

## Capítulo 6

### Conclusões gerais e perspectivas

As células dendríticas (DC) possuem a capacidade de captar, processar e apresentar antígenos aos linfócitos T virgens, pelo que desempenham um papel crucial no início e modulação da resposta imunológica. Por outro lado, estudos recentes sugerem que as DC são essenciais na manutenção da tolerância periférica a antígenos próprios (Steinman *et al.*, 2000). O estado de diferenciação/maturação das células dendríticas parece determinar o balanço entre imunidade e tolerância.

Neste trabalho estudaram-se os eventos de sinalização intracelular que ocorrem nas DC após o contacto com estímulos que promovem a diferenciação e maturação destas células, designadamente o lipopolissacarídeo (LPS), o factor estimulante de colónias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e alérgenos de contacto. Como modelo experimental utilizou-se uma linha celular imatura, precursora das células dendríticas da pele de feto de murganho (FSDC).

**No capítulo 3**, os resultados obtidos demonstraram que o LPS induziu um aumento da transcrição do ARNm da isoforma indutível da sintase do monóxido de azoto (iNOS), da expressão da proteína iNOS e da produção de monóxido de azoto (NO). Estes resultados sugerem ainda que o aumento da expressão da iNOS e da produção de NO foi mediado por mecanismos de sinalização intracelular que

envolveram a activação da cinase de *Janus 2* (JAK2) e do factor nuclear de transcrição *kappa B* (NF- $\kappa$ B). Foi também observado que a inibição da activação da JAK2, pelo tyrphostin B42, preveniu a degradação da proteína inibitória do NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B- $\alpha$ , bem como a migração nuclear e a ligação do factor de transcrição NF- $\kappa$ B ao ADN das células FSDC.

**No capítulo 4**, observou-se que o GM-CSF aumentou a expressão da iNOS e a produção de NO em células FSDC e os resultados sugerem que este aumento foi mediado pela activação da JAK2 e do factor de transcrição NF- $\kappa$ B. O GM-CSF aumentou a fosforilação e degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$ , promovendo, deste modo, a ligação do NF- $\kappa$ B (subunidades p50, p52, e RelB) ao ADN das células FSDC.

**No capítulo 5**, investigou-se o efeito de dois alergénios de contacto, o sulfato de níquel e o 2,4-dinitrofluorbenzeno (DNFB), na expressão da iNOS. Os resultados obtidos demonstraram que apenas o níquel aumentou a expressão da iNOS e a produção de NO em células dendríticas da epiderme de murganho. No entanto, os dois antigénios de contacto induziram a ligação do NF- $\kappa$ B ao ADN e activaram diferentes subunidades deste factor de transcrição.

Um estudo recente demonstra que a expressão da iNOS aumenta durante a maturação das DC (Chen *et al.*, 2002 b). Estes resultados são concordantes com os obtidos neste trabalho em que o LPS, o GM-CSF e o alergénio de contacto níquel, estímulos que induzem a maturação das DC, aumentaram a expressão da iNOS. De referir ainda que, nas células FSDC, o LPS demonstrou ser o composto mais potente na indução da expressão da iNOS e na produção de NO, quando comparado com o efeito da citocina GM-CSF, do factor de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  (Cruz *et al.*, 1999; Cruz *et al.*, 2001 a; Cruz *et al.*, 2001 b), ou ainda do alergénio de contacto níquel (Cruz *et al.*, 2003). Este efeito pode dever-se ao facto do LPS estimular a produção de várias citocinas, nomeadamente TNF- $\alpha$ , interleucina (IL)-1, GM-CSF, interferão (IFN)- $\alpha$  e

IFN- $\beta$  (Verhasselt *et al.*, 1997; Yamaoka *et al.*, 1998; Zaks-Zilberman *et al.*, 2001; Hoshino *et al.*, 2002; Jacobs e Ignarro, 2001), todas elas relacionadas com a produção de NO (Cruz *et al.*, 1999; Vadiveloo *et al.*, 2000; Hirafuji *et al.*, 2002). Nas células FSDC, o LPS poderá estimular a produção de citocinas que, de um modo autócrino, poderão induzir a expressão da iNOS e a produção de NO. De facto, em macrófagos, a produção de IFN- $\alpha/\beta$  estimulada por LPS induz a expressão da iNOS (Gao *et al.*, 1998; Jacobs e Ignarro, 2001). As diferenças na quantidade de NO produzida pelas células FSDC estimuladas por LPS, GM-CSF, TNF- $\alpha$  e pelo alergénio de contacto níquel podem dever-se, ainda, à activação de diferentes vias de sinalização intracelular envolvidas na expressão da iNOS. De facto, o LPS e o GM-CSF activam a JAK2, ao contrário de alergénios de contacto que não activam esta via de sinalização (Valk *et al.*, 2002). Outro mecanismo que pode justificar o efeito potente do LPS na indução da produção de NO é o facto de o LPS estimular a produção de citocinas envolvidas na activação da JAK/STAT, designadamente o GM-CSF, IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  (Rane e Reddy, 2000). Os factores de transcrição STATs (transdutores do sinal e activadores da transcrição) poderão, com o factor de transcrição NF- $\kappa$ B activado pelo LPS, cooperar positivamente na regulação da expressão da iNOS nas células FSDC. De acordo com esta hipótese, em macrófagos, a fosforilação do factor de transcrição STAT1 medeia o sinergismo entre as vias de sinalização activadas por LPS e IFN- $\gamma$  (Kovarik *et al.*, 1998). Recentemente foi ainda demonstrado que o STAT1, activado pela JAK2, e o NF- $\kappa$ B regulam a transcrição do gene humano da proteína iNOS (Ganster *et al.*, 2001). De facto, a regulação da transcrição de genes em células eucarióticas requer, frequentemente, acções cooperativas entre várias proteínas. Assim, o STAT6 e o NF- $\kappa$ B cooperam, de um modo sinérgico, na activação da transcrição induzida por IL-4 (Shen *et al.*, 1998), e em células dendríticas, a expressão do factor regulador do interferão (IRF)-1 envolve a activação do STAT1 e do NF- $\kappa$ B (Remoli *et al.*, 2002). O sinergismo observado entre o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  na activação da transcrição de vários genes é mediado pela cooperação entre STAT1 e NF- $\kappa$ B

(Ohmori *et al.*, 1997), e o factor de transcrição da família Ets (específicos do epitélio), Ets-1, interage com o factor de transcrição NF- $\kappa$ B para, de um modo sinérgico, aumentar a transactivação do gene *iNOS* (Rudders *et al.*, 2001).

O envolvimento do factor de transcrição NF- $\kappa$ B na transcrição do gene *iNOS* não foi estudado directamente neste trabalho. Em alternativa, foi utilizado o antioxidante ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC), um inibidor do factor de transcrição NF- $\kappa$ B, que demonstrou inibir a expressão da *iNOS* e a produção de NO estimuladas por LPS e GM-CSF, nas células FSDC. Entre as abordagens experimentais que poderiam comprovar o envolvimento directo do NF- $\kappa$ B na indução da expressão da proteína *iNOS*, salienta-se a transfecção das FSDC com mutantes deste factor de transcrição contendo acção dominante negativa. O envolvimento do NF- $\kappa$ B na transcrição do gene *iNOS* poderia ser comprovado transfectando as FSDC com um gene repórter fundido com a região promotora do gene da *iNOS*, mas mutado nos locais de consenso que ligam o NF- $\kappa$ B. Em trabalhos futuros propomos utilizar estas técnicas para comprovar, de facto, o envolvimento directo do NF- $\kappa$ B na transcrição do gene da *iNOS* e na expressão da proteína.

O factor de transcrição NF- $\kappa$ B parece estar envolvido na diferenciação, maturação e sobrevivência das células dendríticas (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; Ardeshtna *et al.*, 2000; Giannoukakis *et al.*, 2000; Lyakh *et al.*, 2000; Neumann *et al.*, 2000; Yoshimura *et al.*, 2001), e na activação dos linfócitos T induzida pelas células dendríticas (O'Sullivan e Thomas, 2002; Andreakos *et al.*, 2003). Neste trabalho, todos os estímulos utilizados activaram o NF- $\kappa$ B, embora as subunidades activadas tenham sido diferentes. O LPS induziu a ligação de todas as proteínas do NF- $\kappa$ B ao ADN das FSDC e o GM-CSF activou as subunidades p50, p52, e RelB. O alergénio de contacto níquel estimulou as proteínas p65, RelB e c-Rel, enquanto que o DNFB activou as proteínas p50, p52, p65 e RelB.

Estudos efectuados em macrófagos e células dendríticas demonstram claramente a capacidade do NF- $\kappa$ B participar na resposta celular mediada por diversas vias de sinalização intracelular, modulando a transcrição de genes alvo de uma forma diferencial (Baltathakis *et al.*, 2001). De facto, a composição das subunidades do factor de transcrição NF- $\kappa$ B varia de célula para célula e durante a diferenciação (Grigoriadis *et al.*, 1996). Estudos recentes demonstram que o desenvolvimento e a sobrevivência das células dendríticas envolvem diferentes subunidades do NF- $\kappa$ B (Ouaaz *et al.*, 2002). A activação diferencial das subunidades deste factor de transcrição contribui para a especificidade e selectividade do seu efeito biológico, o que poderá justificar as diferenças observadas na produção de monóxido de azoto após a interacção das FSDC com os diferentes estímulos utilizados neste trabalho.

A activação da iNOS e a activação do factor de transcrição NF- $\kappa$ B, que foram alvo de estudo neste trabalho, modulam claramente as funções das células dendríticas e a apresentação de antigénios aos linfócitos T (Bogdan, 2001; Li e Verma, 2002). O NF- $\kappa$ B, por ser crucial na regulação da expressão de genes pró-inflamatórios, está altamente activado nos focos inflamatórios em diversas doenças, designadamente em patologias da pele (psoríase, dermatite de contacto alérgica, cancro da pele) (Bell *et al.*, 2003). Deste modo, o conhecimento aprofundado dos eventos de sinalização intracelular activados durante a maturação das DC será certamente útil para:

- melhorar estratégias terapêuticas que visam a modulação das resposta imunológicas envolvidas na dermatite de contacto alérgica e na rejeição de transplantes, bem como a utilização das DC como adjuvantes da imunização em cancros e infecções;
- validar testes *in vitro* que permitam identificar químicos com potencial para induzir dermatite de contacto alérgica e, deste modo, substituir as técnicas actuais que recorrem a animais de laboratório.

