

**SIMONE RODRIGUES CAMPELO**

**MODULAÇÃO IMUNOLÓGICA *in vitro* DE CÉLULAS DE  
LANGERHANS E MACRÓFAGOS POR DROGAS UTILIZADAS NO  
MANEJO DE REAÇÕES HANSÊNICAS**

**BELÉM**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**SIMONE RODRIGUES CAMPELO**

**MODULAÇÃO IMUNOLÓGICA *in vitro* DE CÉLULAS DE  
LANGERHANS E MACRÓFAGOS POR DROGAS UTILIZADAS NO  
MANEJO DE REAÇÕES HANSÊNICAS**

**Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.**

**Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado**

**Instituto de Ciências Biológicas – UFPA**

**BELÉM**

**2008**

**SIMONE RODRIGUES CAMPELO**

**MODULAÇÃO IMUNOLÓGICA *in vitro* DE CÉLULAS DE  
LANGERHANS E MACRÓFAGOS POR DROGAS UTILIZADAS NO  
MANEJO DE REAÇÕES HANSÊNICAS**

**Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular, avaliado pela seguinte banca examinadora.**

**Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado  
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA**

**Prof. Dr.  
Departamento**

**Prof. Dr.  
Departamento**

**Prof. Dr.  
Departamento**

**BELÉM  
2008**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus maravilhoso, que todos os dias tem me abençoado e que é a minha fonte de ânimo, força e dedicação. A esse Deus que me deu a vida e todos aqueles a quem amo muito, e por isso, todas às vitórias são para honra e louvor do Seu nome.

À minha linda família por todo amor, apoio e dedicação, especialmente aos meus pais, Waldenilson e Rosangela, por todo amor e apoio que sempre me deram para alcançar nossos sonhos, e por serem exemplo para a minha vida todos os dias; aos meus irmãos Samantha e Caio, que são meus amados companheiros; aos meus avós, Miguel e Odete, porque estiveram presentes em toda minha vida e sempre cuidaram de mim; às minhas queridas tias, Rosana e Bela, que são minhas mães e amigas; aos meus tios Miguel e Paulo, por toda ajuda e momentos de alegria; e às minhas grandes amigas Daisy Elaine e Regina, sempre presentes e nas lutas e alegrias.

Ao meu orientador prof. Dr. Claudio Salgado, pelo incentivo, apoio e por todo conhecimento compartilhado.

A toda equipe do Laboratório de Dermato-Imunologia UFPA/UEPA/MC, em especial ao Msc. Moises Silva, que se tornou mais que um amigo, um namorado maravilhoso que me ajudou em tudo e em todos os momentos; aos grandes amigos Prof. Dr. Jorge Pereira e Suellen Yamano; aos alunos Waléria, Denis e Rosana, amigos e companheiros; aos funcionários Cleide, Fátima, Nilce, Silvia e Leide e aos técnicos Elaine e Sidney, por toda ajuda e apoio.

Aos meus amigos Livia Tavares, Kátia Emi, Hector Figueroa, Elida Mamede, Hellen Lopes, Suziani Mota, Fabio Cavalcante, Nina e Cissa.

A todos que estiram próximos e que contribuíram para a realização desta obra.

## RESUMO

As células de Langerhans (CLs) estão localizadas na epiderme e desempenham um papel chave na indução da resposta imune e da tolerância. Recentemente foi descrito que o estímulo gerado pelo *M. leprae* na hanseníase aumenta o acúmulo destas células na epiderme, mostrando que elas podem estar envolvidas nos eventos imunológicos locais que ocorrem nos estados reacionais. Prednisona, talidomida, ciclosporina e amitriptilina são utilizadas no controle das reações hansênicas, mas pouco se sabe sobre a influência destas drogas sobre as CLs. A imunopatogenia da resposta celular nos estados reacionais ainda é pouco estudada e os efeitos do antidepressivo amitriptilina sobre as CLs é desconhecido. No entanto, diversas evidências sugerem que estas drogas exercem seus efeitos pela modulação das funções de diferentes células imunocompetentes. Os macrófagos são células fagocíticas que atuam como primeira linha de defesa do organismo, e que estão envolvidos na formação de granulomas em pacientes com hanseníase. O objetivo do presente estudo foi analisar a ação *in vitro* das drogas prednisona, talidomida, ciclosporina e amitriptilina sobre a produção de citocinas por CLs e macrófagos de camundongos BALB/c. As CLs foram isoladas, purificadas e cultivadas a partir da epiderme pela técnica de “panning” e os macrófagos foram isolados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c. Após 36 h de tratamento com as drogas, os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10 foram medidos por ELISA. A produção de TNF- $\alpha$  por CLs foi inibida nas duas concentrações de todas as drogas estudadas, no entanto, não houve alterações significativas na produção de IL-12. A produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos foi também diminuída no tratamento com prednisona ( $10^{-6}$ M e  $10^{-8}$ M), talidomida ( $10^{-6}$ M), ciclosporina ( $10^{-6}$ M) e amitriptilina ( $10^{-6}$ M). Também observamos diminuição dos níveis de IL-12 secretados pelos macrófagos, quando cultivados com prednisona ( $10^{-8}$ M), talidomida ( $10^{-6}$ M), ciclosporina ( $10^{-8}$ M) e amitriptilina ( $10^{-6}$ M e  $10^{-8}$ M). Os níveis de IL-10 produzidos não foram alterados por nenhuma das drogas testadas. Estes resultados mostram que estas drogas podem modular a resposta imune através da regulação da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-12 por CLs purificadas da epiderme e macrófagos peritoniais.

## ABSTRACT

Langerhans cells (LCs) are localized in the epidermis and performs a key role in the induction of immune response and tolerance. Recently, it was described the stimulus generated by *M. leprae* in leprosy enhances the accumulation of these cells in the epidermis, showing that they can be involved in the local immunologic events that occur in the leprosy reactional states. Prednisone, thalidomide, cyclosporine and amitriptyline are used in the control of leprosy reactions, but little is known about the influence of these drugs on the LCs. The immunopathogeny of the cellular response in the reactional states is yet little studied and the effects of the antidepressive amitriptyline on LCs are unknown. However, several evidences suggest that these drugs perform their effects by the modulation of different immunocompetent cells functions. Macrophages are phagocytic cells that act as first line of defense of the organism, and they are involved in the granuloma formation in patients with leprosy. The objective of the present study was to analyze the *in vitro* action of prednisone, thalidomide, cyclosporine and amitriptyline on the cytokine production by LCs and macrophages of BALB/c mice. LCs were isolated, purified and cultivated from the epidermis by the panning technique and macrophages were isolated by the peritoneal cavity of BALB/c mice. After 36 h of treatment with the drugs, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-12 and IL-10 were measured by ELISA. The TNF- $\alpha$  production by LCs was inhibited in both concentrations of all drugs studied, however no important alterations in IL-12 production were detected. TNF- $\alpha$  production by macrophages was also decreased by prednisone ( $10^{-6}$ M e  $10^{-8}$ M), thalidomide ( $10^{-6}$ M), cyclosporine ( $10^{-6}$ M), and amitriptyline ( $10^{-6}$ M e  $10^{-8}$ M). IL-10 levels were not modified for none of the drugs tested. The results show that these drugs can modulate the immune response by the regulation of pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-12 by purified epidermal LCs and peritoneal macrophages.

## SUMÁRIO

| DESCRIÇÃO  | PÁGINA |
|--|--------|
| <b>CAPA</b> .....  | i      |
| <b>FOLHA DE ROSTO</b> .....                                  | ii     |
| <b>BANCA EXAMINADORA</b> .....                               | iii    |
| <b>AGRADECIMENTOS</b> .....                                  | iv     |
| <b>RESUMO</b> .....  | v      |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | vi     |
| <b>SUMÁRIO</b> .....   | vii    |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....                                   | 7      |
| <b>1.1. Sistema Imunológico</b> .....                        | 7      |
| <b>1.2. Macrófagos</b> .....                                 | 10     |
| <b>1.3. Células Dendríticas</b> .....                        | 12     |
| <b>1.4. Células de Langerhans</b> .....                      | 14     |
| <b>1.5. Hanseníase</b> .....                                 | 15     |
| <b>1.6. Reações Hansênicas</b> .....                         | 17     |
| <b>1.7. Drogas Imunomoduladoras</b> .....                    | 18     |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....                                    | 22     |
| <b>2.1. Objetivo Geral</b> .....                             | 22     |
| <b>2.2. Objetivos Específicos</b> .....                      | 22     |
| <b>3. METODOLOGIA</b> .....                                  | 23     |
| <b>3.1. Animais de experimentação</b> .....                  | 23     |
| <b>3.2. Isolamento das células de Langerhans</b> .....       | 23     |
| <b>3.3. Isolamento de macrófagos peritoniais</b> .....       | 24     |
| <b>3.4. Tratamento com as drogas imunomoduladoras</b> .....  | 24     |
| <b>3.5. Viabilidade das células de Langerhans</b> .....      | 25     |
| <b>3.6. Identificação e quantificação de citocinas</b> ..... | 25     |
| <b>3.7. Análise Estatística</b> .....                        | 25     |
| <b>4. RESULTADOS</b> .....                                   | 26     |
| <b>5. DISCUSSÃO</b> .....                                    | 30     |
| <b>6. CONCLUSÕES</b> .....                                   | 36     |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                   | 37     |



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Sistema Imunológico

Imunologia é o estudo das defesas do organismo contra infecções (ABBAS & JANEWAY, Jr., 2000). A efetividade deste sistema é revelada pelo fato de que muitos animais são raramente infectados, apesar da exposição às centenas de milhares de microorganismos diariamente (BROWN *et al.*, 2007). O sistema imunológico tem como principal função distinguir o próprio do não-próprio, e essa habilidade é necessária para proteger o organismo de patógenos invasores e para eliminar células alteradas ou modificadas, tal como células malignas, células infectadas e células apoptóticas (PENG *et al.*, 2007).

Duas principais subdivisões compõem o sistema imunológico, a imunidade inata e a adaptativa (também conhecida como adquirida). O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra patógenos, e seus mecanismos incluem a fagocitose por macrófagos e granulócitos, o sistema complemento, quimiocinas, citocinas e a ação de células matadoras naturais (*natural killer* ou NK) (STEINMAN, 2007b). A imunidade adaptativa está envolvida na eliminação do patógeno na fase tardia da infecção, bem como na geração de memória imunológica. Embora estas duas subdivisões do sistema imune apresentem funções distintas, ambas possuem componentes celulares e humorais os quais cooperam para proteger o organismo de infecções. No entanto, as conexões entre os vários componentes imunes não são ainda completamente conhecidas.

A ativação do sistema imune inato leva à captação de antígenos estranhos por células apresentadoras de antígenos (APC) profissionais, que podem migrar para órgãos linfóides secundários para apresentá-los aos linfócitos. Estes antígenos são processados em fragmentos menores, chamados peptídeos, e expostos na superfície de APCs ligados a moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC). O complexo MHC-peptídeo é então reconhecido pelo receptor de

célula T (TCR), representando o primeiro sinal para a ativação (ABBAS & JANEWAY, Jr., 2000). Os antígenos localizados no citoplasma são processados por fagossomos, translocados para o retículo endoplasmático e apresentados por moléculas MHC classe I para o reconhecimento por células T citotóxicas (T CD8<sup>+</sup>), enquanto que os antígenos extracelulares são fagocitados, processados e apresentados pelas APCs pela via endocítica da molécula MHC classe II, para o reconhecimento por células T helper (T CD4<sup>+</sup>) (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998).

No entanto, somente a apresentação do antígeno não é suficiente. Para estimular a resposta mediada por células T é necessário haver a co-estimulação (HOWARD *et al.*, 2004), um segundo sinal que é fornecido por moléculas presentes na superfície celular, denominadas moléculas co-estimulatórias, amplificando ou modulando os sinais provenientes do receptor de célula T (TCR) (KROCZEK *et al.*, 2004). Portanto, a presença de ambos os sinais levam a expansão clonal e ao desenvolvimento de células T efetoras (ABBAS & JANEWAY, Jr., 2000).

Embora várias moléculas tenham demonstrado propriedade co-estimuladora, as mais potentes são restritas às APCs profissionais (KROCZEK *et al.*, 2004), sendo as mais importantes e bem caracterizadas as moléculas da família B7 (MARELLI-BERG *et al.*, 2007), como B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), que se ligam aos membros da família CD28 (ABBAS & JANEWAY, Jr., 2000; CARRENO & COLLINS, 2002; GREENWALD *et al.*, 2005). As moléculas B7-1 e B7-2 apresentam especificidade para dois membros desta família: o receptor estimulador CD28 e o receptor CTLA-4, que inibe a resposta por célula T e regula a tolerância periférica por esta célula (GREENWALD *et al.*, 2005). CD40 é outra molécula que desempenha importante função co-estimulatória, e que apresenta como ligante o receptor CD40L (CD154), expresso principalmente em células T ativadas (GREWAL & FLAVELL, 1998).

Após ativação, as células T CD4<sup>+</sup> podem se diferenciar nos subtipos de Th1 ou Th2, distinguidas pelos tipos de genes de citocinas que elas expressam. Muitos fatores influenciam nessa diferenciação, incluindo a dose de antígeno, a natureza e

o grau da co-estimulação, e as citocinas produzidas durante a diferenciação (FEILHARIRI *et al.*, 2005), como por exemplo, IL-12 e IL-4 que desempenham um papel dominante na diferenciação de células Th1 e Th2, respectivamente (O'GARRA & ARAI, 2000). A IL-12 é produzida por APCs e células fagocíticas, como monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (CDs), e atua principalmente em células T e NK, estimulando a proliferação, a produção de IFN- $\gamma$  e o aumento das atividades citotóxicas destas células (WATFORD *et al.*, 2003). As células Th2, mastócitos e basófilos são os principais produtores de IL-4, o qual além de promover a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> em Th2, também determina a produção de classes específicas imunoglobulinas por células B (NELMS *et al.*, 1999).

Estudos recentes têm destacado a importância de outro tipo de células T, denominadas T regulatórias (Treg), que possuem atividades inibitórias sobre autoimunidade, desempenhando um importante papel na manutenção da tolerância periférica, bem como na regulação de várias respostas imunes, pois apresentam habilidade tanto para inibir respostas inflamatórias crônicas, quanto para gerar tolerância imune a tumores (PAN *et al.*, 2008). Estas células foram originalmente descritas por suas funções supressoras exercidas sobre células T efetoras (SAKAGUCHI, 2000). Porém, recentes evidências revelaram a existência de interações com APCs, sendo as células dendríticas (CDs), as células B e os monócitos/macrófagos as principais subpopulações que respondem após exposição às Tregs através da redução de suas funções como apresentadoras de antígenos, pelo aumento da expressão de moléculas imunossupressoras e da produção de citocinas antiinflamatórias (MAHNKE *et al.*, 2008).

## 1.2. Macrófagos

Os macrófagos são as células da primeira linha de defesa do sistema imunológico, e atuam principalmente nos processos inflamatórios, infecciosos e no controle do surgimento de células tumorais (LEWIS & MURDOCH, 2005; SERBINA *et al.*, 2007; ZHANG & MOSSER, 2008). São células fagocíticas que podem ser estimuladas ou inibidas pelo contato com diferentes agentes ou por citocinas produzidas por outras células (MA *et al.*, 2003), efetuando a destruição e a eliminação de patógenos e células estranhas, além de atuar nos processos de reparo tecidual (HUME *et al.*, 2002).

Suas funções de reconhecimento na imunidade inata são mediadas principalmente por receptores presentes em sua superfície, tal como receptores Fc, receptores de moléculas do sistema complemento, receptores tipo lectina e receptores *toll-like* (TLR), também ocorrendo o reconhecimento direto de carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Os diversos estímulos existentes podem gerar a produção de citocinas pró-inflamatórias, produção de óxido nítrico (NO) e seus derivados e o aumento da expressão de moléculas de co-estimulação, o que favorece sua função como apresentadora de antígenos (GORDON, 2003).

A ativação dos macrófagos também ocorre em resposta à produção de IFN- $\gamma$  pelas células T CD4 durante as respostas Th1, um processo chave na imunidade celular contra infecções com patógenos intracelulares, como o *M. tuberculosis*. Além desta via de ativação, conhecida como via clássica, a ativação dos macrófagos também pode ocorrer pelas citocinas IL-4 e IL-13 do pólo Th2, resultando em macrófagos ativados que apresentam um fenótipo distinto, porém consistente com seu papel na imunidade humoral e reparo (GORDON, 2003). Portanto, estas células são críticas na defesa contra diversos tipos de infecções, apresentando uma variedade de mecanismos utilizados no reconhecimento e destruição de patógenos (RAVETCH & ADEREM, 2007). A ativação dos macrófagos é de fundamental

importância, não somente na iniciação da resposta inflamatória, mas também na resolução desta resposta (ZHANG & MOSSER, 2008).

A importância da indução do recrutamento de monócitos para os sítios de infecção tem sido bastante estudada, especialmente com relação à formação de granulomas. Os monócitos se diferenciam em macrófagos, alterando suas propriedades efetoras, incluindo a habilidade de liberar reativos de oxigênio e metabólitos de nitrogênio (GORDON, 2007).

### **1.3. Células Dendríticas**

As células dendríticas (CD) representam uma população de células apresentadoras de antígenos (APC) que atuam como iniciadoras e moduladoras das respostas imunes (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998). O termo “*dendritic*” foi usado pela primeira vez por Steinman e Cohn para descrever uma população de células aderentes obtidas do baço, que apresentavam extensões citoplasmáticas distintas, denominadas dendritos, e baixa capacidade fagocítica, característica que as diferenciavam dos macrófagos (STEINMAN, 2007b). A busca pelo entendimento da imunogenicidade foi o que levou ao descobrimento destas células, e desde então, surgiram diversas perspectivas sobre sua influência na imunologia e na medicina (STEINMAN, 2007a).

Estas células podem se originar tanto de progenitores linfóides como de mielóides, apresentando diferenças fenotípicas e funcionais (BANCHEREAU *et al.*, 2000), formando então um sistema de CDs que são encontradas em tecidos linfóides e não-linfóides, presentes como subpopulações que diferem na produção de citocinas, receptores de captação e reconhecimento de antígenos e receptores de citocinas e quimiocinas, dentre outros (ANJUERE *et al.*, 1999; ARDAVIN, 2003; HOWARD *et al.*, 2004; STEINMAN, 2003).

Nos tecidos periféricos, as CDs são encontradas em um estado imaturo, funcionando como sentinelas que detectam e acumulam antígenos. A maturação é um processo contínuo, iniciada ainda nos órgãos periféricos, e que ocorre quando as CDs encontram antígenos ou citocinas inflamatórias, se completando durante a interação com a célula T (BANCHEREAU *et al.*, 2000). O processo de maturação regula a captura, o processamento e a apresentação de antígenos, a produção de citocinas e a expressão de moléculas co-estimulatórias, fatores que estão envolvidos na sua capacidade imunogênica (SALLUSTO & LANZAVECCHIA, 2002).

A principal função das CDs é capturar e processar antígenos para apresentá-los como fragmentos antigênicos ligados às moléculas MHC classes I e II para as células T imaturas (MELLMAN & STEINMAN, 2001). As CDs capturam antígenos através de fagocitose, pinocitose e endocitose via diferentes grupos de receptores (MOSER & MURPHY, 2000), como receptores Fc para complexos antígeno-anticorpo (NIMMERJAHN & RAVETCH, 2007), receptores de lectina tipo C para glicoproteínas (KANAZAWA, 2007), e receptores TLR para antígenos microbianos (TAKEDA & AKIRA, 2001). Dessa forma, as CDs podem responder rapidamente a diversos fatores, tornando-se potentes estimuladoras da imunidade.

Após ativação, as CDs em amadurecimento adquirem habilidade para migrar dos tecidos periféricos para os órgãos linfóides via vasos linfáticos, onde podem completar sua maturação, atrair linfócitos T e B pela liberação de quimiocinas e manter a viabilidade de linfócitos T recirculantes (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998). A mobilização das CDs pelos vasos linfáticos requer a indução de receptores de quimiocina, sendo o receptor CCR7 fundamental para a sua entrada nestes vasos (RANDOLPH, 2001). Além disso, as rotas de migração de cada subtipo de CD diferem notavelmente, sendo observados diferentes padrões de migração (RANDOLPH *et al.*, 2007).

Durante condições patológicas, as áreas de células T recebem grandes quantidades de CDs altamente estimuladas, que são especializadas na apresentação de antígenos (SALLUSTO & LANZAVECCHIA, 2002), e que possuem

em sua superfície moléculas como B7-1, B7-2 (SALGADO *et al.*, 1999a) e CD40 (SALGADO *et al.*, 1999b), dentre outras, e estas interagem com os receptores específicos presentes na superfície de células T, CD28 e CD40L (GUERMONPREZ *et al.*, 2002).

As CDs desempenham um papel essencial na indução e controle da imunidade mediada por células T, podendo também ativar a expansão e diferenciação de outras classes de linfócitos, como células B, NK e células T NK, através da expressão de moléculas ou pela produção de citocinas (BANCHEREAU *et al.*, 2000; BANCHEREAU & STEINMAN, 1998; STEINMAN, 2003). A interação entre CDs e células T ocorre através da formação de sinapses imunológicas, onde a regulação estrutural do citoesqueleto das CDs parece ter um papel crucial (DUSTIN *et al.*, 2006). Além das diversas moléculas e ligantes envolvidos na ativação das células T, citocinas produzidas pelas CDs também estão altamente envolvidas neste processo. As CDs são também importantes na polarização de células T CD4<sup>+</sup> em Th1 e Th2 e na indução de células T CD8<sup>+</sup> de memória (FUJII *et al.*, 2004; GUERMONPREZ *et al.*, 2002; MOSER & MURPHY, 2000; STEINMAN, 2003).

Recentemente, diversas evidências têm demonstrado que as CDs também são capazes de induzir tolerância periférica, a qual completa a tolerância central, um mecanismo indispensável para o controle de células T auto-reativas (GAD *et al.*, 2003; HUGUES *et al.*, 2006; NOVAK & BIEBER, 2008). Estas CDs, conhecidas como tolerogênicas, podem induzir tolerância via deleção, e também contribuem para a expansão e diferenciação de células Treg (STEINMAN, 2003). Diversos fatores que podem favorecer a indução de tolerância foram identificados, incluindo baixos níveis de expressão de moléculas co-estimulatórias, como ocorre durante a apresentação de peptídeos próprios, derivados da ingestão de material apoptótico (STEINMAN *et al.*, 2000). Por causa de sua dupla função (indução de imunidade e tolerância), as CDs têm sido foco em terapias baseadas no sistema imune para o tratamento de tumor e indução de tolerância imunológica em doenças autoimunes e transplantes (PAN *et al.*, 2008).

#### 1.4. Células de Langerhans

As células de Langerhans (CLs) são um grupo de CDs derivadas da medula óssea que estão situadas principalmente em uma camada suprabasal da epiderme, e constituem 1-3% de todas as células epidérmicas. Elas foram as primeiras CDs a serem descobertas quando, em 1868, Paul Langerhans, então estudante de medicina, descreveu células com morfologia dendrítica na epiderme humana (NAKAMURA *et al.*, 1999; ROMANI *et al.*, 2003).

As CLs possuem um número de moléculas de adesão e co-estimulatórias em sua superfície que contribuem para a realização de sua função na ativação de células T. Essa função apresentadora de antígeno das CLs é aumentada e completada através das interações entre suas moléculas de adesão ou co-estimulatórias e seus ligantes nas células T imaturas (NAKAMURA *et al.*, 1999).

A expressão de MHC classe II é aumentada em CLs durante cultura, em associação com sua capacidade de apresentação de antígeno, como também a expressão de moléculas de adesão, como ICAM-1, e co-estimulatórias, como B7-1 e B7-2, indicando que estas são moléculas que desempenham importantes funções na maturação, e conseqüentemente, no aumento da capacidade de apresentação de antígenos das CLs (NAKAMURA *et al.*, 1999).

As CLs também expressam lectinas tipo C como DEC205 (CD205), langerin (CD207) e dectin-1 (ASAHINA & TAMAKI, 2006). DEC205 é expressa em CLs de camundongo, em contraste às CLs de humano, que expressam baixos níveis desta molécula, a qual é aumentada durante a maturação (EBNER *et al.*, 2004). Langerina é um marcador chave de CLs, presente tanto na epiderme de camundongos como na epiderme de humanos (VALLADEAU *et al.*, 2002), e que é um potente indutor de grânulos de Birbeck (VALLADEAU *et al.*, 2000), organelas exclusivas das CLs descritas como componentes de via endocítica (KISSENPENNIG *et al.*, 2005). Dectin-1 é um receptor de  $\beta$ -glicano e zymozan, polímeros derivados de fungos



(TAYLOR *et al.*, 2002). Na epiderme, esses receptores podem mediar a captação de patógenos encontrados pelas CLs (EBNER *et al.*, 2004).

Existem diversos métodos que podem ser utilizados para estudar as CLs da epiderme, sendo os métodos de separação enzimática os mais comumente utilizados. No entanto, muitas destas técnicas são complicadas, demoradas e não proporcionam um grande número de células viáveis, e as CLs obtidas por tripsinização, por exemplo, podem apresentar alterações nas moléculas de superfície, como consequência do tratamento enzimático. Portanto, uma alternativa útil para a separação da epiderme é a utilização da enzima dispase, como descrito previamente (ROMANI *et al.*, 2003).

### **1.5. Hanseníase**

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa crônica, causada pelo bacilo álcool-ácido resistente *Mycobacterium leprae*, uma bactéria intracelular obrigatória não-cultivável em meios artificiais, e que apresenta tropismo por macrófagos e células de Schwann (BRITTON & LOCKWOOD, 2004). Esta doença constitui importante problema de saúde pública no Brasil e em vários países do mundo, e é a principal causa de incapacidade física permanente dentre as doenças infecto-contagiosas (AGRAWAL *et al.*, 2005; MOSCHELLA, 2004).

Diversos achados indicam que as vias aéreas superiores são a principal rota de transmissão do *M. leprae* (VAN BEERS *et al.*, 1996), e o domicílio é apontado como importante fator de transmissão da doença (BRITTON & LOCKWOOD, 2004; GOULART *et al.*, 2002), embora muitas pessoas não desenvolvam os sintomas clínicos após a exposição ao bacilo (BRITTON & LOCKWOOD, 2004). Desta forma, muitas evidências sugerem que a variabilidade na resposta do hospedeiro à infecção pelo *M. Leprae* deve-se, em grande parte, a fatores genéticos do hospedeiro (ALCAIS *et al.*, 2005).

Em 1966, Ridley e Jopling propuseram uma classificação baseada em critérios imunológicos e histológicos, considerando as formas clínicas como um espectro em que os extremos eram constituídos pelos tipos polares tuberculóide e pólo virchowiano (lepromatoso), e a região correspondente aos dimorfos (“boderline”) foi subdividida, resultando em um sistema de cinco grupos: hanseníase tuberculóide (TT), dimorfo-tuberculóide (DT), dimorfo-dimorfo (DD), dimorfo-virchowiano (DV), e virchowiano (VV) (BRITTON & LOCKWOOD, 2004).

O pólo tuberculóide caracteriza-se pela resposta do tipo Th1 contra o bacilo, com manifestações relacionadas à exacerbação da resposta imune celular e, o pólo virchowiano, por deficiência da resposta imune celular, com numerosas lesões na pele, e por imunidade humoral que exhibe altos títulos de anticorpos contra glicolípido fenólico-1 (PGL-1) (MOSCHELLA, 2004). PGL-1 e outras estruturas lipídicas da parede celular podem estar relacionadas no contexto de resistência à eliminação por macrófagos e atividade imunomoduladora. Além disso, outros estudos adicionaram evidências de que PGL-1 pode estar envolvido na determinação da afinidade do *M. Leprae* pelos nervos periféricos (RAMBUKKANA, 2001).

Recentemente foi demonstrado que o estímulo micobacteriano gera acúmulo de CLs durante os episódios reacionais na hanseníase, demonstrando a participação destas células nos locais de ativação em lesões de pele (MIRANDA *et al.*, 2007). Os macrófagos também possuem importante função na patogênese da hanseníase, pois estão presentes nos sítios de infecção e são ativados por componentes do *M. leprae*. Os estímulos gerados pelo bacilo promovem a produção de citocinas pelos macrófagos, tal como TNF- $\alpha$ , o que indica um papel direto destas células na resposta imune contra esta infecção (BARKER, 2006).

O tratamento do paciente com hanseníase é indispensável para alcançar a cura e quebrar a cadeia de transmissão da doença, sendo portanto estratégico no controle da endemia, e para eliminar a hanseníase enquanto problema de saúde pública. Na poliquimioterapia (PQT) três principais drogas são usadas: rifampicina,

dapsona e clofazimina, com administração associada. Essa associação evita a resistência medicamentosa do bacilo que ocorre, com frequência, quando se utiliza apenas um medicamento, impossibilitando a cura da doença (FUNASA, 2002). Além disso, tem sido demonstrado que a imunização com BCG concede variável eficácia protetora contra hanseníase em diversos países, variando de 34% a 80% (BRITTON & LOCKWOOD, 2004).

### 1.6. Reações hansênicas

A hanseníase pode apresentar episódios agudos denominados estados reacionais, ou reações hansênicas, que são freqüentemente acompanhadas de quadros de neurite, principalmente durante os primeiros meses de tratamento com MDT, e que podem resultar em incapacidade física, muitas vezes irreversível. A neuropatia que ocorre na hanseníase é causada em parte pelo *M. leprae*, que tem a capacidade de invadir o sistema nervoso periférico (RAMBUKKANA, 2000), podendo ser aguda ou crônica, com presença ou ausência de dor, que pode ocorrer durante o processo inflamatório, associado ou não a compressão neural (SBH & SBD, 2003).

Dependendo da etiopatogênese, as reações são classificadas em tipo 1, ou reação reversa, e tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH). A reação tipo 1 é caracterizada por episódios de hipersensibilidade que se manifestam principalmente na pele e nervos, resultando na eliminação do *M. leprae*. Essas reações ocorrem tipicamente em pacientes “imunologicamente instáveis”, como BT, BB e BV, e se manifestam clinicamente como lesões de pele infiltradas e neurite aguda. A reação tipo 2 resulta da deposição de imunocomplexos em tecidos e no endotélio vascular, que se desenvolve em pacientes com alta carga antigênica, como resultado da produção aumentada de anticorpos nos tipos DV e VV. No entanto, esse processo não confere proteção em termos de limitação da infecção ou eliminação do *M. leprae*, porém colabora para a eliminação tecidual de antígenos do bacilo (AGRAWAL *et al.*, 2005). Além da pele e nervos, outros órgãos podem estar envolvidos: linfonodos, fígado, baço, peritônio, testículos, olhos, articulações,

tendões, músculos e ossos. Pode haver febre, leucocitose e estimulação policlonal de anticorpos (GOULART *et al.*, 2002).

O Centro de Referência e Treinamento em Dermatologia Sanitária “Dr. Marcello Cândia” (CRTDS) foi criado em 1989 para atender a crescente demanda por serviços de atendimento especializado e treinamento em hanseníase no Estado do Pará (SALGADO & CRUZ, 2007). Em levantamento recente dentro deste centro, verificamos que a demanda maior de pacientes refere-se aos episódios reacionais, que são de difícil manejo em Unidades Básicas de Saúde (UBS).

### **1.7. Drogas imunomoduladoras**

O tratamento dos estados reacionais tem a finalidade de controlar as alterações imuno-inflamatórias e evitar as deficiências físicas decorrentes do dano neural (SBH & SBD, 2003). O tipo de tratamento depende de diversos fatores como de sua severidade, da presença de neurite, do envolvimento facial, da gravidez, de alergias ou de reações adversas às drogas (MOSCHELLA, 2004).

Os corticosteróides, como prednisona ou prednisolona, são as drogas de escolha para o tratamento das reações tipo I. São conhecidos por suprimirem processos inflamatórios, sendo frequentemente utilizados no tratamento de doenças auto-imunes e alérgicas, atuando principalmente através da inibição do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), fator de transcrição que regula a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ . Os corticosteróides induzem a produção do inibidor I $\kappa$ B, o qual se liga ao NF- $\kappa$ B, impedindo sua translocação para o núcleo, onde se liga aos sítios promotores específicos que regulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias (STERNBERG, 2006). Seus efeitos são também mediados pelo receptor de glicocorticóide (RG), o qual está presente no citoplasma e após ativação por um ligante se transloca para o núcleo, funcionando como um fator de transcrição (HOETZENECKER *et al.*, 2004). Este receptor interage com o cAMP e eleva sua

concentração, resultando na diminuição da secreção de TNF- $\alpha$  em vários tipos celulares (FRANCHIMONT *et al.*, 1999), como macrófagos peritoniais e CLs em suspensão epidérmica (SERRES *et al.*, 1996; ZHU *et al.*, 2007). Porém, seu papel na regulação da produção de citocinas antiinflamatórias é ainda contraditório (MOZO *et al.*, 2004), e pouco sobre seus efeitos sobre CLs.

Quando alguns pacientes não respondem bem ao tratamento com corticosteróides, outras terapêuticas podem ser utilizadas. Sena *et al.* (2006) avaliaram a eficácia da ciclosporina no tratamento da neurite crônica, demonstrando que esta droga pode ser útil no controle da dor e dano neural, e que seu mecanismo de ação parece estar relacionado à inibição de anticorpos anti-NGF, presentes no soro de pacientes (SENA *et al.*, 2006). A ciclosporina é uma droga imunossupressora que inibe a via calcineurina/NFAT, que está envolvida na transcrição de genes que codificam citocinas como IL-2 e IL-4, além do receptor CD40L. As vias de sinalização JNK e p38, que podem ser ativadas quando respostas de células T são provocadas através dos receptores TCR e CD28 de co-estimulação, são também sensíveis a ciclosporina (MATSUDA & KOYASU, 2000).

Diversas evidências sugerem que a ciclosporina exerce suas funções imunológicas não somente em linfócitos, mas também em APCs tal como células B, macrófagos e CDs (TAJIMA *et al.*, 2003). A ciclosporina pode inibir a expressão das moléculas CD40 e B7-1 em CLs purificadas da epiderme (SALGADO *et al.*, 1999a) e a produção de IL-12 por CDs do sangue periférico, além de aumentar a secreção de IL-10 por CDs estimuladas com LPS (TAJIMA *et al.*, 2003).

A talidomida tem sido usada no controle do ENH desde a década de 60, sendo a única indicação aprovada desta droga, já que apresenta conhecido efeito teratogênico (TEO *et al.*, 2002). A talidomida apresenta propriedades sedativa, imunomoduladora, dentre outras, além de diversos modos de ação (WU *et al.*, 2005). Um dos seus principais mecanismos de ação é a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  produzido por monócitos, CDs (CORRAL & KAPLAN, 1999) e CLs *in vitro* (DENG *et al.*, 2003).

A amitriptilina é um antidepressivo tricíclico que é usado como adjuvante no tratamento de uma variedade de condições de dor crônica (BRYSON & WILDE, 1996). Esta droga pode ser usada no tratamento das dores persistentes em pacientes com reações hansênicas, já que possui ação analgésica e promove a recuperação da função neural (SBH & SBD, 2003), sendo relatados bons resultados com o uso de amitriptilina e imipramina, porém ainda não publicados (STUMP *et al.*, 2006). Os antidepressivos tricíclicos bloqueiam a recaptção de norepinefrina ou de serotonina pela membrana neuronal pressináptica, ocasionando o aumento de sua concentração nas sinapses do sistema nervoso central (SANCHEZ & HYTTEL, 1999). Porém, a inibição da recaptção destes neurotransmissores é somente um dos mecanismos de ação da amitriptilina. Além dos efeitos analgésicos, já foram descritos efeitos neurotóxicos (KITAGAWA *et al.*, 2006; LIRK *et al.*, 2006) e anestésicos (SUDOH *et al.*, 2003), e outros trabalhos mostraram que a amitriptilina é um potente bloqueador de canais dependentes de voltagem, como canais de Na<sup>+</sup> (PANCRAZIO *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2004) e canais de K<sup>+</sup> (CASIS & SANCHEZ-CHAPULA, 1998).

Estudos mostram que a amitriptilina apresenta efeitos imunorregulatórios, induzindo apoptose em linfócitos humanos em proliferação (KARLSSON *et al.*, 1998) e suprimindo a ativação de células NK por IFN- $\gamma$  (XIAO & ENEROTH, 1996). Os antidepressivos tricíclicos podem também afetar a produção *in vitro* de citocinas por células imunocompetentes, como IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  por linfócitos e monócitos (XIA *et al.*, 1996). No entanto, os efeitos imunomoduladores da amitriptilina sobre CDs são ainda desconhecidos.

Apesar dos avanços terapêuticos e dos estudos para prevenir e reverter os danos nos nervos (GIRDHAR *et al.*, 2007), pouco se sabe sobre o mecanismo de ação imunológico das drogas imunomoduladoras utilizadas no tratamento das reações hansênicas. A produção de citocinas é um evento chave tanto na iniciação como na regulação das respostas imunes e, por isso, diferentes drogas têm sido usadas rotineiramente para suprimir ou modificar sua produção, e

conseqüentemente, alterar respostas imunes em um amplo espectro de doenças (ROWLAND *et al.*, 1998).

Sugere-se então, a partir destas observações, que as drogas imunomoduladoras utilizadas em estados reacionais possam controlar a produção de citocinas, diminuindo a capacidade das CLs de ativar outras células imunológicas, tendo como conseqüência a melhora do quadro clínico. Estudos da imunomodulação de drogas utilizadas no controle das reações hansênicas em novos modelos *in vitro* possibilitam um melhor entendimento dos mecanismos de ação envolvidos e de identificação de novas drogas que possam ser utilizadas nas reações hansênicas resistentes aos medicamentos convencionais e que muitas vezes conduzem o paciente à incapacidade física.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Analisar *in vitro* a ação das drogas prednisona, talidomida, ciclosporina e amitriptilina sobre células de Langerhans (CLs) e macrófagos de camundongos BALB/c.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Isolar e cultivar CLs purificadas da epiderme de camundongos BALB/c;
- Isolar e cultivar macrófagos peritoniais de camundongos BALB/c;
- Tratar as culturas celulares por 36 h com as drogas imunomoduladoras nas concentrações de  $10^{-6}$ M e  $10^{-8}$ M;
- Avaliar a viabilidade das CLs antes e após tratamento com as drogas;
- Verificar a produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10 pelas CLs e pelos macrófagos após 36h de tratamento com as drogas através de ensaio imunoenzimático (ELISA);



### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos isogênicos BALB/c, entre quatro a oito semanas de vida, fornecidos e mantidos pelo Biotério do Instituto Evandro Chagas (IEC), e alimentados com ração e água *ad libitum*.

#### 3.2. Isolamento de células de Langerhans:

As células foram isoladas, purificadas e cultivadas conforme a método previamente descrito (SALGADO *et al.*, 1999). Os camundongos BALB/c foram sacrificados e a pele foi removida das regiões dorsal e ventral. Os fragmentos de tecido epitelial foram incubados em meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, USA) contendo 3000U/ml de dispase II (Roche Company-Germany) a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> por 3 horas. A epiderme foi separada da derme e incubada com DNase 0.025% (Sigma, St. Louis, USA) por 20 minutos em temperatura ambiente e, após pipetagem, foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-IA<sup>d</sup> 1:600 (BD PharMingen, San Diego, CA) por 1 h à 4°C. A suspensão de células epidérmicas marcada foi então incubada em placas previamente revestidas com anticorpo anti-IgG fração Fc 1:100 (Gappel, Durham, NC) por uma hora à 4°C. Após lavagem, as placas foram submetidas à pipetagens vigorosas para remover as CLs, que foram cultivadas em meio RPMI-1640, suplementado com soro fetal bovino à 10% (Nutricell, Campinas, Brasil) e solução de estreptomicina/penicilina (Sigma, St. Louis, USA), e cultivadas em placas de 96 poços a 37 °C, em ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.3. Isolamento de macrófagos peritoniais:**

Os macrófagos foram obtidos por lavagem peritoneal com 5 a 10 mL de soro fisiológico (Equiplex, Brasil) estéril gelado, e após massagear lentamente, o líquido foi aspirado e distribuído em tubos de 15 mL para centrifugação, a 1500 rpm por 3 minutos. As células foram ressuspendidas em RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, USA) suplementado com soro fetal bovino a 10% (Nutricell, Campinas, Brasil), solução de penicilina/estreptomicina (Sigma, St. Louis, USA) e 2-mercaptoetanol (Merck, Alemanha) (TRIPATHI *et al.*, 2008). Em seguida, uma alíquota de 70  $\mu$ L da suspensão de células foi distribuída em lamínulas de vidro de 5,0x5,0 mm, as quais foram incubadas durante 2 h em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas com soro para remover as células não aderidas e os macrófagos aderidos foram incubados em placas de 24 poços contendo 500  $\mu$ L de meio RPMI 1640 por 24 h. A quantidade obtida foi de aproximadamente  $5 \times 10^4$  macrófagos/lamínula, sendo o cálculo realizado através da contagem em microscópio óptico após coloração com Giemsa.

### **3.4. Tratamento com as drogas imunomoduladoras:**

As drogas prednisona, talidomida, ciclosporina e amitriptilina (Sigma, St. Louis, USA) foram diluídas em metanol e estocadas nas concentrações de  $10^{-4}$ M e  $10^{-6}$ M, a -20°C. Após isolamento e purificação, as CLs e macrófagos foram cultivados por 36 h com as drogas ou com metanol nas concentrações finais de  $10^{-6}$ M e  $10^{-8}$ M. Os macrófagos foram estimulados com LPS por 8h, após o tratamento de 36 h com as drogas.

### **3.5. Viabilidade das CLs:**

Após o tratamento com as drogas, as CLs foram lavadas com PBS e marcadas com 10 $\mu$ g/mL de Iodeto de Propídeo (IP) para análise da viabilidade celular por citometria de fluxo (Couter Epics XL, Beckman Couter).

### **3.6. Identificação e quantificação de citocinas:**

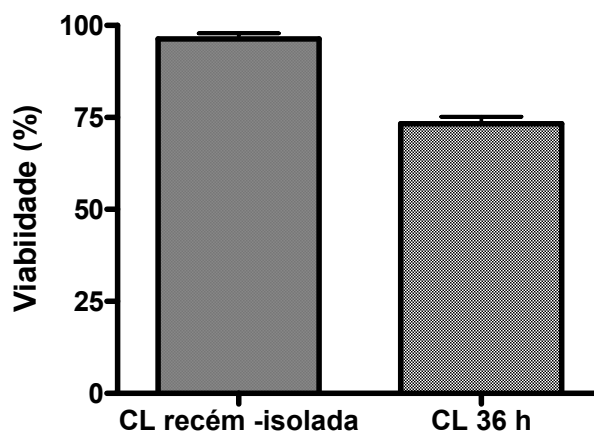
Os sobrenadantes das culturas de CLs e das culturas de macrófagos foram obtidos após 36 h de tratamento com as drogas imunomoduladoras. A produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10 (BD Biosciences, San Jose, CA) foi medida por ELISA, segundo protocolo dos fabricantes dos kits. A leitura das placas foi realizada na absorbância de 450nm em uma leitora de ELISA (MRX Revelation-DINEX MB/USA). Todas as amostras foram analisadas em triplicata e os resultados expressos em pg/mL.

### **3.7. Análise estatística:**

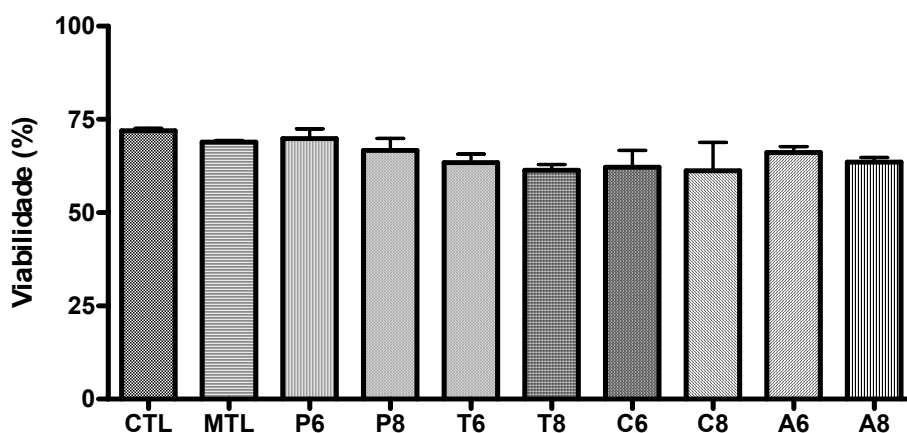
Os resultados das dosagens das citocinas por ELISA foram analisados pelo teste ANOVA, estabelecendo-se um valor de diferença estatisticamente significante de  $p < 0,05$  entre os testes e o grupo controle.

#### 4. RESULTADOS

As CLs recém-isoladas, obtidas pela técnica de panning, apresentaram uma viabilidade de aproximadamente 96% (Fig. 1), e foram então cultivadas por 36 h na presença ou ausência de prednisona, talidomida, ciclosporina e amitriptilina nas concentrações de  $10^{-6}$ M e  $10^{-8}$ M, sendo a legenda dos gráficos descrita como a inicial de cada droga seguida de algarismo referente a concentração (ex. prednisona  $10^{-6}$ M = P6). A viabilidade das CLs após 36 h de cultura foi de aproximadamente 73% (Fig.1). As células cultivadas por 36 h com as drogas não apresentaram alterações significativas na viabilidade (Fig. 2).

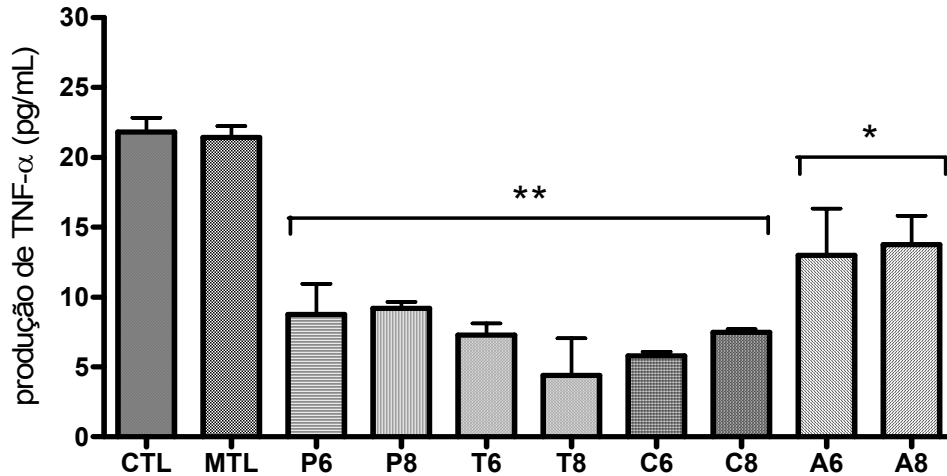


**Figura 1. Viabilidade das CLs cultivadas por 36 h.** As células recém-isoladas ou cultivadas por 36 h foram marcadas com PI (10 $\mu$ g/mL) e analisadas por citometria de fluxo. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

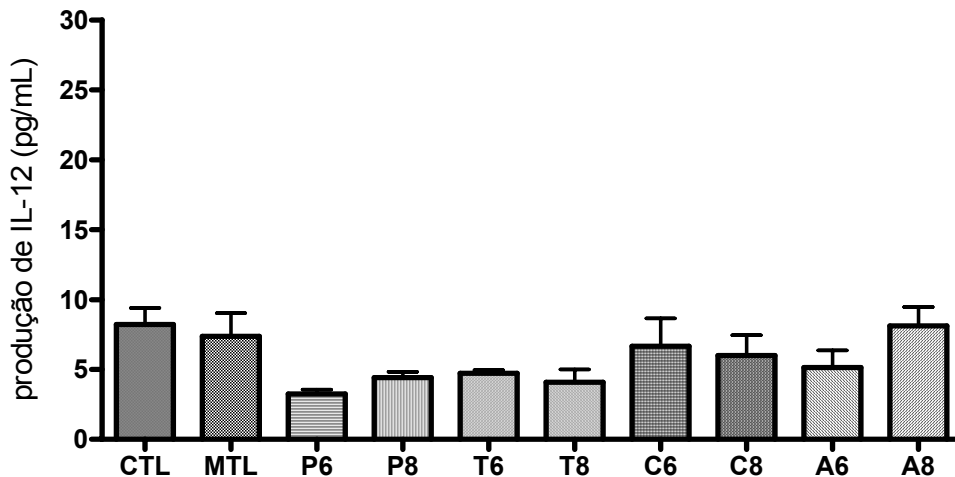


**Figura 2. Viabilidade das CLs cultivadas com as drogas por 36 h.** As células tratadas por 36 h com prednisona, talidomida, ciclosporina e amitriptilina foram marcadas com IP (10 $\mu$ g/mL) e analisadas por citometria de fluxo. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

A produção de TNF- $\alpha$  pelas CLs foi significativamente inibida por prednisona, talidomida, ciclosporina e amitriptilina, em ambas as concentrações (Fig.3). No entanto, não foram detectadas alterações na produção de IL-12 por nenhuma das drogas (Fig. 4). As CLs não produziram IL-10 (dados não mostrados).

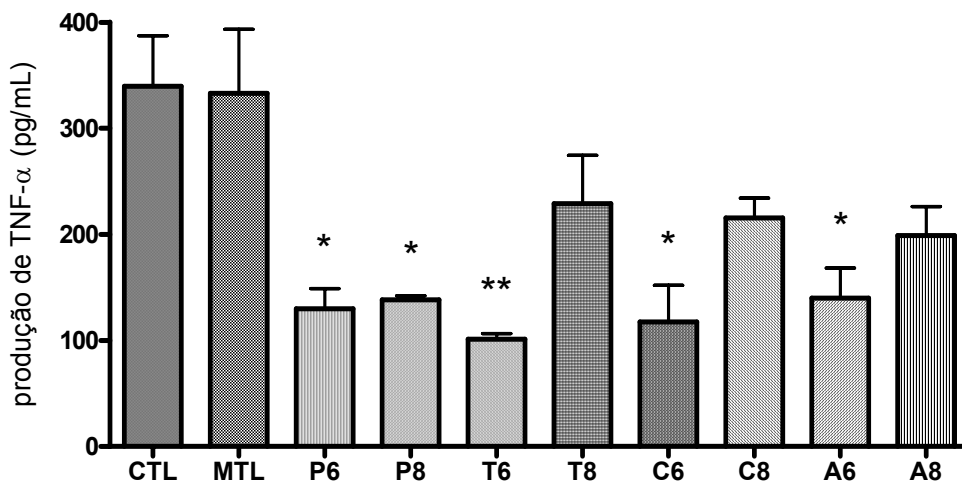


**Figura 3. Efeitos das drogas imunomoduladoras na produção TNF- $\alpha$  por CLs.** As células ( $1 \times 10^6$ /mL) foram tratadas por 36 h com prednisona, talidomida, ciclosporina e amitriptilina nas concentrações de  $10^{-6}$ M e  $10^{-8}$ M. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes. CTL =controle, MTL = metanol. \*  $p < 0,05$  para controle versus grupos tratados com as drogas.

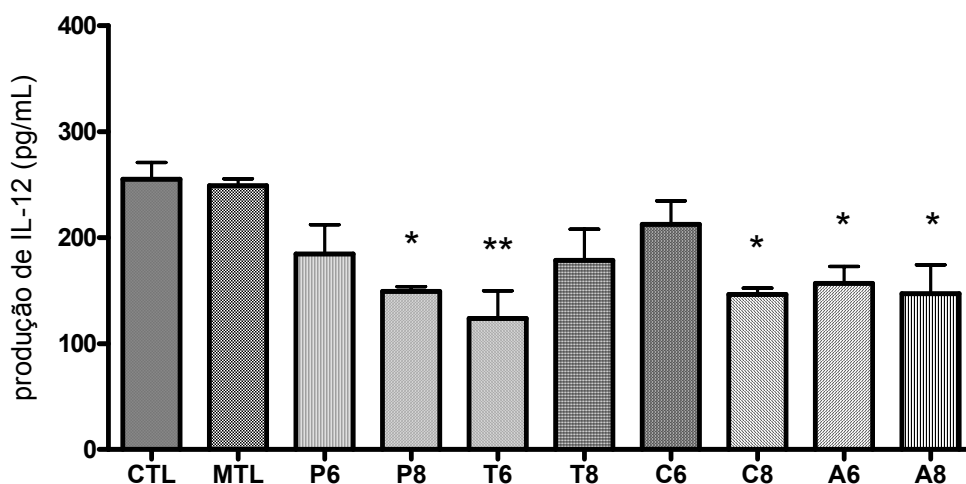


**Figura 4. Efeitos das drogas imunomoduladoras na produção de IL-12 por CLs.** As células ( $1 \times 10^6$ /mL) foram tratadas por 36 h com prednisona, talidomida, ciclosporina e amitriptilina nas concentrações de  $10^{-6}$ M e  $10^{-8}$ M. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes. CTL =controle, MTL = metanol. \*  $p < 0,05$  para controle versus grupos tratados com as drogas.

Os macrófagos foram cultivados por 36 h com as drogas imunomoduladoras, e posteriormente estimulados com LPS por 8 h. A produção de TNF- $\alpha$  foi inibida por prednisona na concentração de  $10^{-8}$ M e por talidomida e ciclosporina na concentração de  $10^{-6}$ M (Fig.5), enquanto que a produção de IL-12 foi inibida por talidomida e amitriptilina na concentração de  $10^{-6}$ M e por prednisona, ciclosporina e amitriptilina na concentração de  $10^{-8}$ M (Fig.6).

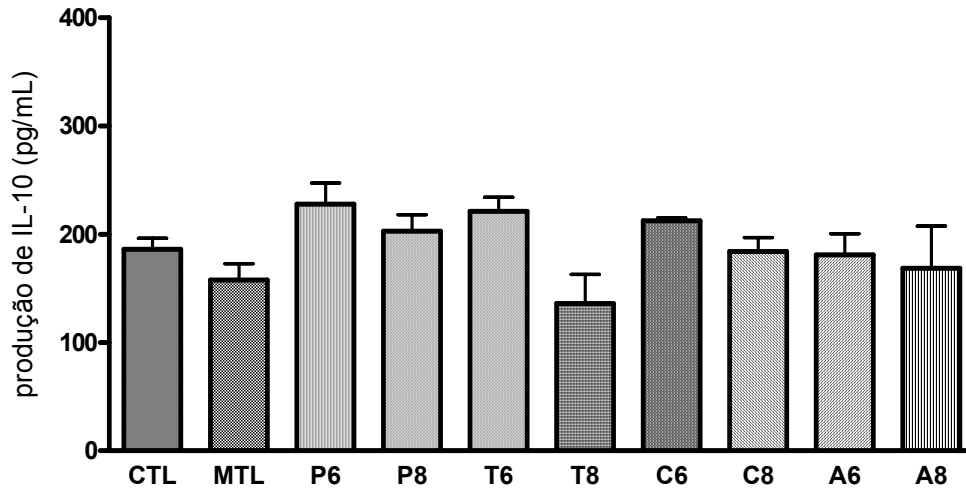


**Figura 5. Efeitos das drogas imunomoduladoras na produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos.** As células ( $5 \times 10^4$ /poço) foram tratadas por 36 h com prednisona, talidomida, ciclosporina e amitriptilina nas concentrações de  $10^{-6}$ M e  $10^{-8}$ M. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes. CTL =controle, MTL = metanol. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  para controle versus grupos tratados com as drogas.



**Figura 6. Efeitos das drogas imunomoduladoras na produção de IL-12 por macrófagos.** As células ( $5 \times 10^4$ /poço) foram tratadas por 36 h com prednisona, talidomida, ciclosporina e amitriptilina nas concentrações de  $10^{-6}$ M e  $10^{-8}$ M. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes. CTL =controle, MTL = metanol. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  para controle versus grupos tratados com as drogas.

Os níveis de IL-10 produzidos pelos macrófagos não foram alterados significativamente por nenhuma das drogas testadas (Fig.7).



**Figura 7. Efeitos das drogas imunomoduladoras na produção de IL-10 por macrófagos.** As células ( $5 \times 10^4$ /poço) foram tratadas por 36 h com prednisona, talidomida, ciclosporina e amitriptilina nas concentrações de  $10^{-6}$ M e  $10^{-8}$ M. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes. CTL = controle, MTL = metanol. \*  $p < 0,05$  para controle versus grupos tratados com as drogas.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo analisou os efeitos *in vitro* das drogas prednisona, talidomida, ciclosporina e amitriptilina sobre a produção de citocinas por CLs purificadas da epiderme e por macrófagos peritoniais de camundongos BALB/c, no período de 36 h, onde as CLs encontram-se bastante ativadas em cultura (SALGADO *et al.*, 1999a). As CLs produziram TNF- $\alpha$ , e a prednisona, em ambas as concentrações, reduziu esta produção. Este resultado está de acordo com estudos previamente publicados, onde se observou que as CDs derivadas de monócitos humanos apresentaram o mesmo comportamento quando na presença de dexametasona (WOLTMAN *et al.*, 2000). Efeito similar foi observado por um glicocorticóide sintético (Clobetasol-17-propionato) que reduziu os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-12p70 produzidos por CDs, porém, estas células foram pré-estimuladas com LPS, frequentemente utilizado para estimular CDs derivadas de monócitos (VIEIRA *et al.*, 1998).

Neste trabalho não detectamos alterações significativas na produção de IL-12 pelas CLs. Em nossos experimentos não utilizamos LPS como estimulador, pois estas células não respondem bem a esta substância, já que apresentam baixa expressão de TLR4 e não expressam CD14, os quais são fundamentais para o reconhecimento de LPS (TADA *et al.*, 2004). Sabe-se que o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias pela via do TLR4 é gerado pela ativação de NF- $\kappa$ B, que é o principal alvo de imunossupressão por corticosteróides e, portanto, o mecanismo pelo qual a prednisona inibe a produção de IL-12 nas células ativadas por LPS. Deste modo, podemos inferir que os níveis basais de IL-12 nas CLs não são afetados pela presença da prednisona, sugerindo que as vias de produção de IL-12 nas CLs podem ser diferentes da via de inibição de citocinas pró-inflamatórias utilizada pela prednisona em CDs estimuladas com LPS, pois a produção desta interleucina é também mediada por outros fatores de transcrição, já que as CLs não podem ser estimuladas com LPS.



Nossos resultados mostram que a prednisona também inibe a produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos, corroborando com um estudo prévio que descreveu a supressão da produção de TNF- $\alpha$  em monócitos do sangue periférico pré-incubados por 24 e 48 h com LPS, e posteriormente estimulados com dexametasona. No entanto, o mesmo trabalho também mostrou que a dexametasona em altas concentrações ( $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  M) inibe, e em baixas concentrações ( $10^{-8}$  e  $10^{-9}$  M) aumenta a produção de IL-10 (FRANCHIMONT *et al.*, 1999). Outro estudo mostrou que em macrófagos alveolares pré-incubados com metilprednisolona por 20h, e posteriormente ativados por LPS, também ocorre supressão da produção de TNF- $\alpha$  e aumento da produção de IL-10 (FRANKENBERGER *et al.*, 2005), o que não foi detectado em nosso estudo, possivelmente porque as vias de inibição de TNF- $\alpha$  utilizadas pela prednisona nestas células devem ser diferentes das vias utilizadas pra modular a produção de IL-10, já que a regulação dos genes das citocinas pró-inflamatórias é controlada principalmente pelo NF- $\kappa$ B, enquanto que a indução de IL-10 é mediada pelo fator de transcrição Sp1 (CHANTEUX *et al.*, 2007).

A prednisona também inibiu a secreção de IL-12 por macrófagos em 36 h de tratamento, corroborando os dados existentes na literatura, como no estudo realizado por Dekruyff *et al.*, onde foi observado que macrófagos pré-tratados com dexametasona por 18h, e depois estimulados com antígeno de *Listeria* por 2 dias, apresentaram redução significativa na produção de IL-12 (DEKRUYFF *et al.*, 1998), sendo então outro mecanismo imunomodulador desta droga.

Na análise da ação imunomoduladora da talidomida, observamos que ocorreu redução nos níveis de TNF- $\alpha$  produzidos pelas CLs em 36 h de tratamento, corroborando o estudo prévio realizado, onde observou-se que a talidomida tem profundos efeitos inibitórios sobre a habilidade de apresentação de antígenos de CLs purificadas da epiderme, inibindo a produção de TNF- $\alpha$  por estas células (DENG *et al.*, 2003). A talidomida também apresentou efeitos inibitórios na secreção de TNF- $\alpha$  por macrófagos em 36h de tratamento, como também demonstrado em estudo prévio, onde ocorreu uma redução significativa de 30% na produção de TNF- $\alpha$  em células do sangue periférico tratadas com talidomida por 48h (ROWLAND *et*

*al.*, 1998). Além disso, os níveis de IL-12 secretados por macrófagos também foram diminuídos, mas somente quando cultivados com a maior concentração da droga, corroborando estudos prévios que demonstraram a inibição da produção de IL-12 por talidomida em monócitos estimulados com LPS (MOLLER *et al.*, 1997) e a diminuição do RNAm de IL-12 por talidomida e análogos, em monócitos cultivados com *M. leprae* (SAMPAIO *et al.*, 2002). O mecanismo pelo qual a talidomida inibe a produção de TNF- $\alpha$  está relacionado à regulação da via de indução do NF- $\kappa$ B, já que esta droga inibe a degradação do I $\kappa$ B, reduzindo a expressão do RNAm de TNF- $\alpha$ , que é induzida pelo NF- $\kappa$ B (PAUL *et al.*, 2006), e isto sugere que esta é também a provável via de inibição de IL-12, pois a expressão desta citocina pode ser também modulada pelo mesmo fator de transcrição.

Os experimentos com ciclosporina revelaram uma inibição da produção de TNF- $\alpha$  por CLs, em ambas as concentrações utilizadas, mostrando que esta droga apresenta o mesmo efeito inibitório observado nos testes com prednisona e talidomida. Porém, não observamos alterações significativas na secreção de IL-12 por estas células, discordando do observado em um estudo anterior, onde foi relatado que dexametasona possui maiores efeitos inibitórios sobre a função de CDs derivadas de monócitos do que a ciclosporina, pois diminuiu parcialmente a produção de TNF- $\alpha$  e bloqueou a produção de IL-12 (WOLTMAN *et al.*, 2000). Isto sugere que os efeitos da ciclosporina sobre a produção de TNF- $\alpha$  ocorrem em diferentes níveis de inibição entre estes dois tipos de CDs, sendo maior nas CLs, da mesma forma com relação a secreção de IL-12, que foi inibida nas CDs, mas não foi alterada nas CLs, resultados possivelmente relacionados com a natureza da diferenciação destas células, já que possuem estados de maturação e níveis de produção de IL-12 distintos (PEISER *et al.*, 2004). Além disso, estes efeitos inibitórios da ciclosporina sobre a produção de IL-12 podem induzir a formação de CDs tolerogênicas, pois afeta sua capacidade de apresentação de antígenos às células T (SAUMA *et al.*, 2003), resultando na redução ou alteração da resposta imunológica no quadro reacional.

García *et al.* descreveu resultados similares de diminuição da secreção basal de TNF- $\alpha$  por ciclosporina em macrófagos alveolares (LOSA GARCIA *et al.*, 1998) e em monócitos da linhagem U936 (GARCIA *et al.*, 2000), quando cultivados por 18 h em várias concentrações, na presença ou na ausência de LPS. Em outro estudo foi demonstrado que em subtipos de CDs de sangue periférico (CD11c<sup>+</sup> e CD11c<sup>-</sup>), tratados com ciclosporina, ocorre supressão da produção de IL-12, enquanto que os níveis de IL-10 são aumentados (TAJIMA *et al.*, 2003). Nossos resultados mostraram que em macrófagos, a inibição por ciclosporina ocorreu somente com a maior concentração, tanto na produção de TNF- $\alpha$ , quanto de IL-12, corroborando com diversos dados da literatura, sugerindo que os efeitos imunomoduladores da ciclosporina podem ser dose-dependentes, e seu mecanismo inibitório está relacionado também com a inibição de fatores de transcrição, como NF- $\kappa$ B e AP-1, através da regulação da via de sinalização do Ca<sup>+</sup> (calmodulina e proteína kinase-II dependente de calmodulina – CaMK-II ) (MA *et al.*, 2007). Apesar de os efeitos desta droga sobre a produção de citocinas por CLs não serem relatados na literatura, sabe-se que a mesma pode atuar causando redução no número, na síntese de DNA e na função destas células (BORGHI-CIRRI *et al.*, 2001), podendo inibir a expressão de moléculas co-estimulatórias (SALGADO *et al.*, 1999a) e sua diferenciação (BORGHI-CIRRI *et al.*, 2001).

Em relação à amitriptilina, apesar de existirem alguns trabalhos recentes demonstrando que a droga possui capacidade de imunomodulação, pouco se sabe sobre o seu mecanismo de ação e quais células do sistema imunológico são reguladas por ela. Xia *et al.* relatou que os antidepressivos tricíclicos clomipramina, imipramina e citalopram causam redução na liberação de TNF- $\alpha$  por monócitos do sangue periférico estimulados com LPS (XIA *et al.*, 1996). Recentemente, um trabalho utilizando amitriptilina e seu metabólito, nortriptilina, demonstrou a diminuição da secreção de TNF- $\alpha$  em culturas de células gliais (OBUCHOWICZ *et al.*, 2006). Por outro lado, estudo recente utilizando sangue total examinou os efeitos de diferentes tipos de antidepressivos, como desipramina, clomipramina e trimipramina relatando não afetarem a produção de TNF- $\alpha$  e IL-12 (DIAMOND *et al.*, 2006). Nossos dados revelaram que a amitriptilina inibiu a secreção de TNF- $\alpha$  nos dois tipos celulares estudados, o que corrobora estudos anteriores realizados com

células isoladas. No entanto, os mecanismos imunomodulatórios desta droga não são ainda completamente conhecidos, mas acredita-se que estão relacionados com o aumento intracelular de cAMP (XIA *et al.*, 1996).

Sobre os estudos que relataram a ausência de ação de antidepressivos sobre a titulação do TNF- $\alpha$ , pode-se dever ao uso de antidepressivos não-tricíclicos ou mesmo ao uso de sangue total, situação em que a presença de outras células pode afetar a produção de TNF- $\alpha$ , seja pela secreção de outras citocinas, ou mesmo pelo contato direto célula-célula. Além do mecanismo envolvendo o aumento dos níveis intracelulares de cAMP, acredita-se que a existência de receptores de serotonina em células do sistema imune possam também ser um outro potente mecanismo de ação destas drogas (MAES *et al.*, 1999).

A citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  é importante na resposta antimicrobiana e na formação de granuloma durante a infecção (ANDERSSON *et al.*, 2005). No entanto, a produção excessiva de TNF- $\alpha$  pode causar dano tecidual, o qual está presente em lesões de pele e no plasma em grandes quantidades durante reações do tipo I (KHANOLKAR-YOUNG *et al.*, 1995). Assim, a regulação da produção desta citocina por APCs apresenta um importante papel para a redução da inflamação em reações hansênicas (ANDERSSON *et al.*, 2005), mecanismo pelo qual as drogas imunomoduladoras utilizadas neste trabalho podem atuar. Com relação à inibição observada na produção de IL-12 por macrófagos, este pode ser outro possível modo de ação, pois como mostrado por Nomaguchi *et al.* esta citocina é responsável pelo aumento da atividade bactericida de macrófagos peritoniais contra *M. leprae*, tanto diretamente, estimulando a produção de NO, como indiretamente, pela produção de IFN- $\gamma$  por células T e NK (NOMAGUCHI *et al.*, 2001).

A IL-10 é produzida principalmente por células Th2, porém também pode ser produzida por macrófagos em resposta a diversos estímulos, incluindo antígenos derivados de *Mycobacteria* (MURRAY & YOUNG, 1999). Os resultados deste trabalho demonstram que a produção de IL-10 induzida por LPS não é afetada por nenhuma das drogas imunomoduladoras, o que poderia contribuir com os efeitos

supressores desta citocina sobre as funções dos macrófagos, através da redução de suas atividades antimicobacterianas (MURRAY & YOUNG, 1999), favorecendo a sobrevivência do *M. leprae* dentro de macrófagos cultivados com esta citocina (FUKUTOMI *et al.*, 2004). A presença de IL-10 em pacientes com hanseníase virchowiana sugere um possível papel na resposta imunológica ineficiente aos antígenos de *M. leprae* (MISRA *et al.*, 1995), o que poderia levar à diferenciação de células Treg, que são essenciais na indução de tolerância periférica e a supressão da resposta imune antígeno-específica (TAYLOR *et al.*, 2006).

## 6. CONCLUSÕES

As CLs tiveram uma significativa diminuição na produção de TNF- $\alpha$  por todas as drogas estudadas, independente da concentração utilizada, contudo estas células não apresentaram alterações na produção de IL-12, nas mesmas condições.

Os macrófagos apresentaram uma diminuição da produção de TNF- $\alpha$  por prednisona nas duas concentrações estudadas, e por talidomida, ciclosporina e amitriptilina na concentração de  $10^{-6}$ M. Além disso, prednisona e ciclosporina na concentração de  $10^{-8}$ M, talidomida na concentração de  $10^{-6}$ M, e amitriptilina nas duas concentrações, diminuíram a produção de IL-12 por estas células.

As drogas prednisona, talidomida, ciclosporina e amitriptilina podem regular a produção de citocinas pró-inflamatórias produzidas por CLs purificadas da epiderme e por macrófagos peritoneais, aparentemente de modo dose-dependente, sendo este modelo experimental *in vitro* importante para o entendimento de como as drogas imunomoduladoras podem atuar sobre células envolvidas na resposta imune, especialmente na hanseníase.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS, A. K. & JANEWAY, C. A., JR. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell* v.100, p.129-138, 2000.
2. AGRAWAL, A., PANDIT, L., DALAL, M. et al. Neurological manifestations of Hansen's disease and their management. *Clin.Neurol.Neurosurg.* v.107, p.445-454, 2005.
3. ALCAIS, A., MIRA, M., CASANOVA, J. L. et al. Genetic dissection of immunity in leprosy. *Curr.Opin.Immunol.* v.17, p.44-48, 2005.
4. ANDERSSON, A. K., CHADUVULA, M., ATKINSON, S. E. et al. Effects of prednisolone treatment on cytokine expression in patients with leprosy type 1 reactions. *Infect.Immun.* v.73, p.3725-3733, 2005.
5. ANJUERE, F., MARTIN, P., FERRERO, I. et al. Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. *Blood* v.93, p.590-598, 1999.
6. ARDAVIN, C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat.Rev.Immunol.* v.3, p.582-590, 2003.
7. ASAHINA, A. & TAMAKI, K. Role of Langerhans cells in cutaneous protective immunity: is the reappraisal necessary? *J.Dermatol.Sci.* v.44, p.1-9, 2006.
8. BANCHEREAU, J., BRIERE, F., CAUX, C. et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* v.18, p.767-811, 2000.
9. BANCHEREAU, J. & STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* v.392, p.245-252, 1998.
10. BARKER, L. P. Mycobacterium leprae interactions with the host cell: recent advances. *Indian J.Med.Res.* v.123, p.748-759, 2006.
11. BORGHI-CIRRI, M. B., RICCARDI-ARBI, R., BACCI, S. et al. Inhibited differentiation of Langerhans cells in the rat epidermis upon systemic treatment with cyclosporin A. *Histol.Histopathol.* v.16, p.107-112, 2001.
12. BRITTON, W. J. & LOCKWOOD, D. N. Leprosy. *Lancet* v.363, p.1209-1219, 2004.
13. BROWN, K. L., COSSEAU, C., GARDY, J. L. et al. Complexities of targeting innate immunity to treat infection. *Trends Immunol.* v.28, p.260-266, 2007.
14. BRYSON, H. M. & WILDE, M. I. Amitriptyline. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in chronic pain states. *Drugs Aging* v.8, p.459-476, 1996.
15. CARRENO, B. M. & COLLINS, M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* v.20, p.29-53, 2002.

16. CASIS, O. & SANCHEZ-CHAPULA, J. A. Mechanism of block of cardiac transient outward K<sup>+</sup> current (I<sub>to</sub>) by antidepressant drugs. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* v.32, p.527-534, 1998.
17. CHANTEUX, H., GUISSSET, A. C., PILETTE, C. et al. LPS induces IL-10 production by human alveolar macrophages via MAPKinases- and Sp1-dependent mechanisms. *Respir.Res.* v.8, p.71, 2007.
18. CORRAL, L. G. & KAPLAN, G. Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. *Ann.Rheum.Dis.* v.58 Suppl 1, p.I107-I113, 1999.
19. DEKRUYFF, R. H., FANG, Y., UMETSU, D. T. Corticosteroids enhance the capacity of macrophages to induce Th2 cytokine synthesis in CD4<sup>+</sup> lymphocytes by inhibiting IL-12 production. *J.Immunol.* v.160, p.2231-2237, 1998.
20. DENG, L., DING, W., GRANSTEIN, R. D. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor-alpha production and antigen presentation by Langerhans cells. *J.Invest Dermatol.* v.121, p.1060-1065, 2003.
21. DIAMOND, M., KELLY, J. P., CONNOR, T. J. Antidepressants suppress production of the Th1 cytokine interferon-gamma, independent of monoamine transporter blockade. *Eur.Neuropsychopharmacol.* v.16, p.481-490, 2006.
22. DUSTIN, M. L., TSENG, S. Y., VARMA, R. et al. T cell-dendritic cell immunological synapses. *Curr.Opin.Immunol.* v.18, p.512-516, 2006.
23. EBNER, S., EHAMMER, Z., HOLZMANN, S. et al. Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin. *Int.Immunol.* v.16, p.877-887, 2004.
24. FEILI-HARIRI, M., FALKNER, D. H., MOREL, P. A. Polarization of naive T cells into Th1 or Th2 by distinct cytokine-driven murine dendritic cell populations: implications for immunotherapy. *J.Leukoc.Biol.* v.78, p.656-664, 2005.
25. FRANCHIMONT, D., MARTENS, H., HAGELSTEIN, M. T. et al. Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. *J.Clin.Endocrinol.Metab* v.84, p.2834-2839, 1999.
26. FRANKENBERGER, M., HAUSSINGER, K., ZIEGLER-HEITBROCK, L. Liposomal methylprednisolone differentially regulates the expression of TNF and IL-10 in human alveolar macrophages. *Int.Immunopharmacol.* v.5, p.289-299, 2005.
27. FUJII, S., LIU, K., SMITH, C. et al. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J.Exp.Med.* v.199, p.1607-1618, 2004.
28. FUKUTOMI, Y., MATSUOKA, M., MINAGAWA, F. et al. IL-10 treatment of macrophages bolsters intracellular survival of *Mycobacterium leprae*. *Int.J.Lepr.Other Mycobact.Dis.* v.72, p.16-26, 2004.
29. FUNASA. Guia de Vigilancia Epidemiológica., 2002.



30. GAD, M., CLAEISSON, M. H., PEDERSEN, A. E. Dendritic cells in peripheral tolerance and immunity. *APMIS* v.111, p.766-775, 2003.
31. GARCIA, J. E., DE CABO, M. R., RODRIGUEZ, F. M. et al. Effect of cyclosporin A on inflammatory cytokine production by U937 monocyte-like cells. *Mediators.Inflamm.* v.9, p.169-174, 2000.
32. GIRDHAR, B. K., GIRDHAR, A., CHAKMA, J. K. Advances in the treatment of reactions in leprosy. *Indian J.Lepr.* v.79, p.121-134, 2007.
33. GORDON, S. Alternative activation of macrophages. *Nat.Rev.Immunol.* v.3, p.23-35, 2003.
34. \_\_\_\_\_. The macrophage: past, present and future. *Eur.J.Immunol.* v.37 Suppl 1, p.S9-17, 2007.
35. GOULART, I. M., PENNA, G. O., CUNHA, G. [Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*]. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* v.35, p.365-375, 2002.
36. GREENWALD, R. J., FREEMAN, G. J., SHARPE, A. H. The B7 family revisited. *Annu.Rev.Immunol.* v.23, p.515-548, 2005.
37. GREWAL, I. S. & FLAVELL, R. A. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu.Rev.Immunol.* v.16, p.111-135, 1998.
38. GUERMONPREZ, P., VALLADEAU, J., ZITVOGEL, L. et al. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* v.20, p.621-667, 2002.
39. HOETZENECKER, W., MEINGASSNER, J. G., ECKER, R. et al. Corticosteroids but not pimecrolimus affect viability, maturation and immune function of murine epidermal Langerhans cells. *J.Invest Dermatol.* v.122, p.673-684, 2004.
40. HOWARD, C. J., CHARLESTON, B., STEPHENS, S. A. et al. The role of dendritic cells in shaping the immune response. *Anim Health Res.Rev.* v.5, p.191-195, 2004.
41. HUGUES, S., BOISSONNAS, A., AMIGORENA, S. et al. The dynamics of dendritic cell-T cell interactions in priming and tolerance. *Curr.Opin.Immunol.* v.18, p.491-495, 2006.
42. HUME, D. A., ROSS, I. L., HIMES, S. R. et al. The mononuclear phagocyte system revisited. *J.Leukoc.Biol.* v.72, p.621-627, 2002.
43. KANAZAWA, N. Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. *J.Dermatol.Sci.* v.45, p.77-86, 2007.
44. KARLSSON, H., GU, Y., DEPIERRE, J. et al. Induction of apoptosis in proliferating lymphocytes by tricyclic antidepressants. *Apoptosis.* v.3, p.255-260, 1998.
45. KHANOLKAR-YOUNG, S., RAYMENT, N., BRICKELL, P. M. et al. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) synthesis is associated with the skin and peripheral

- nerve pathology of leprosy reversal reactions. *Clin.Exp.Immunol.* v.99, p.196-202, 1995.
46. KISSENFENNIG, A., AIT-YAHIA, S., CLAIR-MONINOT, V. et al. Disruption of the langerin/CD207 gene abolishes Birbeck granules without a marked loss of Langerhans cell function. *Mol.Cell Biol.* v.25, p.88-99, 2005.
  47. KITAGAWA, N., ODA, M., NOBUTAKA, I. et al. A proposed mechanism for amitriptyline neurotoxicity based on its detergent nature. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* v.217, p.100-106, 2006.
  48. KROCZEK, R. A., MAGES, H. W., HUTLOFF, A. Emerging paradigms of T-cell co-stimulation. *Curr.Opin.Immunol.* v.16, p.321-327, 2004.
  49. LEWIS, C. & MURDOCH, C. Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies. *Am.J.Pathol.* v.167, p.627-635, 2005.
  50. LIRK, P., HALLER, I., HAUSOTT, B. et al. The neurotoxic effects of amitriptyline are mediated by apoptosis and are effectively blocked by inhibition of caspase activity. *Anesth.Analg.* v.102, p.1728-1733, 2006.
  51. LOSA GARCIA, J. E., MATEOS, R. F., JIMENEZ, L. A. et al. Effect of cyclosporin A on inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Respir.Med.* v.92, p.722-728, 1998.
  52. MA, J., CHEN, T., MANDELIN, J. et al. Regulation of macrophage activation. *Cell Mol.Life Sci.* v.60, p.2334-2346, 2003.
  53. MA, W., MISHRA, S., GEE, K. et al. Cyclosporin A and FK506 inhibit IL-12p40 production through the calmodulin/calmodulin-dependent protein kinase-activated phosphoinositide 3-kinase in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells. *J.Biol.Chem.* v.282, p.13351-13362, 2007.
  54. MAES, M., SONG, C., LIN, A. H. et al. Negative immunoregulatory effects of antidepressants: inhibition of interferon-gamma and stimulation of interleukin-10 secretion. *Neuropsychopharmacology* v.20, p.370-379, 1999.
  55. MAHNKE, K., BEDKE, T., ENK, A. H. Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression. *Cell Immunol.*, 2008.
  56. MARELLI-BERG, F. M., OKKENHAUG, K., MIRENDA, V. A two-signal model for T cell trafficking. *Trends Immunol.* v.28, p.267-273, 2007.
  57. MATSUDA, S. & KOYASU, S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* v.47, p.119-125, 2000.
  58. MELLMAN, I. & STEINMAN, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* v.106, p.255-258, 2001.
  59. MIRANDA, A., AMADEU, T. P., SCHUELER, G. et al. Increased Langerhans cell accumulation after mycobacterial stimuli. *Histopathology* v.51, p.649-656, 2007.

60. MISRA, N., SELVAKUMAR, M., SINGH, S. et al. Monocyte derived IL 10 and PGE2 are associated with the absence of Th 1 cells and in vitro T cell suppression in lepromatous leprosy. *Immunol.Lett.* v.48, p.123-128, 1995.
61. MOLLER, D. R., WYSOCKA, M., GREENLEE, B. M. et al. Inhibition of IL-12 production by thalidomide. *J.Immunol.* v.159, p.5157-5161, 1997.
62. MOSCHELLA, S. L. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. *J.Am.Acad.Dermatol.* v.51, p.417-426, 2004.
63. MOSER, M. & MURPHY, K. M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat.Immunol.* v.1, p.199-205, 2000.
64. MOZO, L., SUAREZ, A., GUTIERREZ, C. Glucocorticoids up-regulate constitutive interleukin-10 production by human monocytes. *Clin.Exp.Allergy* v.34, p.406-412, 2004.
65. MURRAY, P. J. & YOUNG, R. A. Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice. *Infect.Immun.* v.67, p.3087-3095, 1999.
66. NAKAMURA, K., SAITOH, A., YASAKA, N. et al. Molecular mechanisms involved in the migration of epidermal dendritic cells in the skin. *J.Investig.Dermatol Symp.Proc.* v.4, p.169-172, 1999.
67. NELMS, K., KEEGAN, A. D., ZAMORANO, J. et al. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu.Rev.Immunol.* v.17, p.701-738, 1999.
68. NIMMERJAHN, F. & RAVETCH, J. V. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv.Immunol.* v.96, p.179-204, 2007.
69. NOMAGUCHI, H., JAHAN, N., MANDAL, B. C. et al. IL-12 and IL-18 synergistically induce the bactericidal activity of murine peritoneal cells against *M. leprae*. *Nihon Hansenbyo.Gakkai Zasshi* v.70, p.113-119, 2001.
70. NOVAK, N. & BIEBER, T. 2. Dendritic cells as regulators of immunity and tolerance. *J.Allergy Clin.Immunol.* v.121, p.S370-S374, 2008.
71. O'GARRA, A. & ARAI, N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol.* v.10, p.542-550, 2000.
72. OBUCHOWICZ, E., KOWALSKI, J., LABUZEK, K. et al. Amitriptyline and nortriptyline inhibit interleukin-1 release by rat mixed glial and microglial cell cultures. *Int.J.Neuropsychopharmacol.* v.9, p.27-35, 2006.
73. PAN, P. Y., OZAO, J., ZHOU, Z. et al. Advancements in immune tolerance. *Adv.Drug Deliv.Rev.* v.60, p.91-105, 2008.
74. PANCRAZIO, J. J., KAMATCHI, G. L., ROSCOE, A. K. et al. Inhibition of neuronal Na<sup>+</sup> channels by antidepressant drugs. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* v.284, p.208-214, 1998.

75. PAUL, S. C., LV, P., XIAO, Y. J. et al. Thalidomide in rat liver cirrhosis: blockade of tumor necrosis factor-alpha via inhibition of degradation of an inhibitor of nuclear factor-kappaB. *Pathobiology* v.73, p.82-92, 2006.
76. PEISER, M., WANNER, R., KOLDE, G. Human epidermal Langerhans cells differ from monocyte-derived Langerhans cells in CD80 expression and in secretion of IL-12 after CD40 cross-linking. *J.Leukoc.Biol.*, 2004.
77. PENG, Y., MARTIN, D. A., KENKEL, J. et al. Innate and adaptive immune response to apoptotic cells. *J.Autoimmun.* v.29, p.303-309, 2007.
78. RAMBUKKANA, A. How does Mycobacterium leprae target the peripheral nervous system? *Trends Microbiol.* v.8, p.23-28, 2000.
79. \_\_\_\_\_. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of Mycobacterium leprae. *Curr.Opin.Microbiol.* v.4, p.21-27, 2001.
80. RANDOLPH, G. J. Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Semin.Immunol.* v.13, p.267-274, 2001.
81. RANDOLPH, G. J., OCHANDO, J., PARTIDA-S NCHEZ. Migration of Dendritic Cell Subsets and their Precursors. *Annu.Rev.Immunol.*, 2007.
82. RAVETCH, J. & ADEREM, A. Phagocytic cells. *Immunol.Rev.* v.219, p.5-7, 2007.
83. ROMANI, N., HOLZMANN, S., TRIPP, C. H. et al. Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *APMIS* v.111, p.725-740, 2003.
84. ROWLAND, T. L., MCHUGH, S. M., DEIGHTON, J. et al. Differential regulation by thalidomide and dexamethasone of cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunopharmacology* v.40, p.11-20, 1998.
85. SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* v.101, p.455-458, 2000.
86. SALGADO, C. G. & CRUZ, C. A. V. Hanseníase: Análise dos dados epidemiológicos brasileiros em relação ao resto do mundo, com especial ênfase à Região norte do Brasil. *Coleção de Estudos Regionais sobre os Objetivos de Desenvolvimento do Milênio* v.Região Norte, p.184-190, 2007.
87. SALGADO, C. G., NAKAMURA, K., SUGAYA, M. et al. Differential effects of cytokines and immunosuppressive drugs on CD40, B7-1, and B7-2 expression on purified epidermal Langerhans cells. *J.Invest Dermatol* v.113, p.1021-1027, 1999a.
88. SALGADO, C. G., NAKAMURA, K., SUGAYA, M. et al. Functional CD40 ligand is expressed on epidermal Langerhans cells. *J.Leukoc.Biol.* v.66, p.281-285, 1999b.
89. SALLUSTO, F. & LANZAVECCHIA, A. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res.* v.4 Suppl 3, p.S127-S132, 2002.

90. SAMPAIO, E. P., HERNANDEZ, M. O., CARVALHO, D. S. et al. Management of erythema nodosum leprosum by thalidomide: thalidomide analogues inhibit M. leprae-induced TNF $\alpha$  production in vitro. *Biomed.Pharmacother.* v.56, p.13-19, 2002.
91. SANCHEZ, C. & HYTTEL, J. Comparison of the effects of antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding. *Cell Mol.Neurobiol.* v.19, p.467-489, 1999.
92. SAUMA, D., FIERRO, A., MORA, J. R. et al. Cyclosporine preconditions dendritic cells during differentiation and reduces IL-2 and IL-12 production following activation: a potential tolerogenic effect. *Transplant.Proc.* v.35, p.2515-2517, 2003.
93. SBH & SBD. Hanseníase: Estados Reacionais. *Projeto Diretrizes* p.1-19, 2003.
94. SENA, C. B., SALGADO, C. G., TAVARES, C. M. et al. Cyclosporine A treatment of leprosy patients with chronic neuritis is associated with pain control and reduction in antibodies against nerve growth factor. *Lepr.Rev.* v.77, p.121-129, 2006.
95. SERBINA, N. V., JIA, T., HOHL, T. M. et al. Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annu.Rev.Immunol.*, 2007.
96. SERRES, M., VIAC, J., SCHMITT, D. Glucocorticoid receptor localization in human epidermal cells. *Arch.Dermatol Res.* v.288, p.140-146, 1996.
97. STEINMAN, R. M. Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS* v.111, p.675-697, 2003.
98. \_\_\_\_\_. Dendritic cells: understanding immunogenicity. *Eur.J.Immunol.* v.37 Suppl 1, p.S53-S60, 2007a.
99. \_\_\_\_\_. Lasker Basic Medical Research Award. Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. *Nat.Med.* v.13, p.1155-1159, 2007b.
100. STEINMAN, R. M., TURLEY, S., MELLMAN, I. et al. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J.Exp.Med.* v.191, p.411-416, 2000.
101. STERNBERG, E. M. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat.Rev.Immunol.* v.6, p.318-328, 2006.
102. STUMP, P. R. N. A. G., VIRMOND, M., BACCARELLI, R. et al. Dor Crônica em Hanseníase - Um Problema de Saúde Pública. *Boletim Epidemiológico Paulista* v.3, 2006.
103. SUDOH, Y., CAHOON, E. E., GERNER, P. et al. Tricyclic antidepressants as long-acting local anesthetics. *Pain* v.103, p.49-55, 2003.
104. TADA, Y., ASAHINA, A., FUJITA, H. et al. Differential effects of LPS and TGF- $\beta$  on the production of IL-6 and IL-12 by Langerhans cells, splenic dendritic cells, and macrophages. *Cytokine* v.25, p.155-161, 2004.

105. TAJIMA, K., AMAKAWA, R., ITO, T. et al. Immunomodulatory effects of cyclosporin A on human peripheral blood dendritic cell subsets. *Immunology* v.108, p.321-328, 2003.
106. TAKEDA, K. & AKIRA, S. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells* v.6, p.733-742, 2001.
107. TAYLOR, A., VERHAGEN, J., BLASER, K. et al. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology* v.117, p.433-442, 2006.
108. TAYLOR, P. R., BROWN, G. D., REID, D. M. et al. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J.Immunol.* v.169, p.3876-3882, 2002.
109. TEO, S. K., RESZTAK, K. E., SCHEFFLER, M. A. et al. Thalidomide in the treatment of leprosy. *Microbes.Infect.* v.4, p.1193-1202, 2002.
110. TRIPATHI, S., BRUCH, D., KITTUR, D. S. Ginger extract inhibits LPS induced macrophage activation and function. *BMC.Complement Altern.Med.* v.8, p.1, 2008.
111. VALLADEAU, J., CLAIR-MONINOT, V., DEZUTTER-DAMBUYANT, C. et al. Identification of mouse langerin/CD207 in Langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues. *J.Immunol.* v.168, p.782-792, 2002.
112. VALLADEAU, J., RAVEL, O., DEZUTTER-DAMBUYANT, C. et al. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity.* v.12, p.71-81, 2000.
113. VAN BEERS, S. M., DE WIT, M. Y., KLATSER, P. R. The epidemiology of *Mycobacterium leprae*: recent insight. *FEMS Microbiol.Lett.* v.136, p.221-230, 1996.
114. VIEIRA, P. L., KALINSKI, P., WIERENGA, E. A. et al. Glucocorticoids inhibit bioactive IL-12p70 production by in vitro-generated human dendritic cells without affecting their T cell stimulatory potential. *J.Immunol.* v.161, p.5245-5251, 1998.
115. WANG, G. K., RUSSELL, C., WANG, S. Y. State-dependent block of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels by amitriptyline via the local anesthetic receptor and its implication for neuropathic pain. *Pain* v.110, p.166-174, 2004.
116. WATFORD, W. T., MORIGUCHI, M., MORINOBU, A. et al. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* v.14, p.361-368, 2003.
117. WOLTMAN, A. M., DE FIJTER, J. W., KAMERLING, S. W. et al. The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* v.30, p.1807-1812, 2000.
118. WU, J. J., HUANG, D. B., PANG, K. R. et al. Thalidomide: dermatological indications, mechanisms of action and side-effects. *Br.J.Dermatol.* v.153, p.254-273, 2005.

119. XIA, Z., DEPIERRE, J. W., NASSBERGER, L. Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1 beta and TNF-alpha release in human blood monocytes and IL-2 and interferon-gamma in T cells. *Immunopharmacology* v.34, p.27-37, 1996.
120. XIAO, L. & ENEROTH, P. Tricyclic antidepressants inhibit human natural killer cells. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* v.137, p.157-162, 1996.
121. ZHANG, X. & MOSSER, D. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J.Pathol.* v.214, p.161-178, 2008.
122. ZHU, X. Y., LIU, Y. J., DIAO, F. et al. Role of glucocorticoids and glucocorticoid receptor in priming of macrophages caused by glucocorticoid receptor blockade. *Endocrine.* v.31, p.130-137, 2007.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)