.; FELDMANN, A.; WEITZ, J.; SEIFERT, L.; SEIFERT, A.M.; SCHMITZ, M. Clinical Significance of Tumor-Infiltrating Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Cancers (Basel) .**, [*s. l.*], v. 14, ed. 5, p. 1-19, 2022. DOI 10.3390/cancers14051216. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8909898/. Acesso em: 30 mar. 2025.

POZENEL, P.; ZAJC, K.; SVAJGER, U. Factor of time in dendritic cell (DC) maturation: short-term activation of DCs significantly improves type 1 cytokine production and T cell responses. **Mol Med Rep.**, [*s. l.*], v. 22, ed. 1, p. 1-14, 2024. DOI 10.1186/s12967-024-05368-4. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39202777/. Acesso em: 30 mar. 2025.

QIU, Y; SU, M; LIU, L; TANG, Y; PAN, Y; SUN, J. Clinical Application ofCytokines in Cancer Immunotherapy. **Drug, Design, Development and Therapy**, [*s. l.*], v. 27, p. 2269-2287, 2021. DOI 10.2147/DDDT.S308578. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8166316/. Acesso em: 7 jan. 2025.

SAITO, Y.; KOMORI, S.; KOTANI, T.; MURATA, Y.; MATOZAKI, T. The Role of Type-2 Conventional Dendritic Cells in the Regulation of Tumor Immunity. **Cancers (Basel).**, [*s. l.*], v. 14, n. 8, p. 1-16, 2022. DOI 10.3390/cancers14081976. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31366174/. Acesso em: 1 abr. 2025.

SANZ, A.B.; SANCHEZ-NINO, M.D.; MANZARBEITIA, F.; RUIZ-ANDRES, O.; SELGAS, R.; RUIZ-ORTEGA, M.; GONZALES-ERGUITA, C.; EGIDO, J.; ORTIZ, A. A. Inflammatory cytokines and survival factors from serum modulate tweak- induced apoptosis in PC-3 prostate cancer cells. **PLoS One**, [*s. l.*], v. 7, ed. 10, p. 1-15, 2012. DOI 10.1371/journal.pone.0047440. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3471822/. Acesso em: 30 mar. 2025.
KONG, X.; CHENG, D.; XU, X.; ZHANG, Y.; LI, X.; PAN, W. IFNγ induces apoptosis in gemcitabineresistant pancreatic cancer cells. **Mol Med Rep.**, [*s. l.*], v. 29, ed. 5, p. 1-9, 2024. DOI 10.1371/journal.pone.0047440. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10975025/. Acesso em: 30 mar. 2025.

Shepherd, G. J. (2010). *Fitopac 2.1.2.85. Manual Do Usuário*. *1*.
TODARO, M; ZERILLI, M; VITIANI, L.C.; BINI, M; ALEA, M.P. Autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10 is required for survival and growth of thyroid cancer cells. **Cancer Research**, [*s. l.*], v. 66, n. 3, p. 1491-1499, 2006. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-05-2514. Disponível em: https://aacrjournals.org/cancerres/article/66/3/1491/526683/Autocrine-Production-of-Interleukin-4-and. Acesso em: 17 jul. 2024.

TREPAT, X.; CHEN, Z.; JACOBSON, K. Cell migration. **Compr Physiol.**, [*s. l.*], v. 2, ed. 4, p. 2369-2392, 2012. DOI 10.1002/cphy.c110012. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4457291/. Acesso em: 1 abr. 2025.

VIGNALI, D.A.A.G; KUCHROO, V.K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. Nature Immunology, [s. l.], v. 13, ed. 8, p. 722-728, 2012. DOI 10.1038/ni.2366. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22814351/. Acesso em: 2 abr. 2025.

YAN, J.; SMYTH, M.J.; TENG, M.W.L. Interleukin (IL)-12 and IL-23 and Their Conflicting Roles in Cancer. **Cold Spring HarbPerspect Biol**, Austrália, v. 10, n. 7, p. 1-18, 2018. DOI 10.1101/cshperspect.a028530. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6028064/pdf/cshperspect-CYT-a028530.pdf. Acesso em: 8 out. 2024.

WU, C.H.; HSIEH, P.F.; LEE, Y.H.; KUO, W.W.; WU, R.C.; HSIEH, M.L.; PANG, S.; YANG, Y; LIN, V.C. Nuclear Respiratory Factor 1 Overexpression Inhibits Proliferation and Migration of PC3 Prostate Cancer Cells. **Cancer Genomics Proteomics** , [*s. l.*], v. 19, n. 5, p. 614-623, 2022. DOI 10.21873/cgp.20346. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9353720/. Acesso em: 7 jan. 2025.