

Capítulo 1

Introdução

As células dendríticas (DC) da pele, denominadas células de *Langerhans* (LC), foram descritas pela primeira vez em 1868 por Paul Langerhans. Posteriormente, em meados de 1970, Ralph Steinman identificou uma população de células com forma dendrítica no baço (Steinman e Cohn, 1973).

As células dendríticas, componente essencial do sistema imunológico, localizam-se nos tecidos periféricos não linfóides num estado imaturo, e são reactivas a sinais característicos de um processo infeccioso ou inflamatório, ou ainda de destruição de tecidos. Estes sinais incluem produtos derivados de agentes patogénicos, designadamente o lipopolissacarídeo (LPS), o ARN de cadeia dupla de vírus, motivos de citosina e guanina (CpG) não metilados de ADN bacteriano e ainda citocinas inflamatórias, como o factor de necrose tumoral (TNF)- α , a interleucina (IL)-1 e a IL-2. Perante estes estímulos, as DC sofrem um processo de maturação que se traduz pela produção de citocinas, quimiocinas e pela expressão aumentada de moléculas envolvidas numa eficiente apresentação de antígenos (Ag) aos linfócitos T. Entre estas moléculas incluem-se as co-estimuladoras, CD40, CD80, CD86, DC-SIGN (molécula não integrina, captadora da molécula de adesão intercelular 3 e específica das DC), e as moléculas do complexo *major* de histocompatibilidade (MHC) II contendo o Ag que irá ser reconhecido pelo receptor dos linfócitos T (TCR) (Flores-

Romo, 2001). Durante este processo de maturação, as DC abandonam os tecidos periféricos, entram nos vasos linfáticos aferentes e migram para os gânglios linfáticos onde interagem com os linfócitos T virgens (*naive*) e iniciam uma resposta imunológica específica.

A demonstrar a complexidade e diversidade da biologia das DC, surgem estudos recentes, indicando que as DC são essenciais no bloqueio de linfócitos T potencialmente auto-reactivos que escaparam à selecção negativa efectuada no timo. Assim, as DC desempenham um papel essencial na tolerância periférica (Steinman *et al.*, 2000; Hawiger *et al.*, 2001; Mellman e Steinman, 2001; Legge *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002, Steinman *et al.*, 2003) e o balanço entre imunidade e tolerância é modulado pela dinâmica e flexibilidade das células dendríticas.

A poderosa actividade adjuvante que as DC possuem na estimulação de respostas celulares específicas por parte dos linfócitos tem contribuído para o desenvolvimento de estratégias imuno-terapêuticas, designadamente de vacinas anti-microbianas potentes, e estratégias que visam a estimulação de respostas anti-tumorais. Por outro lado, o facto de as DC promoverem tolerância periférica tem contribuído para a sua utilização terapêutica no bloqueio de respostas imunológicas que medeiam reacções alérgicas, doenças auto-imunes e rejeição de transplantes.

1.1. Células dendríticas: origem, diferenciação e distribuição no organismo

As células dendríticas são continuamente produzidas a partir de precursores hematopoiéticos da medula óssea. Estas células podem ser divididas em vários tipos, de acordo com a expressão de marcadores de superfície, com base em funções específicas que possuem e consoante a localização no organismo. Os mecanismos que controlam a produção das DC ou dos seus progenitores, na medula óssea, não são completamente conhecidos e permanece por esclarecer se estes mecanismos dependem de factores provenientes de outros locais do organismo, além da medula óssea, e se são afectados por estímulos ambientais externos, como produtos bacterianos (Grabbe *et al.*, 2000).

Existem vários tipos de DC com diferentes funções biológicas e os estudos que investigam este assunto referem dois modelos que explicam a proveniência dos diferentes tipos especializados de células dendríticas. O modelo da plasticidade funcional refere que os vários tipos de DC representam diferentes estados de maturação de uma linhagem celular única, em que a diversidade de funções depende exclusivamente de sinais locais presentes no ambiente envolvente (figura 1a). Alternativamente, o modelo da linhagem especializada sugere que os vários tipos de DC derivam de linhagens celulares independentes (figura 1b). De acordo com este modelo, os sinais que determinam a separação das linhagens actuam numa fase inicial da diferenciação das DC e portanto num precursor destas células. Provavelmente, a realidade *in vivo* será uma mistura destes dois modelos, em que um elevado grau de plasticidade funcional parece, cada vez mais, ser uma característica geral das DC e dos seus precursores (Grabbe *et al.*, 2000; Shortman e Liu, 2002).

Figura 1. Modelos de formação de células dendríticas funcionalmente distintas. a - O modelo da plasticidade funcional sugere que todas as células dendríticas (DC) pertencem a uma única linhagem celular hematopoiética. Os diferentes tipos de DC são formados por acção de factores presentes no ambiente envolvente e possuem uma elevada plasticidade funcional. b - O modelo da linhagem especializada sugere que os diferentes tipos de DC derivam de diferentes precursores formados numa fase precoce da via de diferenciação das DC. iDC, DC imatura; pDC, precursor da DC (retirado de Shortman e Liu, 2002).

As células dendríticas de murganho são consideradas totalmente diferenciadas quando expressam à superfície a proteína CD11c (subunidade αX da integrina CR4), as moléculas co-estimuladoras CD80, CD86, CD40 e quando apresentam moderada a elevada expressão de moléculas MHCII. No entanto, quando as células são activadas os níveis destas proteínas podem ser aumentados, ocorrendo então a maturação celular das mesmas com aquisição da capacidade de induzir a proliferação de linfócitos T. A expressão diferencial de proteínas de superfície, nomeadamente CD4, CD8, CD11b (subunidade αM da integrina CR3) e o receptor multilectina específico das DC, DEC-205 (CD205), permitem distinguir cinco tipos de células dendríticas nos tecidos linfóides de murganhos de laboratório não infectados, como indicado na tabela 1 (Shortman e Liu, 2002).

Tal como referido anteriormente, o conhecimento da origem dos diferentes tipos de DC de murganhos permanece ainda por esclarecer. Inicialmente pensava-se que os diferentes tipos de células resultavam de linhagens de desenvolvimento separadas, sendo as DC CD8⁺ provenientes de precursores linfóides e as DC CD8⁻ provenientes de precursores mielóides (Reid, 1998). No entanto, estudos recentes

sugerem que o fenótipo de superfície das DC totalmente diferenciadas e as suas capacidades funcionais não estão pré-determinados nestes precursores iniciais hematopoiéticos, uma vez que qualquer um destes precursores (linfóide ou mielóide) pode originar, em cultura, todos os tipos de DC (Martin *et al.*, 2000; Traver *et al.*, 2000; Martínez del Hoyo *et al.*, 2002 a).

Resultados recentemente publicados demonstram a ocorrência de algum grau de separação de linhagens, mas numa fase de diferenciação posterior à dos precursores hematopoiéticos linfóide e mielóide, verificando-se, no entanto, algum grau de plasticidade funcional quer nos precursores, quer nos diferentes tipos de células dendríticas (Ito *et al.*, 2001; Shortman e Liu, 2002) (figura 2). A existência desta plasticidade funcional nas DC totalmente diferenciadas foi recentemente demonstrada, uma vez que o mesmo tipo de DC pode promover quer uma resposta por parte dos linfócitos T *helper* (Th) do tipo 1, quer do tipo Th2, dependendo da dose, do tipo de antigénio, do meio envolvente no momento da maturação (Rescigno, 2002; Boonstra *et al.*, 2003) e ainda do estado de maturação das DC. Todas estes factores poderão modular a produção de IL-12 pelas DC e assim promover uma resposta Th1, que se caracteriza pela produção de IL-2 e interferão (IFN)- γ , ou pelo contrário, favorecer respostas imunológicas do tipo Th2 (com produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10) (Lipscomb e Masten, 2002; Shortman e Liu, 2002; Boonstra *et al.*, 2003).

Um estudo recente demonstra ainda que todos os tipos de DC existentes em órgãos linfóides de murganho podem ser reconstituídos a partir de um precursor comum às células dendríticas que se caracteriza por ser desprovido de potencial de diferenciação linfóide e mielóide. Os autores deste estudo sugerem a existência de uma via independente de diferenciação das células dendríticas (Martínez del Hoyo *et al.*, 2002 b).

Tabela 1- Tipos de células dendríticas e sua distribuição em tecidos linfóides de murganho

| | DC linfóides CD4 ⁻ CD8 ^{alto} CD205 ^{alto} CD11b ⁻ | DC mielóides CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD205 ⁻ CD11b ⁺ | DC mielóides CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD205 ⁻ CD11b ⁺ | DC mielóides CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD205 ⁺ CD11b ⁺ | Células <i>Langerhans</i> CD4 ⁻ CD8 ^{baixo} CD205 ^{alto} CD11b ⁺ |
|--|---|---|---|---|--|
| Percentagem total de DC em | | | | | |
| -Baço | 23 | 56 | 19 | <4 | <1 |
| -Timo | 70 | | | | |
| -Gânglios linfáticos | 19 | 4 | 37 | 26 | <4 |
| -Gânglios linfáticos de drenagem da pele | 17 | 4 | 17 | 20 | 33 |

Apesar dos estudos mais recentes sugerirem que o fenótipo de superfície das DC e as suas capacidades funcionais não estão pré-determinados nestes precursores iniciais hematopoiéticos, os termos DC linfóide e DC mielóide ainda continuam a ser bastante utilizados na literatura. Estes resultados dizem respeito a murganhos de laboratório não infectados. Os restantes 30% de DC do timo parecem ser principalmente CD4⁻CD8⁻CD205⁺CD11b⁻, com algumas CD11b⁺ (retirado de Shortman e Liu, 2002).

No Homem, ao contrário dos murganhos em que foram efectuados um elevado número de estudos, existe pouca informação sobre os diferentes tipos de DC presentes nos tecidos. O sangue representa a principal fonte de células dendríticas e, embora algumas DC do sangue estejam totalmente diferenciadas e aptas a induzirem proliferação dos linfócitos, o sangue é essencialmente uma fonte de precursores de DC e de células dendríticas imaturas. Além disso, as DC do sangue são extremamente heterogéneas no que diz respeito à expressão de uma série de marcadores, e estas diferenças reflectem, essencialmente, diferentes estados de maturação e activação, e não diferentes linhagens das DC. Uma outra característica que impede a comparação directa das DC humanas com as de murganho é a ausência da proteína CD8 nas células dendríticas humanas, pelo que permanece por esclarecer o correspondente nos seres humanos das DC CD8⁺ de murganho (Lipscomb e Masten, 2002).

Muitos dos conhecimentos adquiridos sobre os vários tipos de DC humanas e as suas vias de desenvolvimento a partir de precursores (figura 2) provêm, não do

isolamento directo de células dendríticas a partir de tecidos, mas de estudos do seu desenvolvimento em cultura a partir de precursores de DC ou de DC imaturas. Estes estudos sugerem a existência de diferentes vias de desenvolvimento das DC, embora a correspondência entre as DC produzidas em cultura e as existentes *in vivo*, permaneça ainda por confirmar, tanto em murganhos como no Homem. Assim, no Homem têm sido descritos três tipos de DC: 1) as células dendríticas da epiderme, ou células de *Langerhans*; 2) as células dendríticas da derme ou intersticiais localizadas em vários tecidos periféricos; 3) as células dendríticas plasmacitóides, produtoras de interferão do tipo I (IFN- α/β), localizadas no sangue e em tecidos (Bancherau *et al.*, 2000; Grabbe *et al.*, 2000; Liu, 2001, Rescigno, 2002).

Apesar de existirem algumas diferenças entre as DC de murganho e humanas, é também evidente a existência de grandes semelhanças entre as mesmas, pelo que as células dendríticas de murganho fornecem um modelo apropriado para o estudo da biologia das células dendríticas. Algumas diferenças devem-se, provavelmente, ao processo de obtenção das células (produção em cultura, isolamento a partir dos tecidos ou do sangue) e não reflectem diferenças fundamentais entre estas duas espécies. De referir ainda que, tanto as DC de murganho como as humanas são muito heterogéneas no que respeita aos diferentes tipos de células existentes e às suas vias de diferenciação. Além disto, as funções biológicas das DC são fortemente moduladas por produtos microbianos e outros eventos potencialmente patológicos para o organismo, designadamente a destruição de tecidos (Lipscomb e Masten, 2002; Shortman e Liu, 2002).

Figura 2. Vias de desenvolvimento das células dendríticas (DC) humanas. Alguns tipos de linhagens das células dendríticas progridem para um estado de diferenciação terminal mas imaturo, sob a acção de citocinas endógenas, sendo necessários estímulos exógenos para uma completa activação e maturação. Outras linhagens de células dendríticas permanecem provavelmente num estado precursor e requerem estimulação microbiana para produzirem células dendríticas totalmente maduras. CLA, antigénio associado a linfócitos cutâneos; pDC, precursor da DC; TGF- β , factor de crescimento transformante β ; TNF- α , factor de necrose tumoral- α ; GM-CSF, factor estimulante de colónias de macrófagos e granulócitos; TLR, receptores *Toll-like*; CD40L, ligando do CD40; IL, interleucina; IFN, interferão (adaptado de Lipscomb e Masten, 2002 e Shortman e Liu, 2002).

1.2. Imunobiologia das células dendríticas

1.2.1. Captação de antigénios

As células dendríticas imaturas são altamente endocíticas, ao contrário das DC maduras que perdem esta capacidade. Os mecanismos envolvidos na captação dos antigénios pelas células dendríticas são a fagocitose através de receptores membranares, a endocitose mediada por receptores num processo dependente de

clatrina, e ainda a macropinocitose de fase fluída (Mellman e Steinman, 2001). Nas DC, o processo de macropinocitose é constitutivo, não selectivo e permite a internalização contínua de grandes volumes de fluído (Sallusto *et al.*, 1995). As células dendríticas expressam diversos receptores envolvidos na captação de antigénios, designadamente:

- a) receptores para as imunoglobulinas (Ig) G: Fc γ Rs (Fc γ RII/CD32, receptor de baixa a moderada afinidade e Fc γ RI/CD64, receptor de alta afinidade);
- b) receptores para IgE: Fc ϵ Rs (Fc ϵ RI, receptor de alta afinidade e Fc ϵ RII/CD23, receptor de baixa afinidade);
- c) receptores do complemento: CD11b (CR3), CD11c, CD88 (C5a);
- d) receptores *scavenger*, como a integrina $\alpha_v\beta_5$ e CD36, envolvidos na fagocitose de células apoptóticas ou necróticas (Hart, 1997; Banchereau e Steinman, 1998; Gordon, 2002);
- e) receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que reconhecem padrões moleculares associados a agentes patogénicos (PAMPs), ou seja, estruturas invariáveis dos microorganismos, existentes na superfície celular dos mesmos e ausentes nas células hospedeiras (Figdor *et al.*, 2002). Os PRRs incluem os receptores de lectina tipo C e os receptores *Toll-like* (TLR).

Os receptores de lectina tipo C ligam açúcares presentes em microorganismos, nomeadamente estruturas contendo manose, através de domínios de reconhecimento de hidratos de carbono, altamente conservados durante a evolução (Figdor *et al.*, 2002). Dentro deste grupo de receptores, incluem-se: o receptor de manose (CD206); o receptor específico das DC e que liga a lectina C do tipo manano, DEC205 (CD205); a langerina (CD207) presente nas células de *Langerhans* e o DC-SIGN (CD209, cujos ligandos exógenos são o vírus de imunodeficiência humana, *Mycobacterium tuberculosis*, *Shistosoma mansoni*, *Helicobacter pylori*) (Engering *et al.*, 2002; van Kooyk e Geijtenbeek, 2002; Geijtenbeek *et al.*, 2003; Van Die *et al.*, 2003). Estes receptores de lectina tipo C podem também actuar como receptores de reconhecimento de auto-antigénios.

Os receptores *Toll-like* (TLR) são proteínas transmembranares expressas nas DC, macrófagos e células epiteliais. Estes receptores desempenham um papel crucial no reconhecimento de uma infecção bacteriana e promovem a activação de diferentes cascatas de sinalização intracelular que culminam com a activação dos factores de transcrição proteína activadora 1 (AP-1) e factor nuclear de transcrição *kappa* B (NF- κ B) e ainda com a maturação das DC (Medzhitov, 2001; Rescigno, 2002).

Até à data, foram identificados dez membros da família dos TLR responsáveis pelo reconhecimento de diferentes ligandos. O TLR4 está envolvido no reconhecimento do LPS de bactérias Gram-negativas e de ácidos lipoteicóicos de bactérias Gram-positivas. O TLR2 reconhece o LPS da espiroqueta *Leptospira interrogans* e da *Porphyromonas gingivitis*, e ainda lipoproteínas bacterianas, o peptidoglicano de bactérias Gram-positivas, o lipoarabinomanano da *Mycobacteria*, o lípido fosfatidilinositol glicosilado do *Trypanossoma cruzi* e a parede celular de leveduras. Este vasto número de ligandos do TLR2 é explicado, em parte, pela cooperação entre este receptor e outros dois receptores, designadamente o TLR6 e TLR1. Deste modo, a formação de heterodímeros entre o TLR2 e o TLR6, ou entre o TLR2 e o TLR1 ditam a especificidade no reconhecimento do ligando. O TLR3 é expresso predominantemente em células dendríticas e funciona como receptor de ARN de cadeia dupla proveniente de vírus. O TLR5 está envolvido no reconhecimento da flagelina das bactérias e o TLR9 reconhece motivos CpG não metilados de ADN bacteriano.

Embora os TLR estejam envolvidos no reconhecimento dos padrões moleculares associados a agentes patogénicos, não está ainda comprovado que participem no processo de internalização dos mesmos. Estudos recentes sugerem, no entanto, a internalização do TLR4 e TLR9 após reconhecimento dos respectivos ligandos (Medzhitov, 2001; Rescigno, 2002; Imler e Hoffmann, 2003).

1.2.2. Processamento de antígenos

As DC possuem a capacidade de captar antígenos, por mecanismos dependentes e independentes de receptores, e de os degradar, com produção de péptidos antigénicos que se ligam a moléculas MHC.

O processamento de antígenos pelas células dendríticas ocorre essencialmente através de duas vias: uma via exógena, ou endossómica, e uma via endógena, ou proteossómica, em que os antígenos são acoplados a moléculas MHCII e MHCI, respectivamente (Watts, 1999; Davoust e Banchereau, 2000; Mellman e Steinman, 2001; Lipscom e Masten, 2002).

Apresentação do antígeno pela via MHC classe II ou endossómica

Habitualmente, os antígenos captados do meio extracelular por endocitose, fagocitose ou macropinocitose, são eficientemente acoplados a moléculas do complexo *major* de histocompatibilidade classe II e reconhecidos posteriormente por linfócitos T CD4⁺. Após captação, os antígenos são dirigidos para endossomas onde ocorre clivagem em pequenos péptidos antigénicos por enzimas proteolíticas. Estes péptidos entram posteriormente em compartimentos vesiculares acídicos, ricos em moléculas MHCII, onde ocorre a ligação dos péptidos antigénicos às moléculas de MHCII. Estas moléculas, com o novo péptido antigénico acoplado, atravessam o citoplasma em vacúolos exocíticos e dirigem-se para a superfície celular. As MHCII podem ser recicladas por vias endocíticas e adquirem novos antígenos nos compartimentos vesiculares ricos em moléculas MHCII.

As cadeias α e β que constituem as moléculas MHC de classe II são sintetizadas no retículo endoplasmático (RE) onde uma cadeia constante protege o domínio capaz de ligar polipeptídeos das MHCII de uma eventual ligação prematura a antígenos endógenos. Esta cadeia constante é posteriormente degradada, por proteases, num polipeptídeo pequeno (denominado de CLIP, polipeptídeo da cadeia constante associado a classe II). Este polipeptídeo é então substituído pelo péptido antigénico, nas vesículas ricas em MHCII, por um factor trocador de péptidos

(designado de HLA-DM no Homem e H-2M nos murganhos) (Lipscomb e Masten, 2002).

Nas células dendríticas imaturas, as moléculas MHCII e os péptidos degradados acumulam-se em vesículas intracelulares. Após activação das DC, os complexos MHCII/antigénio migram para a superfície celular.

Mais recentemente foi proposto um outro mecanismo pelo qual péptidos antigénicos são acoplados a moléculas de MHCII em células dendríticas imaturas. Segundo este modelo, proteases extracelulares podem degradar antigénios externos e originarem péptidos que se podem ligar directamente a moléculas MHCII vazias presentes na superfície das células dendríticas (Davoust e Banchereau, 2000). No entanto, a relevância fisiológica deste modelo permanece ainda por esclarecer.

Apresentação do antigénio pela via MHC classe I ou proteassómica

Na via endógena ou proteassómica os antigénios intracelulares são eficientemente acoplados a moléculas do complexo *major* de histocompatibilidade classe I e reconhecidos posteriormente por linfócitos T CD8⁺. Assim, as proteínas endógenas (próprias ou de origem patogénica) são degradadas em péptidos pelo proteassoma. Por intermédio do transportador associado ao processamento de antigénios (TAP), os péptidos dirigem-se para o RE. Neste organito, as moléculas MHCI recém-sintetizadas ligam-se aos péptidos antigénios e os complexos MHCI/péptidos antigénios são posteriormente transportados, por vesículas exocíticas, para a membrana citoplasmática.

Apesar de durante muito tempo se pensar que a via proteassómica processava apenas antigénios sintetizados dentro das células apresentadoras de antigénio, designadamente antigénios tumorais e polipeptídeos provenientes de vírus sintetizados no interior das DC durante uma infecção, actualmente sabe-se que antigénios exógenos podem sofrer também degradação no proteassoma e em seguida migrar para o RE para ser acoplados às moléculas MHCI, tal como os antigénios endógenos (Shen *et al.*, 1997; Rodriguez *et al.*, 1999; Watts, 1999). Este processo é

denominado de apresentação cruzada de antígenos (*cross-presentation*) (Heath e Carbone, 2001 a; Mellman e Steinman, 2001) e ocorre apenas em algumas células, designadamente nas DC. Recentemente foi demonstrado que os ligandos microbianos de alguns TLR, designadamente do TLR3 e TLR9, activam as DC e induzem apresentação cruzada de antígenos a linfócitos T citotóxicos (Datta *et al.*, 2003).

O processo de apresentação cruzada de antígenos pode originar por parte dos linfócitos CD8⁺ tanto uma imunidade eficaz (*cross-priming*) como induzir tolerância (*cross-tolerance*) (Heath e Carbone, 2001 b). Este mecanismo permite que as DC activem linfócitos T CD8⁺ (ou induzam tolerância) contra antígenos que não foram expressos nas próprias células dendríticas (Albert *et al.*, 2001; Heath e Carbone, 2001 b), designadamente antígenos tumorais após as DC fagocitarem células tumorais e antígenos de bactérias ou vírus após fagocitose de células apoptóticas infectadas.

O facto de o processo de apresentação cruzada de antígenos induzir imunidade ou tolerância tem sido explicado por dois mecanismos alternativos, referidos na literatura. Um dos mecanismos refere a existência de apenas um tipo de DC com plasticidade para ser tolerogénico ou imunogénico, dependendo da natureza do antígeno (Heath e Carbone, 2001 b). Alternativamente, poderão existir dois tipos de DC com funções especializadas para regular a imunidade ou induzir tolerância (células dendríticas tolerogénicas). Contudo, não existem evidências directas que comprovem esta teoria (Austyn, 1999; Kalinsky *et al.*, 1999; Sallusto e Lanzavecchia, 1999). Vários estudos referem que DC imaturas captam antígenos derivados de células apoptóticas, tumorais ou transplantadas, presentes na periferia, e transferem os péptidos antigénicos para DC residentes nos gânglios linfáticos, provavelmente DC plasmacitóides, as quais, em situações de *steady-state*, induzem tolerância (Inaba *et al.*, 1998; Kalinsky *et al.*, 1999; Iyoda *et al.*, 2002).

Este processo de apresentação cruzada de antígenos pode ser manipulado e utilizado para fins terapêuticos, designadamente na indução de respostas *in vivo* dos linfócitos T CD8⁺ a uma série de antígenos tumorais ou microbianos, ou ainda, na

modulação de respostas auto-imunes e na sobrevivência de transplantes (Bonham *et al.*, 2002).

1.2.3. Mecanismos de migração e maturação das células dendríticas

As células dendríticas derivadas da medula óssea circulam no sangue como células precursoras, podendo migrar para os tecidos não linfóides e aí residirem como células dendríticas imaturas. As células intersticiais e as células de *Langerhans* são exemplos de DC imaturas que se localizam em zonas de interface com o ambiente externo, designadamente nas mucosas e na pele.

O desenvolvimento de um processo infeccioso induz a libertação de vários factores solúveis, nomeadamente quimiocinas e citocinas. As quimiocinas são péptidos activadores de receptores acoplados a proteínas G, expressos nos leucócitos e que regulam o recrutamento de células inflamatórias. Estes péptidos são produzidos nos tecidos periféricos por células endoteliais, células epiteliais e leucócitos, sendo a sua produção induzida em resposta a estímulos inflamatórios (quimiocinas inflamatórias). Além disso, são também produzidas, de um modo constitutivo, por células endoteliais e leucócitos nos órgãos linfóides secundários, regulando interacções entre células dendríticas, linfócitos B e T (quimiocinas constitutivas ou linfóides) (Sallusto e Lanzavecchia, 1999).

Na presença de um foco infeccioso, as quimiocinas promovem o recrutamento das DC imaturas que captam e processam os antigénios presentes no local da infecção. Por acção de citocinas, algumas produzidas pelas próprias DC (IFN- α/β em infecções virais, TNF- α , IL-1 β), ocorre a activação das células dendríticas. Simultaneamente, as DC migram através dos vasos linfáticos até aos gânglios linfáticos mais próximos, onde se dirigem para as zonas ricas em linfócitos T virgens e, após interacção com estas células, iniciam a resposta imunológica (Banchereau e Steinman, 1998; Flores-Romo, 2001; Rescigno e Borrow, 2001). Durante o processo

de migração, ocorre a maturação das DC que se caracteriza por uma série de modificações fenotípicas e funcionais, referidas na figura 3.

A migração das DC do sangue para os tecidos periféricos e o seu movimento dos tecidos periféricos para os tecidos linfóides, durante o desenvolvimento de um processo inflamatório, ocorre por acção das quimiocinas e é acompanhado por uma expressão diferencial de proteínas de adesão e de receptores de quimiocinas nas DC e nas células endoteliais. Assim, as DC produzem quimiocinas inflamatórias e linfóides de um modo coordenado no tempo e no espaço. As quimiocinas inflamatórias (proteína inflamatória de macrófagos 1, MIP-1; quimiocina normalmente expressa e segregada por linfócitos T, regulada na activação, RANTES; proteína quimiotáctica de monócitos, MCP e ainda IL-8) são produzidas pelas células dendríticas imaturas e actuam de um modo autócrino e parácrino. De um modo autócrino, as quimiocinas inicialmente estimulam, e posteriormente diminuem, a expressão de vários receptores de quimiocinas inflamatórias nas DC, permitindo-lhes responder sucessivamente a outras quimiocinas (Sallusto *et al.*, 1998). De um modo parácrino, as DC sustentam o processo inflamatório através do recrutamento de monócitos, células dendríticas imaturas e outras células inflamatórias para o local onde se encontra o antigénio.

Quando as células dendríticas, já num estado maduro, atingem as zonas dos tecidos linfóides ricas em linfócitos T, passam a produzir níveis elevados de quimiocinas linfóides (quimiocina induzida pelo vírus *Epstein-Barr*, ELC/MIP-3 β ; quimiocina derivada de macrófagos, MDC; quimiocina regulada por activação e do timo, TARC; quimiocina regulada por activação e pulmonar, PARC; proteína induzida pelo IFN- γ , IP-10) (Sallusto *et al.*, 1999; Flores-Romo, 2001; Lipscomb e Masten, 2002). Estas quimiocinas recrutam outras células dendríticas maduras, linfócitos T virgens e linfócitos T recentemente activados aumentando, deste modo, a probabilidade de ocorrerem múltiplas adesões entre estas células e as DC no interior dos órgãos linfóides (Sallusto e Lanzavecchia, 1999; Morse *et al.*, 2002).

Deste modo, a capacidade que as DC possuem para responder a quimiocinas inflamatórias ou linfóides depende do estado de maturação das mesmas, uma vez que a sua maturação envolve ausência de resposta às quimiocinas inflamatórias e aumento de resposta a quimiocinas linfóides (figura 3). Este facto deve-se à expressão diferencial dos receptores para as quimiocinas durante o processo de maturação das DC. Células dendríticas imaturas expressam receptores para as quimiocinas inflamatórias, designadamente CCR1, CCR2, CCR5 e CXR1. Durante a maturação das DC ocorre uma diminuição da expressão de CCR1, CCR5, CCR6 e CXCR1 e um aumento da expressão de CXCR4, CCR4, CCR7, ou seja, ocorre uma diminuição na expressão de receptores de quimiocinas inflamatórias e um aumento da expressão de receptores de quimiocinas constitutivas linfóides (Sallusto e Lanzavecchia, 1999; Parlato *et al.*, 2001).

O receptor CCR7 assume particular importância na migração das DC para os tecidos linfóides. Este receptor responde à quimiocina dos tecidos linfóides secundários (SLC) e à ELC/MIP-3 β . A SLC é produzida pelas células endoteliais linfáticas, e tanto a SLC como a ELC são produzidas pelas células dendríticas em zonas dos órgãos linfóides ricas em linfócitos T. A distribuição anatómica de SLC e a secreção de ELC atraem de um modo coordenado as células dendríticas, inicialmente dos tecidos periféricos para os linfáticos aferentes e destes para as zonas dos tecidos linfóides ricas em linfócitos T (Flores-Romo, 2001). O CCR7 é também selectivamente expresso em linfócitos T e B virgens, permitindo a migração destas células para os tecidos linfóides (Sallusto *et al.*, 1999).

A função fundamental do receptor CCR7 na migração das DC para os órgãos linfóides foi claramente demonstrada em murganhos deficientes neste receptor, nos quais as DC maduras perderam a capacidade de migrar para os gânglios linfáticos. O CCR7 demonstrou ainda ser crucial para a entrada das células de *Langerhans* nos vasos linfáticos da pele, na migração para os gânglios linfáticos e no aparecimento da

dermatite de contacto alérgica em resposta a antígenos de contacto (Wang *et al.*, 2001; Lipscomb e Masten, 2002).

Figura 3. **Migração e maturação das células dendríticas (DC).** As DC sofrem maturação após o contacto com citocinas e produtos bacterianos. Simultaneamente, migram através dos vasos linfáticos até aos gânglios linfáticos onde apresentam os antígenos aos linfócitos T. Durante este processo de migração e maturação, ocorrem alterações fenotípicas e funcionais das DC. pDC, precursor da DC; iDC, DC imatura; mDC, DC madura; PGE₂, prostaglandina E₂; AMP, 5'-monofosfato de adenosina cíclico; LC, células de *Langerhans* (retirado de Lipscomb e Masten, 2002).

1.2.4. *Co-estimulação dos linfócitos induzida pelas células dendríticas*

Nos órgãos linfóides, as células dendríticas transportadoras de antígenos já processados vão interagir com os linfócitos T. No entanto, as adesões que se estabelecem entre os linfócitos e as DC não são suficientes, por si só, para ocorrer a activação dos linfócitos e o início da resposta imunológica, sendo fundamental ocorrer co-estimulação, um processo que assegura uma amplificação eficaz da sinalização nos linfócitos T virgens.

As primeiras e mais importantes moléculas co-estimuladoras caracterizadas foram o CD28, em linfócitos T virgens, e os correspondentes ligandos, CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), cuja expressão sofre um aumento durante a maturação das DC (tabela 2) (Hart, 1997; Banchereau e Steinman, 1998).

A molécula CTLA-4 (antígeno 4 dos linfócitos T citotóxicos) liga com maior afinidade ao CD80 e CD86 do que o CD28, estando a sua expressão aumentada nos linfócitos T activados (Walunas e Bluestone, 1998).

O terceiro membro da família B7 é o B7RP-1 (proteína relacionada com B7-1). Esta proteína liga-se à proteína imunológica indutível co-estimuladora (ICOS), cuja expressão também se encontra aumentada nos linfócitos T activados (Yoshinaga *et al.*, 1999). A proteína B7RP-1 é expressa predominantemente nos linfócitos B, embora exista também em macrófagos e células dendríticas. No entanto, a sua função nas DC não foi ainda esclarecida (Lipscomb e Masten, 2002).

O quarto e quinto membros da família B7 são os ligandos PD-L1 (também denominado B7-H1) e PD-L2 que existem normalmente expressos nas DC e que se ligam ao receptor de morte celular programada-1 (PD-1) dos linfócitos T. Esta interacção exerce um efeito inibitório na proliferação e na produção de citocinas por parte dos linfócitos T.

Finalmente, a molécula B7-H3 (homólogo 3 da proteína B7), que foi recentemente isolada e clonada, tem uma expressão elevada nas DC imaturas e baixa nas DC maduras, ao contrário do observado para as outras moléculas da família B7. O seu ligando é ainda desconhecido e esta molécula está envolvida na co-estimulação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e ainda na indução da produção de IFN- γ (Lipscomb e Masten, 2002).

Tabela 2- Moléculas co-estimuladoras envolvidas na interacção entre células dendríticas e linfócitos T

| Células dendríticas | Linfócitos T |
|---------------------|--------------|
|---------------------|--------------|

Família B7 e receptores

| | |
|---------------|----------------------|
| B7-1 (CD80) | CD28, CTLA-4 (CD152) |
| B7-2 (CD86) | CD28, CTLA-4 (CD152) |
| B7RP-1 | ICOS |
| PD-L1 (B7-H1) | PD-1 |
| PD-L2 | PD-1 |
| B7-H3 | Desconhecido |

Ligandos e receptores da família TNF

| | |
|---------------|-----------------|
| CD40 | CD40L (CD154) |
| OX40L | OX40 (CD134) |
| TRANCE (RANK) | TRANCE (RANK-L) |

Diversos

| | |
|-----------------|-------------------------------|
| ICAM-1 (CD54) | LFA-1 (CD11a/CD18) |
| DC-SIGN (CD209) | ICAM-3 (CD50), ICAM-2 (CD102) |
| SLAM (CD150) | SLAM (CD150) |
| CD58 (LFA-3) | CD2 |

ICAM, molécula de adesão intercelular; LFA, antigénio associado à função leucocitária; SLAM, molécula de activação e de sinalização dos linfócitos; TRANCE, citocina induzida por activação e relacionada com o TNF; RANK, receptor activador do NF- κ B (retirado de Lipscomb e Masten, 2002).

Os ligandos e receptores da família do TNF, até ao momento cerca de cinquenta, são também co-estimuladores importantes na interacção entre células dendríticas e linfócitos T, particularmente o CD40 nas DC e o CD40L (CD154) nos linfócitos T (tabela 2). Durante interacções eficientes entre linfócitos T e DC, ocorre um aumento da expressão do CD40L nos linfócitos T que, progressivamente, vão sendo activados. O CD40L pode então ligar-se ao CD40 presente nas células dendríticas, promovendo a sua maturação final e a libertação de IL-12, necessária para uma polarização Th1. O CD40 e TRANCE (citocina induzida por activação e relacionada com o TNF) expressos em quantidades elevadas nas DC maduras, sustentam a

viabilidade das DC durante a sua interacção com os linfócitos T activados (Josien *et al.*, 2000; Steinman, 2000).

Outros membros da família do TNF, designadamente o OX40 nos linfócitos T e OX40L nas DC, desempenham um papel complementar na proliferação e produção de citocinas pelos linfócitos T e parecem promover respostas Th2 (Tanaka *et al.*, 2000).

Um outro grupo de receptores heterogéneo tem sido descrito como regulador das interacções entre DC e linfócitos T (tabela 2). O antigénio associado à função leucocitária 1 (LFA-1 ou CD11a/CD18) interage com a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) (CD54), sendo esta interacção necessária para uma eficiente estimulação da resposta imunológica. A molécula DC-SIGN, específica das DC, está envolvida na captação de antigénios, em processos de migração e adesão celular e ainda na formação da sinapse imunológica com os linfócitos T (Geijtenbeek *et al.*, 2002). Estudos recentes sugerem que a ligação entre as moléculas DC-SIGN das DC e ICAM-3 dos linfócitos T virgens é necessária para uma interacção eficiente entre o complexo péptido antigénico/molécula MHCII das DC e o receptor TCR nos linfócitos T. De facto, a utilização de anticorpos contra a proteína DC-SIGN inibe a proliferação de linfócitos T induzida pelas DC (Geijtenbeek *et al.*, 2000 b; Steinman, 2000). O DC-SIGN também se pode ligar a ICAM-2, embora com menor afinidade, e esta interacção parece ser importante durante a migração das DC através do endotélio (Geijtenbeek *et al.*, 2000 a).

A molécula de activação da sinalização de linfócitos (SLAM) foi recentemente identificada nas DC. É descrita como uma molécula co-estimuladora cuja expressão é induzida durante a maturação das DC (Kruse *et al.*, 2001). Tal como a SLAM, a glicoproteína CD83 é também um marcador de maturação das células dendríticas. A sua expressão sofre um aumento durante a maturação das DC, o que sugere o seu envolvimento na indução das respostas imunológicas (Lechmann *et al.*, 2002).

Estudos recentes sugerem que a co-estimulação poderá ditar o início de uma resposta imunológica ou, pelo contrário, induzir tolerância. Esses estudos referem que células dendríticas imaturas induzem directamente tolerância nos linfócitos, uma vez que estas DC imaturas não possuem capacidade co-estimuladora dos linfócitos, ao contrário das células dendríticas maduras que são responsáveis pelo início de uma resposta imunológica (Davoust e Banchereau, 2000; Lutz *et al.*, 2000; Steinman *et al.*, 2000; Mellman e Steinman, 2001; Nouri-Shirazi e Guinet, 2002).

Outros estudos sugerem ainda que o bloqueio das propriedades co-estimuladoras das DC poderá ser uma estratégia para aumentar o potencial tolerogénico das DC (Lu *et al.*, 1999). No entanto, muito recentemente foi sugerido que a maturação das DC é necessária para induzir tolerância de linfócitos T CD8⁺ e que o balanço entre imunidade/tolerância é determinado por um sinal activado na presença de linfócitos T CD4⁺ e de células dendríticas (Albert *et al.*, 2001; Shortman e Heath, 2001).

1.2.5. *Eventos biológicos após a interacção entre células dendríticas e linfócitos*

Uma eficiente interacção entre células dendríticas e linfócitos traduz-se por uma indução da divisão dos linfócitos T virgens *in vivo*. Deste modo, após a imunização primária, os linfócitos que sofreram divisão adquirem um fenótipo efector e migram dos gânglios linfáticos para os tecidos não linfóides e inflamados, de modo a executarem as suas funções biológicas (Lambrecht, 2001; Lanzavecchia e Sallusto, 2001). O fenótipo efector dos linfócitos é influenciado pelas células dendríticas, uma vez que as DC podem modular a polarização da resposta dos linfócitos T *helper* nos gânglios linfáticos, em Th1 ou Th2.

Os linfócitos Th1 e Th2 são células efectoras num estado de diferenciação terminal que se caracterizam por produzirem diferentes citocinas. As citocinas produzidas pelas células Th1 (IFN- γ , IL-2, linfotóxina- α) promovem a imunidade celular activando processos fagocíticos e citotóxicos em células efectoras, designadamente em linfócitos T citotóxicos, macrófagos e células *natural killer*. As citocinas produzidas

pelas células Th2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13) activam a produção, pelos linfócitos B, de anticorpos específicos do antigénio.

Vários factores contribuem para o balanço Th1-Th2, designadamente as características e a dose do antigénio (doses elevadas ou baixas), a natureza e quantidade das moléculas co-estimuladoras (ICAM-1, CD40, CD80, CD86, OX40-L), o tipo, o estado de maturação e a quantidade de células dendríticas que atingem os gânglios linfáticos, a natureza da interacção e duração da ligação MHC-TCR (de alta ou baixa afinidade) e ainda a produção de citocinas (IFN- γ , IL-12, IL-10 e IL-6) (Vieira *et al.*, 2000; Moser e Murphy, 2000; Tanaka *et al.*, 2000; Lambrecht, 2001; de Jong *et al.*, 2002; Rescigno, 2002; Boonstra *et al.*, 2003).

Deste modo, agentes que induzem a libertação de IL-12 (IFN- γ , LPS, CD40L, ARN de cadeia dupla de vírus, ADN bacteriano) promovem respostas Th1, ao contrário de agentes inibidores da produção de IL-12 que promovem respostas Th2. Entre os últimos incluem-se compostos que elevam a produção de AMPc (designadamente histamina, agonistas β adrenérgicos, prostaglandina E2), IL-10 e ainda glucocorticóides (Kalinski *et al.*, 1999; Kalinski *et al.*, 2001; Lambrecht, 2001). No entanto, um estudo recente refere a existência de outros mecanismos, independentes de IL-12, que podem promover respostas imunológicas Th1 e que envolvem a activação da cinase regulada por sinais extracelulares (ERK) (Smits *et al.*, 2002). Estes resultados indicam que a modulação das diferentes respostas imunológicas Th, estimulada pelas células dendríticas, é variável e pode promover, por parte dos linfócitos, respostas Th1 ou Th2.

Em suma, após o estabelecimento da sinapse imunológica entre DC e linfócitos ocorre o início das respostas imunológicas primárias. As células dendríticas fornecem três sinais necessários para ocorrer proliferação e diferenciação de linfócitos T virgens (figura 4). O sinal 1 diz respeito à interacção entre os complexos *major* de histocompatibilidade I ou II acoplados aos antigénios e o TCR presente nos linfócitos T CD8⁺ ou CD4⁺, respectivamente. O sinal 2 surge após a interacção entre as moléculas

acessórias da superfície das DC (CD11a/LFA-1, CD40, CD54, CD80, CD86) e os respectivos ligandos na superfície dos linfócitos. Este sinal é necessário para assegurar a divisão e diferenciação dos linfócitos T virgens em células efectoras. A secreção, ou a não secreção, de IL-12 contribui para a polarização dos linfócitos T virgens em células Th1 ou Th2, respectivamente (sinal 3), (figura 4) (Lipscomb e Masten, 2002).

Figura 4. **Modelo da interacção entre células dendríticas e linfócitos T.** As células dendríticas (DC) fornecem três sinais necessários para ocorrer proliferação e diferenciação de linfócitos T virgens. O sinal 1 diz respeito à interacção entre as moléculas MHC e o TCR; o sinal 2 surge após a interacção entre as moléculas co-estimuladoras nas DC e os respectivos ligandos nos linfócitos T; o sinal 3 contribui para a polarização de linfócitos T virgens em linfócitos efectores Th1 ou Th2 (TCR, receptor dos linfócitos T; MHC, complexo *major* de histocompatibilidade; IL, interleucina) (retirado de Coates *et al.*, 2002).

1.3. Dermatite de contacto alérgica: função das células de *Langerhans*

A dermatite de contacto alérgica (DCA) resulta de uma reacção de hipersensibilidade retardada, mediada por linfócitos T e dirigida a haptenos que entraram em contacto com a pele. Os haptenos são moléculas de baixo peso molecular que penetram na pele e se ligam a proteínas transportadoras, normalmente por uma ligação covalente, formando-se o complexo proteína-hapteno (alergénio) que funciona como antigénio. Este antigénio é captado e processado pelas células dendríticas da epiderme, nomeadamente pelas células de *Langerhans* (LC) que

representam 3-6% das células da epiderme (figura 5) e, provavelmente também por DC da derme.

As células de *Langerhans* representam o paradigma da célula dendrítica, quer no Homem quer nos murganhos. Estas células possuem marcadores característicos e ausentes em outros tipos de DC. Em condições basais, e na epiderme, as LC são imaturas e expressam CD1a (ausente nos murganhos), caderina-E e a langerina (CD207), uma lectina transmembranar do tipo C. A langerina está envolvida na formação dos grânulos de *Birbeck* e é um receptor de endocitose com efeitos potenciais no processamento e apresentação de antígenos (Valladeau *et al.*, 2000; Valladeau *et al.*, 2002). Estudos recentes demonstram que alérgenos de contacto, estímulos inflamatórios e produtos bacterianos aumentam a expressão da langerina (Geissmann *et al.*, 2002; Stoitzner *et al.*, 2003).

Assim, as LC imaturas da epiderme processam o alérgeno que entra em contacto com a pele e, posteriormente, transportam-no (ligado às moléculas MHC) para os gânglios linfáticos de drenagem próximos desta região da pele, onde ocorre a activação dos linfócitos T virgens (Takashima *et al.*, 2000). A migração das LC ocorre em resposta à produção local de citocinas inflamatórias, designadamente IL-1 β e TNF- α , produzidas pelas próprias LC e pelos queratinócitos (Cumberbatch *et al.*, 1997; Stoitzner *et al.*, 1999; Cumberbatch *et al.*, 2000).

Figura 5. **Corte histológico de pele humana.** As células de *Langerhans* epidérmicas foram marcadas com um anticorpo contra a proteína CD1a (retirado de Kanitakis, 1998).

Estudos recentes sugerem que a interacção de citocinas e quimiocinas com os receptores apropriados dirigem a migração e o movimento das LC para os gânglios linfáticos (Kimber *et al.*, 2000). São exemplos, a quimiocina MIP-3 α (através do CCR6), produzida após estímulos inflamatórios e detectada apenas em epitélios inflamados, e a quimiocina SLC (Caux *et al.*, 2000; Sebastiani *et al.*, 2002 a). Neste processo de migração é também fundamental o aumento da expressão da metaloproteinase 9, de integrinas α 6, de ICAM-1, de CD44 e a diminuição da expressão de caderina-E, de CCR1 e CCR5 (Cumberbatch *et al.*, 2000; Ratzinger *et al.*, 2002). Estas alterações fenotípicas e funcionais permitem a migração das LC através da derme até aos vasos linfáticos aferentes e gânglios linfáticos, onde se encontram os linfócitos T virgens (figura 6).

Figura 6. **As células de *Langerhans* captam os alergénios que entram em contacto com a pele e migram para órgãos linfóides onde apresentam os alergénios a linfócitos T.** Durante o processo de migração as células de Langerhans (LC) sofrem maturação e adquirem a capacidade de estimular linfócitos T virgens (retirado de Janeway *et al.*, 2001).

Os alergénios de contacto, *per se*, são capazes de causar algum grau de agressão às células da epiderme e induzir ou aumentar a produção local de citocinas (nomeadamente IL-1 β e GM-CSF) e quimiocinas que contribuem, não só para a migração, mas também para a maturação das LCs (Grabbe e Schwarz, 1998; Kimber

et al., 1998; Murphy *et al.*, 2000). Alguns autores defendem que um certo grau de agressão provocado por estes alérgenos (associado com a produção de citocinas relevantes) pode facilitar ou ser mesmo necessário para induzir uma resposta imunológica (Cumberbatch *et al.*, 2000; Cumberbatch *et al.*, 2002).

O GM-CSF tem sido referido como um factor produzido na epiderme necessário para a maturação das LC. Após a maturação, que ocorre durante o processo de migração, estas células expressam níveis elevados de CCR7, de moléculas MHC e de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD86, CD80), que lhes vão permitir interagir e activar os linfócitos T virgens nos gânglios linfáticos. Esta interacção é responsável pelo início da resposta imunológica adquirida (fase de sensibilização da DCA) através da formação de linfócitos efectores T CD8⁺ de memória (e linfócitos T CD4⁺ efectores e reguladores). Os linfócitos T CD4⁺ diferenciam-se em diferentes tipos funcionais, designadamente Th1 e Th2. De igual modo, os linfócitos T CD8⁺ diferenciam-se em células funcionais do tipo 1 e do tipo 2. Os linfócitos efectores do tipo 1 produzem IL-2 e IFN- γ , enquanto que os linfócitos efectores do tipo 2 segregam IL-4, IL-5 e IL-10 (Kimber e Dearman, 2002).

Os alérgenos de contacto, como o 2,4-dinitrofluorbenzeno (DNFB) e oxazolona, induzem preferencialmente respostas do tipo 1, em contraste com os alérgenos respiratórios que induzem respostas essencialmente do tipo 2 (Dearman e Kimber, 1992). Existem, no entanto, estudos que sugerem o envolvimento de respostas Th2 na fase de sensibilização da DCA, induzida por DNFB (Yokozeki *et al.*, 2000).

O contacto posterior da pele com o mesmo hapteno desencadeia, no espaço de 24 a 48 horas, uma reacção imuno-inflamatória aguda da pele que pretende eliminar o antígeno detectado. A DCA manifesta-se, na sua fase aguda, por eritema, edema, pápulas, vesículas, e exsudação muito pruriginosas. Durante esta fase da DCA, denominada de fase efectora, os linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ de memória que circulam na corrente sanguínea entram em contacto com a pele exposta ao alérgeno.

O recrutamento destes linfócitos de memória é regulado por diferentes moléculas de adesão expressas na superfície das células endoteliais, ou por quimiocinas libertadas por células residentes da pele, designadamente fibroblastos, queratinócitos, e mastócitos (Albanesi *et al.*, 2001; Sebastiani *et al.*, 2002 b).

Após apresentação do alergénio aos linfócitos pelas LC, ou por outras células apresentadoras de antigénio recrutadas para o local da inflamação cutânea, os linfócitos sofrem activação. Estes linfócitos activados específicos do alergénio produzem citocinas, designadamente IFN- γ , recrutam outras células inflamatórias (monócitos, células dendríticas) e amplificam a resposta inflamatória, que se traduz no aparecimento das lesões clínicas que caracterizam a DCA.

Até recentemente, pensava-se que as células efectoras da DCA eram exclusivamente linfócitos T CD4⁺. No entanto, foi já demonstrado que os linfócitos T CD8⁺ e os linfócitos T CD4⁺ são células efectoras cruciais no desenvolvimento da DCA em resposta ao DNFB (Wang *et al.*, 2000). Outros estudos efectuados em murganhos sugerem que os linfócitos T CD4⁺ podem desempenhar funções reguladoras e efectoras, sendo os linfócitos T CD8⁺ as células efectoras citotóxicas responsáveis pelas manifestações clínicas da DCA (Cavani *et al.*, 1998; Grabbe e Schwarz, 1998; Sebastiani *et al.*, 2002 b). De facto, animais deficientes em moléculas MHC I não desenvolvem DCA em resposta ao potente alergénio de contacto DNFB, enquanto que murganhos deficientes em moléculas MHC II exibem uma DCA exacerbada (Bour *et al.*, 1995). Outros estudos sugerem que os linfócitos T CD8⁺ são as células responsáveis pelos efeitos citotóxicos (inflamatórios) associados à DCA induzida pelos alergénios de contacto níquel e DNFB (Moulan *et al.*, 1998; Kehren *et al.*, 1999).

O potencial citotóxico dos linfócitos T CD8⁺ efectores parece ser modulado por IFN- γ (Blauvelt *et al.*, 2003) e envolve a via da perforina e do complexo Fas/ligando Fas. Assim, num modelo experimental de DCA induzido por DNFB, observou-se que, em murganhos deficientes nos dois sistemas acima mencionados (perforina e Fas/Fas

ligando), ocorria a produção de linfócitos T CD8⁺ específicos do alergénio DNFB, mas estes não desenvolviam DCA (Kehren *et al.*, 1999).

A maior parte dos haptenos que provocam DCA são moléculas pequenas, lipofílicas ou iões metálicos (trinitrofenol, níquel, crómio, cobalto) que requerem ligação a proteínas para se tornarem antigénios. Estes compostos químicos devem ser suficientemente electrofílicos para reagirem, de um modo covalente, com os grupos nucleofílicos das proteínas da pele. Assim, a sua capacidade de reagir com proteínas está relacionada com a capacidade de induzir sensibilização cutânea. Algumas moléculas que causam DCA – denominadas pró-haptenos – não são electrofílicas e não se ligam a proteínas, mas são convertidas, na pele, em espécies electrofílicas por reacções químicas (designadamente a colofónia e turpentina), ou enzimáticas (como a parafenilendiamina ou o isoeugenol), uma vez que a pele é um local importante de metabolismo extra-hepático (Smith Pease *et al.*, 2003). As estruturas alvo dos haptenos são, normalmente, grupos tiol e resíduos de lisina e cisteína de aminoácidos (Becker *et al.*, 2003).

Actualmente, existem vários ensaios que utilizam animais quer na identificação de compostos químicos com potencial para induzir sensibilização cutânea, quer na quantificação da potência de alergénios de contacto. Entre outros, referem-se o teste com o gânglio linfático regional – LLNA, e o teste de maximização em cobaia -GPMT (Basketter *et al.*, 2000; Gerberick *et al.*, 2001; Kimber *et al.*, 2002). Estes testes permitem identificar, para cada alergénio, um valor limiar a partir do qual ocorre sensibilização e aparecimento da DCA. Contudo, estes valores limiares variam entre diferentes espécies animais e entre diferentes indivíduos da mesma espécie, e são ainda modulados por diversos factores. Entre estes, incluem-se a dose de alergénio aplicado por área de pele, o tempo de exposição da pele ao alergénio (curto, prolongado, exposição única ou repetida), a integridade da pele (pele íntegra ou inflamada) e ainda o veículo do alergénio de contacto (Basketter *et al.*, 2002). A escala destas variáveis é frequentemente quantificável e os testes acima mencionados

fornecem informações úteis na identificação de limites de exposição a alérgenos de contacto, abaixo dos quais não ocorre DCA. Pretende-se, com esta informação, que a morbilidade atribuída à DCA seja controlada e que seja o mais baixa possível.

Nos últimos anos, vários laboratórios têm procurado implementar testes *in vitro* que permitam identificar compostos químicos com potencial sensibilizante e, deste modo, substituir o uso de animais de laboratório.

1.4. Fisiologia e fisiopatologia do monóxido de azoto

1.4.1. Biossíntese do monóxido de azoto e efeitos biológicos

A partir da descoberta do monóxido de azoto (NO) pela equipa de Moncada (Palmer *et al.*, 1987), em 1987, o trabalho de investigação relacionado com o NO aumentou exponencialmente e com ele o conhecimento da multiplicidade dos seus efeitos, quer fisiológicos quer patológicos. O NO está envolvido na modulação da vasodilatação, na agregação das plaquetas e nas propriedades adesivas dos leucócitos, no controlo de doenças infecciosas e tumorais, nos processos auto-imunes, nas doenças degenerativas crónicas e ainda na comunicação neuronal (Ignarro, 2002).

A multiplicidade das acções biológicas do monóxido de azoto deve-se, em parte, às suas propriedades físico-químicas. Este gás de pequenas dimensões (30 Da) e sem carga é também um radical livre por ser portador de um electrão desemparelhado, o que lhe confere uma grande reactividade. Os seus efeitos fisiológicos podem ser exercidos na célula que o produz ou em células adjacentes, uma vez que o NO se difunde facilmente entre compartimentos celulares e é solúvel em meios biológicos. O monóxido de azoto possui uma semi-vida que varia de segundos a minutos, dependendo da sua concentração e do ambiente físico-químico

envolvente, e tem como alvos intracelulares ADN (bases pirimidina), proteínas, grupos prostéticos (grupos heme) e lípidos (originando peroxidação lipídica), podendo ainda reagir com outras moléculas inorgânicas (oxigénio, superóxido ou metais de transição). Considerando ainda que muitos dos alvos do NO são eles próprios moléculas reguladoras (factores de transcrição e proteínas envolvidas em vias de sinalização intracelular) facilmente se compreende a diversidade de efeitos biológicos do NO. De facto, frequentemente efeitos tóxicos e protectores, mediados por este radical, são observados em paralelo (Grisham *et al.*, 1999).

Nos mamíferos, o NO endógeno é sintetizado pela sintase do monóxido de azoto (NOS), da qual são conhecidas três isoformas distintas. A NOS neuronal (nNOS ou NOS 1) e a NOS endotelial (eNOS ou NOS 3) são também denominadas colectivamente de NOS constitutiva, uma vez que a sua expressão é constitutiva nas células e a sua actividade é regulada por fluxos de cálcio intracelular que se ligam posteriormente à calmodulina. Apesar de estas duas isoformas da NOS terem sido identificadas inicialmente em neurónios e células endoteliais, respectivamente, hoje sabe-se que a expressão das mesmas não se restringe a estes tipos celulares. A outra isoforma é denominada NOS indutível (iNOS ou NOS 2) uma vez que a sua expressão ocorre em resposta à activação celular por citocinas (IL-1, TNF- α) ou componentes bacterianos, como o lipopolissacarídeo. Esta isoforma foi inicialmente descrita em macrófagos de murganho estimulados, mas actualmente sabe-se que pode ser expressa em células dendríticas, células endoteliais, células epiteliais, queratinócitos, condrócitos, fibroblastos, células *natural killer*, entre outras. Contrariamente às outras duas isoformas, a actividade da iNOS não depende de cálcio e calmodulina, uma vez que esta proteína se encontra firmemente ligada à NOS (Knowles e Moncada, 1994; Lamas *et al.*, 1998; Alderton *et al.*, 2001).

As três isoformas da NOS apresentam entre si aproximadamente 50% de homologia na sequência de aminoácidos, mas entre mamíferos cada isoforma é altamente conservada (aproximadamente 90% de homologia). Estas isoformas são

activas apenas como homodímeros de polipeptídeos de 130-133 kDa (iNOS e eNOS) ou 160 kDa (nNOS). Cada isoforma é formada por duas regiões: uma região C-terminal do tipo reductase, geradora de electrões, que possui um elevado grau de homologia com a enzima citocromo P 450 reductase, e uma região N-terminal do tipo oxidase. A porção N-terminal apresenta ainda uma região hémica associada com o local de ligação ao substrato e todas as NOS apresentam na sua região média um local de ligação para a calmodulina (Griffith e Stuehr, 1995).

As três isoformas da NOS catalisam a conversão de L-arginina e oxigénio molecular em N^o-hidroxi-L-arginina e posteriormente em NO e citrulina (figura 7). A reacção de síntese de NO necessita de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reduzida) como co-factor e produz NO e L-citrulina estequiometricamente.

Embora as três isoformas catalisem a mesma reacção, elas diferem no que refere à sua regulação, amplitude e duração de produção de NO, e ainda na distribuição intracelular. A isoforma eNOS é uma proteína ancorada à membrana do aparelho de Golgi e as outras isoformas (nNOS e iNOS) são solúveis e citoplasmáticas. Em resposta a estímulos fisiológicos (nomeadamente substâncias vasoactivas ou neurotransmissores), o NO é produzido rapidamente pela eNOS e nNOS, em células endoteliais e neurónios, respectivamente, durante períodos de tempo curtos (minutos) e em baixas concentrações (picomolar), e as respostas observadas nas células alvo (células musculares, neurónios, plaquetas) são rápidas e transitórias. Nestes sistemas, o NO interage directamente com a enzima guanilciclase, levando à produção do segundo mensageiro, o monofosfato de guanosina cíclico. Contrariamente, citocinas e produtos bacterianos induzem a expressão da iNOS que produz NO em quantidades elevadas (nanomolar), num processo lento e prolongado (horas ou dias) (Alderton *et al.*, 2001). Neste sistema, os efeitos do NO são indirectos e mediados por espécies reactivas de óxido de nitrogénio (RNOS), com a fórmula genérica NO_x, que são produzidas na presença de oxigénio molecular. Estes

compostos são extremamente instáveis e interagem com alvos intracelulares envolvidos na regulação celular, provocando a nitrosilação de proteínas e de compostos tiol, como a glutathione.

Nos sistemas biológicos e em soluções aquosas, o N_2O_3 é o maior RNOS formado a partir da oxidação do NO, sendo posteriormente hidrolisado e excretado sob a forma de nitritos ou nitratos. O NO pode ainda interagir com o anião superóxido e produzir o anião peroxinitrito, tóxico e altamente reactivo, responsável pela citotoxicidade e pelos efeitos pró-inflamatórios do NO (Coleman, 2001).

Recentemente foi identificada uma sintase de monóxido de azoto na mitocôndria (mtNOS). A sua existência foi demonstrada em várias preparações mitocondriais de diferentes órgãos (coração, fígado), e em diferentes espécies animais (rato, porco). Esta enzima requer funcionalmente os mesmos cofactores e substrato referidos para as restantes isoformas constitutivas da NOS, e o NO produzido pela mtNOS parece modular o consumo de oxigénio, a produção de ATP e a produção de radicais livres por inibir, de um modo reversível, a citocromo oxidase (Giulivi, 2003).

Figura 7. Conversão da L-arginina em L-citrulina por acção da sintase do monóxido de azoto (NOS) na presença de cofactores (NO, monóxido de azoto; NOS, sintase do monóxido de azoto; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reduzida)

1.4.2. Mecanismos de regulação da produção de monóxido de azoto pela isoforma indutível da sintase do monóxido de azoto

A iNOS é a isoforma da NOS mais envolvida em respostas imunológicas, razão pela qual grande parte deste trabalho consistiu no estudo dos eventos intracelulares que regulam a expressão da isoforma indutível da sintase do monóxido de azoto em células apresentadoras de antígeno, designadamente células dendríticas da pele.

Ao contrário do observado com as outras isoformas, a expressão da iNOS é regulada por citocinas (TNF- α , IFN- γ , e IL-1 β) e componentes bacterianos, e normalmente envolve a síntese *de novo* e a estabilização do ARNm e da proteína iNOS. A regulação da expressão da iNOS difere entre células humanas e células de roedores. Deste modo, as células de roedores expressam facilmente a iNOS em resposta ao LPS ou a citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-1 β e TNF- α), enquanto que as células humanas requerem uma combinação de citocinas ou tratamentos mais complexos para ocorrer a expressão da iNOS (Bogdan, 2001). A relativa facilidade na indução da iNOS observada em roedores pode dever-se à proximidade de elementos funcionalmente importantes na região promotora do gene *iNOS*, ao contrário do observado em células humanas em que os elementos críticos se encontram mais afastados (Ganster *et al.*, 2001)

Vários mecanismos regulam a produção e a expressão da iNOS. Embora existam diferenças entre a região promotora do gene que codifica a proteína iNOS humana e a de murganho (Chu *et al.*, 1998), os factores de transcrição que participam neste processo são similares, incluindo o factor nuclear de transcrição *kappa* B (NF-

κ B, o qual será abordado mais adiante em pormenor), a proteína activadora 1 (AP-1), o transdutor do sinal e activador da transcrição (STAT)-1 α , o factor regulador do interferão (IRF)-1, o factor nuclear da interleucina 6 (NF-IL6) e ainda a proteína do grupo-I(Y) de alta mobilidade (Xie *et al.*, 1994; Weisz *et al.*, 1996; Taylor e Geller, 2000; Ganster *et al.*, 2001; Pellacani *et al.*, 2001). Dependendo da citocina ou do estímulo microbiano e ainda do tipo de células, diferentes vias de sinalização podem modular a expressão da iNOS, designadamente as que envolvem as cinase de *Janus* (JAK1, JAK2 e tyk2), a cinase Raf-1, as cinases da família MAPK (cinase de proteínas activada por agentes mitogénicos) p38 MAPK, JNK (cinase do terminal amínico da proteína *c-Jun*) e ERK1/2 (cinase regulada por sinais extracelulares), a proteína cinase C (PKC), a proteína cinase A (PKA), a cinase responsável pela fosforilação da posição 3 do fosfatidilinositol (PI3K), e ainda as proteínas fosfatase 1 e 2A (Bogdan, 2001). O próprio monóxido de azoto exerce um efeito bifásico na transcrição do gene *iNOS*. Baixas concentrações de NO activam o NF- κ B e aumentam a expressão da iNOS, enquanto que concentrações elevadas de NO têm um efeito oposto, sendo, deste modo, prevenida uma produção exagerada de monóxido de azoto (Connelly *et al.*, 2001).

O aumento da degradação da proteína iNOS pela via do proteassoma é outro mecanismo através do qual ocorre regulação da produção de NO. O factor de crescimento transformante (TGF)- β suprime a produção de NO em macrófagos por aumentar a degradação da iNOS, e a diminuição dos níveis da iNOS em resposta à estimulação com glucocorticóides parece dever-se, parcialmente, à degradação da iNOS (Osawa *et al.*, 2003).

A regulação da produção de NO pode ser feita também por várias proteínas que bloqueiam a dimerização da iNOS, nomeadamente a proteína de macrófagos associada com a NOS de 110 kDa (NAP110) e a proteína do sistema nervoso central *kalirin* (Ratovitski *et al.*, 1999 a; Ratovitski *et al.*, 1999 b).

A actividade da iNOS é também modulada pela disponibilidade extracelular e intracelular do substrato L-arginina, que depende do sistema de transporte y^+ e ainda

da enzima arginase. Esta enzima degrada arginina em ureia e L-ornitina, prevenindo, deste modo, a produção de NO por diminuição da quantidade do substrato (Bogdan, 2001). A disponibilidade de tetrahidrobiopterina (BH4), essencial para a reacção de catálise mediada pela NOS, pode regular também a produção de NO (Bogdan, 2001).

1.4.2.1. Envolvimento do factor de transcrição NF- κ B na expressão da isoforma iNOS e na produção de NO: mecanismos moleculares de activação e desactivação do NF- κ B

O NF- κ B engloba uma família de factores de transcrição cruciais na regulação de respostas imunológicas e inflamatórias, sendo muitas vezes denominado de mediador central da resposta imunológica. O NF- κ B activo promove a expressão de cerca de cento e cinquenta genes que codificam, essencialmente, proteínas envolvidas nas respostas imunológicas e inflamatórias, designadamente iNOS, ciclooxigenase 2, cerca de vinte e sete citocinas (designadamente IFN- γ , IL-18; TNF- α , IL-1, quimiocinas), proteínas envolvidas na apresentação de antígenos (CD80, CD86), receptores envolvidos na adesão e migração de leucócitos e ainda receptores envolvidos no reconhecimento imunológico, como membros do complexo *major* de histocompatibilidade (Pahl, 1999). Deste modo, o NF- κ B regula as respostas imunológicas naturais e adquiridas, sendo rapidamente activado em resposta a vários estímulos como agentes patogénicos (LPS), sinais de stresse e citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1).

Este factor de transcrição é crucial na regulação da expressão da proteína iNOS quer em células humanas, quer em células de roedores. A região promotora do gene *iNOS* de murganho contém locais de ligação para o NF- κ B situados entre -85 e -76 pb (pares de bases) e entre -971 e -962 pb, a montante do local de iniciação da transcrição (Xie *et al.*, 1994; Weisz *et al.*, 1996). A região promotora do gene *iNOS* humano apresenta diferenças relativamente à do murganho, nomeadamente no que

se refere à localização dos locais de ligação do NF- κ B, tendo sido sugerido que o local fundamental se situa a -5.8 kpb a montante do local de iniciação da transcrição (de Vera *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1998; Ganster *et al.*, 2001).

A família NF- κ B inclui vários membros, designadamente RelA (p65), p50 (p105), p52 (p100), c-Rel e RelB. Estas proteínas contêm uma região estruturalmente conservada, com cerca de trezentos aminoácidos, próxima do terminal amínico e contendo os domínios de ligação ao ADN, de localização nuclear e de dimerização. As proteínas c-Rel, RelB e RelA contêm ainda uma região próxima do terminal carboxílico, não homóloga, com um domínio de transactivação que activa a transcrição de genes contendo locais de ligação ao NF- κ B (Chen e Ghosh, 1999; Mercurio e Manning, 1999 a). As restantes proteínas do NF- κ B não possuem este domínio de transactivação mas têm a capacidade de se ligar a regiões de consenso no ADN, funcionando como repressores da transcrição (Ghosh e Karin, 2002). As proteínas p50 e p52 são geradas por processamento proteolítico das proteínas precursoras p105 e p100, respectivamente. Qualquer membro da família NF- κ B pode formar homodímeros, com excepção do RelB. Cada membro desta família forma também heterodímeros com as restantes proteínas NF- κ B, mas a subunidade p65 associada à subunidade p50 ou p52 constituem os heterodímeros mais frequentes nas células de mamíferos. As proteínas p50 e p65 encontram-se distribuídas por vários tipos de células, enquanto que a subunidade RelB encontra-se em regiões específicas do timo, gânglios linfáticos e placas de Peyer, e a sua expressão está normalmente confinada a células dendríticas e a linfócitos B. A expressão da proteína c-Rel está normalmente confinada aos linfócitos e às células hematopoiéticas (Li e Verma, 2002). De referir ainda que a transcrição de RelB, c-Rel e p105 é regulada pelo NF- κ B (Bren *et al.*, 2001; Solan *et al.*, 2002).

As proteínas do NF- κ B existem no citoplasma sob uma forma inactiva por estarem associadas a proteínas inibidoras, denominadas de I κ B (figura 8). As

proteínas mais comuns são o I κ B- α , I κ B- β e I κ B- ϵ . Estas proteínas possuem várias repetições de anquirina, motivos contendo trinta e três aminoácidos, que medeiam interações proteína-proteína. As proteínas p100 e p105 contêm repetições de anquirina similares e podem funcionar como moléculas tipo-I κ B. No entanto, este domínio existente nestas proteínas precursoras pode ser degradado e clivado por enzimas. Um outro membro menos usual da família I κ B é o Bcl-3, que interage especificamente com homodímeros p50 e p52 e pode induzir a expressão de genes regulados pelo NF- κ B. Deste modo, esta proteína parece ter uma função diferente da exercida pelos restantes membros do I κ B (Karin, 1999).

Inicialmente foi proposto que as proteínas I κ B retêm o NF- κ B no citoplasma por mascararem as sequências de localização nuclear (NLS) presentes nas subunidades do NF- κ B. Contudo, estudos recentes sugerem que a localização citoplasmática do complexo NF- κ B desactivado pelo I κ B resulta de um movimento contínuo entre os compartimentos nucleares e citoplasmáticos, uma vez que, das duas NLS presentes no NF- κ B, apenas uma está mascarada pela proteína I κ B- α . Deste modo, a outra sequência NLS permanece livre e permite a migração do complexo para o núcleo. Por outro lado, o sinal de exportação nuclear (NES), localizado no terminal amínico da proteína I κ B- α , é responsável por expelir o complexo NF- κ B/I κ B do núcleo. Este processo, que visa expulsar do núcleo o complexo NF- κ B/I κ B é mais eficiente do que o inverso, pelo que, os dímeros de NF- κ B inactivos pela interacção com as proteínas I κ B- α estão normalmente localizados no citoplasma. Este comportamento foi descrito apenas para a proteína I κ B- α e as implicações fisiológicas deste movimento contínuo entre os compartimentos nucleares e citoplasmáticos permanecem ainda por esclarecer (Li e Verma, 2002).

Quando ocorre estimulação celular adequada, a proteína I κ B- α é rapidamente degradada e sintetizada *de novo*, uma vez que o gene I κ B- α possui, na sua região promotora, locais de ligação ao NF- κ B. A proteína I κ B- α sintetizada *de novo* possui

uma sequência NLS que lhe permite entrar no núcleo para remover os dímeros de NF- κ B dos seus locais de ligação ao ADN, e transportá-los para o citoplasma, reprimindo a função do NF- κ B. Deste modo, a degradação do I κ B- α induz uma activação transitória do NF- κ B, ao contrário do I κ B- β cuja degradação leva a uma activação persistente do NF- κ B, dado que não possui a capacidade de remover os complexos NF- κ B ligados à região promotora dos seus genes alvo (Chen e Ghosh, 1999; Mercurio e Manning, 1999 a). Estudos realizados em murganhos deficientes nas várias proteínas do I κ B têm demonstrado alguma redundância funcional relativamente às proteínas I κ B- α , I κ B- β e I κ B- ϵ , que resulta, normalmente, numa activação sustentada do NF- κ B (Gerondakis *et al.*, 1999; Li e Verma, 2002).

A utilização de modelos animais deficientes nas cinco proteínas do NF- κ B tem demonstrado funções cruciais das mesmas na regulação das respostas imunológicas naturais e adquiridas, na fisiologia dos linfócitos, na defesa anti-microbiana e na sobrevivência celular. Murganhos deficientes na proteína p65 sofrem degeneração hepática e morrem durante o desenvolvimento embrionário. Pelo contrário, murganhos deficientes nas restantes quatro proteínas são imunodeficientes, mas não se observam alterações no desenvolvimento embrionário. Murganhos deficientes em mais do que uma proteína do NF- κ B desenvolvem fenótipos mais severos e morrem durante o desenvolvimento embrionário ou após o nascimento (Gerondakis *et al.*, 1999; Li e Verma, 2002).

Para a maior parte dos estímulos conhecidos, exceptuando a radiação ultravioleta e o peróxido de hidrogénio, a degradação do I κ B é essencial para a libertação e subsequente activação do NF- κ B (figura 8). A fosforilação do I κ B, mediada pela cinase do I κ B (IKK), é um evento crucial neste processo e ocorre em resíduos específicos de serina, designadamente Ser32 e Ser36 do I κ B- α . O I κ B- α fosforilado é então ubiquitinado em resíduos lisina (21 e 22) e posteriormente degradado pelo proteassoma 26S. Deste modo, os dímeros de NF- κ B são libertados

no citoplasma, migram para o núcleo e induzem a transcrição de genes alvo (Mercurio e Manning, 1999 a; Chen e Ghosh, 1999).

Figura 8. Activação da via de sinalização do NF- κ B. A activação do factor de transcrição NF- κ B é mediada por várias vias de sinalização intracelular estimuladas por LPS, citocinas ou stresse. A cinase (IKK) do inibidor do NF- κ B (I κ B) constitui um ponto de convergência das várias vias de sinalização e é constituída pelas subunidades IKK α , IKK β e IKK γ ou NEMO. A activação deste complexo resulta na fosforilação e degradação do I κ B com libertação do NF- κ B para o núcleo e transcrição de genes alvo, designadamente o gene *iNOS* (adaptado de Yamamoto e Gaynor, 2001).

O complexo IKK, de 700-900 kDa, é constituído por várias proteínas: IKK1 (IKK α), IKK2 (IKK β) e a subunidade reguladora moduladora essencial do NF- κ B (NEMO, também conhecida por IKK γ). A subunidade NEMO não possui actividade cinásica intrínseca mas contém motivos envolvidos em interacções proteína-proteína, enquanto que as cinases IKK1 e IKK2 podem fosforilar *in vitro* I κ B- α , β e ϵ . Este complexo IKK é um ponto de convergência para a activação do NF- κ B induzida por uma série de estímulos e a ausência de qualquer uma das proteínas do complexo IKK provoca o bloqueio da activação do NF- κ B. Recentemente foram identificados dois componentes adicionais ao complexo IKK, designadamente a proteína de choque térmico 90 e o CD37, cujas funções não foram ainda esclarecidas (Karin, 1999).

Os mecanismos moleculares envolvidos na activação do complexo IKK não estão ainda bem identificados. Uma das hipóteses sugere que a activação de um receptor é responsável por activar uma cinase do IKK com consequente fosforilação do IKK. Alternativamente, foi proposta a existência de uma proteína adaptadora, que poderá direccionar o complexo IKK para perto do receptor com consequente alteração de conformação e estimulação da sua auto-fosforilação. Diversas cinases poderão actuar como cinases do IKK, designadamente a MEKK (cinase da cinase da ERK) 1, a MEKK2, a MEKK3, a NIK (cinase indutora do NF- κ B), a TBK1 (homólogo da IKK,

recentemente identificado), a TAK1 (cinase activada pelo TGF- β) e a PKC ζ (uma proteína cinase C atípica). No entanto, a função exacta de cada uma destas proteínas na via de sinalização do NF- κ B requer investigação adicional (Mercurio e Manning, 1999 a; Li e Verma, 2002).

De um modo geral, considera-se que a actividade do NF- κ B é regulada pela degradação do I κ B com conseqüente activação deste factor de transcrição. No entanto, alguns estudos têm sugerido que a actividade do NF- κ B é também regulada por modificação directa das suas proteínas, designadamente por fosforilação e provavelmente por acetilação (Zhong *et al.*, 1997; Wang e Baldwin, 1998; Yang *et al.*, 2001). De acordo com estes estudos foi demonstrado que, após a degradação do I κ B- α , a fosforilação da subunidade p65 no resíduo serina 276 pela PKA é essencial para uma ligação eficiente desta subunidade à proteína com capacidade de ligação ao CREB (proteína com capacidade de ligação a elementos de resposta ao AMPc), um co-activador da transcrição. Outras enzimas com capacidade de fosforilar a proteína p65, aumentando a sua actividade, incluem a cinase da caseína II e o IKK2. Estudos genéticos têm demonstrado que várias proteínas, incluindo a TBK1, a IKK1/2, a NIK e a PKC ζ , são importantes no controlo da actividade do NF- κ B, provavelmente por fosforilação (Mercurio e Manning, 1999 b; Li e Verma, 2001). Estes estudos demonstram que a fosforilação do NF- κ B é crucial para a sua função e representa, provavelmente, um meio adicional de regulação deste factor de transcrição em resposta a diferentes estímulos.

1.4.3. O monóxido de azoto e a imunobiologia da pele

O NO é produzido durante respostas imunológicas e inflamatórias e está envolvido na imunidade inata, por ser citotóxico contra organismos infecciosos, e na imunidade adquirida, por modular a morte e a função das células do sistema imunológico. A produção de NO é uma característica genuína das células do sistema

imunológico (células dendríticas, células *natural killer*, mastócitos, monócitos, macrófagos, células de *Küpffer*, microglia, eosinófilos e neutrófilos), assim como de outras células envolvidas nas reacções imunológicas (células endoteliais, células epiteliais, células musculares lisas dos vasos sanguíneos, fibroblastos, queratinócitos, condrócitos, hepatócitos). As isoformas iNOS e eNOS têm sido descritas em macrófagos, DC, células *natural killer* e ainda linhas celulares, clones, hibridomas e células tumorais de linfócitos T e B. No entanto, a expressão das isoformas da NOS em linfócitos T e B primários permanece ainda por esclarecer (Bogdan, 2001).

O uso de dadores de NO, de inibidores da NOS e a análise de murganhos geneticamente modificados e deficientes na sintase do monóxido de azoto tem demonstrado claramente que o NO governa uma série de eventos no sistema imunológico. Entre estes, incluem-se a diferenciação, proliferação e apoptose de células do sistema imunológico, os efeitos imunossuppressores, a produção de citocinas e quimiocinas, a expressão de moléculas de adesão e co-estimuladoras e ainda a síntese e deposição de componentes da matriz extracelular (Bogdan, 2001).

A produção de NO e a expressão da iNOS ocorre em células dendríticas, após estimulação por bactérias e parasitas (Stenger *et al.*, 1996; Dalpke *et al.*, 2002; Rescigno *et al.*, 2002; Norimatsu *et al.*, 2003). Estudos recentes sugerem que as DC têm uma acção citotóxica directa em linhas celulares tumorais por mecanismos que dependem parcialmente do monóxido de azoto (Shimamura *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002).

O NO produzido pelas próprias DC pode modular as suas funções, designadamente a captação de antígenos (Paolucci *et al.*, 2000) e a apresentação de antígenos a linfócitos (Hoffman *et al.*, 2002). O monóxido de azoto pode ainda inibir a proliferação de linfócitos (Lu *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1998; Ozaki *et al.*, 2002), ou mesmo induzir apoptose de linfócitos T e timócitos (Bonham *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1999; Aiello *et al.*, 2000), assim como das próprias DC (Lu *et al.*, 1996; Stanford *et al.*, 2001). Em resumo, o monóxido de azoto produzido por células dendríticas parece

modular as respostas imunológicas dos linfócitos, sendo, por estas razões, considerada uma molécula crucial na imunidade inata e adquirida mediada pelas DC.

Na pele o NO é produzido por diferentes células residentes, designadamente queratinócitos (Heck *et al.*, 1992; Shimizu *et al.*, 1997), melanócitos (Rocha e Guillo, 2001), fibroblastos, células endoteliais, e células dendríticas da pele, as células de *Langerhans* (Bull *et al.*, 1996; Qureshi *et al.*, 1996; Mohenn, 1997; Ross *et al.*, 1998). Este gás inorgânico é um mediador autócrino e parácrino de processos muito diversos e complexos que ocorrem na pele (Bruch-Gerharz *et al.*, 1998). Deste modo, o NO está envolvido na manutenção da homeostasia da pele (Krischel *et al.*, 1998), na regulação da vasodilatação, na produção de melanina, na imunidade contra agentes patogénicos e ainda na cicatrização da pele (Heck *et al.*, 1992; Thornton *et al.*, 1998; Abd-El-Aleem *et al.*, 2000; Frank *et al.*, 2000; Witte e Barbul, 2002). A produção exagerada de NO tem sido demonstrada em patologias da pele, designadamente psoríase (Sirsjö *et al.*, 1996; Morhenn, 1997; Rowe *et al.*, 1997), dermatite atópica e dermatite de contacto alérgica (Ormerod *et al.*, 1997; Ross *et al.*, 1998; Ross e Reske-Kunz, 2001; Sahin *et al.*, 2001; Wallengren e Larsson, 2001).

O papel do NO na dermatite de contacto alérgica (DCA) é extremamente complexo. Em baixas concentrações o NO é pró-inflamatório, na medida em que induz vasodilatação e é responsável pelo recrutamento de neutrófilos. Em concentrações elevadas o NO diminui a expressão de moléculas de adesão, suprime a activação e induz apoptose de células inflamatórias (Coleman, 2001). Estudos *in vivo* demonstram que a aplicação de cremes capazes de libertar NO promovem a inflamação (Ormerod *et al.*, 1999), enquanto que cremes contendo inibidores da iNOS inibem a inflamação (Morita *et al.*, 1995). A expressão da isoforma iNOS é induzida durante a DCA (Ormerod *et al.*, 1997; Ross *et al.*, 1998; Sahin *et al.*, 2001) e num modelo de DCA, provocado em murganhos pelo antigénio de contacto DNFB, foi demonstrada a produção de NO pela iNOS (Ross *et al.*, 1998). De acordo com estes estudos, a

injecção de inibidores da iNOS por via intradermal suprime a DCA. Contudo, murganhos deficientes em iNOS desenvolvem uma resposta agravada na fase efectora da DCA, sugerindo que o NO está envolvido na resolução clínica da DCA (Ross e Reske-Kunz, 2001) e reforçando, deste modo, a complexidade do envolvimento do monóxido de azoto nesta patologia cutânea.

1.5. Objectivos do trabalho

Este trabalho teve como objectivo identificar algumas vias de sinalização intracelular activadas nas células apresentadoras de antígeno, designadamente células dendríticas da pele, após o contacto com lipopolissacarídeo (LPS), com citocinas e com alergénios de contacto. Como modelo experimental utilizou-se uma linha celular imatura, precursora das células dendríticas da pele de feto de murganho (FSDC).

O monóxido de azoto (NO) é produzido pela isoforma indutível da sintase do monóxido de azoto (iNOS) durante a resposta imunológica e modula as funções das células dendríticas, designadamente a captação e a apresentação de antígenos aos linfócitos T. A expressão da iNOS e de várias proteínas envolvidas na resposta imunológica é modulada pelo factor nuclear de transcrição *kappa* B (NF- κ B), que se sabe estar envolvido na diferenciação, maturação e sobrevivência das células dendríticas.

O trabalho realizado nesta dissertação teve por objectivo o estudo do efeito do LPS na produção de NO e na expressão da isoforma indutível da sintase do monóxido de azoto (iNOS), bem como o estudo dos eventos de sinalização intracelular activados por esta endotoxina, designadamente a activação do NF- κ B (capítulo 3).

O efeito do factor estimulante de colónias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), uma citocina epidérmica, na produção de NO e na expressão da iNOS foi

também investigado. Foram, ainda, alvo de estudo os eventos de sinalização intracelular activados pelo GM-CSF, designadamente a activação do NF- κ B (capítulo 4).

Neste trabalho foi também investigado o efeito de dois alergénios de contacto (2,4-dinitrofluorbenzeno e níquel), causadores de dermatite de contacto alérgica, na produção de NO, na expressão da iNOS e na activação do NF- κ B (capítulo 5).