

Ana Luísa Vital Castanheira de Carvalho

Activação das células dendríticas da pele por
alergenos e citocinas epidérmicas

Universidade de Coimbra
2003

Ana Luísa Vital Castanheira de Carvalho

Activação das células dendríticas da pele por alergenos e citocinas epidérmicas

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para prestação de provas do V Mestrado em Tecnologias do Medicamento.

Este trabalho foi realizado ao abrigo de uma bolsa de técnico de investigação com referência CNC-BTI/02/01, no âmbito do projecto de investigação FCT SAPIENS 36373/99.

Universidade de Coimbra
2003

Agradecimentos

Os meus sinceros agradecimentos,

à Professora Doutora Maria Celeste Lopes, pela oportunidade que me proporcionou para a realização deste trabalho, pela excelente formação científica que me concedeu, pela perspicácia e inteligência com que me ensina a ver a vida e pelo rigor, generosidade, apoio, acompanhamento e amizade com que me orientou,

ao Professor Doutor Carlos Duarte, pelo seu interesse e disponibilidade excepcionais, pelos seus conselhos criteriosos e pelo rigor científico com que acompanhou este trabalho,

à Dra Margarida Gonçalo, pela ajuda concedida e pelos interessantes conselhos de grande utilidade na ligação entre a investigação laboratorial e a experiência clínica,

à Teresa, por tudo o que me ensinou, pela sua contribuição no desenvolvimento deste trabalho, pela sua ilimitada paciência e disponibilidade, pelo ânimo e encorajamento que me deu nas horas de desespero, pelo seu genuíno espírito de partilha e pela sua profunda amizade,

à Alexandrina, à Luísa e à Margarida, pelo apoio e ajuda que me deram em todos os momentos e pela amizade partilhada,

ao Zé Nuno, por me ter dado a conhecer este grupo de investigação sem o qual este trabalho não teria sido possível, pelo verdadeiro amigo que é e pelas suas 'rabujices' bem humoradas que alegam quem o rodeia,

à Professora Doutora Leonor Almeida, por desde cedo ter despertado em mim o interesse e gosto pela ciência e pelo carinho e amizade que sempre me dedicou,

a todos os colegas de outros grupos de trabalho, que de algum modo me ajudaram com o espírito de entreatajuda demonstrado,

aos meus Pais, por sempre me terem motivado e incentivado na realização deste trabalho, pelo apoio e confiança que depositaram em mim, pela sua profunda exigência e ilimitada generosidade e amor que me permitiram chegar até aqui,

ao Nuno, pelo carinho e infinita paciência em todos aqueles momentos menos felizes, pela força e incentivo constantes que me deu, pela sua ajuda incansável dispensada diariamente, por ser a pessoa maravilhosa que é, por todo o seu amor.

A todos, Obrigada!

Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	RNA mensageiro
BSA	albumina de soro bovino
CD40L	ligando para CD40
DC	célula dendrítica
DCA	dermatite de contacto alérgica
DEPC	dietilpirocarbonato
DCNB	2,4-dicloronitrobenzeno
DNFB	2,4-dinitrofluorobenzeno
ECL	quimioluminiscência melhorada
EDTA	ácido N,N,N',N'-etilenodiaminotetracético
EMSA	ensaio do desvio da mobilidade electroforética
FSDC	linha celular dendrítica derivada da pele de feto de rato
GM-CSF	factor estimulante de colónias de macrófagos e granulócitos
H ₃ PO ₄	ácido ortofosfórico
HEPES	ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfónico
IC ₅₀	concentração que inibe 50% do efeito máximo
IL-1	interleucina-1
IL-12	interleucina 12
IL-12R	receptor para inetrleucina 12
IL-6	interleucina 6
iNOS	isoforma indutível da sintase do óxido nítrico
I κ B	inibidor do factor de transcrição do NF- κ B
kDa	kilodalton
LC	célula de Langerhans
MHC	complexo <i>major</i> de histocompatibilidade

MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NF- κ B	factor nuclear de transcrição <i>kappa</i> B
NO	óxido nítrico
NO ₂ ⁻	nitritos
PBS	tampão fosfato salino
PDTC	pirrolidinoditiocarbamato
SDS	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	electroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SEM	erro padrão da média
TBS	tampão Tris salino
Th1	linfócitos T <i>helper</i> 1
Th2	linfócitos T <i>helper</i> 2
TNF-R	receptor do factor de necrose tumoral
TNF- α	factor de necrose tumoral- α
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol

Resumo	1
Capítulo 1 – Introdução	4
1.1. CÉLULAS DENDRÍTICAS: DEFINIÇÃO E ASPECTOS GERAIS	4
1.1.1. ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO NO ORGANISMO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	5
1.1.2. PRECURSORES DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS E DIFERENCIAÇÃO CELULAR	7
1.2. IMUNOBIOLOGIA DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	11
1.2.1. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA	11
1.2.1.1. Moléculas de reconhecimento do antigénio	11
<i>Receptores de reconhecimento padrão (PRR)</i>	12
<i>Receptores Fc</i>	14
1.2.1.2. Moléculas de adesão e migração celular	14
<i>Moléculas de adesão</i>	15
<i>Receptores para quimiocinas</i>	16
1.2.1.3. Moléculas de interação entre células dendríticas e linfócitos T	17
<i>Moléculas co-estimuladoras</i>	18
<i>Citocinas e seus receptores</i>	19
<i>Outras moléculas</i>	22
1.2.2. MECANISMOS DE MIGRAÇÃO, MATURAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR	24
1.2.3. FUNÇÕES BIOLÓGICAS: IMUNIDADE <i>VERSUS</i> TOLERÂNCIA	26
1.2.3.1. Dermatite do contacto alérgica	27
1.3. CÉLULAS DENDRÍTICAS E IMUNIDADE DA PELE	29
1.3.1. CÉLULAS DE LANGERHANS: CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E MORFOLÓGICAS	29
1.3.2. MATURAÇÃO E FUNÇÃO IMUNOESTIMULATÓRIA DAS CÉLULAS DE LANGERHANS	32

1.4. SÍNTESE E FUNÇÃO BIOLÓGICA DO ÓXIDO NÍTRICO	33
1.4.1. FUNÇÕES FISIOLÓGICAS E FISIOPATOLÓGICAS DO ÓXIDO NÍTRICO	33
1.4.2. SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO E ISOFORMAS DA SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO	34
1.4.2.1. Expressão da isoforma indutível da sintase do óxido nítrico	35
1.4.3. ACTIVACÃO DE FACTORES DE TRANSCRIÇÃO E EXPRESSÃO GENÉTICA	36
1.4.3.1. Factores de transcrição: Família NF- κ B/Rel	36
1.4.4. O ÓXIDO NÍTRICO E A IMUNOBIOLOGIA DA PELE	37
1.4.5. MECANISMO DE ACÇÃO DOS GLUCOCORTICÓIDES NO TRATAMENTO DA DERMATITE DE CONTACTO ALÉRGICA	38
1.5. OBJECTIVOS E PERSPECTIVAS FUTURAS	39
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	41
2.1. Cultura de células dendríticas da pele de feto de rato (FSDC)	41
2.2. Condições de cultura	42
2.3. Ensaio de redução do sal de tetrazólio MTT	42
2.4. Quantificação da concentração de nitritos nos sobrenadantes das culturas celulares (ensaio de <i>Griess</i>)	43
2.5. Detecção de proteínas por <i>Western blot</i>	44
2.6. Imunofluorescência	46
2.7. Ensaio do desvio da mobilidade electroforética (EMSA)	47
2.8. Materiais	49

Capítulo 3 - Expressão das proteínas de superfície CD40 e IL-12R induzidas pelos antígenos de contacto sulfato de níquel (NiSO₄) e 2,4-dinitrofluorobenzeno (DNFB) numa linha celular dendrítica da pele	50
3.1. Resumo	50
3.2. Introdução	51
3.3. Resultados	54
3.3.1. O NiSO ₄ e o DNFB induziram a expressão de CD40 nas FSDC	54
3.3.2. Efeito do GM-CSF no aumento da expressão de CD40 induzida por DNFB e NiSO ₄	55
3.3.3. Indução da expressão de IL-12R por DNFB e NiSO ₄ : efeito do GM-CSF	58
3.4. Discussão	61
Capítulo 4 – Estudo do efeito da dexametasona na activação do NF-κB, na expressão da iNOS e na produção de NO, em células FSDC incubadas com GM-CSF	66
4.1. Resumo	
4.2. Introdução	66
4.3. Resultados	66
4.3.1. Inibição da produção de NO pela dexametasona, em células FSDC estimuladas com GM-CSF	68
4.3.2. Efeito da dexametasona na expressão da proteína iNOS, em células FSDC estimuladas com GM-CSF	68
4.3.3. Efeito da dexametasona na activação do NF- κ B, em células FSDC estimuladas com GM-CSF	71
4.3.4. Efeito da dexametasona nos níveis citosólicos de I κ B- α , em células FSDC estimuladas com GM-CSF	74
4.4. Discussão	77
	79
Capítulo 5 – Conclusões	82
Bibliografia	84

Resumo

As células dendríticas da pele (células de Langerhans) apresentam a capacidade de captar antígenos de contacto e activar os linfócitos T, desencadeando uma resposta imunológica específica. Neste processo, estão envolvidos mecanismos celulares complexos, que se iniciam com a captação e degradação intracelular dos antígenos de contacto. Os pequenos peptídeos resultantes desta degradação proteolítica são exocitados juntamente com as moléculas do complexo *major* de histocompatibilidade e apresentados na superfície membranar. Esta cascata de eventos intracelulares é acompanhada de modificações morfológicas e fenotípicas, que caracterizam o processo de maturação das células dendríticas, e do qual resulta, designadamente, a alteração da expressão de moléculas de superfície.

Este trabalho teve como objectivo identificar alterações do padrão de proteínas induzidas por antígenos de contacto e por uma citocina epidérmica, designada por factor estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), e conhecer o efeito desta citocina na sinalização intracelular em células dendríticas da pele. Para a realização deste estudo, utilizou-se como modelo experimental uma linha celular dendrítica (FSDC), obtida a partir da pele de feto de rato e modificada por um vector retroviral. Os resultados do trabalho experimental realizado apresentam-se em duas partes:

- 1) Na primeira parte, incluem-se os resultados dos efeitos de dois antígenos de contacto, e de um composto não-sensibilizador, na indução de modificações na expressão de proteínas membranares.
- 2) Na segunda parte, apresentam-se os resultados da acção da citocina epidérmica GM-CSF, na activação do factor nuclear de transcrição kappa B (NF- κ B) e na expressão de uma proteína envolvida em processos inflamatórios, a isoforma indutível da sintase do óxido nítrico (iNOS). Uma vez que a dexametasona é um fármaco glucocorticóide com reconhecida

actividade anti-inflamatória e imunossupressora, nesta parte do trabalho apresenta-se, também, o efeito deste fármaco nos referidos processos.

Neste trabalho foram avaliadas as modificações induzidas por dois antigénios de contacto, o 2,4-dinitrofluorobenzeno (DNFB) e o sulfato de níquel (NiSO_4), e por um composto não-sensibilizador, o 2,4-dicloronitrobenzénio (DCNB), na composição celular de proteínas membranares, envolvidas na apresentação antigénica pelas células dendríticas: o CD40 e o receptor de interleucina-12 (IL-12R).

Os resultados demonstraram um aumento da expressão de CD40 e IL-12R após exposição ao DNFB e ao NiSO_4 . O DNFB provocou um aumento mais significativo na expressão destas proteínas. Pelo contrário, o DCNB, utilizado como controlo negativo, não provocou alteração na expressão das proteínas CD40 e IL-12R. A estimulação com GM-CSF aumentou a expressão de ambas as proteínas, ainda que de uma forma não significativa. Contudo, observou-se um efeito aditivo quando esta citocina epidérmica foi testada juntamente com os antigénios de contacto.

Os resultados destes estudos demonstraram que os antigénios de contacto DNFB e NiSO_4 , e a citocina epidérmica GM-CSF, alteraram a composição celular dos marcadores de superfície na linha celular FSDC, sugerindo que este tipo de alterações pode ocorrer durante a fase inicial de sensibilização da dermatite de contacto alérgica.

Evidências recentes demonstram que o óxido nítrico (NO) está envolvido em doenças inflamatórias da pele, designadamente na dermatite de contacto alérgica. Nesta patologia, são largamente utilizados com fins terapêuticos os glucocorticóides, fármacos com acção imunossupressora e anti-inflamatória. Neste trabalho, estudou-se o efeito do glucocorticóide dexametasona na activação do NF- κ B, na expressão da iNOS e na produção de NO, induzidas pela citocina epidérmica GM-CSF.

A citocina GM-CSF levou à activação do factor de transcrição NF- κ B e induziu a expressão da iNOS e a produção de NO. A dexametasona inibiu, de modo dependente da concentração, a produção de NO induzida pelo GM-CSF. A adição de

dexametasona à cultura de células, 30 minutos antes da estimulação com GM-CSF, inibiu de modo estatisticamente significativo, a expressão celular da iNOS. A nível intracelular, a dexametasona impediu o decréscimo dos níveis de I κ B- α , o que resultou no bloqueio da migração do NF- κ B para o núcleo, impedindo assim a sua ligação ao ADN e, conseqüentemente, a transcrição genética.

Estes resultados permitiram concluir que, nas células estimuladas com GM-CSF, a dexametasona inibiu a activação do factor de transcrição NF- κ B e bloqueou a expressão da iNOS e, conseqüentemente, a produção de NO. Em suma, estes resultados sugerem que, nas células dendríticas da pele, a dexametasona é um potente inibidor dos eventos intracelulares envolvidos na síntese de NO.

Capítulo 1

Introdução

1.1. CÉLULAS DENDRÍTICAS: DEFINIÇÃO E ASPECTOS GERAIS

As células dendríticas (DC), conhecidas normalmente como células profissionais apresentadoras de antígeno (APC), desempenham um papel fundamental na modulação da resposta imunológica. Estas células caracterizam-se pela capacidade de captar, processar e apresentar antígenos aos linfócitos T.

Na designação genérica de células apresentadoras de antígeno incluem-se não só as DC, mas também os macrófagos e os linfócitos B (Steinman *et al.*, 1991; Banchereau e Steinman, 1998). Após a interacção com o antígeno, as DC migram, de modo selectivo, dos tecidos periféricos para os órgãos linfóides secundários, onde interagem com os linfócitos T, activando-os e desencadeando a resposta imunológica. Durante este percurso, ocorre o processo de maturação, no qual as DC processam o antígeno e apresentam-no à sua superfície, associado a moléculas do complexo *major* de histocompatibilidade (MHC). Neste processo, as DC sofrem modificações fenotípicas e funcionais, tais como a perda da capacidade de captar e processar antígenos e o aumento da expressão de moléculas acessórias (Banchereau e Steinman, 1998; Caux, 1998).

As DC têm a particularidade de ser o único tipo de células capaz de activar linfócitos T naïve (nunca expostos previamente a um antígeno) e desencadear a resposta imunológica primária. Esta propriedade não é partilhada do mesmo modo por outras APC, tais como macrófagos e linfócitos B. Os linfócitos T naïve ao interagirem com as DC são activados e entram num processo de proliferação e diferenciação, desencadeando-se a resposta imunológica específica (Steinman *et al.*, 1991). Além de

actuarem especificamente na indução da resposta imunológica primária, as DC podem também exercer uma função importante na indução da tolerância imunológica, fundamental no caso da transplantação (Banchereau, 2000; Shortman e Liu, 2002).

Nos últimos anos, outras características biológicas das DC têm sido exploradas, com vista ao seu uso com fim terapêutico. Entre essas características, destaca-se o seu enorme potencial na activação da resposta imunológica contra células tumorais. Alguns ensaios clínicos realizados recentemente evidenciam a eficácia das DC na vacinação e imunoterapia contra o cancro e outras doenças infecciosas (Ribas, 2000).

1.1.1. ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO NO ORGANISMO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Para o conhecimento da fisiologia, função biológica e potencial terapêutico das DC contribuiu, de forma significativa, a tecnologia de isolamento e manipulação *in vitro* dos precursores das DC (Caux, 1998).

O isolamento de DC a partir dos tecidos é difícil e obtêm-se apenas quantidades reduzidas destas células. Este problema foi ultrapassado com a descoberta da obtenção de DC a partir de precursores hematopoiéticos CD34⁺, isolados da medula óssea, do sangue do cordão umbilical ou do sangue periférico. Também se recorre em larga escala à utilização de monócitos para a obtenção de DC (Inaba *et al.*, Saraya *et al.*, 1996; Garderet *et al.*, 2001).

Nos estudos realizados *in vitro*, têm sido utilizadas as DC de origem humana ou murina. O isolamento destas células a partir de outras origens, como por exemplo de macaco rhesus, chimpanzé, porco, cavalo e bovinos, é também viável, mas poucos estudos existem ainda com estas células.

Os dois sistemas de células dendríticas, de origem humana e murina, são muito semelhantes no que diz respeito a marcadores de superfície e padrões de produção de citocinas. As pequenas diferenças que têm sido referidas entre eles,

parecem ser devidas a diferenças na origem dos tecidos e ao método de isolamento e cultura utilizado (Shortman e Liu, 2002). Dadas as semelhanças entre os dois sistemas, as DC de origem murina têm sido largamente utilizadas no estudo da função destas células na regulação da imunidade específica. A seguir indicam-se as características comuns entre as DC humanas e as DC murinas:

- 1) originam-se a partir de células primordiais CD34⁺ da medula óssea**
 - 2) encontram-se no sangue e nos tecidos**
 - 3) têm a capacidade de captar e processar um antígeno em peptídeos antigénicos**
 - 4) expressam moléculas MHC classe II complexadas com peptídeos antigénicos**
 - 5) expressam moléculas co-estimuladoras**
 - 6) maturam e migram em resposta a sinais de perigo**
 - 7) respondem ao microambiente à sua volta com libertação controlada de quimiocinas e citocinas**
- (Lipscomb e Masten, 2002)

O desenvolvimento da metodologia para o isolamento e produção de DC em culturas *in vitro*, veio tornar possível a identificação de várias subpopulações de DC. Até à data, foram identificados vários subtipos de DC, com diferentes características, em diferentes tecidos e órgãos. No organismo humano, as DC distribuem-se pelos espaços intersticiais da maioria dos tecidos humanos não-linfóides (com excepção do cérebro, parte do olho e testículos), pelos órgãos linfóides periféricos ou secundários (gânglios linfáticos, baço e tecidos linfóides associados a mucosas), pelo sangue e pela linfa (Fig. 1.1). Foram ainda identificadas DC no timo (Hart *et al.*, 1997; Reid, 1998; Caux, 1998; Wu *et al.*, 2001; Lipscomb e Masten, 2002).

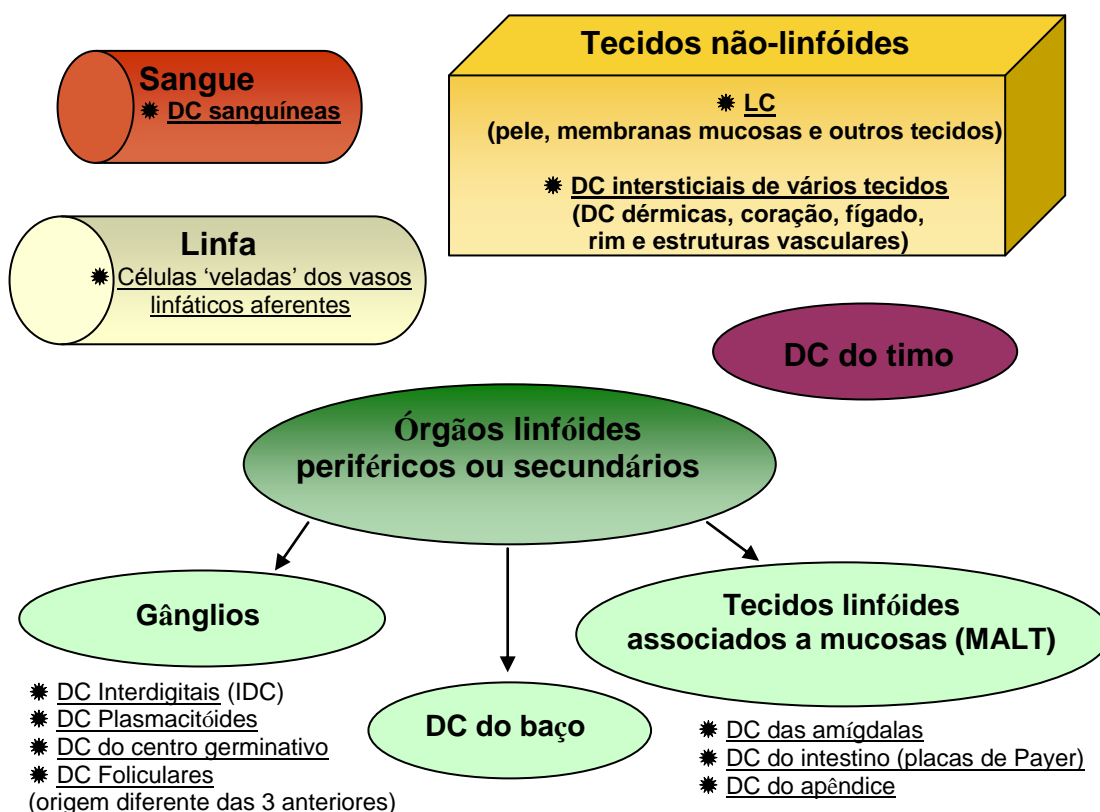


Fig. 1.1. – Distribuição das células dendríticas no organismo

1.1.2. PRECURSORES DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS E DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Inicialmente pensava-se que as DC tinham origem nos precursores da série mielóide e que resultavam da diferenciação dos monócitos. Nos últimos anos, surgiram várias evidências que demonstram a existência de, pelo menos, três vias para a diferenciação das DC:

- 1) a partir de precursores mielóides (série mielóide);
- 2) a partir de precursores linfóides (série linfóide);
- 3) a partir de um precursor comum CD11c⁺/MHC⁻.

Este último precursor, descoberto muito recentemente, não apresenta relação definida com nenhuma das outras duas séries de precursores. Constitui, assim, uma nova via de diferenciação celular, que parece poder originar tanto células de Langerhans como DC intersticiais (del Hoyo *et al.*, 2002).

A identificação de várias subpopulações de DC maduras pode corroborar a teoria da existência de vias distintas para a diferenciação das DC. Contudo, a origem e diferenciação destas células constitui, ainda hoje, um assunto de intenso debate (Liu, 2001; Lipscomb e Masten, 2002).

Na Fig. 1.2 estão representadas, de forma resumida, as conclusões dos estudos mais recentes sobre esta matéria (Grouard *et al.*, 1997; Geissman *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 1999; Banchereau, 2000; Wu *et al.*, 2001; Manz *et al.*, 2001; Liu, 2001; Shortman e Liu, 2002; del Hoyo *et al.*, 2002; Lipscomb e Masten, 2002). Nesta figura, indica-se esquematicamente o conjunto das células progenitoras das DC provenientes da medula óssea, as fases intermédias até à sua diferenciação no sangue e tecidos e, por último, as DC maduras com as respectivas designações com que são referidas na literatura. As designações DC1 e DCi equivalem às DC intersticiais, LC significa células de Langerhans e DC2 representa as DC plasmacitóides.

As DC constituem um grupo heterogéneo de células, diferindo entre si na localização anatómica, no fenótipo da superfície celular e na função. Contudo, estas células apresentam muitas características semelhantes entre si. Todas têm origem nas células progenitoras CD34⁺ da medula óssea, que se diferenciam e são conduzidas através da corrente sanguínea até aos tecidos onde se fixam, numa fase ainda de DC imaturas. Estas DC imaturas têm também a capacidade de captar antigénios e de responder a sinais extracelulares, tais como agentes patogénicos e citocinas inflamatórias, sofrendo maturação e migrando para os órgãos linfóides, onde interagem com linfócitos T (Banchereau e Steiman, 1998; Lipscomb e Masten, 2002).

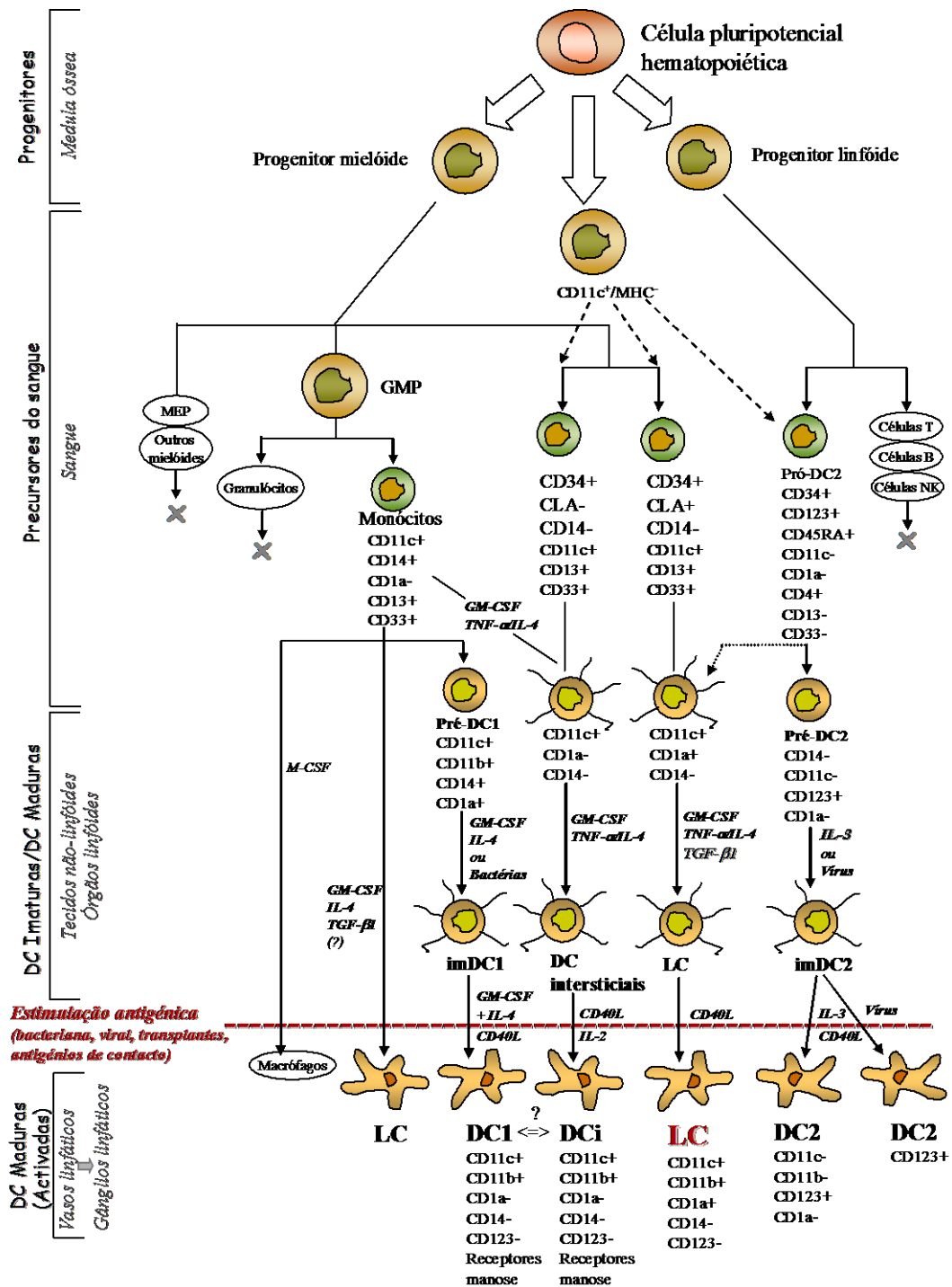


Fig. 1.2 – Diferenciação das células dendríticas a partir de precursores hematopoiéticos

Relativamente à função que as DC têm no organismo e com base em diferenças nos antígenos de superfície, estas células têm sido classificadas em: DC intersticiais, células de Langerhans e DC plasmacitóides (De Smedt *et al.*, 2001; Lipscomb e Masten, 2002). Os vários subtipos de DC respondem de modo diferente a produtos microbianos, produtos de origem viral, estímulos inflamatórios, antígenos de contacto ou transplantação. De igual modo, produzem citocinas diferentes e regulam de modo específico respostas dos linfócitos T. Para além da existência de diferentes precursores, há também factores endógenos e exógenos que modulam o desenvolvimento e a função das DC, tal como se pode inferir da Fig. 1.2. Verifica-se que muitos subtipos de DC permanecem num estado maduro mas latente, até serem activadas por produtos microbianos ou outros sinais de alerta. As fronteiras entre DC imaturas, DC maduras e DC activadas nem sempre são claras e bem definidas. A dinâmica entre estes diferentes estados das DC, em resposta a uma invasão microbiana ou a outros estímulos, pode determinar o balanço entre a tolerância e a imunidade (Shortman e Liu, 2002).

1.2. IMUNOBIOLOGIA DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

1.2.1. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

A identificação das DC baseou-se durante muito tempo, essencialmente, em aspectos morfológicos. Contudo, actualmente, são já conhecidas características funcionais que permitem fazer a distinção de diferentes subclasses de DC. Estes subtipos de DC funcionalmente distintos entre si, possuem também fenótipos antigénicos membranares distintos o que permitiu, não só isolar e caracterizar as diferentes DC, como também conhecer as suas potencialidades imunológicas no organismo (Liu, 2001; Shortman e Liu, 2002).

O fenótipo das DC sofre alteração ao longo da diferenciação e da migração. Por isto, o fenótipo das DC está dependente do local no organismo onde se encontram e, também, do seu estado funcional. Isto é, os marcadores de superfície apresentados pelas DC não são constantes, o que torna difícil definir fenótipos individuais dentro da imensa família das DC ou, eventualmente, usar determinados marcadores para uma possível dedução ontogénica (Makala e Nagasawa, 2002). Contudo, para um determinado estado de maturação das DC, é possível identificar várias subpopulações de DC, pelas características fenotípicas específicas que possuem (Lipscomb e Masten, 2002).

A capacidade para definir subpopulações de DC tem aumentado significativamente nos últimos anos; contudo, continua a ser uma área complexa, que suscita o debate permanente e a investigação constante.

1.2.1.1. Moléculas de reconhecimento do antigénio

As DC encontram-se distribuídas por todo o organismo, incluindo nos locais de entrada dos microorganismos. Inicialmente, participam na captação e no processamento de potenciais antigénios (imunidade inata) e, posteriormente, actuam

na activação dos mecanismos específicos de imunidade mediados por linfócitos T e B (imunidade adquirida) (Gordon, 2002). As interacções célula-célula entre DC, linfócitos T e células endoteliais são cruciais para todos os processos imunológicos. Para que as DC consigam captar e processar os antígenos e, de seguida, interagir com os linfócitos, é necessária a existência de moléculas que permitam e promovam o desempenho destas funções. Entre essas moléculas encontram-se receptores da superfície membranar envolvidos no reconhecimento e captação do antígeno. Estes receptores estão classificados de acordo com a actividade funcional em que participam. De entre os inúmeros receptores já identificados nas DC, seguidamente serão referidos apenas aqueles que são mais relevantes no que se refere à apresentação do antígeno ao linfócito (Hart *et al.*, 2001).

Receptores de reconhecimento padrão (PRR)

Os alvos de reconhecimento da imunidade inata são padrões moleculares comuns e conservados entre os microorganismos de uma dada classe, denominados por padrões moleculares associados a agentes patogénicos (PAMPs). Esta gama de moléculas com padrões estruturais comuns, existente à superfície de muitos microorganismos, está ausente da superfície das células dos mamíferos. Os receptores das células envolvidas na imunidade inata que reconhecem, e se ligam, aos PAMPs são denominados receptores de reconhecimento do padrão (PRR) (Janeway, 1989).

Estes receptores estão não só implicados no reconhecimento de ligandos exógenos durante as fases iniciais da resposta imunológica, mas podem também reconhecer ligandos endógenos durante o funcionamento normal dos tecidos. Existem vários tipos de PRR, entre os quais se destacam os receptores de manose (MR), os receptores 'Toll-like' (TLR) e o receptor DEC-205 (CD205) (Gordon, 2001). A seguir referem-se as principais características de cada um destes receptores.

Receptores de manose (MR)

Este receptor endocítico encontra-se expresso nos macrófagos e, por isso, é muitas vezes globalmente referenciado como receptor de manose dos macrófagos. Também existe nas DC e em algumas células endoteliais. Os ligandos dos MR foram encontrados numa grande variedade de bactérias, fungos e células infectadas com fungos e parasitas (Gordon, 2002).

Receptores 'Toll-like' (TLR)

Os membros da família TLR são receptores transmembranares, caracterizados por possuírem um domínio extracelular e outro intracelular (Rock, 1998), e desempenham uma função importante na resposta imunológica inata e no reconhecimento de agentes patogénicos estranhos ao organismo (microorganismos e outros). Assumem, assim, uma função única e essencial na imunidade, desempenhando um papel de grande importância na detecção da infecção microbiana e na indução da expressão de genes antimicrobianos. A especificidade dos TLR para produtos de origem microbiana permite detectar o tipo de infecção e direccionar uma resposta imunológica adquirida contra os antigénios invasores (Takeda e Akira, 2001).

Os TLR são expressos constitutivamente em DC imaturas derivadas da medula óssea. O reconhecimento de produtos microbianos pelos TLR desencadeia a maturação funcional destas células, levando ao início da resposta imunológica adquirida. Os TLR induzem também a expressão de várias citocinas pelas DC, incluindo a interleucina-12 (IL-12), a qual direcciona a diferenciação dos linfócitos T *helper* (ou auxiliares) naïve em células efectoras Th1 (Takeda e Akira, 2001; Medzhitov, 2001).

Receptor DEC-205 (CD205)

O receptor DEC-205 (ou CD205) apresenta um domínio estrutural de lectina e, ao ser expresso na membrana das DC, aumenta a sua capacidade captadora e apresentadora de antigénio (Kato *et al.*, 2000; Mellman e Steinman, 2001). Este e

outros receptores, estruturalmente pertencentes à família das lectinas, reconhecem domínios de carboidratos em microorganismos, resultando na sua internalização e processamento (Engering *et al.*, 2002).

Recentemente, tem sido demonstrada a existência de receptores de lectina que podem também comportar-se como moléculas de adesão e/ou moléculas sinalizadoras, regulando a migração das DC e a sua interacção com os linfócitos T (Figdor *et al.*, 2002, van Kooyk e Geijtenbeek, 2002). As moléculas de adesão serão debatidas adiante.

Receptores Fc

A opsonização, ou seja, a fagocitose facilitada, é um mecanismo importante na defesa antibacteriana. Na superfície das células fagocíticas existem moléculas proteicas designadas por receptores Fc (FcR), que se podem ligar à fracção Fc das imunoglobulinas G e E. Nos humanos, foram caracterizadas três classes distintas de receptores para a IgG (Fc γ RI, II, III) e duas classes de receptores para a IgE (Fc ϵ RI, II) (Schmitt *et al.*, 1990; Goldsby *et al.*, 2000).

Os receptores Fc permitem a captação específica dos antigénios opsonizados por diversas células. Geralmente, as DC expressam Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc ϵ RI. Estes últimos ligam-se à IgE, imunoglobulina altamente implicada em processos alérgicos (Shibaki, 1998).

1.2.1.2. Moléculas de adesão e migração celular

Antes da interacção com os linfócitos T, as DC circulam através dos tecidos, sofrendo alterações do seu fenótipo que se traduzem na expressão de moléculas de adesão e de receptores de quimiocinas (Hart *et al.*, 2001). A interacção das DC com outras células (nomeadamente linfócitos T) é, então, controlada por uma enorme variedade de moléculas expressas à sua superfície membranar, que reconhecem outras moléculas complementares na superfície da célula com a qual interagem.

Assim, a interacção inicial das DC com os linfócitos T naïve, que também se encontram em migração através dos gânglios linfáticos, depende deste tipo de comunicação célula-célula. A seguir referem-se algumas moléculas de superfície envolvidas nos mecanismos de adesão e migração das DC.

Moléculas de adesão

As moléculas de adesão intercelular (ICAMs), pertencentes à superfamília das imunoglobulinas, desempenham um papel proeminente na regulação da migração e activação, tanto das DC, como dos linfócitos T, no sistema imunológico. Para além dos ICAMs, existem outras moléculas de adesão, pertencentes a outras famílias, designadamente as integrinas e as lectinas (van Kooyk e Geijtenbeek, 2002). Na tabela 1 encontram-se especificadas algumas das moléculas de adesão com maior importância nas interacções entre DC e linfócitos T.

Tabela 1 – Moléculas de adesão: família, ligação e expressão

Molécula	Família	Ligando	Expressão
LFA-1 (antigénio 1 associado à função leucocitária)	<i>Integrinas</i>	ICAM-1 ICAM-2 ICAM-3	Linfócitos T APC
DC-SIGN (não-integrina captadora de ICAMs específica de DC)	<i>Lectinas</i>	ICAM-2 ICAM-3	DC
ICAM-1 (CD54)	<i>Imunoglobulinas</i>	LFA-1	Endotélio vascular APC (DC, LC)
ICAM-2 (CD102)	<i>Imunoglobulinas</i>	LFA-1 DC-SIGN	Endotélio vascular APC
ICAM-3 (CD50)	<i>Imunoglobulinas</i>	LFA-1 DC-SIGN	APC Linfócitos T

A E-caderina é também uma molécula de adesão, cuja expressão se encontra muito relacionada com as funções das células de Langerhans. A expressão da E-caderina diminui à medida que as LC migram, o que pode reflectir as suas

características únicas de interacção adesiva com o epitélio escamoso (Hart *et al.*, 2001).

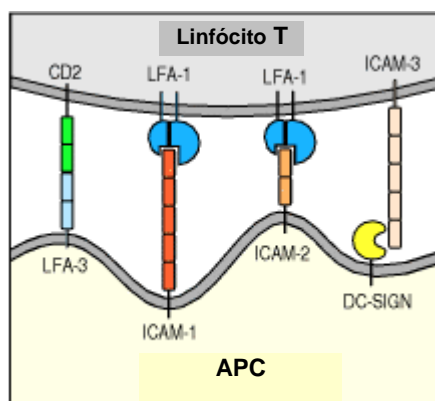


Fig. 1.3. – Interações entre ligandos das células dendríticas e dos linfócitos T

Na Fig. 1.3 estão representadas algumas interações entre moléculas de adesão. A mesma molécula pode ter vários ligandos e existir em diferentes tipos de células, tal como indicado na Fig. 1.3 e na tabela 1. Contudo, a ligação entre ICAM-3 e DC-SIGN é uma ligação específica que só ocorre entre linfócitos T e DC, enquanto que todas as outras interações ocorrem entre linfócitos T e todos os outros tipos de APC (DC, macrófagos e linfócitos B).

Receptores para quimiocinas

As quimiocinas são produzidas por células leucocitárias e endoteliais e constituem uma superfamília de pequenos peptídeos que contêm entre 90 e 130 resíduos de aminoácidos, sendo separadas em dois subgrupos distintos, C-C e C-X-C (Goldsby, 2001). A sua principal função é o recrutamento de células inflamatórias, nomeadamente DC, inicialmente para o local da inflamação onde as quimiocinas estão a ser produzidas e, posteriormente, para os tecidos linfóides (Oppenheim, 2002). As quimiocinas são reconhecidas por receptores CC (CCR) e CXC (CXCR) que medeiam

a sua acção. Até ao momento foram descritas mais de 50 quimiocinas e cerca de 14 receptores (Goldsby, 2001).

1.2.1.3. Moléculas de interacção entre células dendríticas e linfócitos T

Da interacção directa entre as DC e os linfócitos T resultam mudanças fenotípicas devido ao aumento na expressão de outras moléculas co-estimuladoras e funcionais (Fig. 1.4). Nos últimos anos têm vindo a ser identificadas diversas moléculas que, aparentemente, desempenham um papel importante na sinalização entre as DC e os linfócitos T (Hart *et al.*, 2001). A seguir, referem-se as características mais importantes de algumas moléculas de superfície implicadas neste tipo de interacção, as quais podem ser divididas em:

- moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86, CD40, CD40L)
- citocinas e seus receptores (IL-12 e IL-12R, GM-CSF e GM-CSFR)
- outras moléculas (CD83).

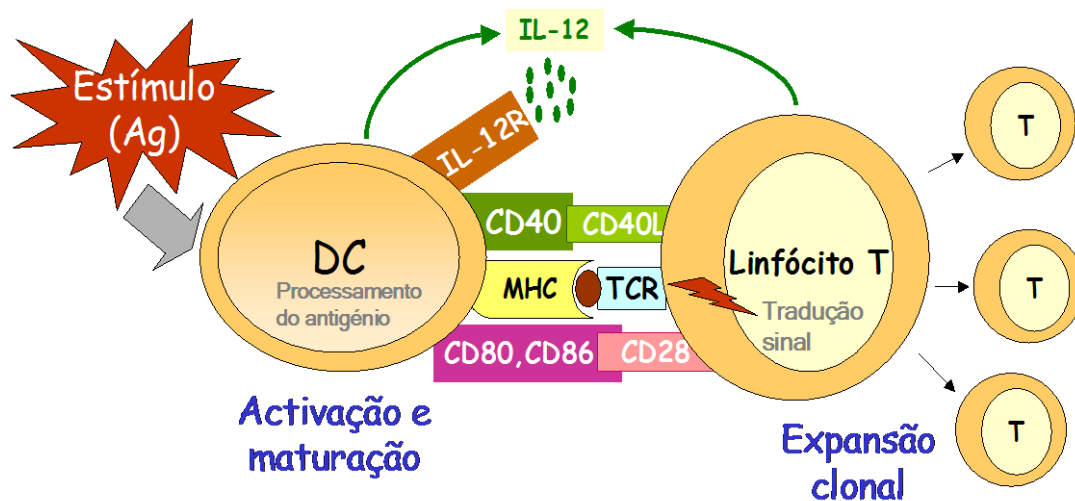


Fig. 1.4. – Moléculas de interacção entre células dendríticas e linfócitos T.

*Moléculas co-estimuladoras***Moléculas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86)**

As moléculas co-estimuladoras melhor caracterizadas e estruturalmente pertencentes à superfamília das imunoglobulinas, são as moléculas da família B7, ou seja, B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86). O CD80 e o CD86 foram os primeiros membros descritos desta grande família B7. Estas moléculas co-estimuladoras são expressas exclusivamente à superfície das células que têm a capacidade de estimular a proliferação dos linfócitos T, como é o caso das DC. A par da descoberta destas duas moléculas, foi caracterizada uma outra molécula co-estimuladora, o CD28, expressa nos linfócitos T. Esta molécula constitui o receptor dos linfócitos T para as moléculas B7, pertencendo também à família das imunoglobulinas. A ligação de moléculas B7 ao CD28 intensifica a expansão clonal de linfócitos T naïve (Janeway *et al.*, 2001).

A expressão das moléculas CD80 e CD86 aumenta após activação e maturação destas. Existem vários estímulos que podem induzir a expressão das duas moléculas ou apenas de uma delas. Entre eles encontram-se estímulos endógenos, como o factor estimulante do crescimento de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e o interferão- γ , e estímulos externos ao organismo, nomeadamente antígenos de contacto como o 2,4-dinitrofluorobenzeno (DNFB) ou o sulfato de níquel (NiSO₄) (Hart, 1997; Lipscomb e Masten, 2002).

CD40

O CD40 é um receptor de superfície, pertencente à superfamília dos receptores do factor de necrose tumoral (TNF-R). Este receptor possui capacidade para iniciar sinais de activação multifacetados em células dendríticas e linfócitos B. O seu ligando natural é uma glicoproteína membranar, do tipo TNF- α , conhecida como ligando do CD40 (CD40L ou CD154) (Moddycliffe *et al.*, 2000; Janeway *et al.*, 2001).

A expressão de CD40 e CD40L tem sido identificada numa grande variedade de células hematopoiéticas e não hematopoiéticas. O CD40 é expresso

constitutivamente em células com elevado potencial proliferativo, incluindo progenitores hematopoiéticos, células endoteliais e epiteliais (queratinócitos) e todas as APC (DC, macrófagos, linfócitos B). Nas DC sanguíneas e LC, o CD40 é expresso em baixas quantidades, aumentando após activação das células (Hart *et al.*, 2001). A expressão de CD40L parece ser restrita a linfócitos T, mastócitos, eosinófilos, basófilos, plaquetas e células *natural killer* (NK). Esta molécula é expressa de modo transitório quando estas células estão activadas (Moddycliffe *et al.*, 2000; Tong e Stone, 2003).

Após activação, os linfócitos T expressam proteínas responsáveis pela manutenção, ou modificação, do sinal coestimulatório responsável pela expansão clonal e diferenciação destas células. Entre essas proteínas encontra-se o ligando do CD40 (CD40L) (Janeway *et al.*, 2001). A interacção do CD40L dos linfócitos T naïve com o CD40 das DC promove a sobrevivência de ambas as células, tornando-se esta interacção crítica para a maturação das DC e para a activação dos linfócitos T (Banchereau *et al.*, 2000).

As DC, ao interagirem com os linfócitos T por intermédio das moléculas de superfície CD40 e CD40L, sofrem um processo de maturação que resulta no aumento da expressão das moléculas MHC classe II e de moléculas de superfície coestimuladoras (como o CD80 e CD86). Deste modo, as DC tornam-se aptas a apresentarem os antigénios e a activarem linfócitos T naïve (Frleta *et al.*, 2003). Esta interacção também induz a produção de uma variedade de citocinas incluindo TNF, IL-1, IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18, todas elas envolvidas na activação e proliferação das linfócitos T naïve (Banchereau *et al.*, 2000; Wesa e Galy, 2002).

Citocinas e seus receptores

As citocinas, tal como as quimiocinas, são um grupo de moléculas solúveis que participam na interacção entre DC e linfócitos T. A produção de citocinas pelas DC pode ser influenciada por diferentes estados de maturação/activação das mesmas.

IL-12 e receptor para IL-12 (IL-12R)

A interleucina 12 (IL-12) é uma citocina heterodimérica (IL-12p70), composta por duas subunidades, as proteínas p40 e p35). Esta citocina é produzida maioritariamente por células fagocíticas apresentadoras de antígenos, tais como DC, monócitos/macrófagos e algumas células B, em resposta a agentes patogénicos, ou a outros estímulos, como por exemplo alérgenos (Trinchieri, 1995; Warbrick *et al.*, 1999).

Os linfócitos T são as células por excelência que respondem à IL-12. Está descrita a produção de IL-12 por DC após interacção destas células com linfócitos T CD4 ou linfócitos T *helper* (Macatonia *et al.*, 1995; Yawalkar *et al.*, 1996).

Existem, pelo menos, três subtipos de linfócitos T *helper* CD4: Th0, Th1 e Th2. Os Th0 são também considerados linfócitos T naïve por nunca terem entrado em contacto com um antígeno e por produzirem citocinas características tanto de Th1 como de Th2 (Abbas *et al.*, 1996). A diferenciação em linfócitos Th1 ou Th2 é dirigida por citocinas exógenas presentes no momento da exposição antigénica, sendo o desenvolvimento de linfócitos Th1 promovido pela IL-12 e o de linfócitos Th2 pela IL-4. A IL-12 é considerada uma citocina pró-inflamatória e um agente imunomodulador; devido a estas propriedades, a IL-12 está presente tanto nas respostas precoces inatas não-específicas, como nas respostas imunológicas adaptativas específicas de antígenos (Trinchieri, 1995; Trinchieri e Gerosa, 1996).

A IL-12 medeia as actividades biológicas das DC através da ligação a um receptor específico da superfície celular. Este receptor da IL-12 (IL-12R) é um complexo funcional composto por duas subunidades tipo beta (IL-12R β 1 e IL-12R β 2) (Presky *et al.*, 1996). A subunidade IL-12R β 1 é amplamente expressa em células de origem hematopoiética, nomeadamente em células mononucleares do sangue periférico (Wu *et al.*, 1997, Jan), enquanto que a subunidade IL-12R β 2 é detectada apenas em células que respondem a IL-12 (Rogge *et al.*, 1997; Szabo *et al.*, 1997).

Os linfócitos T e as células NK são as células que, maioritariamente, respondem à IL-12 através das duas subunidades do seu receptor, a IL-12R β 1 e a IL-

12R β 2. Algumas DC também respondem a esta interleucina e expressam o seu receptor (Nagayama *et al.*, 2000). Recentemente, demonstrou-se ainda, que as DC podem produzir IL-12, o que sugere um efeito autócrino da IL-12 na maturação e função das DC (Kelleher e Knight, 1998).

Parte do trabalho de investigação apresentado nesta dissertação teve como ponto central a expressão de IL-12R pelas DC pertencentes à linha celular usada (FSDC); como tal, este assunto será aprofundado no capítulo respeitante a esse trabalho.

GM-CSF

O factor estimulante do crescimento de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) pertence a uma das famílias de citocinas envolvidas na produção e na própria função das células hematopoiéticas. O GM-CSF foi inicialmente identificado como um factor que levava à proliferação e diferenciação dos monócitos e granulócitos em experiências *in vitro*, tendo sido, posteriormente, demonstrada a sua influência na sobrevivência e função de granulócitos e macrófagos maduros. Muitas das funções *in vitro* do GM-CSF foram também observadas em experiências *in vivo*, tanto com modelos animais como em ensaios clínicos com humanos (Monfardini *et al.*, 2002).

O GM-CSF é, então, uma citocina multifuncional que modula o crescimento e a função da maioria das células leucocitárias. Em clínica é usado para reverter neutropenias associadas a tratamentos de quimioterapia ou a transplantes. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram ainda que o GM-CSF estimula os efeitos antimicrobianos e antitumorais dos macrófagos, estimula a reparação de tecidos após um traumatismo e promove as funções citotóxicas de algumas células, nomeadamente das células NK. No caso específico das DC, desde finais da década de 80 e início dos anos 90, que é reconhecido o papel fundamental do GM-CSF como mediador da sua diferenciação e crescimento a partir de células mononucleares do sangue periférico, assim como na sua viabilidade, maturação e função (Markowicz e Engleman, 1990).

O GM-CSF desempenha o seu papel principal em respostas fisiológicas e inflamatórias do organismo. Os linfócitos T activados, de fenótipo Th1 e Th2, constituem a maior fonte de GM-CSF, assim como de várias outras citocinas (IL-2, IL-3, IL-4, IFN- γ e TNF- β), sendo atingido um alto nível de produção quando ocorre activação do seu receptor (CD28) ou em resposta a sinais coestimulatórios provenientes das APC. Muitas outras células, tais como células endoteliais, fibroblastos, células epiteliais (como, por exemplo, os queratinócitos), macrófagos e mastócitos também podem produzir GM-CSF, em resposta a uma variedade de estímulos imunológicos e inflamatórios (Shannon *et al.*, 1997).

Em face da importância do GM-CSF para as DC, é natural que os seus receptores sejam muito abundantes nestas células, principalmente nas DC maduras, com aproximadamente 3000 locais de ligação/célula. O GM-CSF liga-se a um receptor heterodimérico (GM-CSFR) constituído por duas cadeias, uma alfa (GM-CSFR α) e outra beta (GM-CSFR β). A cadeia α confere especificidade da ligação do GM-CSF ao seu receptor, enquanto que a cadeia β não se liga ao ligando, mas altera a afinidade do receptor para o GM-CSF, passando-a de baixa a elevada afinidade. Esta cadeia β é responsável pela activação de cinases, despoletando a actividade cinásica e iniciando, deste modo, a transdução de sinal (Quelle *et al.*, 1994; Nicola *et al.*, 1997; Monfardini *et al.*, 2002).

Outras moléculas

CD83

A glicoproteína indutível CD83 é mais um membro da superfamília das imunoglobulinas, sendo expressa predominantemente por DC e linfócitos B. Esta molécula é um marcador de maturação das DC, mas as suas funções e os seus ligandos não foram ainda bem identificados. O facto da expressão do CD83 aumentar significativamente durante a maturação das DC, sugere que esta molécula pode ter um papel importante na indução da resposta imunológica, tal como acontece com

outras moléculas co-estimuladoras, como o CD80 e CD86. Recentemente tem sido demonstrado que o CD83 actua, também, como regulador da actividade biológica das DC (Hock *et al.*, 2001; Lechmann *et al.*, 2001, Lechmann *et al.*, 2002).

1.2.2. MECANISMOS DE MIGRAÇÃO, MATURAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR

As DC são as células apresentadoras de antígeno mais potentes na indução e regulação da resposta imunológica, tanto *in vivo* como *in vitro*. Os mecanismos celulares envolvidos nos processos de migração, maturação e diferenciação destas células, já foram referidos anteriormente, resumindo-se agora os pontos principais destes mecanismos.

As DC têm origem na medula óssea, migram para o sangue como uma população imatura e, posteriormente, formam uma extensa rede de DC intersticiais na maioria dos tecidos não linfóides. *In vivo*, as DC no estado imaturo residem na periferia, em tecidos não linfóides, e têm elevada capacidade de captar antígenos estranhos ao organismo, aos quais esses tecidos estão continuamente expostos (como é o caso da pele e mucosas) (Hart, 1997). Pelo contrário, têm fraca capacidade de apresentação antigénica e activação dos linfócitos T. Após captarem um antígeno, as DC intersticiais abandonam os tecidos periféricos e migram até aos tecidos linfóides secundários, onde chegam já no estado maduro. Nesta fase, possuem capacidade para uma potente estimulação dos linfócitos T naíve que aqui vão encontrar, interagindo com eles e induzindo a sua activação (Fig. 1.5) (Austyn, 2001).

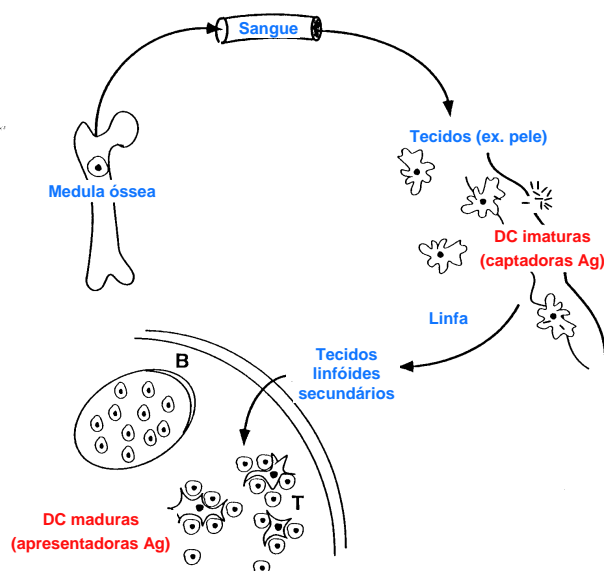


Fig. 1.5. – Ciclo das células dendríticas *in vivo*. Origem, circulação, localização, migração e maturação.

Em geral, as DC têm a capacidade de captar antígenos através de mecanismos mediados, ou não, por receptores. Podem, então, internalizar antígenos estranhos ao organismo por endocitose mediada por receptores ou por fagocitose (captação de partículas) e por pinocitose de fase fluída (captação de antígenos solúveis), a qual é inespecífica por não ser mediada por receptores (Lipscomb, 2002; Austyn, 2001). As DC têm um sistema endolisossomal desenvolvido para a formação de peptídeos a partir de partículas internalizadas. Após o contacto com um antígeno, as DC apresentam uma elevada taxa de biossíntese de moléculas da classe II do MHC, indispensáveis para a formação de complexos com os peptídeos antigénicos processados, os quais são posteriormente exocitados e apresentados na membrana citoplasmática (Davoust e Banchereau, 2000).

Durante o processo de maturação, as DC sofrem profundas mudanças fenotípicas e funcionais. Entre essas mudanças encontram-se a perda da capacidade para internalizar e processar antígenos e a perda da capacidade para sintetizar novas moléculas da classe II do MHC. Por outro lado, aumentam a expressão membranar de complexos MHC classe II-peptídeo, de moléculas co-estimuladoras e de moléculas de adesão intercelular. Neste processo, as DC modificam também o padrão de receptores de quimiocinas, diminuindo a expressão de receptores de quimiocinas inflamatórias, como por exemplo CCR1, CCR5, CCR6 e CXCR1 e aumentando a expressão de receptores de quimiocinas constitutivas linfóides, como é o caso de CXCR4, CCR4 e CCR7. Estes últimos receptores, em particular o CCR7, direccionam as DC para os tecidos linfóides (Parlato et al., 2001). Todas estas modificações ocorridas nas DC permitem a activação dos linfócitos T e consequente indução da resposta imunológica. As células com estas propriedades podem ser designadas DC maduras ou co-estimuladoras (Sallusto e Lanzavecchia, 1999).

Para além das características do antígeno em causa, existem outros factores no microambiente celular que dirigem a produção de citocinas primordiais pelas DC, permitindo o início e a condução da imunidade adquirida. Na grande maioria das

situações, a produção de IL-12 leva ao início de respostas Th1, enquanto que a produção de IL-4 inicia respostas Th2, com produção de IL-12 suprimida. As DC representam, assim, o veículo da imunidade, por activarem os linfócitos T naïve e determinarem a polarização destas células em populações Th1 ou Th2 (Lambrecht, 2001; Morse *at al.*, 2002).

O desenvolvimento de células a partir de um estado imaturo até um estado maduro engloba um processo altamente dinâmico, responsável pelas alterações migratórias, fenotípicas e funcionais das DC, e geralmente designado por maturação ou activação. Há uma grande variedade de estímulos, tais como mediadores inflamatórios, produtos microbianos e outros sinais de alerta, que podem levar a este processo de diferenciação/maturação das DC (Austyn, 2001; Flores-Romo, 2001; De Smedt, 2001; Liu, 2001; Lipscomb, 2002)

1.2.3. FUNÇÕES BIOLÓGICAS: IMUNIDADE VERSUS TOLERÂNCIA

Defende-se, actualmente, a teoria que as APC respondem ao ambiente envolvente transportando uma mensagem antigénica aos linfócitos T, instruindo-os a desenvolverem tolerância ou imunidade. As DC, em particular, são responsáveis não só pelo início da resposta imunológica contra antígenos estranhos, como também desempenham um papel preponderante na indução da tolerância contra antígenos próprios (Mougneau et al., 2002).

Após a produção na medula óssea (ou no fígado fetal), grande parte dos precursores das DC entram nos tecidos não linfóides onde vão residir transitoriamente antes de migrarem para os tecidos linfóides secundários. A sua principal função parece ser a indução da imunidade contra antígenos estranhos. Pelo contrário, os precursores das DC que entram no timo e se desenvolvem em DC, desempenham um papel crucial na indução da tolerância tímica ou central. No timo são apresentados aos linfócitos T todos os peptídeos antigénicos do nosso organismo de modo a que,

posteriormente, o nosso sistema imunológico os reconheça e não reaja contra eles. Actualmente, considera-se que as DC do timo são responsáveis por esta tolerância aos antígenos próprios. No entanto, pode haver antígenos próprios que não passam por este órgão, escapando a esta selecção negativa. Alguns destes antígenos próprios podem tornar-se potencialmente patogénicos (por exemplo metabolitos de degradação celular, células apoptóticas, entre outros), sendo processados como sinal de alerta para o organismo, com subsequente formação de linfócitos T autoreactivos. Este processo pode ser o início e a causa de doenças auto-imunes, caso estes linfócitos não sejam eliminados (Lipscomb e Masten, 2002). É, então, necessária a existência de tolerância fora do timo, de modo a silenciar as respostas imunológicas induzidas por antígenos próprios que escaparam à selecção negativa. Dados recentes indicam a existência de um subtipo de DC que pode entrar directamente nos tecidos linfóides secundários a partir do sangue, apresentando uma função reguladora e contribuindo para a indução ou manutenção da tolerância extra-tímica ou periférica (Hart, 1997; Larregina e Falo, 2001; Mougneau *et al.*, 2002).

Actualmente, a indução da tolerância é um assunto de intensa investigação pelas implicações que tem na prevenção de doenças auto-imunes e no controlo da rejeição de órgãos transplantados.

1.2.3.1. Dermatite do contacto alérgica

A dermatite de contacto alérgica (DCA) é uma forma de hipersensibilidade retardada, resultante de uma reacção imunológica mediada por linfócitos T. Esta reacção imunológica é dirigida, especificamente, contra substâncias antigénicas que entram em contacto com a pele e reagem com as estruturas epidérmicas. Estas moléculas são captadas e processadas pelas LC epidérmicas, APC por excelência do sistema imunológico cutâneo (Janeway *et al.*, 2001; Kimber e Dearman, 2002).

A imunidade adquirida evoluiu de modo a reagir principalmente contra infecções e células malignas. A DCA é um caso em que o organismo reage também

contra substâncias antigénicas ambientais. Para que haja uma reacção alérgica de contacto é necessário que substâncias químicas ambientais entrem em contacto com o indivíduo susceptível. Estas substâncias ocorrem naturalmente na natureza ou são de origem sintética. Têm baixo peso molecular, uma vez que necessitam de penetrar na pele para serem captados e processados pelas LC, de modo a serem reconhecidos como antigénios capazes de induzir uma resposta imunológica. Um dos antigénios de contacto mais potentes, o DNFB, sensibiliza a maioria das pessoas e não ocorre naturalmente na natureza; o níquel, existe no meio ambiente e não provoca hipersensibilidade a todas as pessoas que entram em contacto com este alergeno de contacto. Apesar disso, o níquel continua a liderar a lista internacional de sensibilizadores de contacto indutores de DCA, dado existir em variadas ligas com as quais contactamos diariamente, ao contrário do DNFB, que tem origem sintética e é utilizado para fins experimentais. Todos os dias são descobertas novas substâncias indutoras de DCA (Basketter *et al.*, 2002).

A DCA é composta por duas fases principais: a fase de sensibilização e a fase efectora. A fase inicial da DCA corresponde à chamada fase de sensibilização em que o antigénio de contacto é apresentado ao sistema imunitário. Esta fase é de extrema importância uma vez que vai determinar a reactividade futura do indivíduo a esse alergeno. É também chamada fase de indução, durante a qual é criada a memória imunológica para determinado antigénio de contacto. A fase efetora ocorre quando um indivíduo previamente sensibilizado entra novamente em contacto com o composto. Nesta situação, já existem em circulação no organismo, linfócitos T direccionados para um determinado tipo de resposta imunológica e que, entrando de novo em contacto com o alergeno, proliferam e induzem uma cascata de reacções inflamatórias na área de pele exposta. As LC têm um papel preponderante na apresentação antigénica aos linfócitos T (Enk, 1997; Krasteva *et al.*, 1998; Gonçalo, 1998).

1.3. CÉLULAS DENDRÍTICAS E IMUNIDADE DA PELE

Ao longo da evolução, os organismos superiores têm desenvolvido mecanismos de defesa específicos e não-específicos para protecção contra agressores estranhos. Os mecanismos não-específicos incluem uma primeira linha de defesa representada por barreiras mecânicas e produtos de secreção. Quando as barreiras epiteliais sofrem quebras na sua continuidade, são activadas respostas inflamatórias não-específicas e respostas imunológicas adaptativas. A resposta imunológica adaptativa caracteriza-se por especificidade, memória e capacidade de discriminação entre os antígenos próprios do organismo (antígenos próprios) e os antígenos estranhos ao organismo.

Externamente, a pele e, internamente, as membranas mucosas, constituem estas primeiras barreiras mecânicas totalmente equipadas para desencadear respostas inflamatórias não-específicas e respostas imunológicas específicas. A capacidade coordenada das células imunológicas cutâneas em iniciar e regular a intensidade da resposta imunológica da pele, de modo a manter a sua homeostase, levou a que se considerasse a pele como um órgão imunologicamente competente (Larregina e Falo, 2001).

1.3.1. CÉLULAS DE LANGERHANS: CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E MORFOLÓGICAS

As células de Langerhans (LC) são células dendríticas imaturas, estrategicamente localizadas nos epitélios estratificados, tais como os epitélios da pele, da cavidade oral, da faringe, do esófago, das vias aéreas superiores e ainda noutros tecidos (Larregina e Falo, 2001; Janeway *et al.*, 2001; Anjuere, 2000, Blood).

As LC da pele foram inicialmente descritas por Paul Langerhans, como neurónios intraepiteliais, em 1868. Estas células residem na epiderme, onde formam uma rede intraepitelial com função sentinela (Banchereau e Steinman, 1998).

Representam 2-4% do total da população de células epidérmicas e a sua densidade varia entre, aproximadamente, 200 e 1000 células/mm² de superfície epidérmica, dependendo da área anatómica (mais abundantes na pele da face e do pescoço) (Berman *et al.*, 1983; Stingl, 1990; Banchereau e Steinman, 1998).

A nível ultraestrutural, o organelo citoplasmático principal, que representa uma característica única das LC, é o grânulo de Birbeck (BG), uma estrutura membranar, trilaminar e em forma de bastão, inicialmente descrita em 1961 por Birbeck. Apesar da sua função não estar ainda bem determinada, existem evidências de que este organelo possui a capacidade de captar antigénios (Larregina e Falo, 2001). Recentemente, foi descoberta nas LC uma lectina, a Langerina, cuja função principal parece ser a indução da formação dos BG. Esta lectina é expressa à superfície membranar das células mas, após contacto com um antigénio exterior, é rapidamente internalizada, parecendo ser transformada em grânulos de Birbeck (Valladeau *et al.*, 2002). Além dos BG, as LC apresentam outras características particulares: núcleo recortado, extensa região de Golgi e elevado número de mitocôndrias e lisossomas (Ruco, 1989; Teunissen *et al.*, 1990; Zambruno *et al.*, 1995).

As LC epidérmicas constituem uma população de DC com fenótipo distinto. Geralmente não apresentam marcadores de linhagem específicos e, por isso, são definidas como populações leucocitárias que expressam a molécula CD45 e os marcadores mielóides CD13 e CD33 (Tabela 2). A expressão de Langerina está intimamente relacionada com as LC (Larregina e Falo, 2001; Valladeau *et al.*, 2001).

Na tabela 2 indicam-se alguns marcadores da superfície membranar e outras moléculas citoplasmáticas, que caracterizam o fenótipo das LC. Pode-se também observar a expressão destas moléculas em LC imaturas, as quais são utilizadas na identificação destas células (Teunissen *et al.*, 1990; Zambruno *et al.*, 1995; Banchereau e Steinamn, 1998; Anjuere, 1999).

Tabela 2 – Marcadores de superfície e outras moléculas das LC

Marcadores de superfície e outras moléculas das LC	Expressão nas LC imaturas
CD13, CD33 – marcadores mielóides	+++
CD1a, CD1c, CD11c	+++ ↵
MHC classe II (HLA-DR, -DP e -DQ)	+++ ↵
MHC classe I (HLA-A, B e C)	+ / ++
DEC-205	+++ ↵
Langerina (CD207)	+++ ↵
Ag intracitoplasmático Lag	+++ ↵
Grânulos de Birbeck (BG)	++ ↵
Receptores Fcγ e Fcϵ - relacionados com a captação de antígenios	+++
CD40, CD80, CD86, e CD83	- / +
LFA-1 - ag associado à função leucocitária	-
LFA-3 - molécula de adesão intercelular	+ / ++
ICAM-1 – molécula de adesão intercelular	+ / ++
ICAM-3 – molécula de adesão intercelular	+++

↵ Moléculas usadas na identificação das LC

- / + expressão inexistente ou fraca

+ / ++ expressão fraca a moderada

+++ expressão elevada

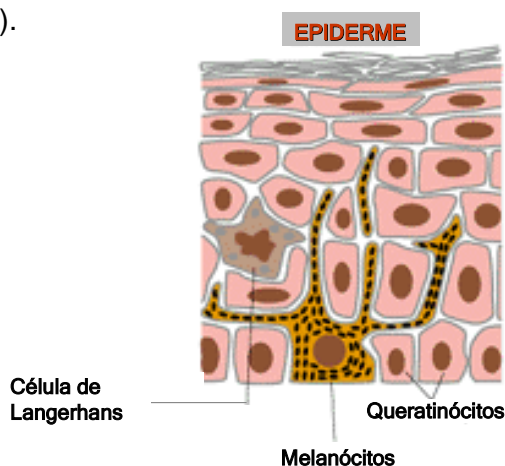
As LC em cultura sofrem profundas alterações, alterando-se drasticamente o fenótipo em apenas um dia de cultura. As células perdem os grânulos de Birbeck e o receptor Fc γ e ocorre um aumento da expressão de moléculas com funções essenciais na apresentação antigénica (MHC classe II, ICAM-1, ICAM-3, LFA-3, MHC classe I, CD40, CD80, CD86) (Banchereau e Steinamn, 1998; Anjuere, 1999).

1.3.2. MATURAÇÃO E FUNÇÃO IMUNOESTIMULATÓRIA DAS CÉLULAS DE LANGERHANS

Tal como acontece com outras DC, a maioria das LC da epiderme migra para os gânglios linfáticos de drenagem após um estímulo imunológico forte, infeccioso ou de outra etiologia. As LC iniciam, então, um percurso no qual se diferenciam em células dendríticas maduras, unicamente destinadas à apresentação dos peptídeos antigénicos e à activação dos linfócitos T naïve e de memória. Nos gânglios linfáticos, rapidamente perdem a capacidade de captar e processar antígenos, sintetizando novas moléculas MHC para eficaz apresentação dos peptídeos antigénicos. Neste processo de maturação, as LC aumentam a expressão de moléculas co-estimuladoras e moléculas de adesão que irão permitir e facilitar a interacção com os linfócitos T (Banchereau e Steinamn, 1998).

Em todo este processo de maturação funcional e aquisição de potencial imunoestimulatório, o GM-CSF é essencial para as LC. Os queratinócitos, células vizinhas das LC epidérmicas (Fig. 1.6), são uma fonte rica em citocinas, em particular de GM-CSF, produzido constitutivamente ou em resposta a estímulos internos ou externos ao organismo (Kimber *et al.*, 1995). Assim, por exemplo, em situações de contacto com estímulos externos, como um antígeno de contacto, os queratinócitos rapidamente produzem GM-CSF, que induz a completa maturação e activação das LC, permitindo-lhes a interacção com os linfócitos T, de modo a desencadear a resposta imunológica (Kimber e Dearman, 1996).

Fig. 1.6. – Composição celular da epiderme: células de Langerhans, queratinócitos e melanócitos.



1.4. SÍNTESE E FUNÇÃO BIOLÓGICA DO ÓXIDO NÍTRICO

1.4.1. FUNÇÕES FISIOLÓGICAS E FISIOPATOLÓGICAS DO ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico é um gás, geralmente conhecido pela sua fórmula química NO ou, mais correctamente, NO[•], sendo por isso definido como um radical livre. O NO é uma molécula altamente difusível e muito reactiva, diferenciando-se do agente anestésico óxido nitroso (N₂O), que é extremamente estável. Até 1987, o NO era apenas conhecido como um constituinte tóxico dos fumos poluentes da exaustão dos automóveis, contribuindo para a poluição das grandes cidades (Farrel e Blake, 1996). Em 1987, descobriu-se que o factor relaxante derivado do endotélio, descrito até então como um agente lábil mediador da vasodilatação, era idêntico ao NO (Palmer *et al.*, 1987). Em seguida, descobriu-se que esta molécula biologicamente activa era produzida por diferentes tipos de células e que desempenhava diversas funções, envolvidas tanto em processos fisiológicos como patológicos. Entre essas funções incluem-se a modulação da vasodilatação, da agregação plaquetar, da actividade citotóxica dos macrófagos activados e da neurotransmissão (comunicação neuronal). Além disto, todas as células envolvidas directa ou indirectamente na imunidade e inflamação sintetizam NO, nomeadamente células apresentadoras de antígeno, queratinócitos, monócitos e macrófagos, células endoteliais e epiteliais, entre outras. A produção de NO biologicamente significativa por linfócitos T é ainda assunto de debate (Farrel e Blake, 1996; Coleman, 2002).

Em resumo, o NO actua em três sistemas biológicos de primordial importância: sistema cardiovascular, sistema nervoso e sistema imunológico. No sistema imunológico, o NO participa na destruição de microorganismos infecciosos, através dos seus efeitos citotóxicos resultantes da elevada concentração atingida no local de produção (Coleman, 2001; Marletta e Spiering, 2002; Brennan e Moncada, 2002). O NO tem sido nos últimos anos objecto de intensa pesquisa em muitos campos da

medicina e da ciência, por ser um intermediário metabólico envolvido em dois campos de acção de extrema importância nos sistemas biológicos: mensageiro através do qual as células comunicam entre si e molécula com funções críticas na imunidade e inflamação.

1.4.2. SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO E ISOFORMAS DA SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO

Nos mamíferos, o óxido nítrico endógeno é sintetizado enzimaticamente a partir de L-arginina e de oxigénio, originando NO e L-citrulina (Fig. 1.7). Esta reacção é catalizada pela enzima sintase do óxido nítrico (NOS), da qual são conhecidas três isoformas distintas. Duas destas isoformas são expressas constitutivamente nas células e designam-se, respectivamente, por NOS-1 ou NOS neuronal e por NOS-3 ou NOS endotelial. A outra isoforma cuja expressão é induzida em consequência da activação celular por estímulos, muitas vezes imunogénicos, designa-se por NOS-2 ou indutível (Bredt, 1999).

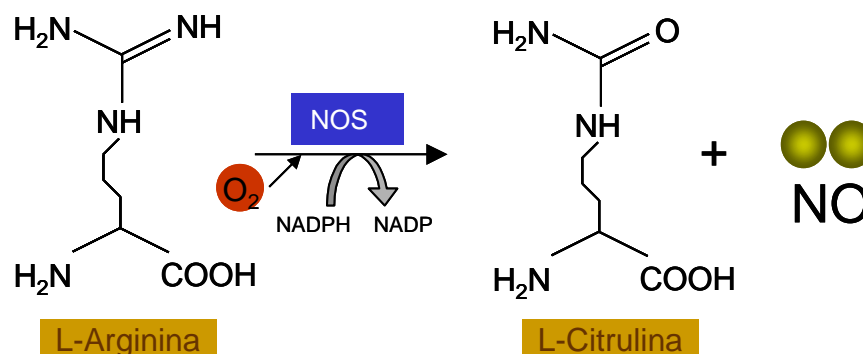


Fig. 1.7. – Reacção de síntese do óxido nítrico (NO) catalisada pela sintase do óxido nítrico (NOS).

A actividade enzimática das isoformas NOS-1 e NOS-3, constitutivamente expressas, é dependente de cálcio intracelular. Por isso, os estímulos extracelulares

que causam o aumento da concentração de cálcio intracelular levam à formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina que se liga a domínios específicos destas isoformas constitutivas produzindo a formação temporária de NO, que desempenha no organismo funções fisiológicas ou moduladoras. Em resposta a um estímulo fisiológico, o NO é gerado rapidamente e de modo transitório em baixas concentrações (ordem dos picomolar, 10^{-12}M). Esta produção de NO ocorre, nomeadamente, nas células endoteliais e neurónios onde existem as isoformas NOS-1 e NOS-3, respectivamente. O NO assim produzido induz respostas rápidas e transitórias nas células alvo, nomeadamente em células do músculo liso, neurónios e plaquetas (Farrell e Blake, 1996; Bredt, 1999; Coleman, 2002).

Pelo contrário, em respostas imunológicas e inflamatórias há indução da expressão da isoforma indutível NOS-2 ou iNOS; neste caso, há uma elevada produção de NO (da ordem dos nanomolar, 10^{-9}M), relativamente lenta e mantida constante durante horas ou dias, uma vez que depois de expressa esta isoforma permanece activa continuamente. A actividade da iNOS não é dependente de cálcio e a expressão desta enzima requer a activação transcricional. Os efeitos imunológicos do NO são maioritariamente indirectos, sendo mediados pelas espécies reactivas de nitrogénio que se formam, devido à oxidação do NO na presença de oxigénio (Coleman, 2001; Coleman, 2002).

1.4.2.1. Expressão da isoforma indutível da sintase do óxido nítrico

A proteína citoplasmática iNOS pode ser expressa em diversos tipos de células incluindo as DC, macrófagos, células endoteliais, células do músculo liso vascular, células polimorfonucleares, fibroblastos, entre outras (Farrel e Blake, 1996).

A iNOS, enzima principal da biossíntese do NO em processos imunológicos e inflamatórios, não existe nas células em repouso e é expressa após activação celular (Bogdan, 2001). Entre a activação das células e a produção de NO decorrem várias horas, o que reflecte o tempo necessário para a síntese do ARNm e da proteína

(Coleman, 2002). Esta activação celular leva à transcrição dos genes que codificam para a iNOS e é induzida por citocinas específicas, como a IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , ou por outros factores exógenos ao organismo, como por exemplo produtos microbianos como o lipopolissacarídeo (LPS), produzidos em situações inflamatórias ou infecciosas (MacMicking, 1997; Bredt, 1999). Deste modo, a iNOS medeia as funções do NO no sistema imunológico. O gene que codifica para a iNOS está sob controlo do factor nuclear de transcrição NF- κ B (Pahl, 1999), o qual desempenha um papel fundamental em respostas celulares inflamatórias e imunológicas (Pfeilschifter *et al.*, 1996).

1.4.3. ACTIVAÇÃO DE FACTORES DE TRANSCRIÇÃO E EXPRESSÃO GENÉTICA

1.4.3.1. Factores de transcrição: Família NF- κ B/Rel

A família de factores de transcrição NF- κ B/Rel tem um papel fundamental na imunidade, inflamação, crescimento, desenvolvimento e morte celular. Pela primeira vez em 1986, Sen e Baltimore identificaram nos linfócitos B um factor nuclear (designado por NF- κ B) que se ligava ao ADN no local activador da transcrição dos genes das cadeias leves (do tipo κ) das imunoglobulinas. Posteriormente, foram identificados, nas regiões promotoras de vários genes, locais funcionais de ligação do NF- κ B. Esta família NF- κ B/Rel dos factores de transcrição eucariotas é constituída pelas subunidades proteicas c-Rel, RelA (p65), RelB, NF- κ B1 (p50) e NF- κ B2 (p52), estruturalmente relacionadas e que se distinguem pela afinidade de ligação ao ADN e pela capacidade de formarem entre si homo- e heterodímeros específicos (Baldwin Jr, 1996).

Na maioria das células, o complexo de transcrição do NF- κ B está presente no citoplasma ligado a proteínas inibitórias, globalmente designadas por I κ B, que o mantêm numa forma inactiva ou latente. A activação de vias de sinalização intracelular accionadas por factores biológicos e condições ambientais, podem activar os dímeros do NF- κ B, através da degradação do I κ B. A degradação desta proteína altera a

estrututra conformacional dos dímeros do NF- κ B, ficando expostas as sequências de localização nuclear, que permitem a migração dos dímeros para o núcleo. Estes dímeros ligam-se a sequências específicas do ADN, colectivamente denominadas por κ B, regulando a expressão genética (Baldwin Jr, 1996; Chen e Ghosh, 1999; Cyert, 2001). Até à data forma já identificados mais de 150 genes activados pelo NF- κ B, entre os quais se encontram os genes que codificam para citocinas e factores de crescimento, proteínas de resposta de fase aguda, imunorreceptores, factores de transcrição, moléculas de adesão celular, reguladores da apoptose, entre outros. Estes dados demonstram que grande parte das proteínas codificadas pelos genes alvo do NF- κ B participam na resposta imunológica (Pahl, 1999).

As vias de sinalização intracelular que regulam o desenvolvimento e actividade das DC não estão ainda bem esclarecidas. Recentemente tem sido demonstrado que os membros da família do NF- κ B estão envolvidos na diferenciação e maturação das DC, o que origina modificações funcionais nestas células que perdem a capacidade de processar o antigénio e adquirem a capacidade o apresentar (Baltathakis *et al.*, 2001; Koski *et al.*, 2001). Outras famílias de factores de transcrição parecem estar envolvidas na imunobiologia das DC, mas não serão referidas porque não estão no âmbito do trabalho realizado.

A activação inapropriada e prolongada do NF- κ B tem sido associada a diversas doenças inflamatórias e, até mesmo, a transformações neoplásicas. Por isto, este factor de transcrição tem sido apontado como um potencial alvo terapêutico para utilização em lesões de tecidos e órgãos (Zingarelli *et al.*, 2003).

1.4.4. O ÓXIDO NÍTRICO E A IMUNOBIOLOGIA DA PELE

O NO está profundamente implicado na biologia da pele. A pele é, por excelência, um local de actividade imunológica importante devido à constante exposição a condições ambientais, tais como stress físico, traumatismos, substâncias

químicas irritantes ou sensibilizadoras e microorganismos infecciosos. Por isto, ocorre constantemente na pele um conjunto de reacções imunológicas, que permite a manutenção das defesas adequadas (Bruch-Gerharz *et al.*, 1998). Foi demonstrado que o NO desempenha, então, um papel preponderante na patogénese da DCA durante a fase inflamatória. Este facto parece estar relacionado com a síntese de citocinas pró-inflamatórias pelas LC e pelos linfócitos T, as quais contribuem para a síntese da iNOS e, conseqüente, produção de NO (Sahin *et al.*, 2001).

1.4.5. MECANISMO DE ACÇÃO DOS GLUCOCORTICÓIDES NO TRATAMENTO DA DERMATITE DE CONTACTO ALÉRGICA

Os glucocorticóides são largamente usados como agentes imunossuppressores e anti-inflamatórios. Vários estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que estes fármacos inibem a expressão de várias citocinas, moléculas de adesão e enzimas envolvidas em processos inflamatórios.

Os glucocorticóides sintéticos dexametasona e prednisona são exemplos de fármacos que controlam a activação de genes envolvidos nos processos inflamatórios. A diminuição da expressão destes genes é obtida pela repressão de factores de transcrição, ou mais concretamente, pela inibição das vias de sinalização que levam à activação de determinado factor de transcrição. O NF- κ B é um factor de transcrição reprimido pela acção dos glucocorticóides, o que resulta na diminuição da actividade transcricional de genes, entre os quais se inclui o gene que codifica a iNOS (Yamamoto e Gaynor, 2001; Pahl, 1999). Estes dados explicam, pelo menos em parte, a acção farmacológica dos glucocorticóides nos processos inflamatórios, como por exemplo a DCA, tendo sido por isso motivo do nosso interesse estudar e conhecer melhor os mecanismos através dos quais a dexametasona actua nas DC.

1.5. OBJECTIVOS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho teve como objectivo conhecer os mecanismos implicados na activação das células dendríticas da pele quando expostas a alérgenos de contacto. O conhecimento actual sobre a imunobiologia das DC mostra claramente o papel importante destas células na fase inicial de sensibilização da dermatite de contacto alérgica. Com a realização deste estudo pretendeu-se identificar alterações do padrão de proteínas induzidas por alérgenos de contacto e pela citocina epidérmica GM-CSF e conhecer o efeito desta citocina na sinalização intracelular em células dendríticas da pele. Para a realização deste estudo, utilizou-se como modelo experimental uma linha celular (FSDC), obtida a partir de células dendríticas da pele de feto de rato e modificada por um vector retroviral.

Na primeira parte do trabalho (Capítulo 3), estudaram-se alterações do padrão de proteínas membranares resultantes da estimulação das DC com alérgenos de contacto e com a citocina epidérmica GM-CSF. Foi também usado um composto não-sensibilizador, como controlo negativo. Estas alterações em determinadas proteínas membranares, provocadas pelos alérgenos de contacto e pelo GM-CSF, são indício da activação das DC que, neste estado de activação, serão responsáveis pela fase inicial da DCA. Deste modo, poder-se-ão detectar potenciais alérgenos de contacto.

Na segunda parte do trabalho (Capítulo 4), estudou-se a acção da citocina epidérmica GM-CSF, na activação do factor nuclear de transcrição kappa B (NF- κ B) e na expressão de uma proteína envolvida em processos inflamatórios, a isoforma indutível da sintase do óxido nítrico (iNOS). Nesta parte do trabalho investigou-se, também, o efeito da dexametasona nos referidos processos, dado tratar-se de um fármaco glucocorticóide com reconhecida actividade anti-inflamatória e imunossupressora.

Compreendendo melhor os mecanismos responsáveis pelo início da DCA assim como o modo de acção de alguns fármacos, será possível no futuro delinear

estratégias terapêuticas capazes de controlar de modo mais eficaz esta patologia. Por outro lado, a expressão de moléculas de superfície membranar representativas de marcadores de activação das DC, pode ser útil na definição de parâmetros indispensáveis à determinação do potencial alergénico de substâncias químicas ambientais. Este tipo de estudos integra-se na estratégia actual de procurar desenvolver metodologias *in vitro* para identificação de potenciais alérgenos de contacto, recorrendo a modelos celulares que funcionem como alternativas credíveis ao uso de testes preditivos com animais.

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2.1. Cultura de células dendríticas da pele de feto de rato (FSDC)

As células dendríticas da pele de feto de rato (células FSDC) foram gentilmente cedidas pelo Dr. G. Girolomoni (Laboratório de Imunologia, Instituto Dermatologico dell'Immacolata, IRCCS, Roma, Itália). As culturas foram mantidas a 37°C, sob uma atmosfera humidificada com 5% de CO₂ e 95% de ar, e diluídas 1:3 de 3 em 3 dias. As células foram cultivadas em meio de cultura de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), suplementado com soro fetal bovino a 10% (v/v), L-glutamina a 1% (m/v), penicilina (100 unidades/ml) e estreptomicina (100 µg/ml), e tamponizado com bicarbonato de sódio 36 mM e HEPES 25 mM, pH 7,4.

Para a realização das experiências, as células aderentes foram tratadas com uma solução de tripsina a 0,05% (m/v) e EDTA 0,02% (m/v) em tampão fosfato salino¹ (PBS), durante aproximadamente 3 minutos e centrifugadas a 180 x g numa centrífuga Sorvall RT 6000 D durante 5 minutos. O sedimento foi ressuspenso em IMDM suplementado e procedeu-se de seguida à determinação da viabilidade e densidade celular. Para o efeito diluiu-se um pequeno volume de suspensão celular na proporção de 4:1 (v/v) com uma solução de azul de tripano a 0,4% e aguardou-se em seguida 1 a 2 minutos. Após este período, necessário para o corante penetrar nas células com membrana fragilizada, colocou-se uma gota da suspensão celular na câmara dum hemocítmetro e procedeu-se à contagem, num microscópio óptico, do número de

¹ Tampão fosfato salino (PBS): NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄.2H₂O 9,1 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4

células coradas (células com a membrana citoplasmática danificada) e do número total de células nos quatro quadrantes. Calculou-se a percentagem de viabilidade celular, normalmente superior a 96%, bem como a densidade da suspensão inicial, tendo em atenção as diluições efectuadas e as características do hemocitómetro.

2.2. Condições de cultura

As células usadas para os ensaios de MTT e quantificação de nitritos foram cultivadas a uma densidade de $0,2 \times 10^6$ células/cm² em placas de cultura com 48 compartimentos. Para os ensaios de imunocitoquímica as células foram cultivadas em lamelas de vidro, previamente colocadas em placas de cultura com 48 compartimentos, a uma densidade de $0,2 \times 10^6$ células/cm². Nas experiências de EMSA e *Western blot* as células foram cultivadas a uma densidade de $0,2 \times 10^6$ células/cm² em placas de cultura com 6 compartimentos. Para o ensaio de *Northern blot* cultivaram-se as células a uma densidade de $0,2 \times 10^6$ células/cm² em caixas de *Petri* com 60 mm de diâmetro.

2.3. Ensaio de redução do sal de tetrazólio MTT

A redução do brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) é um método colorimétrico rápido frequentemente usado para medir proliferação celular e citotoxicidade (Mosman 1983). Neste ensaio, o MTT é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal resulta na formação de cristais de *formazan* de cor azul que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose. Sendo a

endocitose um mecanismo fundamental das células vivas (Liu 1997), o ensaio do MTT tem sido usado frequentemente como ensaio de viabilidade celular.

Nas experiências de MTT, os sobrenadantes das culturas celulares, contendo ou não os compostos testados, foram removidos e as células foram cultivadas com uma solução de MTT (5 mg/ml) em PBS, durante 1 hora a 37°C. Após esta incubação, os cristais de *formazan*, resultantes da redução do MTT, foram dissolvidos numa solução de HCL 0,04 N em isopropanol e a absorvência foi medida num espectrofotómetro (SLT Spectra) a um comprimento de onda de 570 nm, com um filtro de referência de 620 nm. Os valores da viabilidade celular foram expressos em percentagem relativamente à absorvência determinada nas células controlo.

2.4. Quantificação da concentração de nitritos nos sobrenadantes das culturas celulares (ensaio de Griess)

A formação de NO pela isoforma indutível da sintase do NO pode ser indirectamente determinada através da reacção de *Griess* (Green et al, 1982), que quantifica os nitritos acumulados nos sobrenadantes de culturas celulares expostas a vários estímulos, uma vez que o NO origina nitritos em solução aquosa (Coleman, 2002). A reacção de *Griess* envolve a formação de um cromóforo durante a reacção dos nitritos com sulfanilamida e aminas heterocíclicas, como a N-(1-naftil)etilenodiamina, em condições de baixo pH. Durante esta reacção a pH ácido, os nitritos sofrem diazotação com a sulfanilamida e formam um sal de diazónio. O sal de diazónio liga a N-(1-naftil)etilenodiamina formando-se um composto rosa que possui um espectro de absorção característico e que pode ser quantificado por espectrofotometria.

As células foram cultivadas com os diferentes estímulos durante 48 h e os sobrenadantes das culturas celulares foram recolhidos e centrifugados a 1000 x g

numa centrífuga Sigma 3k30, durante 15 minutos. Procedeu-se de seguida à diluição dos sobrenadantes com igual volume do reagente de *Griess*², durante 10 minutos, e o valor da absorvência foi medido a um comprimento de onda de 550 nm (SLT Spectra). A concentração de nitritos nos sobrenadantes das culturas celulares foi determinada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio.

2.5. Detecção de proteínas por *Western blot*

As proteínas dos extractos celulares totais, extractos citoplasmáticos e extractos nucleares foram separadas por electroforese e electrotransferidas para uma membrana de difluoreto de polivinildieno (PVDF). As proteínas em estudo foram detectadas por incubação das membranas com anticorpos primários seguido de incubação com anticorpos secundários (dirigidos contra as imunoglobulinas da espécie animal em que foram produzidos os anticorpos primários) conjugados com a peroxidase de rábano. Os imunocomplexos foram visualizados por quimiluminescência, utilizando o reagente ECL.

Para a preparação dos extractos celulares totais, as células foram lavadas duas vezes com PBS e homogeneizadas por sonicação (VibraCell da Sonics e Materials, Inc) em 150 µl de tampão de lise³, em gelo, quatro vezes, durante 4 segundos a baixa amplitude. Estes extractos celulares totais foram posteriormente armazenados a -70 °C até à aplicação no gel.

Para a obtenção dos extractos nucleares e citoplasmáticos as células foram lavadas duas vezes com PBS e lisadas com o tampão 1⁴, em gelo, durante 15 minutos. Os lisados celulares foram de seguida centrifugados a 2300 x *g* (centrífuga

² Reagente de *Griess*: di-hidroclorato N-(1-naftil)etilenodiamina a 0,1% (m/v), sulfanilamida a 1% (m/v) em H₃PO₄ a 5% (v/v).

³ Tampão de lise: Sacarose 0,32 M, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, mistura inibidora de proteases, pH 7,5.

⁴ Tampão 1: Tris 10 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM, nonidet P-40 0,5% (v/v), DTT 1 mM, inibidores de proteases, pH 7,5.

Sigma 3k30) à temperatura de 4 °C, durante 10 minutos. O sobrenadante, correspondente ao extracto citoplasmático, foi armazenado a – 70 °C até à aplicação no gel. O sedimento foi solubilizado em tampão 2⁵, em gelo, durante 1 hora, e posteriormente centrifugado a 12000 x g, à temperatura de 4 °C, durante 20 minutos. O sobrenadante, correspondente ao extracto nuclear, foi armazenado a – 70 °C até à aplicação no gel. A quantificação da proteína nos extractos celulares totais, nucleares e citoplasmáticos foi efectuada pelo método do ácido bicinchonínico (BCA).

As proteínas dos extractos obtidos foram desnaturadas por fervura a seco (Stuart Scientific) em solução desnaturante⁶ e separadas por electroforese⁷ em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, na presença de SDS (SDS-PAGE), em géis de separação com 7,5% ou com 15% de acrilamida, conforme o peso molecular das proteínas em estudo e de acordo com o procedimento descrito por Smith e Titheradge, 1998. As proteínas no gel foram transferidas para membranas de PVDF, previamente activadas em metanol, usando um sistema TransBlot da BioRad. A electrotransferência⁸ realizou-se durante a noite, à voltagem constante de 40 V e à temperatura de 10 °C. A eficiência da transferência foi sempre avaliada por coloração das membranas com solução de *Ponceau S* 0,2 %.

As membranas foram bloqueadas, durante 1 hora, com 5% (m/v) de leite magro em tampão Tris salino⁹ (TBS) e com Tween-20 0,1% (v/v) (TBST), com o objectivo de bloquear as ligações não específicas dos anticorpos. As membranas foram de seguida incubadas, durante 1 hora à temperatura ambiente, com o anticorpo primário, diluído em 1% (m/v) de leite magro em TBST. Os anticorpos que não ligaram foram removidos por lavagem das membranas, durante 30 minutos, em 1% (m/v) de

⁵ Tampão 2: HEPES 20 mM, MgCl₂ 3 mM, EDTA 0,2 mM, NaCl 300 mM, glicerol 20% (v/v), DTT 1 mM, inibidores de proteases, pH 7,5.

⁶ Solução desnaturante de proteínas: Tris 100 mM, bicina 100 mM, ureia 4 M, SDS 2% (m/v), β-mercaptoetanol 5% (v/v).

⁷ Tampão de electroforese: Tris 100 mM, bicina 100 mM, SDS 0,1% (m/v).

⁸ Tampão de electrotransferência: Glicina 96 mM, metanol 20% (v/v), Tris 125 mM.

⁹ TBS: Tris 200 mM, NaCl 1,37 M, pH 7,6.

leite magro em TBST. A incubação dos anticorpos secundários decorreu à temperatura ambiente, durante 1 hora, com o anticorpo marcado com a peroxidase de rábano, diluído em 1% (m/v) de leite magro em TBST. Depois de novamente lavadas com TBST, os imunocomplexos foram visualizados por quimiluminescência, utilizando o reagente ECL. Para demonstrar a presença de igual quantidade de proteína nas diferentes amostras da membrana procedeu-se ao *stripping* da membrana¹⁰, durante 30 minutos, a 55 °C e com agitação ocasional. Após lavagem das membranas com TBST procedeu-se de novo à técnica de *western blot*, acima descrita, com o anticorpo contra a proteína actina. A expressão das proteínas em cada situação foi analisada utilizando o programa Adobe Photoshop 7.0.

2.6. Imunofluorescência

A expressão e distribuição das proteínas nas células FSDC foram avaliadas por imunocitoquímica. Neste processo, as preparações fixadas e permeabilizadas foram incubadas com anticorpos específicos para as proteínas em estudo. Os anticorpos primários foram visualizados com anticorpos secundários conjugados com o fluoróforo fluoresceína. As preparações foram observadas por microscopia de fluorescência.

Depois de uma breve lavagem com PBS, as células foram fixadas e permeabilizadas com metanol:acetona (1:1), durante 10 minutos. Procedeu-se de seguida ao bloqueio dos locais de ligação dos anticorpos secundários, durante uma hora, por incubação das células com 5% de soro não imune¹¹ da espécie animal em que foi produzido o anticorpo secundário utilizado. Procedeu-se de seguida à incubação com os anticorpos primários, diluídos em PBS com albumina de soro bovino (BSA) a 0,5%, durante 2 horas e à temperatura ambiente. Seguiu-se uma série de três

¹⁰ Solução de *stripping*: β -mercaptoetanol 100mM, SDS 2% (m/v), Tris 62,5 mM, pH 6,7.

lavagens de 5 minutos com PBS contendo BSA 0,5%. Paralelamente foram feitos controlos em que se omitiu o anticorpo primário. A incubação com os anticorpos secundários, ligados ao fluoróforo fluoresceína e diluídos em PBS com BSA 0,5%, foi feita durante 1 hora, à temperatura ambiente e no escuro. Repetiu-se a lavagem (três lavagens de 5 minutos com PBS contendo BSA 0,5%) e procedeu-se à montagem das lamelas sobre lâminas, utilizando o meio de montagem *Vectashield*, que reduz o fotodecaimento da fluorescência.

A observação da fluorescência nas preparações foi feita num microscópio de fluorescência Zeiss Axioskop com filtros 450-490, FT 510 e LP520 (Zeiss). O processamento da imagem foi feito com o programa Adobe Photoshop 7.0.

2.7. Ensaio do desvio da mobilidade electroforética (EMSA)

A técnica do EMSA permite identificar a ligação de proteínas (factores de transcrição) a sequências específicas de ADN, recorrendo para o efeito a uma electroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes. As proteínas que se ligam especificamente a um fragmento de ADN, marcado numa extremidade com o radioisótopo ^{32}P , atrasam a mobilidade do fragmento de ADN livre durante a electroforese, o que resulta no aparecimento de bandas discretas correspondentes aos complexos de ADN com a proteína específica.

As experiências do EMSA foram realizadas de acordo com o método descrito por Greenlund *et al.*, 1994, tendo sido utilizados os extractos nucleares das FSDC, obtidos como descrito em 2.4. Os oligonucleótidos de dupla cadeia contendo a região de consenso para o factor de transcrição NF- κ B (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3') (40 ng) foram incubados com 50 μCi de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ na presença de 9,8 U

¹¹ Solução de bloqueio: 5% (v/v) de soro não imune em PBS com albumina de soro bovino (BSA) 0,5%.

da cinase polinucleótido T4 e de tampão de ligação da cinase¹², durante 1 hora, a 37°C. O ³²P não incorporado foi removido por centrifugação em colunas Sephadex G-50 a 710 x g numa centrífuga Jouan M14.11, e os oligonucleótidos marcados foram armazenados a -20 °C até serem utilizados. A radioactividade presente nos oligonucleótidos foi determinada num contador de radiação gama Packard 2500 TR.

As reacções de ligação proteína/ADN foram realizadas em tampão de ligação¹³ na presença de 20 µg de proteína nuclear, 100000 cpm de [³²P]oligonucleótido, durante 45 minutos e à temperatura ambiente. Os complexos proteína/ADN foram resolvidos por electroforese¹⁴ em gel de poliácridamida a 7%, em condições não desnaturantes, durante 2 horas e 30 minutos e a 150 V. O gel foi seco por acção de calor (80 °C) e de vácuo num secador de géis BioRad 583 e as bandas proteína/ADN foram examinadas por autoradiografia. Para confirmar a especificidade da banda proteína/ADN foram realizados ensaios de competição, que consistiram na adição prévia de um excesso (100 x) de oligonucleótido não marcado às proteínas nucleares, durante 1 hora e à temperatura ambiente, o que resultou sempre no desaparecimento ou diminuição dos complexos específicos. A análise das bandas correspondentes aos complexos de ADN com a proteína específica foi feito com o programa Adobe Photoshop 7.0.

¹² Tampão de ligação da cinase: Tris 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 5mM, espermidina-HCl 0,1 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7.5.

¹³ Tampão de ligação proteína/ADN: HEPES 20 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 0,5mM, KCl 50 mM, 100 µg/ml de poly(dI-dC).poly(dI-dC), Ficol 400 4% (m/v), BSA 1 mg/ml, pH 7,9.

¹⁴ Tampão de electroforese: Tris 44,6 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM

2.8. Materiais

Anticorpo monoclonal contra actina produzido em ratinho e mistura inibidora de proteases - Roche (Carnaxide, Portugal)

Anticorpo policlonal contra $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ produzido em coelho - New England BioLabs Inc. (Beverly, MA, USA)

Anticorpo policlonal contra iNOS produzido em coelho - Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA)

Anticorpos policlonais contra CD40 e contra IL-12R β 1 produzidos em coelho - Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)

DCNB e NiSO_4 - Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA)

Dexametasona - Sigma-Aldrich Química (Sintra, Portugal)

DNFB - Sigma-Aldrich Química (Madrid, Spain)

GM-CSF murídeo recombinante - R&D systems (Minneapolis, MN, USA)

Imunoglobulina de cabra anti-ratinho conjugada com peroxidase de rábano – Pierce (Illinois, USA)

Imunoglobulina de macaco anti-coelho conjugada com peroxidase de rábano, ^{32}P -labeled γ -ATP, T4 polynucleotide kinase, poly(dI-dC).poly(dI-dC), sistema de análise ECL para western blot e filmes de raios-X - Amersham Biosciences (Carnaxide, Portugal)

Imunoglobulina de porco anti-coelho conjugada isotiocianato de fluoresceína (FITC) e soro de porco - DAKO (Copenhagen, Denmark)

Meio de montagem Vectashield para visualização de preparações fluorescentes - Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA, U.S.A.)

Oligonucleótido contendo a região de consenso para o factor de transcrição NF- κB - Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)

Soro fetal bovino - Biochrom KG (Berlin, Germany)

Tripsina - Invitrogen (Paisley, UK)

Triton[®]X 100 e paraformaldeído - VWR International/Merck Eurolab (Lisboa, Portugal)

Todos os outros reagentes - Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA)

Capítulo 3

Expressão das proteínas de superfície CD40 e IL-12R induzidas pelos antigénios de contacto sulfato de níquel (NiSO₄) e 2,4-dinitrofluorobenzeno (DNFB) numa linha celular dendrítica da pele

3.1. Resumo

Neste trabalho investigaram-se os efeitos de dois antigénios de contacto, o sulfato de níquel (NiSO₄) e o 2,4-dinitrofluorobenzeno (DNFB), na expressão de duas moléculas associadas à membrana, o CD40 e o receptor da interleucina 12 (IL-12R). Em estudos paralelos foi avaliado o efeito do 2,4-dicloronitrobenzeno (DCNB), descrito como um composto não-sensibilizador análogo do DNFB e, por isso, incluído neste trabalho como controlo negativo. As experiências foram realizadas na ausência ou na presença da citocina epidérmica GM-CSF, que influencia o processo de maturação das células dendríticas da pele. Utilizou-se neste trabalho uma linha celular dendrítica obtida a partir da pele de feto de rato e transformada por um factor retroviral (FSDC).

Os resultados mostraram que a expressão proteica de CD40 e IL-12R aumentou após a exposição celular ao DNFB e NiSO₄. A citocina epidérmica GM-CSF fez aumentar de modo não significativo a expressão de ambos os marcadores da superfície celular. Quando esta citocina foi testada juntamente com os alérgenos, o efeito observado foi aditivo. Os resultados sugerem que estes antigénios de contacto, assim como a citocina epidérmica GM-CSF, estão envolvidos nas alterações da expressão destes marcadores de superfície das DC da pele, durante a fase inicial da DCA.

3.2. Introdução

A dermatite de contacto alérgica (DCA) ocorre em consequência da crescente exposição da pele a químicos exógenos. É um tipo de patologia que se caracteriza por um processo inflamatório da pele e que envolve a participação de células dendríticas e citocinas epidérmicas (Enk, 1997; Watanabe *et al.*, 2002). As células de Langerhans (LC) e os queratinócitos são células epidérmicas que produzem uma grande variedade de citocinas, de uma forma constitutiva ou após estimulação exógena (Kimber *et al.*, 1995). Estas citocinas e a sua interacção com receptores apropriados expressos pelas LC parecem desempenhar um papel central na fase inicial de sensibilização da DCA (Watanabe *et al.*, 2002).

As LC e outras células dendríticas da pele desempenham uma função primordial na determinação da resposta cutânea a antigénios de contacto, quando aplicados na pele (Enk, 1997; Watanabe *et al.*, 2002). As LC captam estas substâncias exógenas por fagocitose ou pinocitose. Em seguida, ocorre a degradação intracelular destes antigénios em pequenos peptídeos que se ligam a moléculas do MHC classe II. O complexo MHC II-peptídeo é conduzido para a superfície da membrana plasmática por um mecanismo de exocitose vesicular (Lipscomb e Masten, 2002).

Na fase inicial da DCA, as DC possuem grande capacidade para captar e processar o antigénio, mas são fracas na sensibilização e estimulação de respostas primárias dos linfócitos T naïve, os quais não são encontrados na pele. Deste modo, as DC irão sofrer maturação para se tornarem potentes células apresentadoras de antigénio, ao mesmo tempo que migram para os nódulos linfáticos de drenagem da pele onde encontram células T naïve que são, então, sensibilizadas (Girolomoni *et al.*, 1995; Pieri *et al.*, 2001; Satthaporn e Eremin, 2001).

O processo de migração e maturação das DC da pele envolve alterações profundas das moléculas que são expressas na superfície celular (Banchereau e Steinman, 1998), nomeadamente moléculas MHC classe II (Herouet *et al.*, 2000) e

moléculas co-estimuladoras (Coutant *et al.*, 1999; Tuschl e Kovac, 2001), e em moléculas secretadas para o meio extracelular, incluindo citocinas (Pichowski *et al.*, 2000; De Smedt *et al.*, 2001) e metaloproteinases (Ratzinger *et al.*, 2002).

Estudos *in vitro*, usando modelos inteiros de pele humana, culturas de DC derivadas de células CD34⁺ circulantes ou DC imortalizadas de pele animal (Girolomoni *et al.*, 1995; Herouet *et al.*, 2000; Tuschl *et al.*, 2000; De Smedt *et al.*, 2001), têm evidenciado um efeito directo de alguns antigénios de contacto, nomeadamente do níquel, crómio, 2,4-dinitroclorobenzeno (DNCB) e 2,4-dinitrofluorobenzeno (DNFB), nas características fenotípicas e funcionais das DC. Estes químicos aumentam a expressão de moléculas MHC classe II e de moléculas co-estimuladoras, nomeadamente CD54, CD86, CD40 e CD83 (Coutant *et al.*, 1999; Herouet *et al.*, 2000; Tuschl e Kovac, 2001). Alguns estudos demonstram também que os antigénios de contacto podem aumentar a secreção de IL-1 β e de IL-12 pelas DC, mas estas respostas nem sempre são observadas e este assunto é actualmente matéria de intenso debate (Coutant *et al.*, 1999; Aiba *et al.*, 2000; Pichowski *et al.*, 2000; De Smedt *et al.*, 2001; Tuschl e Kovac, 2001).

Neste trabalho, utilizou-se uma linha celular dendrítica de pele de feto de rato (FSDC), como modelo de DC, para estudar o efeito de substâncias químicas com diferentes propriedades sensibilizadoras da pele, na expressão de marcadores da superfície celular.

O GM-CSF é uma das citocinas epidérmicas produzidas por queratinócitos após a aplicação epidérmica de antigénios de contacto na pele. Está demonstrado que o GM-CSF induz a diferenciação e maturação dos progenitores das DC (Kimber *et al.*, 1995; Jonuleit *et al.*, 1996; Banchereau e Steinman, 1998) e, em particular, desta linha celular (Pieri *et al.*, 2001). Neste trabalho, as experiências foram realizadas na presença e na ausência de GM-CSF, com o objectivo de saber se esta citocina influenciava a expressão de marcadores da superfície celular.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o sulfato de níquel (NiSO_4), alérgeno mais prevalente na população humana, e o DNFB, um potente antígeno de contacto experimental, aumentaram a expressão da proteína CD40 e do receptor para a IL-12 (IL-12R) pelas DC. Pelo contrário, o DCNB, um análogo inactivo do DNFB considerado desprovido de potencial alérgico (Becker *et al.*, 1994), não apresentou estes efeitos. A citocina epidérmica GM-CSF, que induz a maturação das FSDC, também aumentou ligeiramente a expressão de CD40 e IL-12R, apresentando um efeito aditivo ao resultado da actividade dos antígenos de contacto.

3.3. Resultados

3.3.1. O NiSO₄ e o DNFB induziram a expressão de CD40 nas FSDC

Neste trabalho foi avaliado o efeito de três químicos com diferente potencial sensibilizador na expressão do marcador de superfície CD40, nas FSDC. O forte antigénio de contacto DNFB, incubado nas concentrações de 0,4 µg/ml, 1 µg/ml e 2,5 µg/ml, durante 24 horas, induziu uma alta expressão de CD40 (Fig. 3.1, linhas 4-6). O antigénio de contacto NiSO₄, incubado nas concentrações de 50 µg/ml e 100 µg/ml, durante 24 horas, também induziu a expressão de CD40 (Fig. 3.1, linhas 2 e 3). Pelo contrário, a incubação das FSDC com o não-sensibilizador, DCNB, nas concentrações de 1 µg/ml e 2,5 µg/ml, durante 24 horas, não teve efeito significativo na expressão do CD40 (Fig. 3.1, linhas 7 e 8).

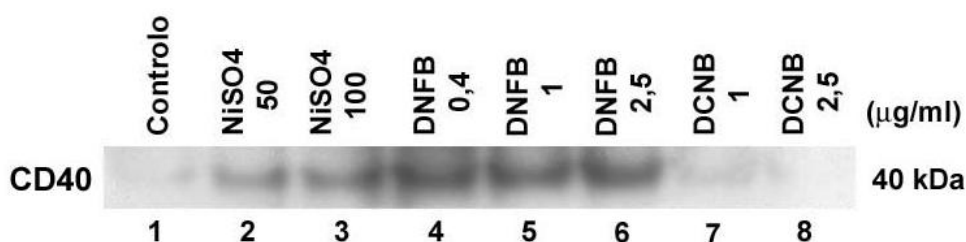


Fig. 3.1 – Efeito de diferentes concentrações de NiSO₄, DNFB e DCNB na expressão proteica de CD40. As células FSDC (2×10^6 células) foram incubadas apenas com meio de cultura (controlo, linha 1), com NiSO₄ (50 µg/ml, linha 2 e 100 µg/ml, linha 3), com DNFB (0,4 µg/ml, linha 4, 1 µg/ml, linha 5 e 2,5 µg/ml, linha 6), ou com DCNB (1 µg/ml, linha 7 e 2,5 µg/ml, linha 8), durante 24 horas. Os extractos celulares totais foram submetidos a uma análise de *western blot*, usando um anticorpo anti-CD40, tal como descrito em Materiais e Métodos (Capítulo 2). A figura apresentada é representativa de três experiências efectuadas com resultados semelhantes.

3.3.2. Efeito do GM-CSF no aumento da expressão de CD40 induzido por DNFB e NiSO₄

Para estudar o efeito da maturação na expressão da molécula co-estimuladora CD40 induzida pelos antígenos de contacto, as células foram pré-incubadas com GM-CSF, durante 24 horas, antes da estimulação com NiSO₄ ou DNFB. Nas Figs. 3.2A e 3.2B mostra-se que a incubação das FSDC com GM-CSF, durante 48 horas, aumentou a expressão de CD40 em 23%, apesar deste efeito não ter alcançado significado estatístico (Fig. 3.2A, linha 2, Fig. 3.2B). A estimulação das células com DNFB (1 µg/ml) ou NiSO₄ (50 µg/ml), durante 24 horas, aumentou significativamente a expressão de CD40, em 50% e 32%, respectivamente (Fig. 3.2A, linhas 3 e 4, Fig. 3.2B), o que está de acordo com os resultados apresentados na Fig. 3.1. Contudo, quando as FSDC foram incubadas com DNFB (1 µg/ml) ou NiSO₄ (50 µg/ml), durante 24 horas, na presença de GM-CSF (100 ng/ml), após uma pré-incubação com a citocina, o aumento na expressão do CD40 foi ligeiramente superior mas não estatisticamente diferente do aumento observado na presença dos antígenos de contacto testados isoladamente (70% e 58%, respectivamente) (Fig. 3.2A, linhas 5 e 6, Fig. 3.2B). É importante notar, que o pequeno efeito do GM-CSF na expressão do CD40, que não atingiu significado estatístico, parece ser aditivo com o efeito dos antígenos de contacto, quando testados conjuntamente (Figs. 3.2A e 3.2B). Nas experiências em que as células foram incubadas com o DCNB, o efeito observado foi o mesmo do obtido com as células controlo, ou seja, células incubadas apenas em meio de cultura (Fig. 3.2A, linha 7).

Na Fig. 3.3, estão indicados os resultados obtidos por imunofluorescência, que confirmam os anteriormente obtidos por *western blot* (Fig. 3.2A). Na Fig. 3.3, observa-se um aumento na expressão de CD40 induzido pelos sensibilizadores NiSO₄ e DNFB, e um aumento ligeiramente maior na expressão da proteína, em células pré-incubadas

com GM-CSF. Por imunofluorescência também se observou que o não-sensibilizador DCNB não teve qualquer efeito na expressão de CD40.

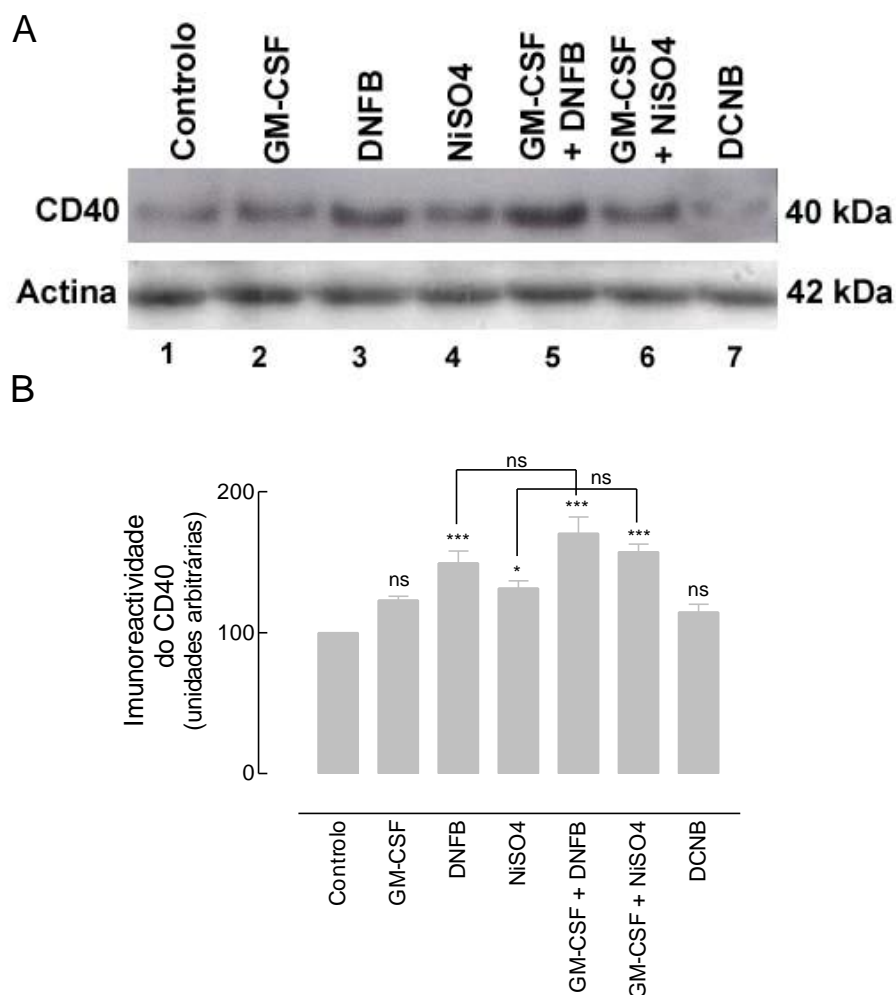


Fig. 3.2 – Efeito do GM-CSF na expressão de CD40 induzida por DNFB e NiSO₄. (A) Análise de *western blot* dos níveis proteicos de CD40 e actina. As células FSDC (2×10^6 células) foram incubadas com meio de cultura na ausência (controlo, linha 1) ou na presença de GM-CSF (100 ng/ml, linha 2), com DNFB (1 μ g/ml, linha 3), com NiSO₄ (50 μ g/ml, linha 4) ou com DCNB (1 μ g/ml, linha 7). As células foram estimuladas com GM-CSF na presença de DNFB (1 μ g/ml, linha 5) ou de NiSO₄ (50 μ g/ml, linha 6). Os extractos celulares totais foram submetidos a uma electroforese SDS-PAGE, transferidos para uma membrana PVDF e submetidos a uma análise de *western blot*, usando um anticorpo contra a proteína CD40, tal como descrito em Materiais e Métodos (Capítulo 2). Seguidamente, a membrana sofreu um processo de 'stripping' e voltou a ser incubada com um anticorpo contra a actina para confirmar a igualdade de quantidade proteica em todas as condições da electroforese. A figura apresentada é

representativa de três experiências efectuadas, com resultados semelhantes. (B) Os resultados obtidos em três experiências independentes foram quantificados com um analisador de imagem usando o programa Adobe Photoshop 7.0 e são apresentados como médias \pm SEM; ns, não significativo, * representa $p < 0.05$ e *** representa $p < 0.001$, quando comparados com o Controlo, tal como determinado pela análise de ANOVA usando o teste de comparação múltipla de Bonferroni.

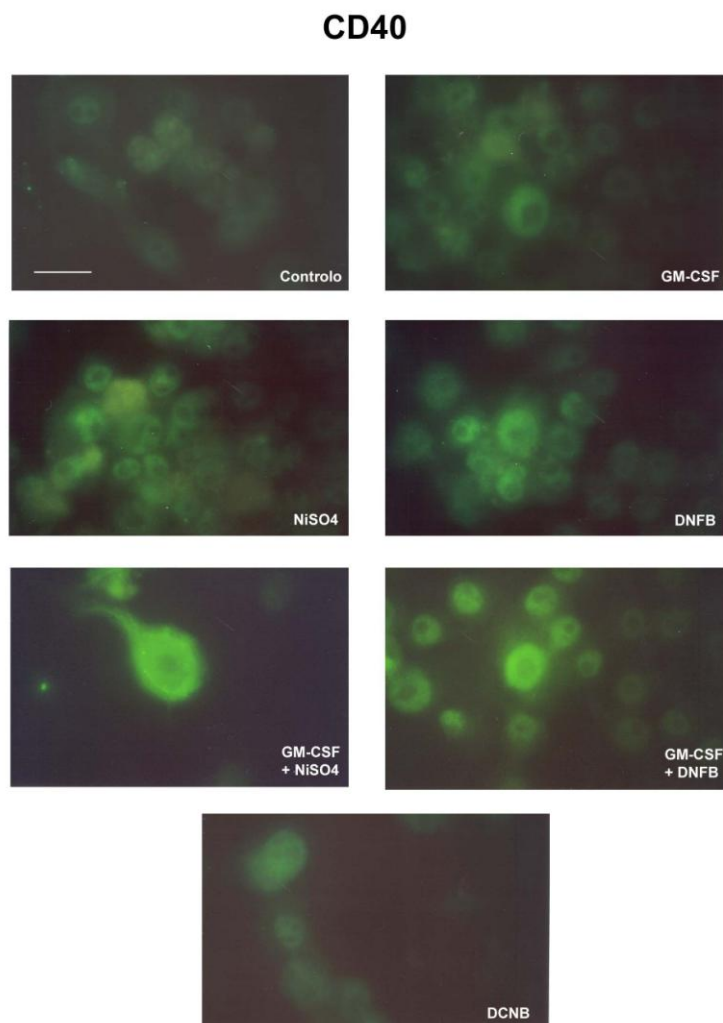


Fig. 3.3 - Efeito do GM-CSF na expressão de CD40 induzida por DNFB e NiSO₄. Microscopia de imunofluorescência da proteína CD40. As células FSDC (0.2×10^6 células) foram incubadas sob as mesmas condições usadas na análise de *western blot*. Esta técnica realizou-se conforme descrito em Materiais e Métodos (Capítulo 2). *Escala representada* = 25 micrómetros (amplificação 250 x).

3.3.3. Indução da expressão de IL-12R por DNFB e NiSO₄: efeito do GM-CSF

Nesta parte do trabalho, estudou-se o efeito do DNFB, NiSO₄ e DCNB na expressão de IL-12R nas FSDC. Tal como indicado nas Figs. 3.4A e 3.4B, quando as células foram incubadas com DNFB (1 µg/ml) ou NiSO₄ (50 µg/ml), durante 24 horas, a expressão de IL-12R aumentou 72% e 45%, respectivamente, quando comparada com a expressão das células controlo, ou seja, células incubadas apenas com meio de cultura (Fig. 3.4A, linhas 1, 4 e 5, Fig. 3.4B). O DCNB não teve qualquer efeito neste modelo (Fig. 3.4A, linha 7).

Com o objectivo de determinar se a fase de maturação das FSDC influencia a expressão de IL-12R induzida pelos antigénios de contacto, as células foram pré-incubadas com 100 ng/ml de GM-CSF, durante 24 horas, antes da estimulação com DNFB e NiSO₄, durante mais 24 horas, juntamente com a citocina. Nas células incubadas apenas com 100 ng/ml de GM-CSF, durante 48 horas, observou-se um pequeno aumento, estatisticamente não significativo, de 23%, na expressão de IL-12R (Fig. 3.4A, linha 2). Nas células FSDC incubadas com os antigénios de contacto DNFB (1 µg/ml) e NiSO₄ (50 µg/ml), durante 24 horas, na presença de GM-CSF (100 ng/ml), após uma pré-incubação de 24 horas com a citocina, o aumento na expressão de IL-12R relativamente ao controlo (90% e 66%, respectivamente) foi maior, mas não estatisticamente diferente do aumento observado nas células estimuladas apenas com os antigénios de contacto (Fig. 3.4A, linhas 3 e 6, Fig. 3.4B). O pequeno efeito do GM-CSF na expressão de IL-12R foi aditivo com a resposta aos antigénios de contacto, tal como observado na expressão de CD40 (Figs. 3.4A e 3B).

Na Fig. 3.5, os resultados de imunofluorescência confirmam os anteriormente obtidos com *western blot* (Fig. 3.4A). Observa-se na Fig. 3.5 um aumento na expressão de IL-12R induzido pelos antigénios de contacto NiSO₄ e DNFB, e um ligeiro aumento na expressão da proteína nas células pré-incubadas com GM-CSF.

Nesta figura também fica demonstrado que o não-sensibilizador DCNB não teve efeito na expressão de IL-12R.

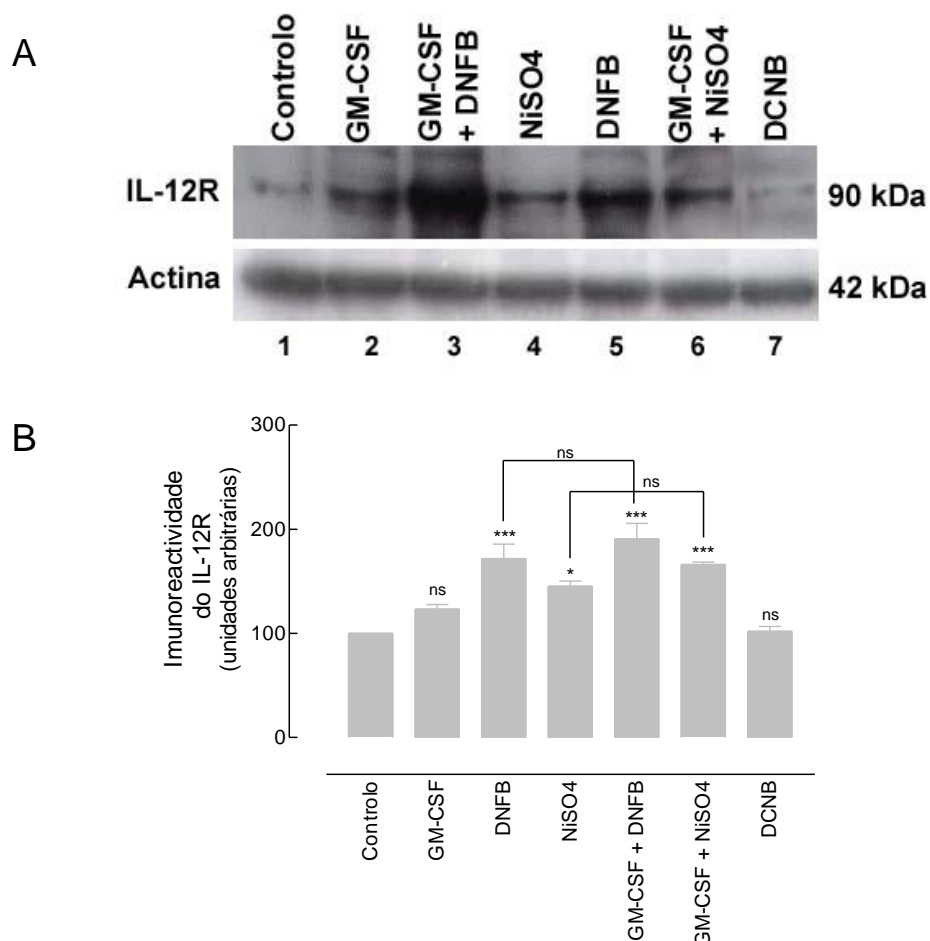


Fig. 3.4 – Efeito do GM-CSF na expressão de IL-12R induzida por DNFB e NiSO₄. (A) Análise de *western blot* dos níveis proteicos de IL-12Rβ1 e actina. As células FSDC (2×10^6 células) foram incubadas com meio de cultura na ausência (controlo, linha 1) ou na presença de GM-CSF (100 ng/ml, linha 2), com NiSO₄ (50 µg/ml, linha 4), com DNFB (1 µg/ml, linha 5) ou com DCNB (1 µg/ml, linha 7). As células foram estimuladas com GM-CSF na presença de DNFB (1 µg/ml, linha 3) ou de NiSO₄ (50 µg/ml, linha 6). Os extractos totais celulares foram submetidos a uma electroforese SDS-PAGE, transferidos para uma membrana PVDF e submetidos a uma análise de *western blot*, usando um anticorpo contra a proteína IL-12R β1, tal como descrito em Materiais e Métodos (Capítulo 2). Seguidamente, a membrana sofreu um processo de 'stripping' e voltou a ser incubada com um anticorpo contra a actina para confirmar a igualdade da quantidade proteica em todas as condições da electroforese. A figura apresentada é representativa de três experiências efectuadas, com resultados semelhantes. (B) Os resultados obtidos em três experiências independentes foram quantificados com um analisador de imagem usando o

programa Adobe Photoshop 7.0 e são apresentados como médias \pm SEM; ns, não significativo, * representa $p < 0.05$ e *** representa $p < 0.001$, quando comparado com o Controlo, tal como determinado pela análise de ANOVA usando o teste de comparação múltipla de Bonferroni.

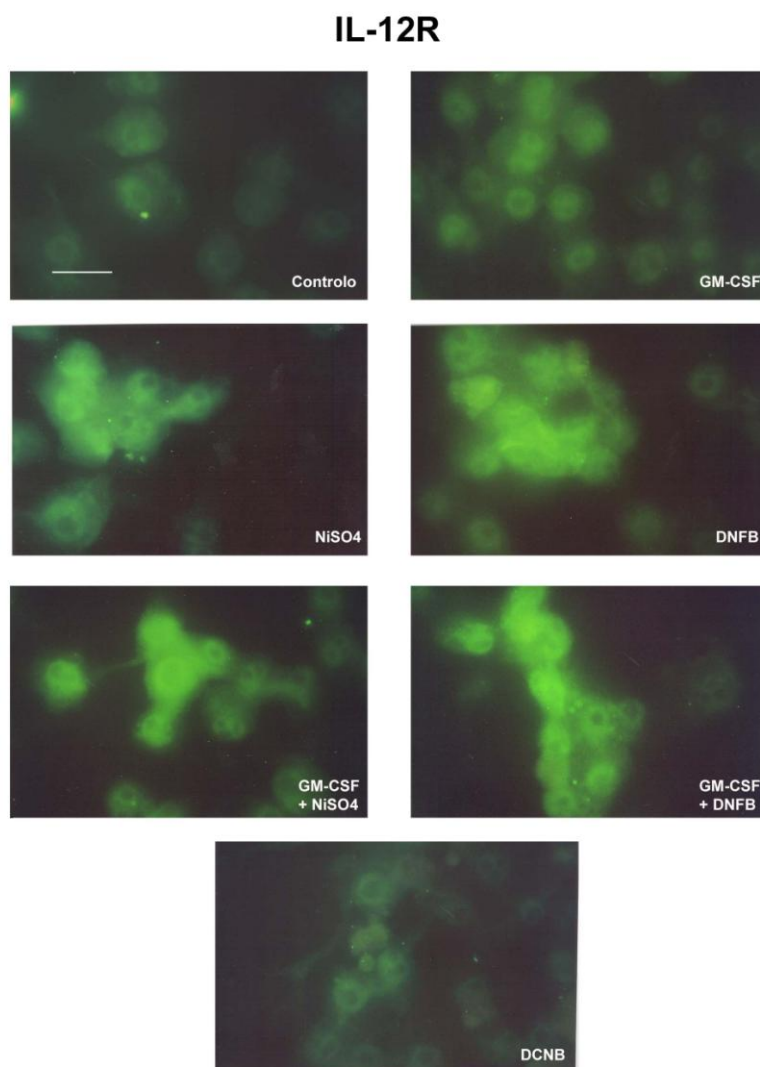


Fig. 3.5 – Efeito do GM-CSF na expressão de IL-12R induzida por DNFB e NiSO₄. Microscopia de imunofluorescência da proteína IL-12R β 1. As células FSDC (0.2×10^6 células) foram incubadas sob as mesmas condições usadas na análise de *western blot*. Esta técnica realizou-se conforme descrito em Materiais e Métodos (Capítulo 2). *Escala representada* = 25 micrómetros (amplificação 250 x).

3.4. Discussão

A linha celular FSDC foi obtida a partir de células dendríticas da pele de feto de rato, por Girolomoni e seus colaboradores, em 1995, representando um modelo de células dendríticas precursoras da pele. Estas células para se tornarem APC funcionalmente eficientes requerem a activação por citocinas epidérmicas (Girolomoni *et al.*, 1995). Trabalhos realizados anteriormente no nosso laboratório, demonstram que as FSDC são sensíveis à citocina epidérmica GM-CSF (Cruz *et al.*, 2001; Vital *et al.*, 2003), a qual está envolvida nos processos *in vivo* de diferenciação e maturação das DC (Kimber *et al.*, 1995; Banchereau e Steinman, 1998; Jonuleit *et al.*, 1996).

Neste trabalho, estudámos o efeito de dois antígenos de contacto, com reconhecido potencial sensibilizador, o DNFB e o NiSO₄, na expressão de dois receptores associados à membrana, CD40 e receptor para a IL-12 (IL-12R). Estudou-se também o efeito do DCNB, como controlo negativo. Os resultados mostraram que ambos os sensibilizadores da pele aumentam a expressão das duas moléculas de superfície, CD40 e IL-12R, enquanto que o não-sensibilizador DCNB não tem efeito significativo (Figs. 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5). O estudo do efeito da pré-incubação das FSDC com GM-CSF demonstrou que o GM-CSF isoladamente aumenta ligeiramente a expressão de CD40 e IL-12R, e este efeito pareceu ser aditivo com o efeito resultante da estimulação das células apenas com os antígenos de contacto (Figs. 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5).

O aumento da expressão do CD40 observado neste trabalho (Figs. 3.2 e 3.3) está de acordo com resultados obtidos com outros tipos de DC (Coutant *et al.*, 1999). O CD40 é um receptor associado à membrana, pertencente à família dos receptores do factor de necrose tumoral (TNF-R), largamente expresso nas células do organismo, incluindo as DC (van Kooten e Banchereau, 2000). O CD40 interage com o seu ligando (CD40L) nos linfócitos T naïve num processo importante para o início da resposta imunológica (Banchereau *et al.*, 2000). A activação do CD40 pelo CD40L é

crítica para a manutenção da viabilidade das DC, para promover a sua maturação através do aumento da expressão de outras moléculas co-estimuladoras, e para controlar a sua migração para os gânglios linfáticos de drenagem (Moodycliffe, *et al.*, 2000; Mann *et al.*, 2002). A ligação do CD40 também activa a expressão de genes que codificam citocinas nas DC e promove a secreção de IL-6 e IL-12. Estas citocinas parecem desempenhar um papel importante na activação direccionada dos linfócitos T naïve, em linfócitos T *helper* 1 (Th1) ou T *helper* 2 (Th2), e no início da resposta imunológica primária (Mann *et al.*, 2002; Wesa *et al.*, 2002). Deste modo, o CD40 pode ser considerado um marcador de activação e maturação das DC.

Os resultados deste trabalho permitem concluir que o antigénio de contacto DNFB induz um aumento maior na expressão do CD40 do que o NiSO₄ (Figs. 3.1, 3.2 e 3.3), o que está de acordo com a sua actividade sensibilizadora, descrita como mais potente, quer *in vitro* quer *in vivo* (Yokoseki *et al.*, 1995). Pelo contrário, a expressão de CD40 não foi afectada pelo não-sensibilizador DNCB (Figs. 3.1, 3.2 e 3.3).

As FSDC foram cultivadas com GM-CSF na ausência ou na presença dos antigénios de contacto, de modo a mimetizar os eventos ocorridos *in vivo*. Durante a DCA, os queratinócitos epidérmicos libertam várias citocinas que influenciam a diferenciação de células da linhagem dendrítica, em particular das LC. O GM-CSF é uma citocina relevante na manutenção do estado diferenciado das LC na epiderme (Pieri *et al.*, 2001). Além das citocinas endógenas, como o GM-CSF, diversos estímulos ambientais, incluindo o contacto cutâneo com substâncias antigénicas, induzem também a libertação de citocinas inflamatórias e quimioattractoras pelos queratinócitos epidérmicos (Corsini e Galli, 1998). Os resultados das experiências realizadas neste trabalho demonstram que o GM-CSF aumenta ligeiramente a expressão de CD40, o que está de acordo com o trabalho de outros investigadores, demonstrando um ligeiro aumento na expressão de CD40 pelo GM-CSF em LC purificadas (Salgado *et al.*, 1999). A expressão de CD40 em células estimuladas com

os antígenos de contacto aumentou na presença de GM-CSF, indicando que o efeito destes dois estímulos é aditivo.

Foi demonstrado, anteriormente, pelo nosso grupo de trabalho que o DNFB, o NiSO₄ e o GM-CSF activam o factor de transcrição NF-κB, em DC da pele (Cruz *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 2002; Cruz *et al.*, 2003; Vital *et al.*, 2003). Este facto sugere que a mesma via de sinalização intracelular pode ser responsável pelo aumento da expressão de CD40 em resposta à estimulação com DNFB, NiSO₄ e GM-CSF. O gene que codifica o CD40 contém locais de ligação para o NF-κB nas suas regiões promotoras (Yoshimura *et al.*, 2001; Nguyen e Benveniste, 2002), podendo ser este o mecanismo através do qual os níveis proteicos do CD40 são aumentados pelos antígenos de contacto e por esta citocina.

A interleucina 12 (IL-12) é uma citocina heterodimérica (IL-12p70) composta por duas subunidades, p35 e p40. Esta interleucina é primariamente produzida por APC, ou seja, DC, monócitos/macrófagos e, em menor escala, por linfócitos B, em resposta a bactérias, produtos bacterianos ou parasitas intracelulares (Trinchieri, 1995); antígenos de contacto podem também induzir a produção de IL-12 por algumas destas células (Warbrick *et al.*, 1999). A IL-12 é uma citocina primordial durante a apresentação antigénica, desempenhando um papel central na diferenciação dos linfócitos T naïve em linfócitos Th1 e no desenvolvimento de respostas Th1, como no caso da DCA (Muller *et al.*, 1995; Gately *et al.*, 1998; Kalinski *et al.*, 1999). A IL-12, além dos efeitos produzidos nos linfócitos T, também induz a activação funcional das DC, aumentando a expressão de moléculas MHC classe II (Grohmann *et al.*, 1998) e a secreção de várias citocinas, nomeadamente GM-CSF, IL-1β, IL-6, TNF-α, IFN-γ e a própria IL-12p40 (Grohmann *et al.*, 1998; Kelleher e Knight, 1998; Nagayama *et al.*, 2000).

A actividade biológica da IL-12 é mediada pela ligação ao seu receptor, IL-12R, o qual forma um complexo composto por duas subunidades tipo beta, IL-12Rβ1 and IL-12Rβ2 (Presky *et al.*, 1996; Nagayama *et al.*, 2000). O IL-12R tem sido descrito nos

linfócitos T, nas células NK e noutras células mononucleares do sangue periférico (PBMC) (Desai *et al.*, 1992; Chua *et al.*, 1994; Chua *et al.*, 1995; Presky *et al.*, 1996). Tem sido também descrita a presença das duas subunidades deste receptor em DC, nas quais a subunidade IL-12R β 1 medeia os eventos de sinalização induzidos pela IL-12, promovendo a sua activação funcional (Grohmann *et al.*, 1998; Nagayama *et al.*, 2000). Contudo, o efeito dos antigénios de contacto na expressão deste receptor (IL-12R) não foi descrito até ao momento. Neste trabalho observámos que o DNFB e, em menor escala, o NiSO₄, aumentaram a expressão de IL-12R β 1 nas FSDC. Pelo contrário, o não-sensibilizador DNCB não apresentou efeito significativo.

Estudos recentes mostraram que antigénios de contacto como o DNCB, com potencial sensibilizador semelhante ao DNFB, podem induzir a produção de IL-12p40 por algumas APC (Warbrick *et al.*, 1999). Deste modo, o aumento da expressão de IL-12R nas DC, induzido pelos antigénios, pode ser fundamental para a ligação de IL-12 produzida pelas próprias DC (produção autócrina de IL-12 pelas DC) ou por outras células vizinhas promovendo, assim, a sinalização por IL-12 e a activação funcional das DC. Tal como para o CD40, o aumento da expressão de IL-12R pelos antigénios de contacto mostrou ser um efeito aditivo com o pequeno efeito do GM-CSF.

Estudos anteriormente realizados pelo nosso grupo de trabalho mostraram que o DNFB, o NiSO₄ e o GM-CSF activam o NF- κ B (Cruz *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 2002; Cruz *et al.*, 2003; Vital *et al.*, 2003). O bloqueio do NF- κ B diminui a expressão de moléculas co-estimuladoras, nomeadamente CD40, e de citocinas imunoestimulatórias, como a IL-12 (Yoshimura *et al.*, 2001). As vias de sinalização intracelular que levam à expressão de IL-12R não foram ainda descritas. Estudos envolvendo a regulação de IL-12R mostraram que a estimulação por IL-12 é suficiente para induzir a expressão das duas subunidades, beta 1 e beta 2 (Rogge *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2001). Uma vez que as vias de sinalização intracelular activadas por IL-12, após a ligação ao seu receptor, envolvem membros da família do NF- κ B nas DC (Grohmann *et al.*, 1998; Yoshimura *et al.*, 2001), é possível que a expressão de IL-12R

esteja dependente deste factor de transcrição. Desse modo, à semelhança do que acontece para o CD40, é provável que os antigénios de contacto e o GM-CSF aumentem a expressão de IL-12R através das mesmas vias de sinalização, nomeadamente por activação do NF- κ B, o qual já mostrou ser activado por GM-CSF, DNFB e NiSO₄ nestas células (Cruz *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 2002; Cruz *et al.*, 2003; Vital *et al.*, 2003).

Em resumo, os resultados deste estudo indicam que: 1) os dois antigénios de contacto, DNFB e NiSO₄, aumentaram a expressão dos dois marcadores de superfície, CD40 e IL-12R, nas células FSDC, enquanto o não-sensibilizador DCNB não teve efeito significativo; 2) o GM-CSF aumentou em pequena proporção a expressão de ambas as proteínas, tendo sido este efeito aditivo com o efeito dos antigénios de contacto; 3) a maior expressão de CD40 e IL-12R foi obtida na presença do forte sensibilizador DNFB, enquanto o NiSO₄ induziu um aumento menor da expressão destas proteínas.

No seu conjunto, os resultados obtidos permitem concluir que os antigénios de contacto, DNFB e NiSO₄, induzem alterações específicas do fenótipo que podem representar um estado de activação precoce das DC, o qual pode ser responsável pelo início da fase de sensibilização da DCA *in vivo*. Os resultados obtidos sugerem ainda que a citocina epidérmica GM-CSF está envolvida nestas alterações. O aumento da expressão de CD40 e IL-12R pode, deste modo, contribuir promissora para a realização de ensaios de identificação de alérgenos de contacto moderados a fortes. Desse modo, será possível o desenvolvimento de métodos de estudo *in vitro* que possam reduzir o número de animais de experiência, usados na determinação do potencial alérgico de substâncias químicas ambientais.

Capítulo 4

Estudo do efeito da dexametasona na activação do NF- κ B, na expressão da iNOS e na produção de NO, em células FSDC incubadas com GM-CSF

4.1. Resumo

Neste trabalho foi investigado o papel da citocina epidérmica GM-CSF e do glucocorticóide sintético dexametasona na activação do factor de transcrição NF- κ B, na expressão da sintase indutível do óxido nítrico (iNOS) e na produção de óxido nítrico (NO). Utilizou-se como modelo experimental, uma linha celular obtida a partir células dendríticas da pele de feto de rato, transformadas por um factor retroviral (FSDC).

Os resultados mostraram que, por um lado, a citocina epidérmica GM-CSF activou o factor de transcrição NF- κ B e induziu a expressão da iNOS e a produção de NO. Por outro lado, a dexametasona inibiu a activação do factor de transcrição NF- κ B, a expressão celular da iNOS e a produção de NO, induzidas pelo GM-CSF. Estes resultados sugerem que a dexametasona é um potente inibidor dos eventos intracelulares envolvidos na síntese de NO, em células dendríticas de pele.

4.2. Introdução

O NO é sintetizado em grandes quantidades pela iNOS. No organismo, este radical livre quando produzido em grandes quantidades, pode actuar no combate contra microorganismos exógenos, estimulando a inflamação induzida por macrófagos

e a morte de células infectadas. Contudo, pode também promover a inflamação ou ter efeitos tóxicos em células adjacentes não infectadas originando, desta forma, a lesão de tecidos saudáveis, a hipersensibilidade ou a autoimunidade (Bruch-Gerharz *et al.*, 1998).

Na pele, o NO produzido pela iNOS pode ter origem em vários tipos de células, designadamente queratinócitos, fibroblastos, células de Langerhans (LC) e ainda outras células dendríticas da pele (DC dérmicas). Na pele, embora o NO desempenhe um papel fundamental na protecção contra os agressores externos (Rowe *et al.*, 1997; Weller, 1997), existem cada vez mais evidências de que o NO produzido em larga escala participa no desenvolvimento de diversas formas de dermatite de contacto (Ross *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 2001), incluindo a dermatite de contacto alérgica (DCA) (Ormerod *et al.*, 1997; Sahin *et al.*, 2001), a dermatite de contacto irritante (Ormerod *et al.*, 1997; Wallengren e Larson, 2001) e a dermatite atópica (Morita *et al.*, 1995; Taniushi *et al.*, 2001). Os glucocorticóides exercem uma actividade multi-funcional anti-inflamatória em muitas doenças de pele, o que justifica a sua frequente utilização na terapêutica clínica destas doenças (Moser *et al.*, 1995; Pan *et al.*, 2001).

O contacto da pele com microorganismos e citocinas epidérmicas, tais como o interferão- γ (IFN- γ), factor de necrose tumoral- α (TNF- α), IL-1 β e GM-CSF, leva à produção de NO pelas DC da pele (células de Langerhans e outras células da pele apresentadoras de antigénios) (Lu *et al.*, 1996; Qureshi *et al.*, 1996; Weller, 1999). Estas células actuam no processo de apresentação de antigénios aos linfócitos T, podendo o NO ter um papel importante neste processo (Bonham *et al.*, 1996; Bonham *et al.*, 1997). Estas observações levam a concluir que a expressão de iNOS nas DC da pele pode modular a sua função como activadoras linfocitárias.

O GM-CSF é uma citocina produzida por queratinócitos quando estimulados por alergenos. Esta citocina promove a maturação das células de Langerhans e a apresentação antigénica, e induz a produção de NO (Cruz *et al.*, 1999). Este efeito

depende da expressão da iNOS e associada com a activação do factor de transcrição NF- κ B (Cruz *et al.*, 2001).

O NF- κ B é um factor de transcrição que existe no citoplasma num estado latente (inactivo), ligado a um inibidor, o I κ B-alfa (I κ B- α) (Pahl, 1999). A exposição das células a uma grande variedade de estímulos fisiológicos e não fisiológicos induz a fosforilação e subsequente degradação da proteína I κ B (Baldwin, 1996). Este processo liberta o factor de transcrição NF- κ B do seu inibidor, permitindo a sua translocação para o núcleo (Chen e Ghosh, 1999), onde vai aumentar a expressão de genes específicos, incluindo os genes envolvidos na expressão da iNOS (Xie *et al.*, 1994; Yamamoto e Gaynor, 2001).

O objectivo deste trabalho foi saber qual o efeito do GM-CSF na expressão da iNOS, e qual o efeito da dexametasona na expressão desta proteína induzida por aquela citocina, numa linha celular da pele de rato (FSDC), uma vez que estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que fármacos glucocorticóides interferem com a actividade da enzima iNOS (Auphan *et al.*, 1995; De Vera *et al.*, 1997; Almawi e Melemedjian, 2002).

4.3. Resultados

4.3.1. Inibição da produção de NO pela dexametasona, em células FSDC estimuladas com GM-CSF

Neste trabalho, as células FSDC foram estimuladas com GM-CSF na concentração de 100 ng/ml de GM-CSF, dado que esta concentração é suficiente para induzir a síntese de nitritos em quantidades facilmente mensuráveis pelo método de Griess. Esta técnica permite quantificar indirectamente a produção de NO, uma vez que em meio aquoso este radical origina nitritos.

A estimulação das células com GM-CSF, durante 48 horas, fez aumentar a produção de nitritos significativamente de $2,7 \pm 1,1 \mu\text{M}$, quando as células foram incubadas apenas com o meio de cultura, para $4,2 \pm 1,5 \mu\text{M}$, quando as FSDC foram incubadas na presença de 100 ng/ml de GM-CSF.

O estudo do efeito da dexametasona na produção de nitritos, induzida por GM-CSF, foi realizado através da adição do fármaco em concentrações crescentes (0,0025 a $1 \mu\text{M}$) à cultura de células, 30 minutos antes da estimulação com GM-CSF. A dexametasona inibiu a produção de nitritos induzida pelo GM-CSF, de modo dependente da concentração (Fig. 4.1), apresentando um valor de IC_{50} de $3,2 \times 10^3 \mu\text{M}$, calculado pelo gráfico de Hill. Uma concentração de $0,5 \mu\text{M}$ de dexametasona, que inibiu completamente a produção de NO, foi usada nas experiências subsequentes com o objectivo de estudar os seus mecanismos de acção. Na ausência do estímulo com GM-CSF, a dexametasona não apresentou qualquer efeito na produção de NO (dados não apresentados).

Os estudos de viabilidade celular foram realizados pelo método da redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), tal como descrito em Materiais e Métodos (Capítulo 2). Os resultados indicaram que as concentrações de dexametasona usadas não apresentaram toxicidade significativa (dados não apresentados).

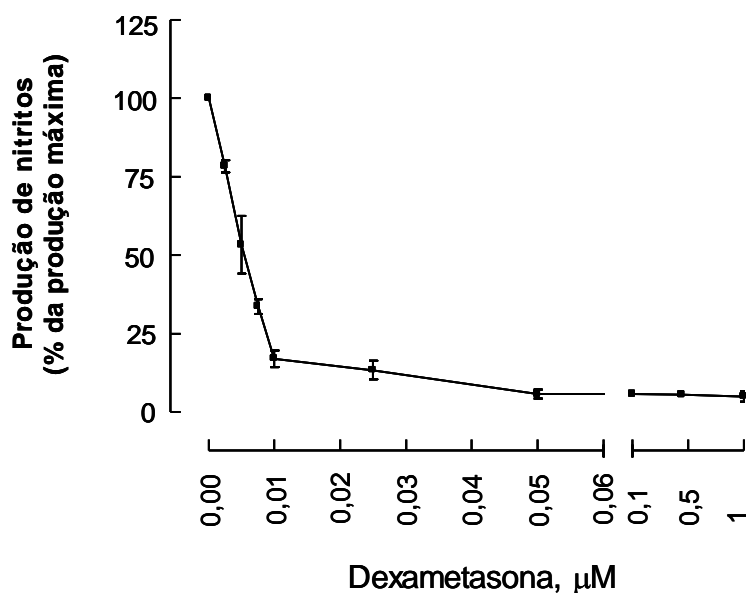


Fig. 4.1 - Efeito da dexametasona na produção de nitritos induzida por GM-CSF em células FSDC. As células FSDC (0.2×10^6 células) foram previamente tratadas, durante 30 minutos, com uma gama de concentrações de dexametasona (0,0025 – 1 µM), tal como indicado, e seguidamente estimuladas com 100 ng/ml de GM-CSF, durante mais 48 horas. Os resultados são expressos como percentagem da produção máxima de nitritos nos sobrenadantes das células cultivadas com GM-CSF e na ausência de dexametasona (100%). Os níveis de nitritos nos sobrenadantes das culturas celulares foram detectados pela reacção de Griess, tal como descrito em Materiais e Métodos (Capítulo 2). Cada valor representa a média \pm SEM de cinco experiências.

4.3.2. Efeito da dexametasona na expressão da proteína iNOS, em células estimuladas com GM-CSF

A análise de *western blot* foi usada para avaliar os níveis da proteína iNOS em células não tratadas (células controlo), em células tratadas com GM-CSF, na presença ou na ausência de dexametasona, e em células tratadas apenas com dexametasona.

Nas Figs. 4.2A e 4.2B, observa-se que as células controlo, ou seja, as células não activadas, expressaram um nível residual da proteína iNOS (linha 1). Nas células estimuladas com GM-CSF, a expressão de iNOS aumentou 106% relativamente às células controlo (linha 2). Nas células estimuladas com GM-CSF e tratadas com dexametasona, a expressão proteica de iNOS foi significativamente inibida, diminuindo para 42% do valor expresso pelas células estimuladas com GM-CSF (linha 4), e para 85% dos níveis proteicos expressos pelas células controlo. Quando foi testado o efeito da dexametasona sozinha, observou-se uma redução da expressão de iNOS para 68% do controlo, redução esta que não apresentou significado estatístico (linha 3). Este decréscimo na expressão da proteína pode-se relacionar com o efeito inibitório da dexametasona na produção de NO, apresentado na Fig. 4.1.

Estes resultados foram confirmados por microscopia de imunofluorescência, realizada nas mesmas condições experimentais usadas na técnica de *western blot* (Fig. 4.2). A Fig. 4.3 mostra que as células controlo, ou seja, células mantidas apenas em meio de cultura, expressaram um nível residual de iNOS. Nas células tratadas com GM-CSF, observou-se um aumento marcado da fluorescência, mostrando um aumento significativo da expressão da proteína. As células estimuladas com GM-CSF e tratadas com dexametasona exibiram uma fluorescência semelhante, ainda que um pouco menor, relativamente às células controlo. As células tratadas apenas com dexametasona apresentaram uma fluorescência mínima, inferior à obtida nas restantes condições experimentais. Todos estes resultados estão relacionados com os resultados obtidos pelo método de *western blot* (Fig. 4.2).

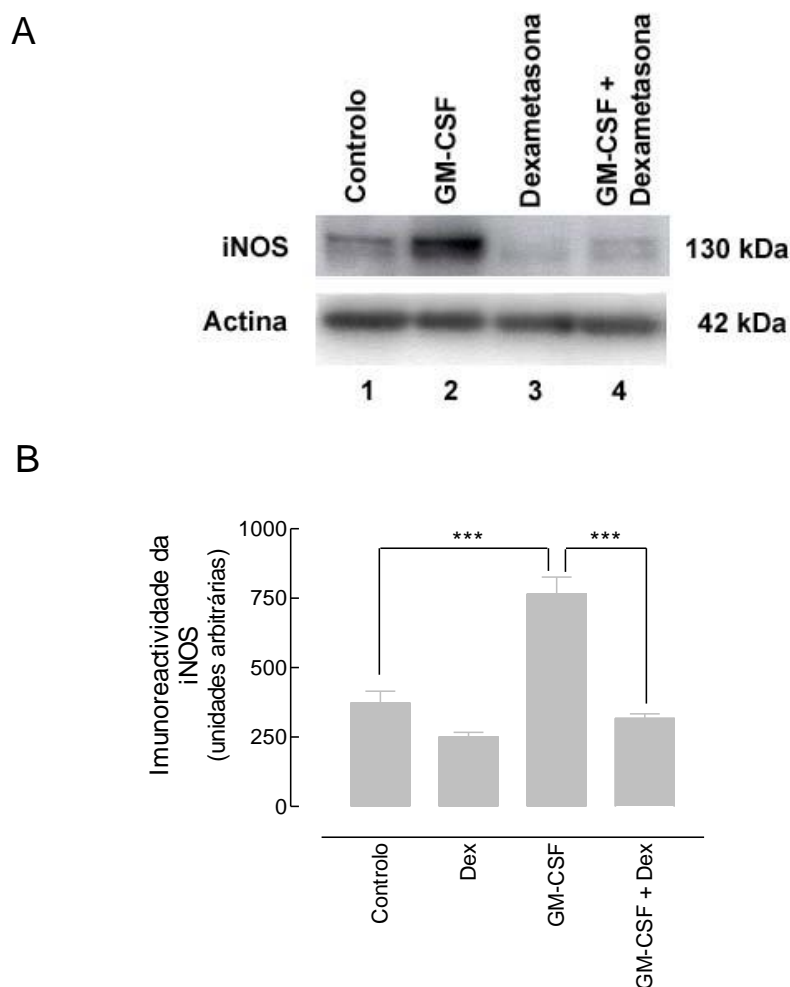


Fig. 4.2 - Efeito da dexametasona (Dex) na expressão proteica de iNOS induzida por GM-CSF em células FSDC. (A) Análise de *western blot* dos níveis proteicos de iNOS e actina. As células FSDC (2×10^6 células) foram incubadas, durante 24 horas, só com meio de cultura (controlo, linha 1), com 100 ng/ml de GM-CSF (linha 2), com 0,5 μ M de dexametasona (linha 3) ou com 100 ng/ml de GM-CSF na presença de 0,5 μ M de dexametasona (linha 4). Para investigar os efeitos da dexametasona na resposta das células ao GM-CSF, estas foram pré-incubadas com o glucocorticóide durante 30 minutos. Os extractos totais celulares foram submetidos a uma electroforese SDS-PAGE, transferidos para uma membrana PVDF e submetidos a uma análise de *western blot*, usando um anticorpo contra a iNOS, tal como descrito em Materiais e Métodos (Capítulo 2). Seguidamente, a membrana sofreu um processo de *stripping* e voltou a ser incubada com um anticorpo contra a actina para confirmar a igualdade da quantidade proteica em todas as condições da electroforese. A figura apresentada é representativa dos resultados de três experiências efectuadas, com resultados semelhantes. (B) Os resultados obtidos em três experiências independentes foram quantificados com um analisador de imagem usando o programa Adobe Photoshop 7.0 e são apresentados como médias \pm SEM. *** representa $p < 0.001$, tal como determinado pela análise de ANOVA usando o teste de comparação múltipla de Bonferroni.

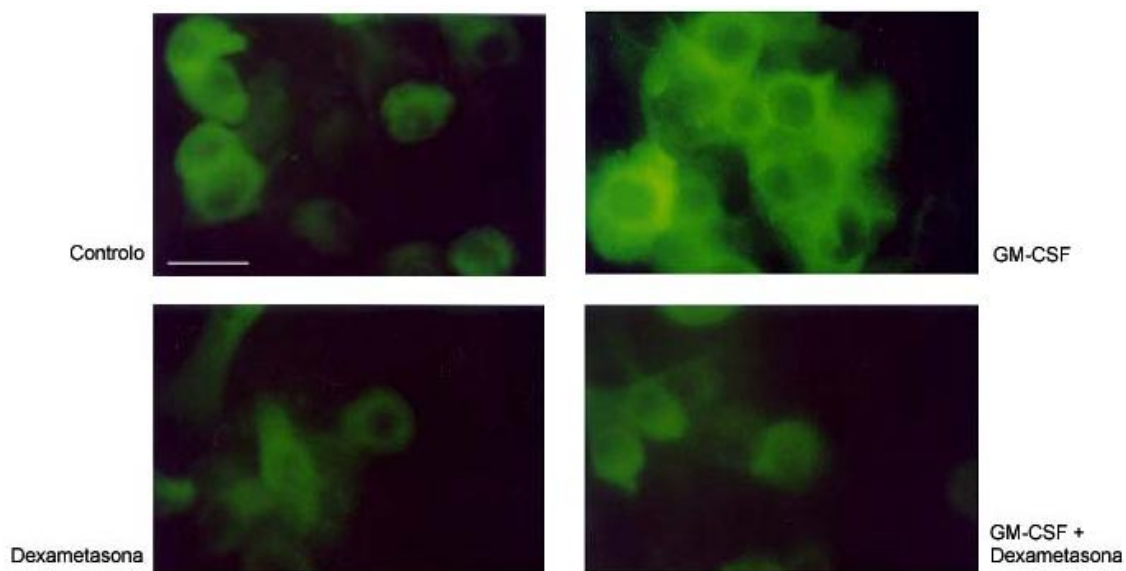


Fig. 4.3 - Efeito da dexametasona (Dex) na expressão proteica de iNOS induzida por GM-CSF em células FSDC. Microscopia de imunofluorescência da proteína iNOS. As células FSDC (0.2×10^6) foram incubadas sob as mesmas condições usadas na análise de *western blot*. *Escala representada* = 25 micrômetros (amplificação 250 x).

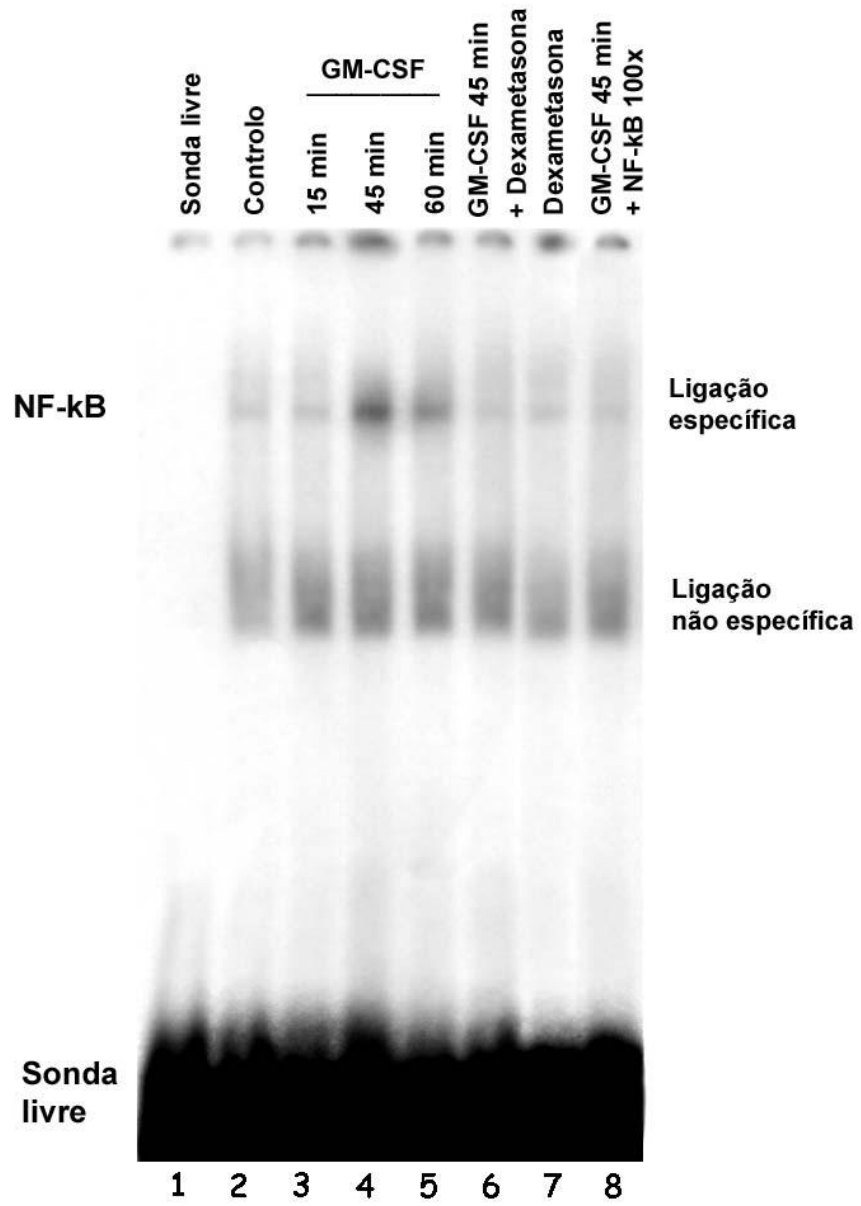
4.3.3. Efeito da dexametasona na activação do NF- κ B, em células FSDC estimuladas com GM-CSF

Nesta parte do trabalho foi avaliado o efeito da dexametasona na activação do NF- κ B induzida pelo GM-CSF, em extractos nucleares de células FSDC, através da análise de EMSA. As células foram incubadas com GM-CSF durante 15, 45 e 60 minutos, para determinar o efeito da citocina na activação do factor de transcrição NF- κ B. Paralelamente testou-se o efeito da incubação com GM-CSF, durante 45 minutos, na presença de dexametasona (0,5 μ M), em células pré-incubadas com o fármaco durante 30 min.

As Figs. 4.4A e 4.4B mostram que o GM-CSF induziu a ligação do NF- κ B ao ADN, exibindo o efeito máximo aos 45 minutos, tempo correspondente a um aumento da actividade de ligação do NF- κ B de 101% relativamente ao obtido nas células controlo (Fig. 4.4A, linhas 2 e 4, Fig. 4.4B). O pré-tratamento com dexametasona preveniu a ligação do NF- κ B ao ADN nas células estimuladas com GM-CSF. As mesmas figuras mostram que a incubação das células com dexametasona, durante 30 minutos, previamente à estimulação com GM-CSF, durante mais 45 minutos na presença do glucocorticóide, bloqueou por completo a ligação do NF- κ B ao ADN induzida pelo GM-CSF (Fig. 4.4A, linha 6). Nestas condições experimentais a ligação do NF- κ B ao ADN decresceu para 55% da actividade encontrada nas células estimuladas com GM-CSF, e não se apresentou significativamente diferente do controlo (Fig. 4.4B). Nas células incubadas apenas na presença de dexametasona não foi observado qualquer efeito na ligação do NF- κ B ao ADN (10% de diferença relativamente ao controlo) (Fig. 4.4A, linha 7).

Como controlo do método EMSA, foi usado um oligonucleótido não marcado (100 vezes em excesso) (linha 8), o qual inibiu a formação do complexo do NF- κ B com o oligonucleótido marcado radioactivamente.

A



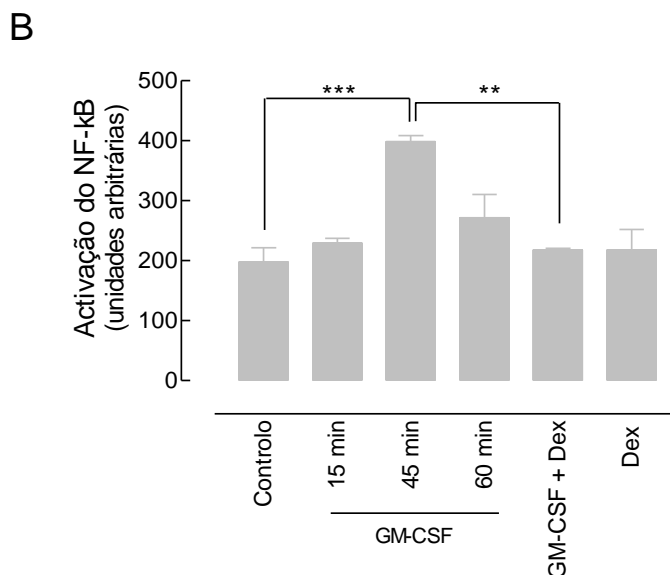


Fig. 4.4 - Efeito da dexametasona (Dex) na ligação do NF-κB ao ADN induzida por GM-CSF em células FSDC. (A) Análise de EMSA da activação do NF-κB. As células (2×10^6 células) foram incubadas apenas com meio de cultura (controlo, linha 2), ou na presença de 100 ng/ml de GM-CSF, durante 15, 45 e 60 minutos (linhas 3-5). Na condição correspondente à linha 6 as células foram pré-incubadas com $0,5 \mu\text{M}$ de dexametasona, durante 30 minutos, antes da estimulação com GM-CSF e dexametasona, por mais 45 minutos. Nas experiências controlo, apresentadas na linha 7, as células foram incubadas com dexametasona durante 75 minutos (tempo correspondente ao tempo total de incubação). Foi usado em excesso um oligonucleótido não marcado, ou seja, um oligonucleótido contendo um consenso de NF-κB não radioactivo, de modo a demonstrar a especificidade das bandas que apresentaram activação (linha 8). Os extractos nucleares foram submetidos a uma análise de EMSA, tal como descrito em Métodos (Capítulo 2). A imagem apresentada é representativa de três experiências efectuadas, com resultados semelhantes. (B) As bandas foram quantificadas com um analisador de imagem usando o programa Adobe Photoshop 7.0 e os resultados são apresentados como médias \pm SEM de três experiências independentes. ** representa $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, tal como determinado pela análise de ANOVA usando o teste de comparação múltipla de Bonferroni.

4.3.4. Efeito da dexametasona nos níveis citosólicos de I κ B- α , em células FSDC estimuladas com GM-CSF

Estudos anteriormente realizados demonstraram que o GM-CSF induz a degradação do I κ B- α em células FSDC (Cruz *et al.*, 2001). Neste trabalho, foi investigado o efeito da dexametasona na modulação dos níveis da proteína I κ B- α . Para isto foram examinados os níveis desta proteína nos extractos celulares citosólicos, através da análise de *western blot*.

Nas Figs. 4.5A e 4.5B pode-se observar que o GM-CSF induziu uma diminuição máxima nos níveis proteicos de I κ B- α aos 45 minutos, altura em que se verificou uma redução nos níveis da proteína para 44% do controlo (Fig. 4.5A, linhas 1 e 3, Fig. 4.5B). Esta diminuição foi completamente inibida quando as células FSDC foram previamente incubadas com dexametasona, durante 30 minutos, e seguidamente estimuladas com GM-CSF, na presença do glucocorticóide, durante mais 45 minutos (Fig. 4.5A, linha 5). Neste caso observou-se um aumento de 93% nos níveis proteicos de I κ B- α comparativamente com as células estimuladas com GM-CSF na ausência de dexametasona (Fig. 4.5B). De facto, a quantidade de I κ B- α presente nas células estimuladas com GM-CSF na presença de dexametasona não foi significativamente diferente dos níveis proteicos encontrados nas células controlo. Estes resultados mostram uma forte relação entre o efeito inibitório da dexametasona na activação do NF- κ B induzida pelo GM-CSF e na diminuição da proteína I κ B- α igualmente induzida pelo GM-CSF.

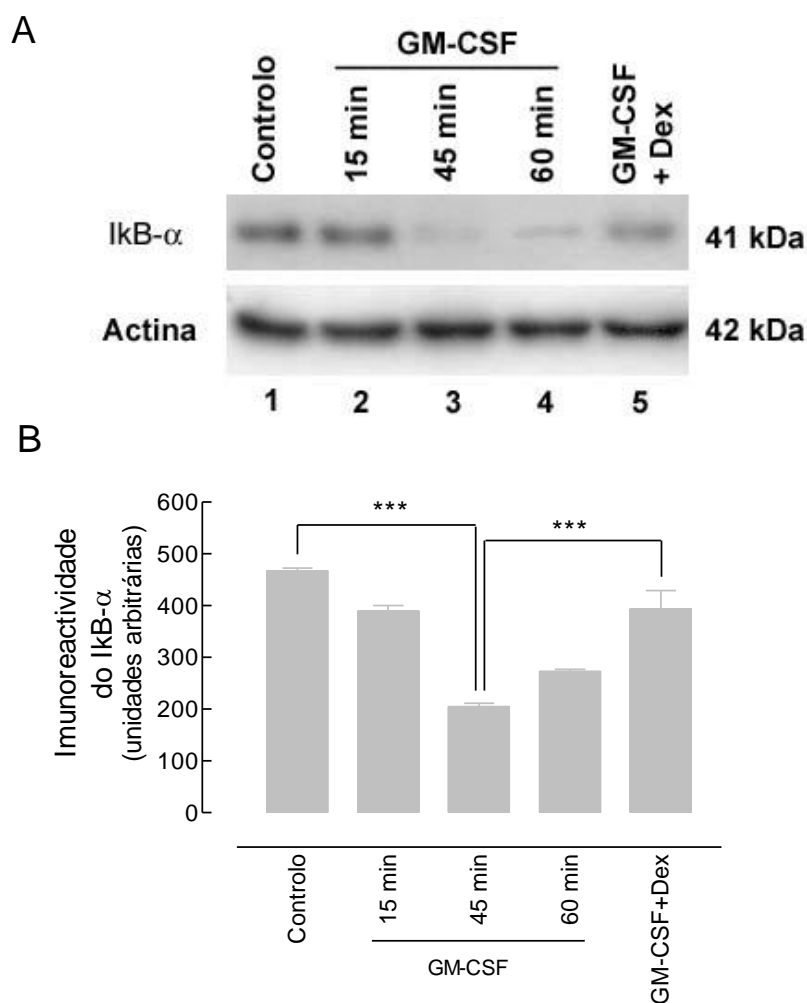


Fig. 4.5 - Efeito da dexametasona (Dex) na diminuição do IκB-α estimulada por GM-CSF em células FSDC. (A) Análise de *western blot* dos níveis proteicos de IκB-α e actina. As células (2×10^6 células) foram incubadas apenas em meio de cultura (controlo, linha 1) ou na presença de 100 ng/ml de GM-CSF, durante 15, 45 e 60 minutos (linhas 2-4). A linha 5 corresponde às células pré-incubadas com 0,5 μM de dexametasona, durante 30 minutos, antes da estimulação com 100 ng/ml de GM-CSF, durante 45 minutos. Os extractos celulares citosólicos foram submetidos a uma electroforese SDS-PAGE, transferidos para uma membrana PVDF e submetidos a uma análise de *western blot*, usando um anticorpo contra a proteína IκB-α, tal como descrito em Métodos (Capítulo 2). Seguidamente, a membrana foi submetida a um processo de *stripping* e incubada de novo com um anticorpo contra a actina, de modo a confirmar a igualdade de quantidade proteica em todas as condições da electroforese. A imagem apresentada é representativa de três experiências efectuadas, com resultados semelhantes. (B) As bandas obtidas na imagem foram quantificadas com um analisador de imagem usando o programa Adobe Photopaint 7.0 e os resultados são apresentados como médias \pm SEM de três experiências independentes. *** representa $p < 0.001$, tal como determinado pela análise de ANOVA usando o teste de comparação múltipla de Bonferroni.

4.4. Discussão

As propriedades anti-inflamatórias dos glucocorticóides, como a dexametasona, têm sido atribuídas a uma diminuição da expressão de genes imunomodulatórios (Yamamoto e Gaynor, 2001; Almawi e Melemedjian, 2002). Estes genes codificam a expressão de enzimas envolvidas nos processos inflamatórios, nomeadamente a iNOS, que produz NO em grandes quantidades (De Vera *et al.*, 1997; Wissink *et al.*, 1998). O NO parece estar implicado nos processos inflamatórios da pele, como por exemplo, na dermatite de contacto alérgica (Ormerod *et al.*, 1997; Sahin *et al.*, 2001), na dermatite atópica (Taniuchi *et al.*, 2001) e noutras doenças inflamatórias da pele (Weller, 1997). Nestas alterações, a terapêutica com GCs têm demonstrado efeitos benéficos. A acção dos glucocorticoides na expressão proteica parece ser mediada através do receptor intracelular dos glucocorticoides (GR) e, dependendo do gene alvo, o complexo ligando-GR pode estimular (transactivar) ou, alternativamente, inibir (transrepressão) a transcrição genética (Cato e Wade, 1996; Almawi e Melemedjian, 2002).

Neste trabalho, verificámos que em células FSDC, o glucocorticóide dexametasona inibe a expressão da proteína iNOS e a produção de NO induzida por GM-CSF. A dexametasona também impediu o decréscimo dos níveis proteicos de I κ B, e subseqüentemente a translocação do NF- κ B para o núcleo, induzida por GM-CSF (Figs. 4.4 e 4.5). O GM-CSF é uma citocina multipotente que medeia o desenvolvimento de DC imunologicamente activas em cultura (Witmer-Pack *et al.*, 1987; Kimber *et al.*, 1995; Thurner *et al.*, 2001) e que está envolvida em processos inflamatórios (Kimber *et al.*, 1995). Na pele, esta citocina epidérmica é produzida por queratinócitos, após a estimulação por alérgenos, e promove a maturação das LC favorecendo, assim, a apresentação antigénica aos linfócitos T (Gonçalo, 1998).

Resultados obtidos recentemente no nosso laboratório demonstraram que a citocina epidérmica GM-CSF induz a expressão da proteína iNOS e a produção de

NO, num processo dependente da migração nuclear do factor de transcrição NF- κ B (Cruz *et al.*, 2001). A migração deste factor ocorre após fosforilação e degradação do seu inibidor citosólico, o I κ B- α , que mantém o NF- κ B 'sequestrado' num estado inactivo no citoplasma, impedindo a sua migração para o núcleo e consequente ligação ao ADN (Baldwin, 1996; Ghosh *et al.*, 1998; Chen e Ghosh, 1999; Cyert, 2001). A região promotora do gene da iNOS contém locais de ligação para o NF- κ B (Pahl, 1999). Em situações em que ocorre activação do NF- κ B, como acontece com o GM-CSF, o NF- κ B migra para o núcleo e pode ligar-se à região promotora do gene da iNOS, estimulando desse modo a sua expressão proteica.

Neste estudo, observou-se que o glucocorticóide dexametasona inibe a expressão da iNOS e, conseqüentemente, a produção de NO. Observou-se, também, que a dexametasona preveniu o decréscimo dos níveis proteicos de I κ B- α (Fig. 4.5) e inibiu a ligação do NF- κ B ao ADN (Fig. 4.4). O mecanismo de supressão do NF- κ B pelos glucocorticóides tem sido extensamente estudado; contudo, a informação existente é ainda controversa. Inicialmente pensou-se que os glucocorticóides inibiam a activação do NF- κ B pelo aumento da transcrição genética da sua proteína inibitória I κ B- α , o que mantinha o NF- κ B na forma de complexos inactivos no citoplasma (Auphan *et al.*, 1995). Estudos posteriores mostraram que a interacção entre o receptor activado dos glucocorticóides e o NF- κ B interferia com a ligação deste ao ADN, impedindo a transcrição de genes (Caldenhoven *et al.*, 1995). Recentemente, novos estudos mostraram que os glucocorticóides podem interferir com o potencial de transactivação do NF- κ B através de alterações do recrutamento de co-factores essenciais para a sua actividade (De Bosscher *et al.*, 2000). Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que na presença de dexametasona não ocorreu um decréscimo nos níveis de I κ B- α citosólico, o que provavelmente impediu a migração do NF- κ B para o núcleo. Isto sugere que a dexametasona activou a síntese *de novo* de I κ B- α .

A indução de respostas alérgicas por antígenos de contacto está dependente da acção de citocinas produzidas localmente. Estas citocinas produzidas na pele podem também servir para influenciar as respostas inflamatórias e imunológicas provocadas por sensibilizadores químicos e, concomitantemente, as características das doenças alérgicas (Kimber *et al.*, 1995). Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que o efeito inibitório da dexametasona na expressão de iNOS e na produção de NO, induzidas por GM-CSF, poderá estar associado ao efeito anti-inflamatório deste glucocorticóide.

O conhecimento das vias de sinalização intracelular envolvidas na expressão da iNOS, e do mecanismo de acção de fármacos como os GCs, pode ser útil no tratamento de processos inflamatórios cutâneos e abrir caminhos para uma melhor compreensão destas patologias.

Capítulo 5

Conclusões

Os resultados deste trabalho permitiram obter as seguintes conclusões:

Os antígenos de contacto DNFB e NiSO₄ aumentaram a expressão de duas proteínas receptoras associadas à membrana, na linha celular FSDC: a molécula co-estimuladora CD40 e o receptor IL-12R. Verificou-se também que a citocina epidérmica GM-CSF aumentou por si só, ainda que de modo estatisticamente não significativo, a expressão destas moléculas. No entanto, a utilização de GM-CSF na presença dos dois antígenos de contacto, resultou num aumento aditivo da expressão de CD40 e IL-12R. O DCNB, referido na literatura como análogo inactivo do DNFB, não apresentou qualquer efeito na expressão destas moléculas, confirmando que os efeitos observados são específicos da acção do antígeno de contacto DNFB.

Os glucocorticóides, nomeadamente a dexametasona, são medicamentos imunossuppressores e anti-inflamatórios utilizados clinicamente no tratamento da dermatite de contacto alérgica. Esta patologia apresenta uma forte componente inflamatória, com produção local de grandes quantidades de NO pelas células da pele. Neste trabalho, verificou-se que a incubação das células FSDC com GM-CSF, aumentou a produção de NO, devido a um aumento da expressão da iNOS. A dexametasona inibiu totalmente a produção celular de NO, assim como, a expressão proteica da iNOS.

O GM-CSF induziu a activação do factor de transcrição NF-κB na linha celular FSDC. A região promotora do gene da iNOS tem locais de ligação para este factor de

transcrição, sugerindo que os efeitos do GM-CSF são mediados pelo NF- κ B. A dexametasona inibiu os efeitos do GM-CSF ao impedir a diminuição dos níveis proteicos do inibidor citosólico do NF- κ B, o I κ B- α ; bloqueando assim a ligação do NF- κ B ao ADN e, conseqüentemente, a transcrição genética.

Os resultados deste trabalho permitiram conhecer algumas das vias de sinalização intracelular activadas pela citocina epidérmica GM-CSF, e por dois antigénios de contacto de referência, durante a fase inicial de sensibilização da dermatite de contacto alérgica. Permitiram, também, elucidar algumas etapas do mecanismo de acção do glucocorticóide dexametasona, utilizado no tratamento da DCA.

O aumento da expressão das moléculas associadas à membrana, relaciona-se com o início da fase de sensibilização da DCA. É nosso objectivo conhecer melhor os mecanismos implicados na modulação da expressão de moléculas de superfície, que funcionam como marcadores de maturação das DC. Com estes conhecimentos procuraremos desenvolver metodologias *in vitro* que permitam detectar potenciais antigénios de contacto, o que permitirá reduzir o número de animais experiências utilizados em investigação.

Bibliografia

- Abbas AK, Murphy KM and Sher A (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**:787-793.
- Aiba S, Manome H, Yoshino Y and Tagami H (2000) In vitro treatment of human transforming growth factor-beta1-treated monocyte-derived dendritic cells with haptens can induce the phenotypic and functional changes similar to epidermal Langerhans cells in the initiation phase of allergic contact sensitivity reaction. *Immunology* **101**:68-75.
- Almawi WY and Melemedjian OK (2002) Negative regulation of nuclear factor-kappaB activation and function by glucocorticoids. *J Mol Endocrinol* **28**:69-78.
- Anjuere F, del Hoyo GM, Martin P and Ardavin C (2000) Langerhans cells develop from a lymphoid-committed precursor. *Blood* **96**:1633-1637.
- Anjuere F, Martin P, Ferrero I, Fraga ML, del Hoyo GM, Wright N and Ardavin C (1999) Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. *Blood* **93**:590-598.
- Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A and Karin M (1995) Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* **270**:286-290.
- Baldwin AS, Jr. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* **14**:649-683.
- Baltathakis I, Alcantara O and Boldt DH (2001) Expression of different NF-kappaB pathway genes in dendritic cells (DCs) or macrophages assessed by gene expression profiling. *J Cell Biochem* **83**:281-290.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B and Palucka K (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**:767-811.
- Banchereau J and Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**:245-252.
- Basketter DA, Evans P, Gerberick GF and Kimber IA (2002) Factors affecting thresholds in allergic contact dermatitis: safety and regulatory considerations. *Contact Dermatitis* **47**:1-6.

- Becker D, Kolde G, Reske K and Knop J (1994) An in vitro test for endocytotic activation of murine epidermal Langerhans cells under the influence of contact allergens. *J Immunol Methods* **169**:195-204.
- Berman B, Chen VL, France DS, Dotz WI and Petroni G (1983) Anatomical mapping of epidermal Langerhans cell densities in adults. *Br J Dermatol* **109**:553-558.
- Bogdan C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* **2**:907-916.
- Bonham CA, Lu L, Hoffman RA, Simmons RL and Thomson AW (1997) Nitric oxide production by dendritic cells is associated with impairment of T cell responses. *Transplant Proc* **29**:1116-1117.
- Bonham CA, Lu L, Li Y, Hoffman RA, Simmons RL and Thomson AW (1996) Nitric oxide production by mouse bone marrow-derived dendritic cells: implications for the regulation of allogeneic T cell responses. *Transplantation* **62**:1871-1877.
- Bredt DS (1999) Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res* **31**:577-596.
- Brennan PA and Moncada S (2002) From pollutant gas to biological messenger: the diverse actions of nitric oxide in cancer. *Ann R Coll Surg Engl* **84**:75-78.
- Bruch-Gerharz D, Ruzicka T and Kolb-Bachofen V (1998) Nitric oxide in human skin: current status and future prospects. *J Invest Dermatol* **110**:1-7.
- Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, Van de Stolpe A, Raaijmakers J, Koenderman L, Okret S, Gustafsson JA and Van der Saag PT (1995) Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* **9**:401-412.
- Cato AC and Wade E (1996) Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Bioessays* **18**:371-378.
- Caux C (1998) Pathways of development of human dendritic cells. *Eur J Dermatol* **8**:375-384.
- Chen FE and Ghosh G (1999) Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Oncogene* **18**:6845-6852.
- Chua AO, Chizzonite R, Desai BB, Truitt TP, Nunes P, Minetti LJ, Warriar RR, Presky DH, Levine JF, Gately MK and et al. (1994) Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *J Immunol* **153**:128-136.

- Chua AO, Wilkinson VL, Presky DH and Gubler U (1995) Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor-beta component. *J Immunol* **155**:4286-4294.
- Coleman JW (2001) Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol* **1**:1397-1406.
- Coleman JW (2002) Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. *Clin Exp Immunol* **129**:4-10.
- Corsini E and Galli CL (1998) Cytokines and irritant contact dermatitis. *Toxicol Lett* **102-103**:277-282.
- Coutant KD, de Fraissinette AB, Cordier A and Ulrich P (1999) Modulation of the activity of human monocyte-derived dendritic cells by chemical haptens, a metal allergen, and a staphylococcal superantigen. *Toxicol Sci* **52**:189-198.
- Cruz MT, Duarte CB, Goncalo M, Carvalho AP and Lopes MC (1999) Involvement of JAK2 and MAPK on type II nitric oxide synthase expression in skin-derived dendritic cells. *Am J Physiol* **277**:C1050-1057.
- Cruz MT, Duarte CB, Goncalo M, Figueiredo A, Carvalho AP and Lopes MC (2001) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates the transcription of nuclear factor kappa B and induces the expression of nitric oxide synthase in a skin dendritic cell line. *Immunol Cell Biol* **79**:590-596.
- Cruz MT, Duarte CB, Goncalo M, Figueiredo A, Carvalho AP and Lopes MC (2002) Differential activation of nuclear factor kappa B subunits in a skin dendritic cell line in response to the strong sensitizer 2,4-dinitrofluorobenzene. *Arch Dermatol Res* **294**:419-425.
- Cruz MT, Goncalo M, Figueiredo A, Carvalho AP, Duarte CB and Lopes MC (2003) The contact sensitizer nickel sulfate activates the transcription factors NF-kB and AP-1 and induces the expression of nitric oxide synthase in a skin dendritic cell line *Experimental Dermatology*, in press.
- Cyert MS (2001) Regulation of nuclear localization during signaling. *J Biol Chem* **276**:20805-20808.
- Davoust J and Banchereau J (2000) Naked antigen-presenting molecules on dendritic cells. *Nat Cell Biol* **2**:E46-48.
- De Bosscher K, Vanden Berghe W, Vermeulen L, Plaisance S, Boone E and Haegeman G (2000) Glucocorticoids repress NF-kappaB-driven genes by disturbing the interaction of

- p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:3919-3924.
- De Smedt AC, Van Den Heuvel RL, Zwi Berneman N and Schoeters GE (2001) Modulation of phenotype, cytokine production and stimulatory function of CD34+-derived DC by NiCl₂ and SDS. *Toxicol In Vitro* **15**:319-325.
- De Vera ME, Taylor BS, Wang Q, Shapiro RA, Billiar TR and Geller DA (1997) Dexamethasone suppresses iNOS gene expression by upregulating I-kappa B alpha and inhibiting NF-kappa B. *Am J Physiol* **273**:G1290-1296.
- del Hoyo GM, Martin P, Vargas HH, Ruiz S, Arias CF and Ardavin C (2002) Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature* **415**:1043-1047.
- Desai BB, Quinn PM, Wolitzky AG, Mongini PK, Chizzonite R and Gately MK (1992) IL-12 receptor. II. Distribution and regulation of receptor expression. *J Immunol* **148**:3125-3132.
- Engering A, Geijtenbeek TB and van Kooyk Y (2002) Immune escape through C-type lectins on dendritic cells. *Trends Immunol* **23**:480-485.
- Enk AH (1997) Allergic contact dermatitis: understanding the immune response and potential for targeted therapy using cytokines. *Mol Med Today* **3**:423-428.
- Farrell AJ and Blake DR (1996) Nitric oxide. *Ann Rheum Dis* **55**:7-20.
- Flores-Romo L (2001) In vivo maturation and migration of dendritic cells. *Immunology* **102**:255-262.
- Frleta D, Lin JT, Quezada SA, Wade TK, Barth RJ, Noelle RJ and Wade WF (2003) Distinctive Maturation of In Vitro Versus In Vivo Anti-CD40 mAb-Matured Dendritic Cells in Mice. *J Immunother* **26**:72-84.
- Garderet L, Cao H, Salamero J, Verge V, Tisserand E, Scholl S, Gorin NC and Lopez M (2001) In vitro production of dendritic cells from human blood monocytes for therapeutic use. *J Hematother Stem Cell Res* **10**:553-567.
- Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U and Presky DH (1998) The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**:495-521.
- Geissmann F, Prost C, Monnet JP, Dy M, Brousse N and Hermine O (1998) Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating

- factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med* **187**:961-966.
- Ghosh S, May MJ and Kopp EB (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**:225-260.
- Girolomoni G, Lutz MB, Pastore S, Assmann CU, Cavani A and Ricciardi-Castagnoli P (1995) Establishment of a cell line with features of early dendritic cell precursors from fetal mouse skin. *Eur J Immunol* **25**:2163-2169.
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborn BA (2000) Kuby Immunology, 4th ed (W. H. Freeman and company, New York) p.95-97.
- Gonçalo M (1998) Langerhans cell in allergic contact dermatitis. *Trab Soc Port Dermatol Venereol* **56**(2): 79-93.
- Gordon S (2002) Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* **111**:927-930.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS and Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* **126**:131-138.
- Greenlund AC, Farrar MA, Viviano BL and Schreiber RD (1994) Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *Embo J* **13**:1591-1600.
- Grohmann U, Belladonna ML, Bianchi R, Orabona C, Ayroldi E, Fioretti MC and Puccetti P (1998) IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF-kappaB and primes DC for IL-12 production. *Immunity* **9**:315-323.
- Grouard G, Risoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J and Liu YJ (1997) The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* **185**:1101-1111.
- Hart DN (1997) Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* **90**:3245-3287.
- Hart DNJ, MacDonald K, Vuckovic S, Clark GJ (2001) Phenotypic characterization of dendritic cells, in: *Dendritic Cells: Biology and clinical applications*, ed. Lotze MT, Thomson AW (Academic Press, San Diego) p. 97-118.

- Herouet C, Cottin M, LeClaire J, Enk A and Rousset F (2000) Contact sensitizers specifically increase MHC class II expression on murine immature dendritic cells. *In Vitro Mol Toxicol* **13**:113-123.
- Ito T, Inaba M, Inaba K, Toki J, Sogo S, Iguchi T, Adachi Y, Yamaguchi K, Amakawa R, Valladeau J, Saeland S, Fukuhara S and Ikehara S (1999) A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol* **163**:1409-1419.
- Janeway CA, Jr. (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54 Pt 1**:1-13.
- Janeway CA, Jr and Travers P (1996) Immunobiology, the immune system in health and disease, 2nd ed (Garland Publishing and Current Biology Ltd, London).
- Jonuleit H, Knop J and Enk AH (1996) Cytokines and their effects on maturation, differentiation and migration of dendritic cells. *Arch Dermatol Res* **289**:1-8.
- Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Wierenga EA and Kapsenberg ML (1999) Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J Immunol* **162**:3231-3236.
- Kato M, Neil TK, Fearnley DB, McLellan AD, Vuckovic S and Hart DN (2000) Expression of multilectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cells. *Int Immunol* **12**:1511-1519.
- Kelleher P and Knight SC (1998) IL-12 increases CD80 expression and the stimulatory capacity of bone marrow-derived dendritic cells. *Int Immunol* **10**:749-755.
- Kim J, Uyemura K, Van Dyke MK, Legaspi AJ, Rea TH, Shuai K and Modlin RL (2001) A role for IL-12 receptor expression and signal transduction in host defense in leprosy. *J Immunol* **167**:779-786.
- Kimber I and Dearman RJ (2002) Allergic contact dermatitis: the cellular effectors. *Contact Dermatitis* **46**:1-5.
- Kimber I and Dearman RJ (1996) Contact hypersensitivity: immunological mechanisms, in Toxicology of contact hypersensitivity, ed. Kimber I and Maurer T (Taylor&Francis, London) p. 4-25.

- Kimber I, Holliday MR and Dearman RJ (1995) Cytokine regulation of chemical sensitization. *Toxicol Lett* **82-83**:491-496.
- Koski GK, Lyakh LA, Cohen PA and Rice NR (2001) CD14+ monocytes as dendritic cell precursors: diverse maturation-inducing pathways lead to common activation of NF-kappaB/RelB. *Crit Rev Immunol* **21**:179-189.
- Krasteva M, Kehren J, Horand F, Akiba H, Choquet G, Ducluzeau MT, Tedone R, Garrigue JL, Kaiserlian D and Nicolas JF (1998) Dual role of dendritic cells in the induction and down-regulation of antigen-specific cutaneous inflammation. *J Immunol* **160**:1181-1190.
- Lambrecht BN (2001) Allergen uptake and presentation by dendritic cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **1**:51-59.
- Larregina AT, Falo LD, Jr. (2001) Dendritic Cells in context of skin immunity, in: *Dendritic Cells: Biology and clinical applications*, ed. Lotze MT, Thomson AW (Academic Press, San Diego) p.301-306.
- Lechmann M, Krooshoop DJ, Dudziak D, Kremmer E, Kuhnt C, Figdor CG, Schuler G and Steinkasserer A (2001) The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *J Exp Med* **194**:1813-1821.
- Lechmann M, Zinser E, Golka A and Steinkasserer A (2002) Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol* **129**:113-118.
- Lipscomb MF and Masten BJ (2002) Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* **82**:97-130.
- Liu YJ (2001) Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**:259-262.
- Lu L, Bonham CA, Chambers FG, Watkins SC, Hoffman RA, Simmons RL and Thomson AW (1996) Induction of nitric oxide synthase in mouse dendritic cells by IFN-gamma, endotoxin, and interaction with allogeneic T cells: nitric oxide production is associated with dendritic cell apoptosis. *J Immunol* **157**:3577-3586.
- Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM and O'Garra A (1995) Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* **154**:5071-5079.

- MacMicking J, Xie QW and Nathan C (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* **15**:323-350.
- Makala LH and Nagasawa H (2002) Dendritic cells: a specialized complex system of antigen presenting cells. *J Vet Med Sci* **64**:181-193.
- Mann J, Oakley F, Johnson PW and Mann DA (2002) CD40 induces interleukin-6 gene transcription in dendritic cells: regulation by TRAF2, AP-1, NF-kappa B, AND CBF1. *J Biol Chem* **277**:17125-17138.
- Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL and Akashi K (2001) Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* **97**:3333-3341.
- Markowicz S and Engleman EG (1990) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes differentiation and survival of human peripheral blood dendritic cells in vitro. *J Clin Invest* **85**:955-961.
- Marletta MA and Spiering MM (2003) Trace elements and nitric oxide function(). *J Nutr* **133**:1431S-1433S.
- Medzhitov R (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **1**:135-145.
- Mellman I and Steinman RM (2001) Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* **106**:255-258.
- Monfardini C, Canziani G, Plugariu C, Kieber-Emmons T, Godillot AP, Kwah J, Bajgier J, Chaiken I and Williams WV (2002) Structure-based design of mimetics for granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). *Curr Pharm Des* **8**:2185-2199.
- Moodycliffe AM, Shreedhar V, Ullrich SE, Walterscheid J, Bucana C, Kripke ML and Flores-Romo L (2000) CD40-CD40 ligand interactions in vivo regulate migration of antigen-bearing dendritic cells from the skin to draining lymph nodes. *J Exp Med* **191**:2011-2020.
- Morhenn VB (1997) Langerhans cells may trigger the psoriatic disease process via production of nitric oxide. *Immunol Today* **18**:433-436.
- Morita H, Semma M, Hori M and Kitano Y (1995) Clinical application of nitric oxide synthase inhibitor for atopic dermatitis. *Int J Dermatol* **34**:294-295.
- Morse MA, Mosca PJ, Clay TM and Lyerly HK (2002) Dendritic cell maturation in active immunotherapy strategies. *Expert Opin Biol Ther* **2**:35-43.

- Moser M, De Smedt T, Sornasse T, Tielemans F, Chentoufi AA, Muraille E, Van Mechelen M, Urbain J and Leo O (1995) Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* **25**:2818-2824.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**:55-63.
- Mougneau E, Hugues S and Glaichenhaus N (2002) Antigen presentation by dendritic cells in vivo. *J Exp Med* **196**:1013-1016.
- Muller G, Saloga J, Germann T, Schuler G, Knop J and Enk AH (1995) IL-12 as mediator and adjuvant for the induction of contact sensitivity in vivo. *J Immunol* **155**:4661-4668.
- Nagayama H, Sato K, Kawasaki H, Enomoto M, Morimoto C, Tadokoro K, Juji T, Asano S and Takahashi TA (2000) IL-12 responsiveness and expression of IL-12 receptor in human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* **165**:59-66.
- Nguyen VT and Benveniste EN (2002) Critical role of tumor necrosis factor-alpha and NF-kappa B in interferon-gamma -induced CD40 expression in microglia/macrophages. *J Biol Chem* **277**:13796-13803.
- Nicola NA, Smith A, Robb L, Metcalf D and Begley CG (1997) The structural basis of the biological actions of the GM-CSF receptor. *Ciba Found Symp* **204**:19-27; discussion 27-32.
- Oppenheim JJ, Yang D, Biragyn A, Howard OM and Plotz P (2002) Chemokine receptors on dendritic cells promote autoimmune reactions. *Arthritis Res* **4 Suppl 3**:S183-188.
- Ormerod AD, Copeland P and Shah SA (2000) Treatment of psoriasis with topical NG-monomethyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Br J Dermatol* **142**:985-990.
- Ormerod AD, Dwyer CM, Reid A, Copeland P and Thompson WD (1997) Inducible nitric oxide synthase demonstrated in allergic and irritant contact dermatitis. *Acta Derm Venereol* **77**:436-440.
- Ormerod AD, Weller R, Copeland P, Benjamin N, Ralston SH, Grabowksi P and Herriot R (1998) Detection of nitric oxide and nitric oxide synthases in psoriasis. *Arch Dermatol Res* **290**:3-8.
- Pahl HL (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**:6853-6866.

- Palmer RM, Ferrige AG and Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**:524-526.
- Pan J, Ju D, Wang Q, Zhang M, Xia D, Zhang L, Yu H and Cao X (2001) Dexamethasone inhibits the antigen presentation of dendritic cells in MHC class II pathway. *Immunol Lett* **76**:153-161.
- Parlato S, Santini SM, Lapenta C, Di Pucchio T, Logozzi M, Spada M, Giammarioli AM, Malorni W, Fais S and Belardelli F (2001) Expression of CCR-7, MIP-3beta, and Th-1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities. *Blood* **98**:3022-3029.
- Pfeilschifter J, Eberhardt W, Hummel R, Kunz D, Muhl H, Nitsch D, Pluss C and Walker G (1996) Therapeutic strategies for the inhibition of inducible nitric oxide synthase--potential for a novel class of anti-inflammatory agents. *Cell Biol Int* **20**:51-58.
- Pichowski JS, Cumberbatch M, Dearman, Basketter DA and Kimber I (2000) Investigation of induced changes in interleukin 1beta mRNA expression by cultured human dendritic cells as an in vitro approach to skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* **14**:351-360.
- Piemonti L, Monti P, Allavena P, Sironi M, Soldini L, Leone BE, Soggi C and Di Carlo V (1999) Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol* **162**:6473-6481.
- Pieri L, Domenici L and Romagnoli P (2001) Langerhans cells differentiation: a three-act play. *Ital J Anat Embryol* **106**:47-69.
- Presky DH, Yang H, Minetti LJ, Chua AO, Nabavi N, Wu CY, Gately MK and Gubler U (1996) A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:14002-14007.
- Quelle FW, Sato N, Witthuhn BA, Inhorn RC, Eder M, Miyajima A, Griffin JD and Ihle JN (1994) JAK2 associates with the beta c chain of the receptor for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and its activation requires the membrane-proximal region. *Mol Cell Biol* **14**:4335-4341.
- Qureshi AA, Hosoi J, Xu S, Takashima A, Granstein RD and Lerner EA (1996) Langerhans cells express inducible nitric oxide synthase and produce nitric oxide. *J Invest Dermatol* **107**:815-821.

- Ratzinger G, Stoitzner P, Ebner S, Lutz MB, Layton GT, Rainer C, Senior RM, Shipley JM, Fritsch P, Schuler G and Romani N (2002) Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin. *J Immunol* **168**:4361-4371.
- Reid CD (1998) The biology and clinical applications of dendritic cells. *Transfus Med* **8**:77-86.
- Ribas A, Butterfield LH and Economou JS (2000) Genetic immunotherapy for cancer. *Oncologist* **5**:87-98.
- Rogge L, Barberis-Maino L, Biffi M, Passini N, Presky DH, Gubler U and Sinigaglia F (1997) Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med* **185**:825-831.
- Ross R, Gillitzer C, Kleinz R, Schwing J, Kleinert H, Forstermann U and Reske-Kunz AB (1998) Involvement of NO in contact hypersensitivity. *Int Immunol* **10**:61-69.
- Ross R and Reske-Kunz AB (2001) The role of NO in contact hypersensitivity. *Int Immunopharmacol* **1**:1469-1478.
- Rowe A, Farrell AM and Bunker CB (1997) Constitutive endothelial and inducible nitric oxide synthase in inflammatory dermatoses. *Br J Dermatol* **136**:18-23.
- Ruco LP, Uccini S and Baroni CD (1989) The Langerhans' cells. *Allergy* **44 Suppl 9**:27-30.
- Sahin S, Onder M, Sancak B, Bukan N and Gurer MA (2001) The role of nitric oxide in allergic contact dermatitis. *Arch Dermatol Res* **293**:214-217.
- Salgado CG, Nakamura K, Sugaya M, Tada Y, Asahina A, Fukuda S, Koyama Y, Irie S and Tamaki K (1999) Differential effects of cytokines and immunosuppressive drugs on CD40, B7-1, and B7-2 expression on purified epidermal Langerhans cells¹. *J Invest Dermatol* **113**:1021-1027.
- Satthaporn S and Eremin O (2001) Dendritic cells (I): Biological functions. *J R Coll Surg Edinb* **46**:9-19.
- Schmitt DA, Bieber T, Cazenave JP and Hanau D (1990) Fc receptors of human Langerhans cells. *J Invest Dermatol* **94**:15S-21S.
- Shannon MF, Coles LS, Vadas MA and Cockerill PN (1997) Signals for activation of the GM-CSF promoter and enhancer in T cells. *Crit Rev Immunol* **17**:301-323.
- Shibaki A (1998) Fc epsilon RI on dendritic cells: a receptor, which links IgE mediated allergic reaction and T cell mediated cellular response. *J Dermatol Sci* **20**:29-38.

- Shortman K and Liu YJ (2002) Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* **2**:151-161.
- Smith FS and Titheradge MA (1998) Detection of NOS Isoforms by Western-blot Analysis, in: Nitric Oxide Protocols from Methods in Molecular Biology, Vol. 100, ed. Titheradge MA (Humana Press Inc., Totowa, NJ) p. 171-189.
- Steinman RM (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* **9**:271-296.
- Stingl G (1990) Dendritic cells of the skin. *Dermatol Clin* **8**:673-679.
- Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U and Murphy KM (1997) Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* **185**:817-824.
- Taniuchi S, Kojima T, Hara Mt K, Yamamoto A, Sasai M, Takahashi H and Kobayashi Y (2001) Increased serum nitrate levels in infants with atopic dermatitis. *Allergy* **56**:693-695.
- Teunissen MB, Wormmeester J, Krieg SR, Peters PJ, Vogels IM, Kapsenberg ML and Bos JD (1990) Human epidermal Langerhans cells undergo profound morphologic and phenotypical changes during in vitro culture. *J Invest Dermatol* **94**:166-173.
- Thurnher M, Zelle-Rieser C, Ramoner R, Bartsch G and Holtl L (2001) The disabled dendritic cell. *Faseb J* **15**:1054-1061.
- Tong AW and Stone MJ (2003) Prospects for CD40-directed experimental therapy of human cancer. *Cancer Gene Ther* **10**:1-13.
- Trinchieri G (1995) Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* **13**:251-276.
- Trinchieri G and Gerosa F (1996) Immunoregulation by interleukin-12. *J Leukoc Biol* **59**:505-511.
- Tuschi H and Kovac R (2001) Langerhans cells and immature dendritic cells as model systems for screening of skin sensitizers. *Toxicol In Vitro* **15**:327-331.
- Tuschi H, Kovac R and Weber E (2000) The expression of surface markers on dendritic cells as indicators for the sensitizing potential of chemicals. *Toxicol In Vitro* **14**:541-549.

- Valladeau J, Caux C, Lebecque S and Saeland S (2001) [Langerin: a new lectin specific for Langerhans cells induces the formation of Birbeck granules]. *Pathol Biol (Paris)* **49**:454-455.
- van Kooten C and Banchereau J (2000) CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* **67**:2-17.
- van Kooyk Y and Geijtenbeek TB (2002) A novel adhesion pathway that regulates dendritic cell trafficking and T cell interactions. *Immunol Rev* **186**:47-56.
- Vital AL, Gonçalo M, Cruz MT, Figueiredo A, Duarte CB and Lopes MC (2003) Dexamethasone prevents GM-CSF-induced NF- κ B activation, iNOS expression and NO production in a skin dendritic cell line *Mediators of Inflammation* **12** :71-78.
- Wallengren J and Larsson B (2001) Nitric oxide participates in prick test and irritant patch test reactions in human skin. *Arch Dermatol Res* **293**:121-125.
- Warbrick EV, Dearman RJ, Basketter DA and Kimber I (1999) Analysis of interleukin 12 protein production and mRNA expression in mice exposed topically to chemical allergens. *Toxicology* **132**:57-66.
- Watanabe H, Unger M, Tuvel B, Wang B and Sauder DN (2002) Contact hypersensitivity: the mechanism of immune responses and T cell balance. *J Interferon Cytokine Res* **22**:407-412.
- Weller R (1997) Nitric oxide--a newly discovered chemical transmitter in human skin. *Br J Dermatol* **137**:665-672.
- Weller R (1999) Nitric oxide, skin growth and differentiation: more questions than answers? *Clin Exp Dermatol* **24**:388-391.
- Wesa A and Galy A (2002) Increased production of pro-inflammatory cytokines and enhanced T cell responses after activation of human dendritic cells with IL-1 and CD40 ligand. *BMC Immunol* **3**:14.
- Wissink S, van Heerde EC, van der Burg B and van der Saag PT (1998) A dual mechanism mediates repression of NF- κ B activity by glucocorticoids. *Mol Endocrinol* **12**:355-363.
- Witmer-Pack MD, Olivier W, Valinsky J, Schuler G and Steinman RM (1987) Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* **166**:1484-1498.

- Wu C, Warriar RR, Wang X, Presky DH and Gately MK (1997) Regulation of interleukin-12 receptor beta1 chain expression and interleukin-12 binding by human peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Immunol* **27**:147-154.
- Wu L, Vandenabeele S and Georgopoulos K (2001) Derivation of dendritic cells from myeloid and lymphoid precursors. *Int Rev Immunol* **20**:117-135.
- Xie QW, Kashiwabara Y and Nathan C (1994) Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* **269**:4705-4708.
- Yamamoto Y and Gaynor RB (2001) Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* **107**:135-142.
- Yawalkar N, Brand CU and Braathen LR (1996) IL-12 gene expression in human skin-derived CD1a+ dendritic lymph cells. *Arch Dermatol Res* **288**:79-84.
- Yokozeki H, Katayama I and Nishioka K (1995) Experimental study for the development of an in vitro test for contact allergens. 1. Primary activation of hapten-specific T cells by hapten-conjugated epidermal cells. *Int Arch Allergy Immunol* **106**:394-400.
- Yoshimura S, Bondeson J, Foxwell BM, Brennan FM and Feldmann M (2001) Effective antigen presentation by dendritic cells is NF-kappaB dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. *Int Immunol* **13**:675-683.
- Zambruno G, Cossarizza A, Zacchi V, Ottani D, Luppi AM, Giannetti A and Girolomoni G (1995) Functional intercellular adhesion molecule-3 is expressed by freshly isolated epidermal Langerhans cells and is not regulated during culture. *J Invest Dermatol* **105**:215-219.
- Zingarelli B, Sheehan M and Wong HR (2003) Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine. *Crit Care Med* **31**:S105-111.