

## Capítulo 5

### **Efeito diferencial de alergénios de contacto na expressão da isoforma indutível da sintase do monóxido de azoto e na activação do factor de transcrição NF- $\kappa$ B**

#### **5.1. RESUMO**

Neste trabalho investigou-se o efeito de dois alergénios de contacto causadores de dermatite de contacto alérgica (DCA), o 2,4-dinitrofluorbenzeno (DNFB) e o sulfato de níquel, na expressão da isoforma indutível da sintase do monóxido de azoto (iNOS) e na produção de monóxido de azoto (NO) por células dendríticas da epiderme de murganho (FSDC). O efeito destes dois alergénios de contacto na activação do factor de transcrição NF- $\kappa$ B também foi investigado. Os resultados obtidos demonstraram que apenas o níquel aumentou a expressão da iNOS com o consequente aumento da produção de NO pelas células FSDC. Os dois alergénios de contacto, níquel e DNFB, induziram a ligação do NF- $\kappa$ B ao ADN, mas activaram diferentes subunidades deste factor de transcrição.

## **5.2. INTRODUÇÃO**

As células dendríticas (DC) da pele, nomeadamente as células de *Langerhans* (LC), estão envolvidas na fase de sensibilização da dermatite de contacto alérgica (DCA). Estas células endocitam os antígenos, abandonam a epiderme e migram para os gânglios linfáticos, onde apresentam os antígenos processados aos linfócitos T. Durante a migração, que depende dos próprios antígenos e de citocinas produzidas na epiderme, as LC sofrem um processo de maturação que culmina com a expressão à superfície celular de proteínas essenciais para a apresentação dos antígenos aos linfócitos T, tais como as moléculas do complexo *major* de histocompatibilidade (MHC) classe I e II e moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86, CD40) (Bancherou e Steinman, 1998). Contudo, os mecanismos de sinalização intracelular activados por alérgenos de contacto que induzem a maturação das DC da pele não são completamente conhecidos. Alguns estudos efectuados por outros autores indiciam o envolvimento do factor de transcrição NF- $\kappa$ B (Oyama *et al.*, 1998; Rescigno *et al.* 1998; Ammon *et al.*, 2000; Neumann *et al.*, 2000) e da p38 MAPK (Hacker *et al.*, 1998; Ardeshtna *et al.*, 2000; Puig-Kröger *et al.*, 2000; Arrighi *et al.*, 2001; Re e Strominger, 2001; Uchi *et al.*, 2002) na maturação das DC.

Os alérgenos de contacto, 2,4-dinitrofluorbenzeno (DNFB) e sulfato de níquel, são causadores de DCA (Smith Pease *et al.*, 2003). Estudos efectuados demonstram que o DNFB induz a fosforilação de proteínas em resíduos de tirosina (Kuhn *et al.*, 1998; Neisius *et al.*, 1999) e que, quer o DNFB quer o níquel, aumentam a expressão das moléculas CD80, CD86, CD83 (Manome *et al.*, 1999; Aiba *et al.*, 2000; Arrighi *et al.*, 2001), por mecanismos de sinalização intracelular que envolvem a activação da p38 MAPK (Arrighi *et al.*, 2001; Goebeler *et al.*, 2001).

O factor de transcrição NF- $\kappa$ B regula a expressão de vários genes que codificam proteínas envolvidas em processos inflamatórios e imunológicos, nomeadamente proteínas essenciais à apresentação de antígenos aos linfócitos T, como as moléculas MHC I e II, CD80, CD86, e proteínas envolvidas na defesa das

células eucarióticas, como a isoforma indutível da sintase do monóxido de azoto (iNOS) (Pahl, 1999). O monóxido de azoto (NO), um radical altamente reactivo produzido por esta enzima (Lamas *et al.*, 1998), tem sido relacionado com o crescimento e cicatrização da pele (Heck, *et al.*, 1992; Krischel *et al.*, 1998; Thornton *et al.*, 1998; Abd-El-Aleem *et al.*, 2000; Frank *et al.*, 2000; Witte e Barbul, 2002), com a apresentação de antigénios aos linfócitos (Holt *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 1996; Aiello *et al.*, 2000; Paolucci *et al.*, 2000; Hoffman *et al.*, 2002) e com o desenvolvimento de processos inflamatórios da pele (Sirsjö *et al.*, 1996; Morhenn, 1997; Rowe *et al.*, 1997), nomeadamente a DCA (Ormerod *et al.*, 1997; Ross *et al.*, 1998; Ross e Reske-Kunz, 2001; Sahin *et al.*, 2001; Wallengren e Larsson, 2001).

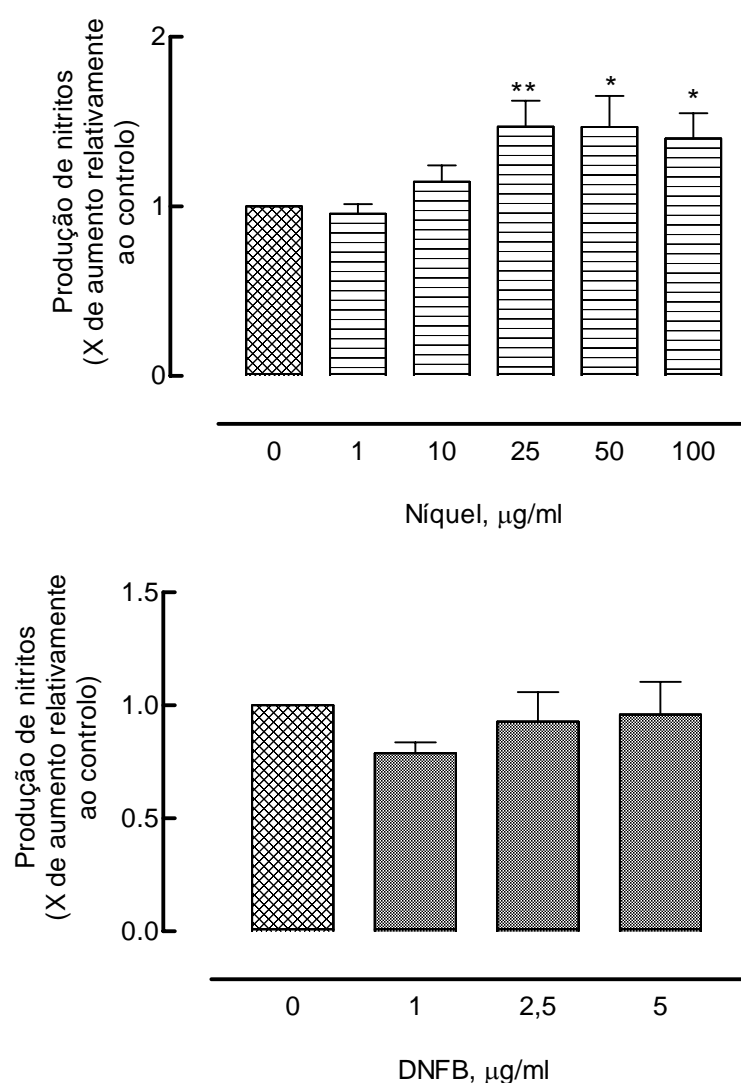
O objectivo deste trabalho consistiu no estudo do efeito de dois alergénios de contacto, o sulfato de níquel e o DNFB, na expressão da proteína iNOS e na activação do factor de transcrição NF- $\kappa$ B nas células FSDC.

### **5.3. RESULTADOS**

#### **5.3.1. Efeito dos alergénios de contacto níquel e DNFB na expressão da proteína iNOS e na produção de NO**

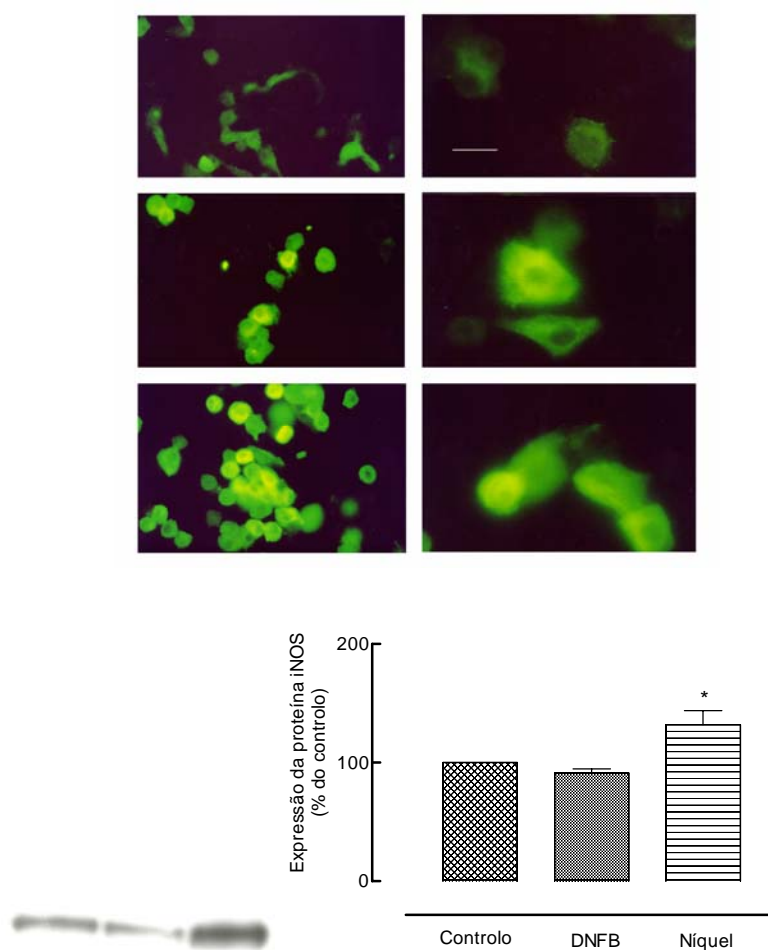
Com o objectivo de avaliar a produção de NO por FSDC estimuladas com os alergénios de contacto, as células foram cultivadas com concentrações crescentes de DNFB (1-5  $\mu$ g/ml) e de sulfato de níquel (1-100  $\mu$ g/ml), durante 48 horas. Os resultados obtidos mostraram que a produção de nitritos, avaliada pela técnica de *Griess*, aumentou com a concentração de níquel utilizada para estimular as células, reflectindo assim um aumento na produção de NO (figura 5.1 A). Após estimulação das células com 50 e 100  $\mu$ g/ml, a produção de NO aumentou, relativamente ao controlo,  $1,47 \pm 0,18$  ( $p < 0,05$ ) e  $1,40 \pm 0,15$  ( $p < 0,05$ ) vezes, respectivamente. Contrariamente aos resultados obtidos com o níquel, o potente alergénio de contacto DNFB não teve qualquer efeito na produção de NO (figura 5.1 B).

Com o objectivo de investigar se o aumento da produção de NO por células estimuladas com níquel envolvia um aumento da expressão da proteína iNOS, procedeu-se à análise da proteína por imunocitoquímica e por *Western blot* (figura 5.2). Os estudos de imunofluorescência mostraram que o níquel (50 e 100  $\mu$ g/ml) induziu um aumento da expressão citoplasmática da proteína iNOS (figura 5.2 A). Estes resultados foram confirmados por *Western blot* (figura 5.2 B), tendo-se observado que o níquel aumentou a expressão da proteína iNOS em  $31,9 \pm 11,8$  % relativamente ao controlo ( $p < 0,05$ ) (figura 5.2 C). Estes resultados permitiram-nos concluir que o níquel induziu um aumento na expressão da proteína iNOS com consequente aumento da produção de monóxido de azoto pelas FSDC. O DNFB não teve qualquer efeito na expressão da proteína iNOS (figuras 5.2 B e 5.2 C).



**Figura 5.1-** Efeito do níquel e do DNFB na produção de nitritos.

As células FSDC foram incubadas com concentrações crescentes de níquel (1-100 µg/ml) (A) ou DNFB (1-5 µg/ml) (B), durante 48 horas. A concentração de nitritos nos sobrenadantes das culturas celulares foi determinada pelo método de *Griess*, usando uma curva padrão de nitrito de sódio. Os resultados foram expressos em número de vezes de aumento da produção de nitritos relativamente ao controlo (células cultivadas na ausência dos alérgenos de contacto). A produção de nitritos nas células controlo foi de  $1,1 \pm 0,19 \mu\text{M}$  (A) e de  $1,3 \pm 0,31 \mu\text{M}$  (B). Os resultados apresentados correspondem a médias  $\pm$  SEM de três a oito experiências independentes. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  quando comparados com o controlo.



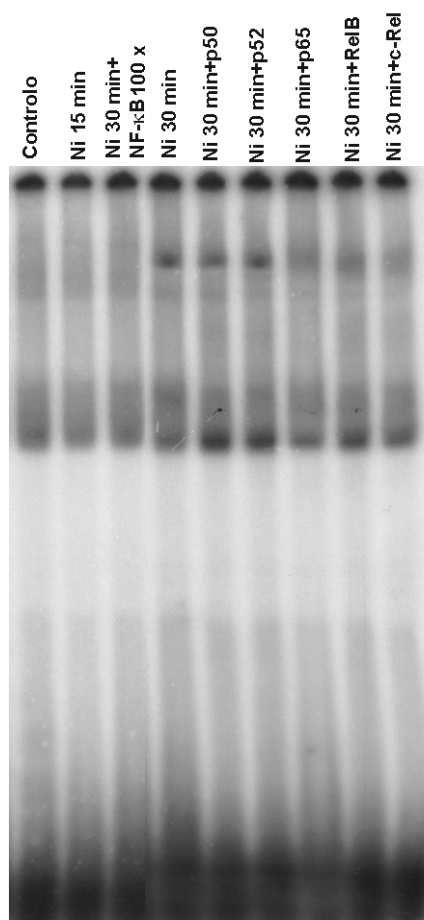
**Figura 5.2-** Efeito do níquel e do DNFB na expressão da proteína iNOS.

(A) As células FSDC foram incubadas com níquel (50 e 100  $\mu$ g/ml), durante 24 horas. A expressão e distribuição intracelular da proteína iNOS foram avaliadas por imunocitoquímica. Após fixação e permeabilização, as células foram incubadas com um anticorpo policlonal, produzido em coelho, contra a proteína iNOS (10  $\mu$ g/ml). Este anticorpo foi visualizado com anticorpos de porco desenvolvidos contra imunoglobulinas de coelho e conjugados com o fluoróforo FITC (1:40). As preparações foram observadas por microscopia de fluorescência normal e são representativas de duas preparações com resultados similares. *Escala da barra* = 25  $\mu$ m (painel esquerdo-ampliação de 100 x; painel direito-ampliação de 250 x). (B) As células FSDC foram incubadas com DNFB (1  $\mu$ g/ml) ou níquel (100  $\mu$ g/ml), durante 24 horas. Os extractos celulares totais foram desnaturados e sujeitos a uma electroforese SDS-PAGE num gel com 10 % de acrilamida, seguida de electrotransferência das proteínas para a membrana de PVDF. A expressão da proteína iNOS foi avaliada por *Western blot*, com um anticorpo contra a proteína iNOS (1:2000). (C) Análise densitométrica do *Western blot*. A densidade das bandas correspondentes à proteína iNOS, nas células cultivadas com DNFB ou níquel, foi expressa em percentagem da densidade das bandas nas células controlo. Os resultados são médias  $\pm$  SEM de quatro experiências. \*  $p < 0,05$  quando comparado com o controlo.

### 5.3.2. Efeito dos alergénios de contacto níquel e DNFB na activação do factor de transcrição NF- $\kappa$ B

Os alergénios de contacto, causadores da dermatite de contacto alérgica, aumentam a expressão de proteínas em células dendríticas, designadamente o complexo *major* de histocompatibilidade I e II, citocinas e seus receptores de superfície, moléculas de adesão intercelular, entre outras (Arrighi *et al.*, 2001). A região promotora dos genes que codificam essas proteínas e muitas outras envolvidas nos processos inflamatórios, como a iNOS, contém locais de ligação para o factor de transcrição NF- $\kappa$ B (Pahl, 1999). Em células não estimuladas as proteínas constituintes do factor de transcrição NF- $\kappa$ B (p50, p52, p65/RelA, RelB e c-Rel) formam dímeros e estão localizadas no citoplasma em associação com proteínas inibitórias, denominadas I $\kappa$ B. A activação celular por diversos estímulos conduz à fosforilação e degradação da proteína inibitória I $\kappa$ B, ocorrendo a migração nuclear do factor de transcrição NF- $\kappa$ B com a consequente indução da transcrição de genes dependentes deste factor de transcrição (Chen e Ghosh, 1999; Mercurio e Manning, 1999 a).

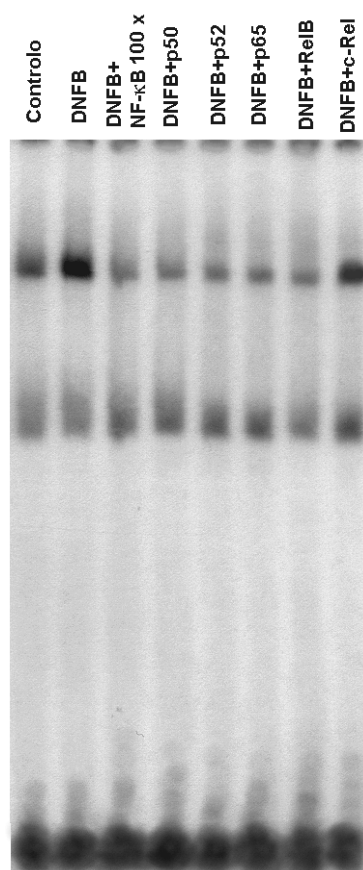
Com o objectivo de avaliar a eventual activação do factor de transcrição NF- $\kappa$ B pelos alergénios de contacto níquel e DNFB, investigou-se o efeito dos mesmos na ligação do NF- $\kappa$ B ao ADN das FSDC, através da análise de EMSA. Os resultados apresentados na figura 5.3 demonstraram que a estimulação das FSDC com níquel, durante 30 minutos, induziu a ligação do NF- $\kappa$ B ao ADN. Os ensaios de *supershift* realizados permitiram-nos ainda concluir que, nas FSDC, apenas as proteínas do NF- $\kappa$ B p65, c-Rel e RelB ligaram ao ADN em resposta ao níquel (figura 5.3). O efeito do DNFB na ligação do NF- $\kappa$ B ao ADN das FSDC, encontra-se representado na figura 5.4. Este alergénio de contacto, tal como o níquel, também induziu a activação deste factor de transcrição, após 15 minutos de estimulação celular. Os ensaios de *supershift* demonstraram que, nas células FSDC, apenas a proteína do NF- $\kappa$ B c-Rel não ligou ao ADN em resposta ao DNFB (figura 5.4).



**Figura 5.3-** Efeito do níquel na ligação do NF- $\kappa$ B ao ADN.

As células FSDC foram incubadas com meio de cultura (controlo), ou com níquel (Ni) (100  $\mu$ g/ml), durante 15 e 30 minutos. Os extractos nucleares das FSDC foram sujeitos à análise de EMSA com o oligonucleótido de dupla cadeia contendo a região de consenso para o factor de transcrição NF- $\kappa$ B. Para confirmar a especificidade das bandas, foram realizados ensaios de competição, que consistiram na adição prévia de um excesso (100 x) de oligonucleótido não marcado aos extractos nucleares, o que resultou na diminuição dos complexos específicos. Os ensaios de *supershift*, que visam identificar as proteínas constituintes do factor de transcrição activado, consistiram na adição, ao extracto nuclear, de anticorpos específicos (2  $\mu$ g) contra as diferentes proteínas constituintes do NF- $\kappa$ B (p50, p52, p65, RelB e c-Rel). Os complexos foram resolvidos por electroforese em gel de poliacrilamida a 7 %, em condições não desnaturantes, e as bandas NF- $\kappa$ B/ADN foram examinadas por autoradiografia. O gel apresentado é representativo de dois geles com resultados similares.





**Figura 5.4-** Efeito do DNFB na ligação do NF-κB ao ADN.

As células FSDC foram incubadas com meio de cultura (controlo), ou com DNFB (1 µg/ml), durante 15 minutos. Os extractos nucleares das FSDC foram sujeitos à análise de EMSA com o oligonucleótido de dupla cadeia contendo a região de consenso para o factor de transcrição NF-κB. Para confirmar a especificidade das bandas, foram realizados ensaios de competição, que consistiram na adição prévia de um excesso (100 x) de oligonucleótido não marcado aos extractos nucleares, o que resultou na diminuição dos complexos específicos. Os ensaios de *supershift*, que visam identificar as proteínas constituintes do factor de transcrição activado, consistiram na adição, ao extracto nuclear, de anticorpos específicos (2 µg) contra as diferentes proteínas constituintes do NF-κB (p50, p52, p65, RelB e c-Rel). Os complexos foram resolvidos por electroforese em gel de poliacrilamida a 7 %, em condições não desnaturantes, e as bandas NF-κB/ADN foram examinadas por autoradiografia. O gel apresentado é representativo de três geles com resultados similares.

#### **5.4. DISCUSSÃO**

O monóxido de azoto é produzido pela iNOS durante o desenvolvimento de respostas imunológicas, designadamente a dermatite de contacto alérgica (DCA) (Ormerod *et al.*, 1997; Ross *et al.*, 1998; Ross e Reske-Kunz, 2001; Sahin *et al.*, 2001; Wallengren e Larsson, 2001). No entanto, não existem estudos sobre o efeito de alergénios de contacto, causadores da DCA, na expressão da iNOS e na produção de NO por células dendríticas da pele. Neste estudo investigou-se a eventual indução da expressão da iNOS por dois alergénios de contacto, o sulfato de níquel e o 2,4-dinitrofluorbenzeno. Os resultados obtidos demonstraram que apenas o níquel aumentou a expressão da iNOS e a produção de NO em células dendríticas da epiderme de feto de murganho (figuras 5.1 e 5.2). Uma vez que a região promotora do gene que codifica a proteína iNOS contém locais de ligação para o factor de transcrição NF-κB (Xie *et al.*, 1994; de Vera *et al.*, 1996; Weisz *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1998; Ganster *et al.*, 2001), investigou-se o efeito dos dois alergénios de contacto na activação do NF-κB. Os resultados obtidos mostraram que o níquel e o DNFB activaram o NF-κB, ainda que de um modo distinto (figuras 5.3 e 5.4). A activação do NF-κB pelo níquel já foi demonstrada, por outros autores, em células endoteliais (Goebeler *et al.*, 1995; Goebeler *et al.*, 2001).

O facto de o níquel e o DNFB terem efeitos distintos na expressão da iNOS e na produção de NO pelas células FSDC, sugere-nos que estes dois alergénios de contacto activam vias de sinalização intracelular diferentes. De facto, os resultados obtidos para a activação do factor de transcrição NF-κB demonstram que, apesar de os dois alergénios de contacto terem induzido a ligação deste factor de transcrição ao ADN das células FSDC, as subunidades envolvidas divergiram. O níquel activou as subunidades do NF-κB p65, RelB e c-Rel, enquanto que o DNFB activou as proteínas p50, p52, p65 e RelB (figuras 5.3 e 5.4). Esta activação diferencial das subunidades do NF-κB em resposta aos dois alergénios de contacto utilizados neste trabalho pode ser responsável pelo diferente efeito do DNFB e do níquel na expressão da iNOS nas

células FSDC. De facto, o factor de transcrição NF- $\kappa$ B possui a capacidade de activar, dependendo da célula e do estímulo, apenas uma parte de todo o repertório de genes dependentes do NF- $\kappa$ B (Mercurio e Manning, 1999 a). Estudos efectuados em macrófagos e células dendríticas demonstram, claramente, a capacidade que a via de sinalização do NF- $\kappa$ B possui para responder a diferentes estímulos, activando diferentes vias de sinalização do NF- $\kappa$ B e apenas uma parte de todos os genes que são alvo deste factor de transcrição (Baltathakis *et al.*, 2001). Estudos recentes demonstram que o desenvolvimento e a sobrevivência das células dendríticas envolvem diferentes subunidades do NF- $\kappa$ B (Ouaaz *et al.*, 2002), pelo que a regulação diferencial das subunidades deste factor de transcrição contribui para a especificidade e selectividade do seu efeito biológico.

Estudos efectuados em células dendríticas revelaram que o níquel e o dinitroclorobenzeno, um alergénio de contacto semelhante ao DNFB, aumentaram a expressão da molécula co-estimuladora CD86. No entanto, estes autores verificaram que o aumento da expressão de CD86, em células dendríticas tratadas com DNCB, foi inibido por anticorpos contra a IL-1 $\beta$  e contra o TNF- $\alpha$ , não se verificando, no entanto, este efeito em células tratadas com níquel (Aiba *et al.*, 1997; Aiba *et al.*, 2000). Por este motivo, foi sugerido que os dois alergénios de contacto usam vias de sinalização distintas para estimular as DC. Estes resultados são consistentes com os obtidos neste trabalho, em que o DNFB e o níquel activaram diferentes subunidades do NF- $\kappa$ B e apenas o níquel aumentou a expressão da iNOS e a produção de NO, nas células FSDC. Em DC derivadas de monócitos, o níquel e o DNFB aumentam a expressão das moléculas CD86 e antigénio leucocitário humano (HLA) e aumentam a produção de TNF- $\alpha$ , mas apenas o níquel induz apoptose das células (Manome *et al.*, 1999), o que também sugere a activação de diferentes vias de sinalização pelos dois alergénios.

Os alergénios de contacto induzem a maturação das DC e aumentam a expressão de proteínas essenciais para uma eficiente apresentação dos antigénios aos linfócitos T (Kimber *et al.*, 1999; Tuschl e Kovac, 2001). No entanto, os

mecanismos de sinalização intracelular activados por alergénios e que induzem a maturação das DC não estão ainda bem esclarecidos. O DNFB e o níquel aumentam a expressão das moléculas de superfície CD80, CD86, CD83 em células de *Langerhans*, em células dendríticas derivadas de monócitos e em DC derivadas de células CD34<sup>+</sup> (Reiser e Schneeberger, 1996; Sing *et al.*, 1999; Aiba *et al.*, 2000; Arrighi *et al.*, 2001; De Smedt *et al.*, 2001), e aumentam a produção de TNF- $\alpha$  e a expressão de HLA-DR em DC derivadas de monócitos (Manome *et al.*, 1999). O níquel aumenta ainda a produção de IL-1 $\beta$ , IL-6 e a expressão de ICAM-1 em células dendríticas derivadas de monócitos (Aiba *et al.*, 1997) e derivadas de células CD34<sup>+</sup> (De Smedt *et al.*, 2001). Os genes que codificam todas estas proteínas contêm, na sua região promotora, locais de ligação para o factor de transcrição NF- $\kappa$ B (Pahl, 1999). Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a via de sinalização do NF- $\kappa$ B está envolvida na sinalização intracelular dos alergénios de contacto e sugerem que a maturação das DC, induzida por estes agentes, envolve o factor de transcrição NF- $\kappa$ B. Estudos efectuados por outros autores demonstram o envolvimento deste factor de transcrição na apresentação de antígenos aos linfócitos e nos processos de sobrevivência, diferenciação e maturação das DC (Burkly *et al.*, 1995; Petit *et al.*, 1997; Oyama *et al.*, 1998; Rescigno *et al.*, 1998; Clark *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999; Verhasselt *et al.*, 1999; Ammon *et al.*, 2000; Ardesna *et al.*, 2000; Giannoukakis *et al.*, 2000; Lyakh *et al.*, 2000; Neumann *et al.*, 2000; Yoshimura *et al.*, 2001; Ouaz *et al.*, 2002).

Os mecanismos de sinalização intracelular induzidos pelos alergénios de contacto DNFB e níquel, responsáveis pela activação do NF- $\kappa$ B nas células FSDC, não foram investigados neste trabalho. Uma vez que o níquel induz a formação de compostos reactivos intermediários de oxigénio (Buzard e Kasprzak, 2000; Huang *et al.*, 2001; Chen e Shi, 2002; Denkhau e Salnikow, 2002; Govindarajan *et al.*, 2002), que se sabe activarem o NF- $\kappa$ B (Allen e Tresini, 2000), é possível que, nas células FSDC, este composto químico gere compostos reactivos intermediários de oxigénio que estimulem este factor de transcrição. Outros mecanismos de sinalização intracelular activados pelo níquel envolvem as enzimas PI3K e a ERK (Andrew *et al.*,

2001; Barchowsky *et al.*, 2002), que podem activar o NF- $\kappa$ B (Mercurio e Manning, 1999 a; Ozes *et al.*, 1999; Romashkova e Makarov, 1999). Este factor de transcrição, uma vez activo, poderá ligar-se à região promotora do gene *iNOS* e induzir a sua transcrição nas células FSDC. Outros mecanismos de sinalização intracelular induzidos por vários alergénios de contacto, designadamente o níquel e o DNFB, envolvem a fosforilação de resíduos tirosina e a activação da p38 MAPK em células dendríticas (Kuhn *et al.*, 1998; Arrighi *et al.*, 2001; Goebeler *et al.*, 2001). Esta cinase está envolvida na activação do NF- $\kappa$ B (Carter *et al.*, 1999; Korus *et al.*, 2002) pelo que, nas FSDC, os alergénios de contacto poderão activar cinases de proteínas, como a p38 MAPK e ERK, que estimulam o NF- $\kappa$ B e induzem a transcrição de genes codificadores de proteínas essenciais para a maturação da DC. Estudos recentes têm demonstrado o envolvimento da p38 MAPK na maturação das células dendríticas (Hacker *et al.*, 1998; Ardesna *et al.*, 2000; Puig-Kröger *et al.*, 2000; Arrighi *et al.*, 2001; Re e Strominger, 2001; Uchi *et al.*, 2002).

Um conhecimento aprofundado das vias de sinalização intracelular activadas pelos alergénios de contacto que induzem a expressão de proteínas envolvidas da dermatite de contacto alérgica, como a *iNOS* (Ormerod *et al.*, 1997; Ross *et al.*, 1998; Sahin *et al.*, 2001), poderá contribuir para a identificação de potenciais locais intracelulares de intervenção terapêutica.