



Liliani Mathias Brum

**ATIVIDADE DA NTPDase DE LINFÓCITOS NA DERMATITE DE CONTATO
ANTES E APÓS TRATAMENTO COM DEXAMETASONA NANOESTRUTURADA**

Santa Maria, RS

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Liliani Mathias Brum

**ATIVIDADE DA NTPDase DE LINFÓCITOS NA DERMATITE DE CONTATO
ANTES E APÓS TRATAMENTO COM DEXAMETASONA NANOESTRUTURADA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Nanociências, do Curso de Pós-graduação em Nanociências – Área de Ciências Naturais e Tecnológicas, Centro Universitário Franciscano.

Orientador: Prof. Dr^a. Daniela Bitencourt Rosa Leal

Santa Maria, RS

2008

Liliani Mathias Brum

**ATIVIDADE DA NTPDase DE LINFÓCITOS NA DERMATITE DE CONTATO
ANTES E APÓS TRATAMENTO COM DEXAMETASONA NANOESTRUTURADA**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-graduação em Nanociências – Área de Ciências Naturais e Tecnológicas, Centro Universitário Franciscano, pela seguinte Banca Examinadora:

Aprovada em ____/____/2008.

Prof.^a Dr.^a Daniela Bitencourt Rosa Leal – Orientador (UNIFRA)

Prof.^a Dr.^a Maria Rosa Chitolina Schetinger

Prof.^a Dr.^a Cleci Menezes Moreira

Santa Maria, RS, 18 de outubro de 2008

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a alguém muito especial,
meu filho Isaac.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me permitiu atingir mais esse desafio.

Ao meu marido, Rovandro, pela paciência e apoio.

Aos meus pais, Wilfredo e Branca Diva e as minhas irmãs, Lisandra e Liane por torcerem sempre por mim e me apoiarem em momentos cruciais.

A minha orientadora, Daniela, por me ensinar o valor da pesquisa e pelas inúmeras horas de dedicação e paciência.

Aos meus incansáveis amigos Luciana, João Felipe, Nara, Gabriela, Danielle, Marta e Ailton, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas Alexandre, Emilia, Lenira, Nelcinda, por entenderem a minha ausência e pelo apoio dispensado.

Aos meus colegas Luís, Leandro, Aline e Gilmor, pelo apoio dispensado, obrigada.

Aos colaboradores do laboratório de Patologia da UFSM, sempre acolhedores com os antigos filhos.

Aos meus colegas do laboratório de Nanociências da UNIFRA, Isabel, Daniel e Rafaela, pela elaboração das formulações aplicadas neste estudo.

E, finalmente, agradeço a todas as outras pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“O homem nada mais é do que aquilo que ele sabe.”

Francis Bacon

RESUMO

Uma vez que os nucleotídeos extracelulares representam uma importante via de modulação da atividade dos linfócitos, é indispensável a presença de um mecanismo enzimático capaz de manter constante a concentração desses no espaço extracelular. A atividade da NTPDase tem sido reconhecida como um marcador de ativação necessário para a função efetora dos linfócitos, participando também dos processos de reconhecimento do antígeno. Na dermatite de contato ocorre uma reação de hipersensibilidade retardada tipo IV, mediada por células, através de um mecanismo imunológico que sensibiliza os linfócitos T frente a um antígeno protéico ou a um hapteno ligado a uma proteína. Dentre os mediadores capazes de modular as ações dos linfócitos destacam-se os nucleosídeos e nucleotídeos da adenina, em especial o ATP extracelular que é capaz de regular as interações célula-célula sendo importante nos processos de ativação, diferenciação, desenvolvimento, proliferação, morte celular e respostas efectoras dos linfócitos. Este estudo procurou determinar primeiramente a hidrólise de nucleotídeos da adenina, pela NTPDase (EC 3.6.1.5, nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase, CD39) em linfócitos de ratos com dermatite induzida por sulfato de níquel, antes e após tratamento com dexametasona livre e dexametasona nanoestruturada, para tentar verificar as possíveis alterações na atividade desta enzima frente a uma reação inflamatória de hipersensibilidade tipo IV e na terapia imunossupressora. Além disso, procurou-se verificar a possível relação da apresentação do fármaco na formulação livre e nanoestruturada com a hidrólise de nucleotídeos da adenina. A atividade enzimática média do grupo com dermatite de contato foi significativamente maior em relação ao grupo controle pelo teste de hipóteses para médias T. Os resultados encontrados estão de acordo com trabalhos realizados anteriormente que demonstram um aumento da atividade enzimática pela ativação dos linfócitos. A hidrólise do ATP e do ADP no grupo tratado com dexametasona livre e no grupo tratado com dexametasona nanoestruturada foi significativamente maior em relação ao grupo controle pelo teste de análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,001$). Observou-se uma maior hidrólise de ADP e ATP, no grupo tratado com dexametasona nanoestruturada em relação ao grupo tratado com dexametasona livre. No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Trabalhos anteriores já demonstraram um aumento de atividade enzimática durante tratamento com dexametasona como um possível efeito compensatório à diminuição do número de linfócitos. Os resultados deste estudo sugerem que a dexametasona nanoestruturada possui um efeito imunossupressor maior, o que pode ser o início da avaliação de um tratamento mais eficaz e seguro para a dermatite de contato. A partir destes resultados podemos concluir que a determinação da atividade da NTPDase em linfócitos poderia ser utilizada como um indicador da eficiência da terapêutica da dermatite de contato.

Palavras-chave: NTPDase; Dermatite de Contato; Dexametasona; CD39.

ABSTRACT

Since the extracellular nucleotides represent an important means of modulating the activity of lymphocytes, it is essential the presence of an enzymatic mechanism to keep constant the concentration of those in the extracellular space. The activity of NTPDase has been recognized as a marker of activation necessary for the function of effector lymphocytes, participate in the processes of recognition of antigen. Contact dermatitis occurs in a delayed hypersensitivity reaction of type IV, mediated by cells through a mechanism that sensitizes the immune T lymphocyte to an antigen protein or a hapten linked to a protein. Among the mediators able to modulate the actions of lymphocytes stand out from the nucleoside and nucleotide adenine, in particular the extracellular ATP that is able to regulate the cell-cell interactions are important processes of activation, differentiation, development, proliferation, cell death and responses of effector lymphocytes. This study sought to determine first of the hydrolysis of adenine nucleotides, the NTPDase (EC 3.6.1.5, nucleoside triphosphate difosfohidrolase, CD39) in lymphocytes from mice with dermatitis induced by nickel sulphate to 5%, before and after treatment with dexamethasone and dexamethasone nanostructured free to try to check the possible changes in the activity of this enzyme front of an inflammatory reaction of type IV hypersensitivity and immunosuppressive therapy. Moreover, it was possible to verify the relationship of submission of the drug in the formulation free and nanostructures with the hydrolysis of adenine nucleotides. The average enzymatic activity of the group with contact dermatitis was significantly higher in the control group by the test of hypotheses to averages T. The results are in line with work done earlier that showed an increase of enzyme activity by the activation of lymphocytes. The hydrolysis of ATP and ADP in the group treated with dexamethasone free and in the group treated with dexamethasone nanostructured was significantly higher in the control group by analysis of variance for a way (ANOVA) followed by Kruskal-Wallis test ($P < 0001$). The results are in line with work done earlier that showed an increase of enzyme activity by the activation of lymphocytes. Was observed greater hydrolysis of ATP and ADP in the group treated with dexamethasone nanostructures in relation to the group treated with dexamethasone free. However, this difference was not statistically significant. Work previously shown an increase of enzyme activity during treatment with dexamethasone as a possible compensatory effect of the decrease in the number of lymphocytes. The results of this study suggest that dexamethasone nanostructures possess a immunosuppressive effects greatest, which may be the beginning of the evaluation of a more effective and safe treatment for contact dermatitis. From these results we can conclude that the determination of the activity of NTPDase in lymphocytes could be used as an indicator of the efficiency of the treatment of contact dermatitis.

Key-words: NTPDase; Contact Dermatitis; Dexamethasone; CD39.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Dexametasona	32
Figura 2 – Topografia e propriedades catalíticas de membros da família E-NTPDase ...	37
Figura 3 – Topografia e propriedades catalíticas das E-NTPDases, E-NPPs, Fosfatase Alcalina e Ecto-5'-Nucleotidase	39
Figura 4 – Ratas sensibilizadas com níquel a 5% utilizando como veículo vaselina sólida	46
Figura 5 – Punção cardíaca para a coleta de amostras de sangue	46
Figura 6 – Anatomo-patológico do grupo controle (C) mostrando ausência de dermatite de contato (aumento de 100x)	50
Figura 7 – Anatomo-patológico do grupo controle (C) mostrando ausência de dermatite de contato (aumento de 200x)	50
Figura 8 – Anatomo-patológico do grupo sensibilizado com níquel a 5% e não tratado (DC), mostrando características de dermatite de contato (aumento de 100x) ..	51
Figura 9 – Anatomo-patológico do grupo sensibilizado com níquel a 5% e não tratado (DC), mostrando características de dermatite de contato (aumento de 200x) ..	51
Figura 10 – Anatomo-patológico do grupo sensibilizado com níquel a 5% e não tratado (DC), mostrando características de espongiose (aumento de 100x) ...	52
Figura 11 – Anatomo-patológico do grupo sensibilizado com níquel a 5% e não tratado (DC), mostrando características de espongiose (aumento de 200x) ...	52

Figura 12 – Hidrólise de ATP e ADP no grupo com dermatite de contato (DC) e no grupo controle (DN). As condições de incubação foram descritas em Materiais e Métodos. As barras representam à média ± EPM de atividade em nmol de Pi/min/mg de proteína. As barras brancas indicam o grupo controle (C) e as barras negras o grupo com dermatite de contato (DC). *Diferença significativa da atividade em relação ao controle por Teste estatístico T (P<0,001). ***Diferença extremamente significativa da atividade em relação ao controle por Teste estatístico T (P<0,001)	54
Figura 13 – Hidrólise do ATP nos grupos controle (C), tratado com dexametasona livre (DL) e tratado com dexametasona nanoestruturada (DN). As condições de incubação foram descritas em Materiais e Métodos. As barras representam à média ± EPM de atividade em nmol de Pi/min/mg de proteína. ***Diferença extremamente significativa da atividade em relação ao controle por Teste de ANOVA seguido pelo Teste de Kruskal-Wallis (P<0,001)	56
Figura 14 – Hidrólise do ADP nos grupos controle (C), tratado com dexametasona livre (DL) e tratado com dexametasona nanoestruturada (DN). As condições de incubação foram descritas em Materiais e Métodos. As barras representam a média ± EPM de atividade em nmol de Pi/min/mg de proteína. **Diferença muito significativa da atividade em relação ao controle por Teste ANOVA seguido pelo Teste de Kruskal-Wallis (P<0,001). ***Diferença extremamente significativa da atividade em relação ao controle por Teste ANOVA seguido pelo Teste de Kruskal-Wallis (P<0,001)	57
Figura 15 – Anatomo-patológico do grupo sensibilizado com níquel a 5% e tratado com dexametasona livre (DL) (aumento de 25x)	59
Figura 16 – Anatomo-patológico do grupo sensibilizado com níquel a 5% e tratado com dexametasona livre (DL) (aumento de 100x)	59
Figura 17 – Anatomo-patológico do grupo sensibilizado com níquel a 5% e tratado com dexametasona livre (DL) (aumento de 200x)	60
Figura 18 – Anatomo-patológico do grupo sensibilizado com níquel a 5% e tratado com dexametasona nanoestruturada (DN) (aumento de 25x)	60

Figura 19 – Anatomo-patológico do grupo sensibilizado com níquel a 5% e tratado com dexametasona nanoestruturada (DN) (aumento de 100x)	61
Figura 20 – Anatomo-patológico do grupo sensibilizado com níquel a 5% e tratado com dexametasona nanoestruturada (DN) (aumento de 200x)	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- DAC – Dermatite alérgica de contato.
- NTPDase – Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
- E-NTPDases – Ecto-nucleosídeos trifosfato difosfohidrolases
- E-NPP – Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
- ATP – Adenosina trifosfato
- ADP – Adenosina difosfato
- AMP – Adenosina monofosfato
- IL – Interleucina
- DCIP – Dermatite de contato por irritação primária
- ICAM-1 – Molécula de adesão intracelular 1
- TNF – Fator de necrose tumoral
- CL – Células de Langerhans
- IgG – Imunoglobulina G
- TCR – Receptor da célula T
- TGF – Fator transformador do crescimento
- NK – *natural killer*
- UV – Ultra-violeta
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- LFA – Antígeno de função leucocitária
- GM-CSF – Fator estimulador de colônias granulócitos/macrófagos
- RNA – Ácido ribonucleico
- ACRs – Regiões conservadas da apirase

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	11
1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 DERMATITE DE CONTATO	17
2.1.1 Dermatite de Contato por Irritação Primária (DCIP)	17
2.1.2 Dermatite Alérgica de Contato (DAC)	19
2.1.2.1 Etapas da dermatite alérgica de contato	20
2.1.2.2 Fatores que interferem na dermatite alérgica de contato	22
2.1.3 Dermatite de Contato Fototóxica	23
2.1.4 Dermatite de Contato Fotoalérgica	24
2.1.5 Dermatite de Contato não Eczematosa	25
2.1.6 Diagnóstico	25
2.1.6.1 Exame Histopatológico	25
2.1.6.2 Teste de contato	26
2.1.7 Tratamento	27
2.1.7.1 Mecanismos de ação das principais drogas utilizadas no tratamento da DAC	28
2.1.7.1.1 Dexametasona	31
2.2 NUCLEOTÍDEOS E SUA FUNÇÃO IMUNE	35
2.2.1 Enzimas que degradam nucleotídeos	36
2.2.1.1 Família E-NTPDase	36
2.2.1.2 Família E-NPP	38
2.2.1.3 Fosfatases alcalinas	38
2.2.1.4 Ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5)	39
2.3 LINFÓCITOS E MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO	40
2.4 FUNÇÕES DA NTPDase NAS CÉLULAS LINFÓIDES	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43

3.1 REAGENTES UTILIZADOS	43
3.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	43
3.3 ANIMAIS	44
3.4 INDUÇÃO DE DERMATITE DE CONTATO	44
3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NTPDase	45
3.5.1 Isolamento de Células Mononucleadas do Sangue dos Animais	45
3.5.2 Determinação de Proteínas	45
3.5.3 Hidrólise de ATP e ADP	45
3.6 OBTENÇÃO DE DEXAMETASONA NANOESTRUTURADA	47
3.6.1 Preparação das Nanopartículas	47
3.6.2 Preparação do Creme Gel Contendo as Suspensões	47
3.7 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	47
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1 INTRODUÇÃO

A dermatite de contato alérgica é uma dermatose inflamatória freqüente nos países industrializados, com grande impacto socioeconômico, sendo uma das doenças ocupacionais mais comuns. Uma vez que é a barreira mais externa do corpo humano, a pele é a primeira a entrar em contato com fatores químicos e físicos provenientes do meio ambiente (HENNINO et al., 2005). A dermatite de contato é induzida pelo contato da pele com substâncias químicas não protéicas denominadas haptenos, correspondendo a uma reação de hipersensibilidade retardada tipo IV, ou mediada por células T hapteno-específicas, através de um mecanismo imunológico que sensibiliza e provoca a ativação dos linfócitos T frente a um antígeno protéico ou a um hapteno ligado a uma proteína (BONNEVILLE et al., 2007).

A utilização de dexametasona, que tem ação antiinflamatória e imunossupressora, inibiria o processo de ativação dos linfócitos, dificultaria a progressão da reação de hipersensibilidade e poderia alterar a atividade da NTPDase/CD39, uma enzima existente na superfície dos linfócitos, diretamente relacionada ao estado ativado destas células.

A enzima NTPDase (EC 3.6.1.5, nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase, CD39) é uma proteína transmembrana que catalisa a hidrólise extracelular dos nucleotídeos ATP e ADP até adenosina monofosfato (AMP), sendo, portanto, uma enzima da família das ectonucleotidases (E-NTPDases) (ZIMMERMANN et al., 2001). Esta enzima, alvo de diversos estudos, tem sido descrita em vários tecidos como em vegetais (VALENZUELA et al., 1989; ANICH et al., 1990), invertebrados (VASCONCELOS et al., 1993), protozoários (MATOS et al., 2001), peixes (Rico et al., 2003), além de vários tecidos de mamíferos, como córtex cerebral (BATTASTINI et al., 1991), útero e glândulas mamárias (VALENZUELA et al., 1989), plaquetas de ratos e humanos (PILLA et al., 1996; LUNKES et al., 2003), células endoteliais (KOZIAK et al., 1999) e linfócitos humanos (PLESNER, 1995; LEAL et al., 2005a). Por estar amplamente distribuída nas células sanguíneas essa ectonucleotidase participa de importantes interações celulares, agindo, por exemplo, na agregação plaquetária e em processos inflamatórios e imunes (ZIMMERMANN, 2001). O sistema imune é constituído por células, entre as quais, estão os linfócitos, que são responsáveis pelo reconhecimento e destruição de antígenos não-próprios. Os linfócitos são originários de células indiferenciadas da medula óssea, passando por poucas fases intermediárias até a medula madura. Em situações patológicas, o número de linfócitos pode sofrer alterações como em estímulos antigênicos, proliferações benignas e malignas. Dentre os mediadores capazes de modular as ações dos

linfócitos destacam-se os nucleotídeos e nucleosídeos da adenina. Em especial, o ATP extracelular é capaz de regular as interações célula-célula, sendo importante nos processos de ativação, diferenciação, desenvolvimento, proliferação, morte celular e respostas efetoras dos linfócitos (DI VIRGILIO, 2000).

O ATP extracelular é ainda citado como um dos responsáveis pelos efeitos citolíticos dos linfócitos T citotóxicos, uma vez que estes podem liberar grandes quantidades de ATP frente a um estímulo antigênico. Entretanto, essas células apresentam mecanismos que degradam o ATP extracelular, responsáveis pela proteção celular contra ações citotóxicas do próprio ATP liberado. Os papéis do ADP e do AMP em linfócitos permanecem desconhecidos. Entretanto, estes nucleotídeos representam uma importante fonte extracelular de adenosina, que pode agir como um agente imunossupressor, pois exerce um efeito tóxico no desenvolvimento dos linfócitos e inibe a ativação destes frente a um antígeno.

As ações promovidas por esses nucleotídeos são mediadas através de uma classe de receptores de membrana conhecidos como receptores purinérgicos (DI VIRGILIO et al., 2001a). Eles se encontram amplamente distribuídos nas células sanguíneas, sendo que os receptores do tipo P2 (ATP) têm sido identificados como componentes chaves na cadeia de eventos que leva à ativação do sistema imune (DI VIRGILIO et al., 2001b; BEI et al., 2003).

Uma vez que os nucleotídeos extracelulares representam uma importante via de modulação da atividade dos linfócitos, é indispensável a presença de um mecanismo enzimático capaz de manter constante a concentração desses no espaço extracelular. Este estudo procurou determinar primeiramente a hidrólise de nucleotídeos da adenina, pela NTPDase (EC 3.6.1.5, nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase, CD39) em linfócitos de ratos com dermatite induzida por sulfato de níquel, antes e após tratamento com dexametasona livre e dexametasona nanoestruturada, para tentar verificar as possíveis alterações na atividade desta enzima frente a uma reação inflamatória de hipersensibilidade tipo IV e na terapia imunossupressora. Além disso, procurou-se verificar a possível relação da apresentação do fármaco na formulação livre e nanoestruturada com a hidrólise de nucleotídeos da adenina. Uma vez que esta enzima serve como marcador de ativação de linfócitos, sua atividade poderia sofrer alterações em reações de hipersensibilidade, assim como ser modulada pela terapia imunossupressora, utilizada em seu tratamento.

Mesmo não sendo a dexametasona nanoestrutura o alvo principal deste trabalho, sua utilização em acréscimo à dexametasona livre serve como mais um subsídio para avaliar a utilização da atividade da NTPDase como marcadora da função imune dos linfócitos durante a dermatite de contato.

A NTPDase tem sido reconhecida como um marcador de ativação de linfócitos T e também como capaz de gerar sinais que amplificam interações célula-célula (KANSAS et al., 1991). Essa enzima desempenha um importante papel no controle da função dos linfócitos incluindo reconhecimento do antígeno e/ou ativação de atividades efectoras das células T-citotóxicas (FILIPPINI et al., 1990). Na dermatite de contato alérgica, existe envolvimento primário do sistema imunológico, através de uma reação de hipersensibilidade tipo IV, a qual é mediada por células T. O conhecimento da atividade da NTPDase durante a dermatite de contato pode servir como um marcador do comprometimento da resposta imunológica durante esta reação de hipersensibilidade. Além disso, sua atividade durante o tratamento com dexametasona nas formas livre e nanoestrutura pode confirmar a função desta enzima durante a imunossupressão. Sendo assim, os objetivos do trabalho foram:

- Determinar a hidrólise de nucleotídeos da adenina, pela NTPDase em linfócitos de ratos com dermatite induzida por sulfato de níquel.
- Determinar a atividade da NTPDase em linfócitos de ratos com dermatite de contato após tratamento com dexametasona livre e nanoestruturada.
- Verificar a possível relação da apresentação do fármaco na formulação livre e nanoestruturada com a hidrólise de nucleotídeos da adenina.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DERMATITE DE CONTATO

A dermatite de contato é uma dermatose de etiologia exógena, sendo causada por agentes externos que, em contato com a pele, desencadeiam uma reação inflamatória. Clinicamente, a dermatite de contato se manifesta, na maioria das vezes, como um eczema. Quanto à etiopatogenia, a dermatite de contato é classificada em: dermatite de contato por irritação primária; dermatite alérgica de contato; dermatite de contato fototóxica e dermatite de contato fotoalérgica (DUARTE et al., 2005).

2.1.1 Dermatite de Contato por Irritação Primária (DCIP)

A dermatite de contato por irritação primária surge em consequência da exposição única ou repetida a agentes agressores, cujos mecanismos de ação não envolvem, eventos imunológicos (RIETSECHEL et al., 1997). Considerando-se os mecanismos desencadeantes e o aspecto clínico, pode-se classificá-la em seis diferentes tipos como Irritação aguda ou irritante primário absoluto, irritante primário absoluto com efeito retardado, irritante primário relativo, reação irritante, irritação pustulosa ou acneiforme e irritação subjetiva (LAMMINTAUTA et al., 1990). Pode ser desencadeada por uma série de substâncias, como solventes, detergentes, óleos de cortes (indústria metalúrgica), cimento e até água, que pode ter papel tanto no desencadeamento como também na manutenção das lesões. É a forma mais freqüente de dermatite de contato, principalmente quando relacionada às atividades profissionais, representando 60% de todas as dermatoses ocupacionais (STORS, 1997).

Alguns estudos tentam demonstrar que alguns indivíduos são mais susceptíveis do que outros a essa dermatose. Desse modo, fatores relacionados ao indivíduo ou fatores externos estariam implicados. Em relação ao indivíduo, os pontos mais importantes estão relacionados com a atopia, pois vários autores tentam mostrar a susceptibilidade dos indivíduos atópicos em relação à dermatite irritativa, devido às alterações na função da barreira cutânea tanto na pele irritada quanto na pele clinicamente normal. Em contrapartida, outros não demonstram essa predisposição. A idade também é um dos fatores relacionados à predisposição a dermatite de contato, crianças menores de oito anos e idosos teriam maior predisposição, sendo, o início do quadro mais lento no idoso do que no jovem (GALHACHER et al., 1998).

Em relação ao sexo, as mulheres apresentam frequência maior desse tipo de dermatite, provavelmente devido à maior exposição aos irritantes e à umidade. Em relação à cor da pele, alguns trabalhos demonstram que as células da camada epidérmica, na pele negra estariam mais compactadas, diminuindo assim os espaços intercelulares. Esse fato dificultaria a penetração das substâncias irritantes na pele negra (DENING et al., 1998).

Quanto aos fatores externos que agem na DCIP, são relevantes a característica da substância, como o tamanho da molécula, a polaridade, a solubilidade e o veículo em que se encontra diluída. As características relativas à exposição da pele ao agente como o tempo de exposição, a periodicidade e o modo de exposição, como contato rápido ou sob oclusão, também são importantes (DUARTE et al., 2005). As características climáticas como o frio, a baixa umidade ou a presença de eventos, favorecem a penetração do irritante (DENING et al., 1998).

Embora bastante estudada, não se conhece ainda o mecanismo pelo qual ocorre a DCIP. O dano inicial está relacionado à perda da integridade da epiderme, decorrente do comprometimento causado às células epiteliais pela substância irritante. A seguir, os queratinócitos lesados começam a produzir citocinas que iniciam o processo inflamatório (BERARDESCA et al., 1997).

A liberação de citocinas pelos queratinócitos estimula outros queratinócitos situados nas proximidades e outras células, como as de Langerhans e as de Merkel. As citocinas também promovem a atração de outras células inflamatórias, ampliando desse modo o processo inflamatório. Algumas interleucinas estão aumentadas na DCIP. Estudos demonstram aumentos significativos nas quantidades de TNF- α (fator de necrose tumoral-alfa), a IL-6 (interleucina-6) e IL-2 (interleucina-2) (WATANABE et al., 2002).

Uma das características do processo inflamatório da DCIP é a presença de moléculas de adesão como o ICAM-1 que é uma molécula de superfície celular, encontrada em leucócitos e outras células que participam da reação inflamatória. Sua produção é estimulada por citocinas como TNF- α , Interferon-gama (IFN- γ) e IL-1. A ICAM é capaz de promover a adesão celular entre leucócitos e outras células de maneira antígeno-inespecífica (CUMBERBATCH et al., 2003). Também nas reações irritativas, os níveis de TNF- α estão aumentados; desse modo, acredita-se que esse seja o mediador inflamatório mais importante da DCIP (SAINT-MEZARD et al., 2004).

A seqüência de eventos de liberação das citocinas parece semelhante na DCIP e na dermatite alérgica de contato (DAC), mas estudos têm demonstrado que eles ocorrem em momentos diferentes do processo inflamatório. A presença de IL-1b, IL-6, IL-10 só será

detectada na DCIP após 24 horas do início do evento, enquanto na DAC estão presentes já nas primeiras 24 horas. Na verdade, os estudos atuais tentam demonstrar que o processo inflamatório é semelhante para todos os tipos de agentes, irritantes ou sensibilizantes, havendo diferenças apenas quanto à especificidade antigênica das células envolvidas (BRAND, 1995; BERARDESCA et al., 1996; BERARDESCA et al., 1997).

2.1.2 Dermatite Alérgica de Contato (DAC)

A dermatite de contato alérgica (DAC) é uma dermatose inflamatória freqüente nos países industrializados, com grande impacto socioeconômico, sendo uma das doenças ocupacionais mais comuns (HENNINO et al., 2005). É caracterizada por eritema, pápulas e vesículas, seguidas de ressecamento e descamação, sendo induzida pelo contato da pele com substâncias químicas não protéicas denominadas haptenos, correspondendo a uma reação de hipersensibilidade cutânea do tipo tardio, mediada por células T hapteno-específicas (BONNEVILLE et al., 2007).

Os haptenos penetram na epiderme e são captados pelas células epidérmicas incluindo as células dendríticas que migram para os linfonodos de drenagem, onde apresentam a proteína conjugada ao hapteno às células T. Os precursores de células T específicos expandem-se clonalmente nos linfonodos de drenagem, recirculam pelo sangue e migram aos tecidos, inclusive à pele. Quando o mesmo hapteno é aplicado sobre a pele, ele é captado pelas células epidérmicas, inclusive as células dendríticas e os queratinócitos, que apresentam o hapteno conjugado a proteína às células T específicas. A ativação de linfócitos T CD8+ induz a apoptose dos queratinócitos e a produção de citocinas e quimiocinas pelas células cutâneas, o que leva ao recrutamento de leucócitos do sangue para a pele. Os linfócitos T CD4+ podem bloquear a ativação/expansão dos efetores CD8+ nos linfonodos durante a sensibilização, e na pele durante a fase de indução da hipersensibilidade de contato (HENNINO et al., 2005). Na dermatite de contato há também uma hiperplasia da epiderme e um marcado infiltrado de células inflamatórias na derme, dando o aspecto de reação inflamatória descamativa (FUJII et al., 2003).

A DAC corresponde à reação de hipersensibilidade do tipo IV e serve de base para a compreensão da imunidade celular. Os vários eventos que ocorrem, permitem dividir a DAC em três etapas: fase de indução ou imunização (via aferente), fase de elicitação (via eferente) e fase de resolução (BELSITO et al., 1999).

2.1.2.1 Etapas da dermatite alérgica de contato

a) Fase de indução ou imunização: Nessa fase, a substância química (hapteno) que entra em contato com a pele é o fator desencadeante da DAC. Os haptenos são substâncias de baixo peso molecular, com reatividade química e solubilidade lipídica capaz de promover sua penetração no extrato córneo e reagir com componentes do sistema imune. O hapteno forma ligações covalentes com proteínas da pele, resultando em um conjugado hapteno-proteína. Esse conjugado hapteno-proteína é o antígeno, que por sua vez, liga-se ao carreador protéico (glicoproteínas) da membrana plasmática das células de Langerhans. Os genes HLA-DR é que dão a especificidade ao carreador protéico. Para que a sensibilização de contato ocorra, o hapteno precisa permanecer na pele de 18 a 24 horas (GRABBE et al., 1998).

As células de Langerhans (CL) são células dendríticas, derivadas da medula óssea cada uma com aproximadamente 12 dendritos, que permitem a ligação entre células, formando uma rede, o que facilita o contato com o antígeno. Constituem 3 a 8% das células epidérmicas e estão localizadas na camada suprabasal da epiderme. São células apresentadoras de antígeno, expressam antígenos da classe II e apresentam também receptores para C3 e fração Fc da IgG. Dependendo do antígeno, as células de Langerhans podem ligar-se a ele ou processá-lo internamente para formar um antígeno completo. A presença do complexo antígeno-células de Langerhans nos vasos linfáticos é observada de duas a quatro horas após o contato da pele com o antígeno. Em período que varia de quatro a seis horas, os antígenos estão presentes nas áreas das células T dependentes dos linfonodos. Estudos demonstraram que a destruição de vasos linfáticos aferentes, responsáveis pela drenagem da pele, poderia evitar a sensibilização. Essa observação demonstrou o papel da drenagem linfática na imunização e sugeriu a importância do gânglio linfático regional na sensibilização (BELSITO et al., 1999. BELSITO et al., 2003).

O antígeno ligado à célula de Langerhans entra em contato com o linfócito CD4+, através do receptor da célula T (TCR). Este encontro antígeno-LT ocorre no gânglio linfático regional, com proliferação de LT contra o antígeno. A apresentação do antígeno pelas células de Langerhans às células T é regulada pela interleucina-6 (IL-6) e pelo fator transformador de crescimento (TGF- β), produzidos pelas células de Langerhans. Um grupo de células T se diferencia em células de memória e outros se tornam LT efetores que circulam, pelo sangue, em todo corpo, levando à disseminação da sensibilidade de contato. As células de memória e as efetores são células Th0 (células T naive) que passam a Th1, por ação de interleucina-12

(IL-12) produzida pelas células de Langerhans. Assim, a neutralização da interleucina-12 previne a fase de indução da dermatite alérgica de contato (não formam células de memória), induzindo tolerância ao hapteno, pois interfere na diferenciação de Th0 para Th1. O tempo mínimo para se completar a fase de indução é de quatro a cinco dias. Em seres humanos é necessário período de 14 a 21 dias até que as células efectoras voltem a circular na pele (BELSITO et al., 1999).

b) Fase de elicitação: As células T efectoras circulam pelo corpo e dentro da pele, fazendo com que os pacientes se predisponham a desenvolver DAC. A fase de elicitação ocorre quando o indivíduo previamente sensibilizado entra de novo em contato com o antígeno. A seqüência inicial é idêntica a que acontece com o indivíduo não sensibilizado, ou seja, formação do complexo hapteno-carreador protéico. O reconhecimento do antígeno se dá pelas células T de memória antígeno-específicas, que se dirigem ao local da aplicação do antígeno na pele. Em período de 24 a 48 horas a reação inflamatória se desenvolve. As células T passam pelas células endoteliais ativadas com auxílio de moléculas de adesão - ICAM-1. Essas moléculas de adesão são ativadas pela IL-1 e TNF- α que, por sua vez, são secretadas pelos queratinócitos epidérmicos. Na via eferente da DAC ocorre liberação de uma série de citocinas, tanto pelos queratinócitos, quanto pelos linfócitos T ativados e pelas células de Langerhans (OPPENHEIN et al., 1991. PIGUET et al., 1991. HAJJAR, 1999).

As principais citocinas que mantêm a fase de elicitação da DAC são (CAMPOS et al., 2003):

- Interleucina-1 (IL-1): secretada pelos queratinócitos, células de Langerhans e pelos linfócitos T ativados (Th1), é também conhecida como fator ativador de linfócito. Suas funções principais são aumentar ação das células de Langerhans, regular a expressão HLA-DR nessas células, controlar a resposta proliferativa das células T e ativar células T a sintetizarem interleucina-2 (IL-2) e IFN- γ , além de regular a ação das moléculas de adesão (ICAM-1).
- Interleucina-2 (IL-2): ou fator de crescimento das células T. A IL-2 amplifica a resposta imune e estimula as células T a aumentarem a secreção de INF- γ .
- Interferon gama (INF- γ): secretado pelas células T tipo Th1, o INF- γ amplifica a resposta imune, aumentando a expressão HLA-DR nas células de Langerhans, ativa células T citotóxicas, células *natural killer* (NK) e macrófagos, e aumenta a produção de IL-1 e do fator de necrose tumoral (TNF- α).

- Fator de necrose tumoral (TNF- α): secretado pelos queratinócitos, é reconhecido como regulador da expressão de moléculas de adesão (ICAM-1) em queratinócitos e em células do endotélio vascular. Piguet et al. (1991), em estudo experimental, demonstraram que o TNF- α tem ação tanto na DCIP como na DAC.
- Interleucina-6 (IL-6): é uma citocina produzida por vários tipos de células, como linfócitos T, células endoteliais vasculares e fibroblastos. É regulada pela IL-1 e TNF- α aumenta a ação das células T mantendo a DAC.
- Interleucina-3 (IL-3) ou fator estimulante de macrófagos: é uma citocina inflamatória produzida por linfócitos T ativados, células NK, mastócitos e queratinócitos. Atua como fator de crescimento e de maturação para células da medula óssea, células T, mastócitos e basófilos.

c) Fase de resolução da dermatite alérgica de contato: A terceira etapa do mecanismo imunológico da DAC corresponde ao término da reação inflamatória. Nessa fase, também são liberadas citocinas que, ao contrário das que são liberadas nas fases anteriores, inibem a reação imunológica. A IL-10 ou fator inibidor da síntese de citocinas inibe a secreção de tais substâncias pelas células Th1 e regula os queratinócitos na fase tardia da DAC, deprimindo a resposta imune (DUARTE et al., 2005).

Além da ação da IL-10, mastócitos e basófilos podem influenciar na resolução da DAC. Após 48 horas do estímulo antigênico ocorre degranulação de mastócitos, que coincide com o início do declínio da resposta imune. Os basófilos podem exercer a mesma função dos mastócitos. Em humanos, de 5% a 15% das células do infiltrado de algumas DAC são basófilos, o que constitui uma grande proporção quando a reação inflamatória está na fase de resolução. Outro mecanismo importante é que, sob estímulo do INF- γ , os macrófagos produzem prostaglandinas do tipo E. Sabe-se que prostaglandina E1 e E2 inibem a produção de IL-2, que como já foi relatado, tem importante papel na fase de elicitação de DAC. Além disso, a liberação de heparinase pelos linfócitos T age na produção de TNF- α . Assim, várias células que liberam elementos responsáveis pelo início da reação imunológica podem, também, a partir de uma etapa subsequente, iniciar a produção de outros fatores responsáveis pela resolução da resposta alérgica (MINTERN et al., 2002).

2.1.2.2 Fatores que interferem na dermatite alérgica de contato

- Idade: As crianças apresentam dermatite alérgica de contato (DAC) frequentemente por

medicamentos tópicos, roupas, sensibilizantes em sapatos e algumas plantas. Durante a infância, a pele é menos reativa aos sensibilizantes de contato; a competência das células T mediadas na resposta imune é controversa. A menor resposta seria devida à exposição limitada aos alérgenos e não à deficiência imunológica. Os idosos também apresentam DAC com frequência, sendo sua causa mais comum medicamentos tópicos normalmente utilizados em úlceras de estase (PREARO et al., 2005).

- Gênero: Pouca diferença existe em relação à susceptibilidade à DAC por um gênero ou outro. A diferença, em geral, está relacionada à intensidade de exposição aos alérgenos. Nas mulheres é mais comum a sensibilização por níquel e perfumes. Nos homens é comum sensibilização por cromo (indústria, construção civil) e outras substâncias relacionadas com dermatoses ocupacionais (GBEDC, 2000).
- Etnia: A ocorrência de DAC é semelhante na pele branca e negra (MCDONALD et al., 1973). Alguns autores estudaram diferenças físico-químicas e susceptibilidade aos alérgenos, e sugerem que a pele negra é mais resistente do que a branca (ANDERSEN et al., 1979).
- Profissão: A DAC corresponde a percentual que varia de 25 a 30% de todas as dermatoses ocupacionais (HOLNESS et al., 1991). As condições de trabalho e seus meios de proteção estão diretamente relacionadas às chamadas sensibilizações ocupacionais. Dependendo do contato com substâncias em seu ambiente de trabalho, o indivíduo pode estar exposto às sensibilizações. É comum o trabalhador da construção civil, sensibilizar-se por substâncias como o cromo e o cobalto (pelo contato com cimento) e posteriormente pelos componentes da borracha (devido ao uso de luvas para proteção) (GBEDC, 2002).
- Localização: Por se tratar de uma dermatite de contato exógena, as principais localizações são as correspondentes às partes do corpo com maior exposição aos materiais que compõem o ambiente: em primeiro lugar, as mãos, seguidas da face, do pescoço, dos pés e do tronco. O local envolvido corresponde àquele da exposição principal ao alérgeno. Entretanto, as lesões podem ultrapassar o local de contato e até se estender para áreas distantes (auto-sensibilização). A localização da dermatose direciona a história, orienta o diagnóstico e auxilia a interpretação do quadro (HAJJAR et al., 1999).

2.1.3 Dermatite de Contato Fototóxica

Essas reações são mais frequentes do que as fotoalérgicas e teoricamente, qualquer

indivíduo pode desenvolvê-las, desde que esteja exposto a quantidades do agente e de luz suficientes para produzi-las. Fatores próprios do indivíduo e ambientais explicam por que alguns indivíduos não a desenvolvem quando em contato com as mesmas substâncias. A maioria das substâncias causadoras dessas reações tem sua distribuição nas camadas mais profundas da pele. Desse modo, seriam ativadas pela radiação ultravioleta A (UVA) que é capaz de penetrar até a derme média. Entretanto, algumas substâncias podem ser ativadas pela ultravioleta B (UVB), por ambas ou até pela luz visível (GALHACHER et al., 1998).

Para que uma reação fototóxica possa ocorrer é necessário que a energia radiante seja absorvida por uma molécula denominada cromóforo, por exemplo, DNA ou melanina. Essa absorção é determinada pelo arranjo dos átomos dessas moléculas. A interação da energia absorvida pelos cromóforos e a substância fotossensibilizante determina a formação de radicais livres, moléculas de vida muito curta e que seriam as iniciadoras do processo de dano celular. Esse dano ocorre principalmente na membrana celular, o que resulta em alterações iônicas, como o influxo de cálcio para a célula, ativando a Fosfolipase A2. Essa enzima é a responsável pela liberação do ácido aracdônico, de cujo metabolismo resulta a formação das prostaglandinas e leucotrienos, importantes mediadores inflamatórios, que causam vasodilatação, vasoconstrição, além de potencializar a ação de histamina, bradicinina e serotonina, substâncias vasoativas liberadas pelos mastócitos (NILSON et al., 1993; OLSZEVER et al., 1995; GOULD et al., 1995; KALISH et al., 1997).

Clinicamente evidencia-se a presença de eritema, edema e algumas vezes a presença de bolhas em áreas expostas à luz, lembrando ocasionalmente queimadura solar com características exageradas. Esse processo pode ser seguido de hiperpigmentação. As áreas mais afetadas são a face, a região posterior do pescoço, a superfície extensora dos antebraços, a face anterior das pernas, existindo limite preciso entre as áreas afetadas e as não comprometidas. Os sintomas podem variar desde sensação de queimação e prurido leve ou intenso até dor. Uma vez que esse quadro não é mediado por processos imunes, a reação pode surgir minutos ou horas após a exposição solar e não requer o contato prévio com o agente causador (HOST et al., 2002).

Como principais agentes fototóxicos, têm-se os psoralênicos, que são encontrados principalmente em plantas como o limoeiro, a figueira e o cajueiro. Alguns psoralênicos são utilizados como medicamentos auxiliares na fototerapia, como o trisoralen, o metoxalem e o bergapten (FLORI et al., 1993).

2.1.4 Dermatite de Contato Fotoalérgica

O mecanismo etiopatogênico é o mesmo da dermatite alérgica de contato. A formação

da reação imunológica do tipo IV necessita da presença concomitante da radiação apropriada e do fotoalérgeno. Após a absorção da energia da luz, a substância é convertida em molécula em estado ativado. Nesse processo, a molécula une-se a carreador protéico para formar um antígeno completo. Uma vez formado o antígeno, o mecanismo que se segue é o mesmo da DAC. Um exemplo comum no Brasil é a dermatite de contato desencadeada por anti-histamínicos de uso tópico. Outras substâncias fotoalérgicas de uso tópico são perfumes, antiinflamatórios não esteróides e antimicóticos tópicos (BERARDESCA et al., 1997).

2.1.5 Dermatite de Contato não Eczematosa

A dermatite alérgica de contato ou por irritação primária normalmente se apresenta como eczema. Em alguns casos, porém, essa dermatite pode não ser eczematosa, assumindo aspectos de dermatite de contato tipo eritema multiforme, de dermatite de contato purpúrica, de dermatite de contato hipercromiante, de dermatite de contato hipocromiante, de dermatite de contato liquenóide, de dermatite de contato acneiforme, de dermatite de contato hiperqueratósica, de dermatite de contato pustulosa e de urticária de contato (BASKETTER et al., 1998).

2.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da dermatite de contato é feito por meio de história clínica detalhada, observando tempo de aparecimento das lesões (TOSTI et al., 2001), o número de surtos apresentados, histórias anteriores relacionadas, atividades profissionais, outras atividades habituais e contato com substâncias químicas (ELDER et al., 1997). O quadro clínico manifestado na maioria das vezes como eczema agudo, subagudo ou crônico, tendo como localizações principais as já referidas (BELSITO, 2003).

2.1.6.1 Exame Histopatológico

O exame histopatológico está indicado para auxiliar no diagnóstico diferencial de dermatoses não eczematosas, apresentando as seguintes alterações (ELDER et al., 1997. PEREIRA, 2001):

- a) *Eczema agudo*: estrato córneo normal, epiderme normal ou espessada com a presença de edema entre queratinócitos, progredindo para a formação de vesículas intra-epidérmicas;

presença de exocitose de linfócitos (presença de linfócitos na epiderme), infiltrado linfocitário ao redor dos vasos superficiais; eosinófilos podem estar presentes tanto no infiltrado como nas áreas de espongiose (desorganização da camada basal devido ao edema intercelular) (PEREIRA, 2001; ONDER, 2002); na DCIP dependendo do agente irritante pode ocorrer ulceração extensa, necrose e acantólise (processo de separação ou dissolução das pontes intercelulares da camada de células espinhosas da epiderme);

- b) *Eczema subagudo*: epiderme acantótica (aumento da espessura da epiderme, geralmente devido ao espessamento do estrato espinhoso), com paraqueratose, pouca ou moderada espongiose (desorganização da camada basal devido ao edema intercelular) e infiltrado inflamatório menos proeminente;
- c) *Eczema crônico*: hiperqueratose, paraqueratose (distúrbio de queratinização da pele caracterizado pelo desaparecimento da camada granulosa e a persistência das células com o núcleo na sua camada córnea), hipergranulose, acantose (aumento da espessura da epiderme, geralmente devido ao espessamento do estrato espinhoso) moderada e espongiose em focos mínimos; infiltrado inflamatório esparso e presença de fibrose nas papilas dérmicas.

2.1.6.2 Teste de contato

O teste de contato ou teste epicutâneo é o método mais eficiente para confirmar o diagnóstico etiológico da dermatite alérgica de contato. A presença de teste positivo a certa substância, relacionada com a história clínica do paciente, possibilita identificar os materiais que, em contato com sua pele, podem desencadear um quadro eczematoso. O mecanismo etiopatogênico dos testes de contato é o mesmo da dermatite alérgica de contato. Ao se aplicar um teste epicutâneo, objetiva-se induzir no paciente a segunda fase da dermatite alérgica de contato, ou seja, a via eferente da reação imunológica do tipo IV. Com isso, frente a um teste positivo, espera-se encontrar, no local da aplicação do teste, uma reação eczematososa de intensidade variável de acordo com a resposta do indivíduo (RAJOGOPALAN et al., 1998).

As principais indicações para realização dos testes de contato são os pacientes com hipótese diagnóstica de dermatite alérgica de contato. Além do teste de contato outros testes são utilizados no diagnóstico da dermatite de contato, como o teste provocativo de uso, utilizado para confirmar a presença de substância sensibilizante em material utilizado pelo paciente. O material é aplicado na dobra cubital duas vezes ao dia durante uma semana. A presença de reação positiva confirma dermatite alérgica de contato desencadeada pela

substância positiva no teste epicutâneo previamente realizado, e presente no material utilizado. Outro, o teste aberto, é utilizado para materiais irritantes no teste fechado (teste epicutâneo padrão). O material é aplicado sobre a pele normal (geralmente região retroauricular) duas vezes ao dia durante dois dias. Também, o fototeste, é utilizado para substâncias fotossensibilizantes. A técnica é a mesma do teste fechado. As substâncias são aplicadas em ambos os lados do dorso, e após 48 horas os testes são retirados, sendo realizada a primeira leitura. A seguir, um dos lados é irradiado com radiação ultravioleta A na dose de 10mJ/cm², enquanto o outro lado é coberto para proteção apenas durante a irradiação do primeiro. A segunda leitura é realizada 96 horas depois, comparando-se os resultados entre o local irradiado e o não irradiado (RITCHEL et al., 1997).

2.1.7 Tratamento

Na dermatite de contato por irritante primário do tipo absoluto (aguda), a retirada do agente leva, na maioria dos casos, à melhoria da condição. As compressas com substâncias adstringentes como água de Alibour (de 1/10 até 1/20) ou líquido de Burrow são utilizados nas lesões secretantes ou com bolhas e vesículas. Os corticóides tópicos podem ser usados para atenuar o processo inflamatório (RAMSING et al., 1995).

Em casos extensos, corticóides sistêmicos são empregados em doses de 0,5 a 1mg/kg/dia por curtos períodos. Os antiinflamatórios não hormonais auxiliam no controle da inflamação. Na fase de recuperação, a tendência é a descamação da pele e nesses casos, cremes hidratantes são úteis (SITTART et al., 1998).

Na dermatite de contato por irritante primário do tipo crônica cumulativa, porém a retirada do agente nem sempre leva à melhora rápida da condição. Os cremes hidratantes, como uréia 10%, cremes com silicone a 10% e outros ajudam na hidratação e na proteção da pele (SITTART et al., 1998). Os corticóides tópicos na forma de cremes ou pomadas devem ser utilizados para o controle da dermatose. A ação dos corticóides pode ser tempo e dose-dependente. O tratamento com essas drogas durante a fase inicial de apresentação do antígeno pode resultar no desenvolvimento de tolerância pela supressão do desenvolvimento de células dendríticas secretoras de IL-10. Estas últimas são requeridas para indução dos linfócitos T reguladores CD4⁺, CD25⁺ e FOXP3⁺ (células Tregs) (LIMA, 2007).

Os corticóides sistêmicos são raramente empregados. Nos casos em que haja associação com dermatite atópica, os anti-histamínicos são necessários para o controle do prurido (SITTART et al., 1998). São alternativas de tratamentos a fototerapia, o coaltar a 5%

em creme e o calcipotriol (SCHALKIJK et al., 1997; SITTART et al., 1998). O FK 506 (tracolumus) também foi estudado na inibição da irritação produzida na pele de porcos da Guiné com bons resultados (LAUERMA et al., 1994).

Em todos os casos de dermatite de contato por irritante primário, a prevenção é realizada pelo uso de equipamentos de proteção, como luvas, botas, roupas adequadas e outros. Na dermatite alérgica de contato, o primeiro passo no controle da DAC é a identificação do agente agressor, evitando-o e fazendo uso de alternativas. Na identificação do alérgeno, o teste de contato é fundamental. Do ponto de vista econômico, foi demonstrado que o teste de contato tem a melhor relação custo-benefício e reduz os custos finais do tratamento da DAC (RAJOGOPALAN et al., 1998).

Os tratamentos incluem a terapia para os sintomas (anti-histamínicos) ou terapia imunossupressiva (corticóides, ciclosporina, etc.). No tratamento do eczema agudo utilizam-se compressas úmidas com permanganato de potássio de 1/40.000 até 1/60.000 ou líquido de Burrow ou água de Alibour 1/10 ou 1/20. Os corticosteróides tópicos em creme devem ser utilizados, e em casos extensos, utilizar corticosteróides por via oral. Os autores preferem o uso da prednisona 1mg/kg/dia, por cinco dias, com redução da dose pela metade e manutenção por período que pode variar de 10 a 14 dias. Importante no tratamento da DAC é a manutenção da terapia por no mínimo 10 dias, pois vários estudos comprovaram a persistência do alérgeno na pele por vários dias. Os anti-histamínicos por via oral são úteis apenas no controle do prurido. Se houver infecção secundária, devem ser prescritos antibióticos, de preferência por via sistêmica, uma vez que os tópicos são sensibilizantes comuns. No tratamento do eczema subagudo utilizam-se cremes de corticosteróides e anti-histamínicos de uso sistêmico se necessário. Os corticóides sistêmicos apenas nos casos extensos. Já nos casos de eczema crônico, a preferência é pelos corticóides em forma de pomada ou unguento. Em alguns casos, emprega-se corticosteróides oclusivos. Se as lesões se apresentarem como líquen simples crônico, fazem-se infiltrações intralesionais com triancinolona (SITTART et al., 1998).

2.1.7.1 Mecanismos de ação das principais drogas utilizadas no tratamento da DAC

As principais drogas utilizadas no controle da DAC são os corticosteróides, que possuem vários efeitos sob o sistema imune. Eles inibem a ativação e proliferação de linfócitos antígeno-específicos com efeitos também nas células apresentadoras de antígenos. Esses processos envolvem a depleção de moléculas CD1 e HLA-DR nas células de

Langerhans, a inibição da liberação de IL-2 e IFN- γ por linfócitos T e a inibição da produção de IL-1 e TNF- α . Mediante esses mecanismos, os corticosteróides inibem tanto a via aferente como a eferente da DAC (FUNK et al., 1994).

A histamina não está envolvida diretamente na patogênese da DAC. Os anti-histamínicos são usados devido aos seus efeitos antipruriginosos e sedativos. Dá-se preferência aos anti-histamínicos clássicos, tal como a difenidramina, meclastina ou hidroxizina (FUNCK et al., 1994; SITTART et al., 1998).

Os imunossuppressores convencionais, a azatioprina e a ciclofosfamida não são usualmente utilizadas para o tratamento da DAC devido aos seus efeitos mielotóxicos, embora interfiram na patogênese da dermatose. A azatioprina inibe as funções dos linfócitos T, a imunidade mediada por células, as funções de células B e várias outras funções linfocitárias. A fase efetora da resposta imune é inibida, mas não a fase indutora. Por outro lado, a ciclofosfamida suprime tanto a fase indutora como a efetora. A única indicação dessas medicações seria na dermatite actínica crônica, em que o quadro eczematoso, principalmente em áreas expostas ao sol, persiste mesmo após a retirada do alérgeno (HO et al., 1993).

A ciclosporina tem, em relação aos imunossuppressores, a vantagem de não ser mielotóxica e, seletivamente afetar as células T com poucos efeitos sobre outras células do sistema imune. Assim, os riscos de infecção e malignidade são menores. No entanto, a ciclosporina é nefrotóxica, e sua segurança a longo prazo ainda não está estabelecida. A ciclosporina inibe a produção de citocinas, especialmente IL-2 e IFN- γ , resultando em diminuição da ativação de células T, monócitos/macrófagos e queratinócitos. A maioria dos linfócitos T presentes no infiltrado inflamatório das lesões de DAC expressa em sua membrana o antígeno LFA-1 (antígeno de função leucocitária). Uma vez que a migração de linfócitos é realizada por intermédio das moléculas de adesão, como ICAM-1, sua inibição pode resultar na diminuição da migração de linfócitos portadores do antígeno de função leucocitária (LFA-1) e células apresentadoras de antígenos para a epiderme. A função de linfócitos T supressores não é inibida pela ciclosporina. A via de ação da ciclosporina é relacionada à inibição dos processos cálcio-dependentes, por sua ligação à ciclofilina e calmodulina, duas proteínas envolvidas no sinal dos processos de transdução, ou seja, participam de reações químicas fundamentais para a realização das funções celulares. Trabalho anterior relata o sucesso do tratamento de paciente portador de DAC grave com ciclosporina. No entanto, devido à nefrotoxicidade e ao custo alto, essa não é uma droga de escolha para a maioria dos casos de DAC (FLORI et al., 1993).

As tentativas de formulações tópicas mostraram resultados controversos. O principal

problema da ciclosporina tópica é sua permeabilidade mínima na pele. Assim, a maioria das formulações tópicas não atenua a DAC. Entretanto, formulações de ciclosporina com potencializadores da absorção cutânea, como propilenoglicol e azona, inibiram significativamente a DAC em porcos da Guiné (THOMPSON et al., 1986; BIREN et al., 1989).

O FK 506 (tacrolimus), um produto do fungo *Streptomyces tsukubaensis*, representa uma nova classe de macrolídeos imunossupressores. Apesar de suas diferenças estruturais em relação à ciclosporina, ambas as drogas têm propriedades imunossupressoras similares, embora o FK 506 seja mais potente. O FK 506 inibe a calcineurina, uma proteína que age como sinalizador na ativação de células T depois de ligar-se a uma proteína intracelular chamada FK BP12. O FK 506, seletivamente, inibe a produção de citocinas de células T e macrófagos, isto é, a produção de IL-2 (e a expressão de seu receptor), IL-3, IL-4, IL-5, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF (fator estimulador de colônias granulócito/macrófago). A produção de IL-6 e IL-10 não é afetada. Os resultados com o uso do FK 506 em cremes na inibição da DAC foram promissores. Por enquanto, o maior problema para o uso em larga escala do FK 506 é seu alto custo (LAUERMA et al., 1994).

A fototerapia com UVB pode bloquear a indução e elicitação da DAC por vários mecanismos. O número de células de Langerhans HLA-DR positivas diminui significativamente. As células apresentadoras de antígeno não-Langerhans também são inibidas. A hiperplasia epidérmica é induzida, o que contribui para a inibição da ligação do antígeno às células de Langerhans. A modulação da expressão de ICAM-1 é uma propriedade imunossupressora descrita, da luz UV, de grande contribuição para a efetividade terapêutica da fototerapia nas doenças inflamatórias da pele. A pentoxifilina inibe a formação de RNA mensageiro de TNF- α . Sendo esse um importante mediador na fase de elicitação da hipersensibilidade de contato, sua inibição é uma estratégia promissora no controle da DAC. Um estudo sobre a inibição do teste de contato com pentoxifilina mostrou inibição em dois pacientes alérgicos ao níquel. Não existem estudos clínicos controlados que mostrem a eficácia da droga na DAC (FUNK et al., 1994).

Os derivados da vitamina D3 são compostos investigados principalmente para o tratamento da psoríase. O calcipotriol é o mais estudado, e supõe-se que também teria ação na DAC. A proliferação e produção de citocinas pelas células T é inibida *in vitro* pela vitamina D3 (LE et al., 1997).

Vários estudos de hipossensibilização foram realizados, sugerindo benefício no controle da DAC. A hipossensibilização que parece ser eficaz apenas para alguns alérgenos, é

específica e de curta duração. O pré-requisito para seu uso é a condição de que o alérgeno não seja tóxico e seja bem absorvido pelo trato gastrointestinal. O níquel e o urushiol são exemplos positivos de estudos clínicos. O princípio deste tratamento é a utilização do antígeno ou de um composto relacionado por via oral ou subcutânea em doses crescentes, na tentativa de obter tolerância. Essa modalidade de tratamento é bastante usada em reações de hipersensibilidade tipo I respiratórias, como a asma e a rinite alérgicas. Na DAC de contato, no entanto, os relatos sobre hipossensibilização são raros, e os resultados, variados e nem sempre confirmados por outros autores. Os mecanismos hipotéticos incluem a ativação de macrófagos, a depleção de linfócitos T reativos, o bloqueio de receptores e a indução de linfócitos T supressores específicos. A limitação do uso é a falta de eficácia a longo prazo, pois, na maioria dos relatos, a melhora obtida só ocorre durante o uso de agente hipossensibilizante (FUNK et al., 1994).

Um estudo comparou a eficácia de um composto tópico com extrato de Ginkgo biloba e b-glucana com placebo em 22 pacientes com DAC. Em 68,2% dos pacientes tratados com a formulação a DAC foi inibida (CASTELLI et al., 1998).

A ascomicina (SDZ ASM 981) é um antiinflamatório derivado de um fungo que foi usado em modelos experimentais de DAC. A potência desse composto é semelhante à do clobetasol (MEINGASSNER et al., 1997). Trabalho realizado anteriormente, descreveu a ação do sulfato de zinco em pacientes sensíveis ao sulfato de níquel. De 15 pacientes testados, houve negatização do teste de contato ao sulfato de níquel em 12 destes (SANTUCCI et al., 1999).

2.1.7.1.1 Dexametasona

Sob a designação comum de corticosteróides (esteróides do córtex supra-renal e análogos de síntese) engloba-se os glicocorticóides com ações metabólicas (metabolismo glucídico, lípidico, protídico, fosfocálcico) e anti-inflamatórios típicos e mineralocorticóides com ações reguladoras do equilíbrio eletrolítico. Um dos principais objetivos no desenvolvimento dos análogos de síntese foi o da obtenção de esteróides com ação anti-inflamatória mais potente e prolongada do que a do cortisol (principal glicocorticóide) e com menos efeitos mineralocorticóides (OSSWALD, 2001; GUIMARÃES, 2001). Por conseguinte, a dexametasona é um potente glicocorticóide com pouca atividade mineralocorticóide (GRAHAME-SMITH, 2002; ARONSON, 2002). O pré-tratamento com dexametasona é capaz de ampliar a população de células Tregs (linfócitos T reguladores). A

manutenção dos níveis do corticóide possibilita a ampliação dos linfócitos Tregs. Esse efeito pode ser observado *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, esse mesmo uso, a longo prazo, pode ampliar a população das células causadoras da doença auto-imune. Portanto, os tratamentos com corticosteróides podem aumentar a resposta T de ação subsequente e agravar a no longo prazo o curso das doenças inflamatórias (LIMA, 2007).

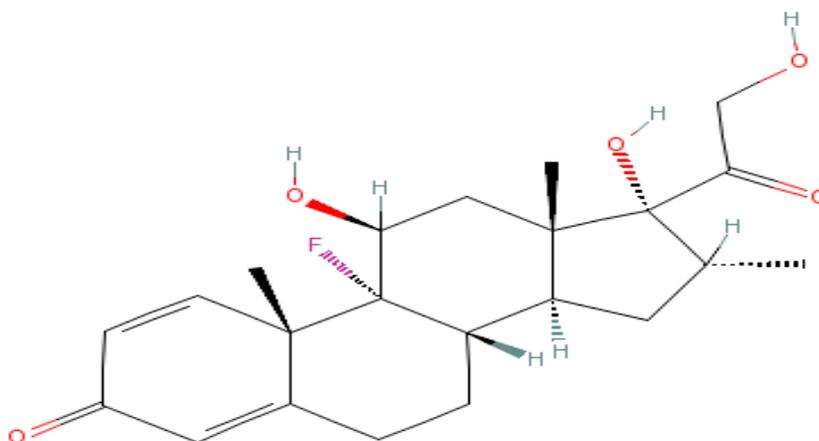


Figura 1 – Dexametasona (INCHEM; DEXAMETHASONE; 2006).

A dexametasona é usada quando os efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores dos corticosteróides são desejados, especialmente para tratamentos intensivos durante períodos curtos (BRAUNWALD et al., 2003). Nos estados alérgicos, controle de situações alérgicas graves ou incapacitantes que não respondem a tentativas terapêuticas adequadas com os recursos convencionais: na rinite alérgica perene ou sazonal; asma brônquica; dermatite de contato; dermatite atópica; doença do soro; reações de hipersensibilidade medicamentosa (AMANTEA et al., 2002).

- Afecções Reumáticas: a dexametasona é usada como terapêutica adjuvante administrada a curto prazo durante um episódio agudo ou de exacerbação de artrite psoriática; artrite reumatóide, incluindo a artrite reumatóide juvenil; espondilite anquilosante; bursite aguda ou sub-aguda; tenosinovite aguda inespecífica; Artrite gotosa aguda; osteoartrite pós-traumática; sinovite das artroses; epicondilite (HARDMAN et al., 2001).
- Doenças Cutâneas: pênfigo; dermatite bolhosa herpetiforme; eritema exsudativo multiforme grave (síndrome de Steven-Johnson); dermatite exfoliativa; micose fungóide; psoríase grave; dermatite seborreica grave (COSTA et al., 2005).
- Doenças Oculares: a dexametasona é usada em processos alérgicos e inflamatórios graves, agudos e crônicos envolvendo o olho e seus anexos, tais como a conjuntivite alérgica;

queratite; úlceras alérgicas marginais da córnea; herpes zoster oftálmico; irite e iridociclite; coriorretinite; inflamação do segmento anterior; uveíte posterior difusa e coroidite; nevrite óptica; oftalmia simpática (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2005).

Outras doenças tratadas com dexametasona podem ser as doenças endócrinas, respiratórias, hematológicas, neoplásicas, estados edematosos, doenças gastrointestinais, tratamento adjuvante na meningite bacteriana; a dexametasona administrada antes ou concomitantemente com a terapêutica anti-bacteriana permite tratamento adjuvante da meningite bacteriana, na medida em que atua como anti-inflamatório do espaço subaracnóide, reduzindo a mortalidade e o choque séptico, e melhorando os resultados clínicos (VAN DE BEEK et al., 2006).

Os corticosteróides exercem efeitos sobre quase todas as células, influenciando o metabolismo proteico, lipídico e glicídico, o balanço hidroeletrolítico, as funções cardiovascular, renal, da musculatura esquelética, do sistema nervoso e de praticamente todos os tecidos e órgãos. Desempenham um papel importante na homeostasia. Os corticosteróides combinam-se com proteínas receptoras citosólicas e, a seguir, esse complexo liga-se à cromatina no núcleo da célula. As RNA polimerases são ativadas e ocorre transcrição de mRNA específicos, resultando na síntese de proteínas nos ribossomos. Muitas das ações dos glicocorticóides dependem da síntese de proteínas, e deve-se pressupor que essas proteínas sejam elas enzimas ou fatores reguladores que controlam as funções celulares apropriadas e determinam os efeitos farmacológicos anteriormente descritos (OSSWALD, 2001; GUIMARÃES, 2001).

Algumas das ações anti-inflamatórias dos corticosteróides podem resultar dos seus efeitos inibitórios sobre a síntese das prostaglandinas. Esse efeito também é medido pela síntese de proteínas, visto que os corticosteróides induzem a síntese de transcortina e macrocortina – proteínas que inibem a síntese de prostaglandinas através da inibição da fosfolipase A2. As respostas mediadas por células podem ser inibidas indiretamente pela inibição da produção de determinadas citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral e as interleucinas. Os glicocorticóides exercem efeitos imunossupressores, pois inibem as funções dos linfócitos, as respostas das células B e das células T a antígenos, com conseqüente comprometimento da imunidade tanto humoral como celular (GRAHAME-SMITH, 2002; ARONSON, 2002).

Algumas precauções devem ser tomadas para o uso de dexametasona. Deve-se utilizar a mais baixa dose possível de corticosteróides para controle da situação em tratamento e,

quando viável, a redução posológica deverá ser gradual, pois os corticosteróides podem exacerbar infecções sistêmicas por fungos e, conseqüentemente, também não devem ser usados quando estão presentes essas infecções. A terapêutica com corticosteróides deve ser usada com grande precaução em indivíduos com enfarte do miocárdio recente, pois elevadas doses de dexametasona podem causar elevação da pressão arterial, retenção de sal e água, e aumento da excreção de potássio. Pode ser necessária a restrição dietética do sal e a suplementação de potássio. Todos os corticosteróides aumentam a excreção de cálcio. O álcool pode aumentar o risco de efeitos adversos, quando associado ao uso de corticosteróides, devendo-se evitar o consumo de álcool. Após tratamento prolongado, a suspensão dos corticosteróides pode causar uma síndrome caracterizada por febre, mialgias e mal-estar (JEROLD et al., 2002).

Quanto à toxicidade, há dois tipos de efeitos tóxicos associados à terapêutica com corticosteróides: os resultantes do abandono da terapêutica e os de administração de doses supra-fisiológicas. Na terapêutica com corticosteróides, deve-se sempre avaliar o balanço risco/benefício para cada paciente, de forma a minimizar os potenciais efeitos tóxicos. O problema mais freqüente associado ao abandono da terapêutica é o agravamento da doença para a qual foi prescrita a dexametasona. A terapêutica prolongada com doses supra-fisiológicas pode ter conseqüências tóxicas, sendo um dos mecanismos de toxicidade a desregulação da transcrição. Os glicocorticóides alteram a ativação dos fatores de transcrição (TFs), por mimetização dos ligantes endógenos ou por alteração do sinal de ativação, induzindo a apoptose de células linfóides (HARDMAN et al., 2001).

A ingestão aguda de dexametasona, mesmo em doses elevadas, raramente provoca problemas clínicos. Foi descrito um caso de suspeita de insuficiência adrenal aguda após overdose. As altas doses intravenosas têm uma incidência moderadamente elevada de efeitos adversos. A maioria das reações são neuropsiquiátricas, mas também ocorrem disritmias cardíacas, convulsões e choques anafiláticos. A exposição crônica resulta em efeitos adversos psicológicos incluindo a aparência cushingoide, fraqueza muscular e osteoporose. Os glicocorticóides estimulam a fibrose cardíaca pela regulação da expressão de colágeno cardíaco, independentemente das alterações hemodinâmicas. Há evidências clínicas da ocorrência de hipertrofia cardíaca em crianças prematuras sob tratamento com dexametasona (KLASSEN et al., 2001).

Como os glicocorticóides têm múltiplos efeitos na inibição do sistema imunológico e na resposta inflamatória, o uso de glicocorticóides está associado ao aumento da susceptibilidade à infecções. No caso da infecção ser diagnosticada deve-se administrar

glicocorticóides, somente se for necessário, e em associação com terapêutica antimicrobiana ou antifúngica (HARDMAN et al., 2001).

O efeito teratogênico é também notado, e apesar de ser racional a prescrição de um ciclo de tratamento de corticosteróides, o uso não deve ser excedido (VAN et al., 2005). Os glicocorticóides que atuam por mimetização dos ligantes endógenos, ativando os fatores de transcrição, induzem erros de expressão genética que tem como consequência malformações fetais (KLASSEN et al., 2001). Uma relação risco/benefício é favorável com uma dose única de corticosteróides administrada as grávidas em risco de parto pré-termo. A eficácia é demonstrada com a diminuição da mortalidade e morbidade. Há redução da eficácia quando são prescritos 2 ou mais ciclos de tratamento, na medida em que surgem efeitos adversos graves para o feto especialmente a nível neurológico (SLOBODA et al., 2005). Os recém-nascidos, de mães que receberam doses substanciais de corticosteróides durante a gravidez, deverão ser cuidadosamente observados para detecção de sinais de hipo-adrenalismo (SAIZOU et al., 2006). O excesso de glucocorticóides leva a gravidez rara, em mulheres com síndrome de Cushing, devido há amenorréia ou oligomenorréia que se evidencia em 75% destas mulheres por inibição da secreção da gonadotrofina (ARON et al., 1990).

2.2 NUCLEOTÍDEOS E SUA FUNÇÃO IMUNE

Os nucleotídeos extracelulares funcionam como sinalizadores moleculares em uma grande variedade de funções fisiológicas tais como reações imunes (DI VIRGILIO et al., 2001 a; YEGUTKIN et al., 2002), coagulação sanguínea, inflamação, reações imunes, contração muscular lisa e de proliferação celular (por exemplo, no desenvolvimento embrionário e câncer) (ROBSON et al., 2006). Em especial, o ATP é capaz de modular importantes processos tais como ativação, proliferação/citotoxicidade celular, desenvolvimento e funções efetoras dos linfócitos (DI VIRGILIO et al., 2000). Já o ADP não apresenta um papel definido nessas células (DOMBROWSKI et al., 1998). A hidrólise do ATP é controlada, em parte pela enzima NTPDase, a qual executa um importante papel em algumas funções dos linfócitos, como reconhecimento e/ou ativação das células T citotóxicas frente a um estímulo antigênico (FILLIPINI et al., 1990). Demonstrou-se que a secreção de importantes citocinas linfocitárias que são mediadas pelo ATP extracelular é dependente da hidrólise desse nucleotídeo e não da sua capacidade de ativar os receptores P2 (LANGSTON et al., 2003). Os nucleotídeos extracelulares possuem importantes papéis como moléculas sinalizadoras, tendo sido bem estabelecidos para diversos tecidos, incluindo o sistema cardiovascular, no qual medeiam

efeitos inflamatórios, antiinflamatórios e na agregação plaquetária (YEGUTKIN et al., 2002).

O ATP, quando secretado para o meio extracelular por células como plaquetas e linfócitos é capaz de mediar a resposta imune (IVANENKOV et al., 2005), uma vez que induz a secreção de importantes mediadores tais como interferon, e IL-2 por parte dos linfócitos T (DI VIRGILIO et al., 2001a; LANGSTON et al., 2003). Além de modular os processos de ativação, diferenciação, desenvolvimento e respostas efetoras dos linfócitos o ATP, dependendo das concentrações extracelulares, ainda é capaz de induzir dois efeitos antagônicos como a proliferação celular, quando em baixas concentrações, e a morte celular, quando em altas concentrações (DI VIRGILIO et al., 2000).

Entretanto, esse nucleotídeo é um importante estimulante da agregação plaquetária (KEUREN et al., 2007), ativando e recrutando essas para o sítio da injúria tecidual (MARCUS et al., 2003). Sabe-se que as plaquetas, quando ativadas, secretam o conteúdo de suas vesículas, sendo o ATP um desses componentes liberados para o meio extracelular. Este ATP secretado pelas plaquetas, por sua vez, seria capaz de influenciar o sistema imune. Em condições fisiológicas, os nucleotídeos estão presentes no meio extracelular em baixas concentrações, normalmente em quantidades nanomolares, podendo chegar até quantidades micromolares em determinadas situações. Estas quantidades são influenciadas por vários fatores, tais como a secreção e/ou lise celulares, o efeito da diluição no espaço extracelular e a ação catalítica de enzimas do tipo E-NTPDases (ectonucleotidases) (DI VIRGILIO et al., 2001b).

2.2.1 Enzimas que degradam nucleotídeos

As enzimas que hidrolisam nucleotídeos extracelulares são conhecidas como ectonucleotidases, pois estão ancoradas à superfície celular e possuem o seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular. As ecto-nucleotidases podem ser classificadas como família das E-NTPDases (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases), família E-NPP (ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase), fosfatases alcalinas e ecto-5'-nucleotidase, sendo amplamente distribuídas nos tecidos (ZIMMERMANN, 2000).

2.2.1.1 Família E-NTPDase

Nos mamíferos foram clonados e caracterizados funcionalmente oito membros desta família. Nem todos os membros desta família são ectoenzimas, pois além da sua localização

extracelular, podem ser encontradas no Complexo de Golgi e retículo endoplasmático. As enzimas que fazem parte desta família possuem domínios de seqüência altamente conservados, que são conhecidos como “regiões conservadoras da apirase” (ACRs) sendo estes relevantes para a atividade catalítica (HANDA e GUIDOTTI, 1996; ZIMMERMANN, 2001).

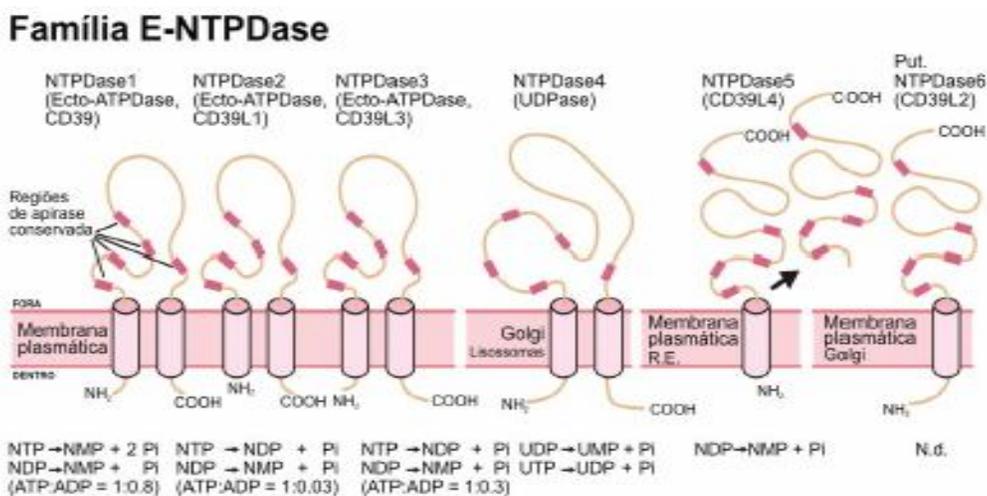


Figura 2 – Topografia e propriedades catalíticas de membros da família E-NTPDase (ZIMMERMANN, 2000).

A NTPDase1 (CD39, ecto-apirase, ecto-difosfohidrolase) hidrolisa ATP e ADP em uma taxa molecular de aproximadamente 1:0,5 a 1:0,9 (KACZMAREK et al., 1996; HANDA e GUIDOTTI, 1996), o que foi observado para enzimas purificadas pertencentes a tecidos como placenta humana (CHRISTOFORIDIS et al., 1995), aorta bovina (PICHER et al., 2000) e pâncreas suíno (LEBEL et al., 1980), entre outros. A NTPDase1 hidrolisa nucleotídeos tri e/ou difosfatados, possui uma atividade catalítica máxima adaptada ao ambiente extracelular, necessitando da presença de cátions divalentes tais como cálcio e magnésio e de um pH alcalino. Na maioria dos casos, os valores de *Km* estão em faixas micromolares. Na sua topografia na membrana possui um domínio transmembrana com regiões amino e carboxiterminais. Estas características também são comuns às enzimas NTPDase2 e NTPDase3 (ZIMMERMANN, 2001).

As enzimas NTPDase1 e NTPDase2 estão presentes em uma grande variedade de tecidos, incluindo coração, placenta, pulmão, fígado, musculatura esquelética, timo, rim, pâncreas, testículos, ovários, próstata, cólon e cérebro (ZIMMERMANN, 1999; BRAUN,

1999). Os altos níveis de atividade de ATPase estão associados com a vasculatura (endotélio, músculo liso e cardíaco), linfócitos e plaquetas (PLESNER, 1995). A NTPDase já foi caracterizada em células do sistema imune como linfócitos (LEAL et al., 2005) e plaquetas (PILLA et al., 1996). A NTPDase2 (CD39L1, ecto-ATPase) possui uma forte preferência pelo ATP com taxas moleculares de ATP/ADP de 1:0,03 ou menos (MATEO et al., 1999).

A NTPDase3 (CDL3, HB6) é um intermediário funcional que hidrolisa ATP em uma taxa molecular de aproximadamente 1: 0,3 (SMITH et al., 1999; CRAWFORD et al., 2007). A NTPDase4 é semelhante às enzimas anteriormente citadas, apresentando duas formas: uma forma está localizada no aparato de Golgi (UDPase) (HANDA; GUIDOTTI, 1998) e uma forma lisossomal está localizada nos vacúolos de UDPase, hidrolisando UDP e outros nucleosídeos di e tri-fosfatados, mas não é capaz de hidrolisar ATP e ADP (ZIMMERMANN, 2000). Quanto à NTPDase5 (CD39L4, ER-UDPase), ela é secretada e possui uma alta prevalência por nucleosídeos 5'-difosfatados, especialmente UDP, quando expressa em células COS-7 (MULERO et al., 1999). Uma suposta NTPDase6 (CD39L2), que ainda não foi funcionalmente caracterizada, está situada no Aparato de Golgi e na membrana plasmática (ZIMMERMANN, 2001). A NTPDase7 (LALP1) foi clonada em humanos e ratos (SHI et al., 2001) e possui localização intracelular, sendo classificada como endo-apirase, com preferência pelos substratos UTP, GTP e CTP. Bigonnesse et al. (2004) clonaram e caracterizaram a NTPDase8 em ratos, a qual parece regular os níveis de nucleotídeos extracelulares de maneira distinta de outras ectonucleotidases.

2.2.1.2 Família E-NPP

Estas enzimas possuem ampla distribuição tecidual e revelam atividade de fosfodiesterase e pirofosfatase as quais são propriedades da mesma molécula enzimática. São capazes de hidrolisar 3', 5'-cAMP a AMP, ATP a AMP e ADP a AMP e Pi ou NAD⁺ a AMP e nicotinamida mononucleotídeo. A hidrólise ocorre tanto com nucleotídeos purínicos quanto pirimidínicos e a família é formada pelas enzimas NPP1, NPP2, NPP3, NPP4, NPP5 (ZIMMERMANN, 2000. GODING et al., 2003). Há evidências que indicam que esta família pode modular a sinalização mediada por receptores P2 (PICHER; BOUCHER, 2000).

2.2.1.3 Fosfatases alcalinas

Estas enzimas representam uma família de ecto-fosfomonoesterases não-específicas

que degradam não somente nucleosídeos 5'-tri, di monofosfatados, mas também liberam fosfato inorgânico de uma variedade de compostos orgânicos, incluindo proteínas (WHITE, 1996). Também hidrolisam PPi (FERNLEY, 1971) e são similares a ecto-5'-nucleotidase, pois são ancoradas na membrana plasmática via GPI e possuem formas solúveis no soro (ZIMMERMANN, 2001).

2.2.1.4 Ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5)

A ecto-5'-nucleotidase ancorada via GPI também é conhecida como proteína de superfície de linfócito CD73 (CHRISTENSEN, 1997), que representa um marcador de maturação de linfócitos B e linfócitos T. Uma forma solúvel desta enzima também já foi descrita. A enzima hidrolisa nucleosídeos 5'-monofosfatados ao seu respectivo nucleosídeo e Pi, sendo a principal responsável pela formação de adenosina extracelular a partir de nucleotídeos da adenina a qual interage com receptores de adenosina (P1) (RESTA; THOMPSON, 1997. ZIMMERMANN, 2000).

A 5'-nucleotidase em linfócitos pode ter um importante papel na regulação do sistema imune humano. Uma atividade diminuída em linfócitos B foi observada em pacientes com deficiência primária de imunoglobulinas (CHRISTENSEN et al., 1997) e em casos de leucemia linfocítica crônica de células B (ROSI et al., 2002). Os receptores de adenosina são expressos numa variedade de tecidos e tipos celulares, incluindo linfócitos, e servem como mediadores muito importantes para respostas fisiológicas, como débito cardíaco e contratilidade, neurotransmissão, função renal, vasodilatação da musculatura lisa, agregação plaquetária, geração de ânion superóxido e lipólise de mastócitos (ROSI et al., 2002).

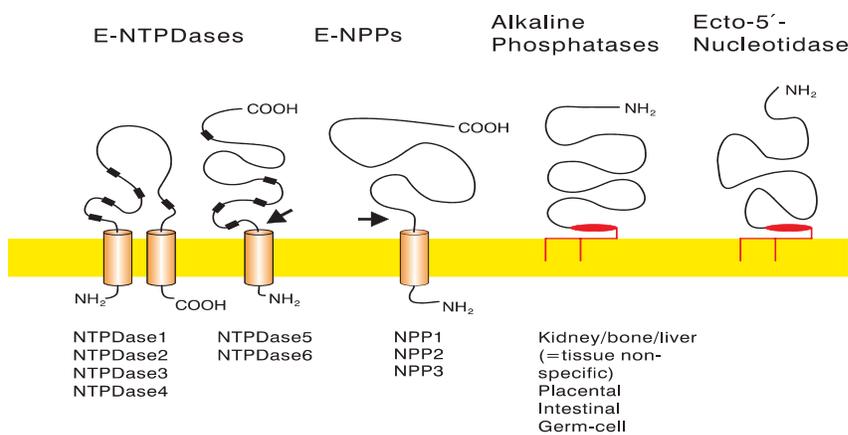


Figura 3 – Topografia e propriedades catalíticas das E-NTPDases, E-NPPs, Fosfatase Alcalina e Ecto-5'-Nucleotidase (ZIMMERMANN, 2000).

2.3 LINFÓCITOS E MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO

Todas as células sanguíneas são originadas na medula óssea a partir de um único precursor hematopoético comum a *Stem cell*, ou célula indiferenciada pluripotente. Até chegar a linfócito adulto os precursores passam por estágios intermediários, como linfoblastos e pró-linfócitos, sendo essa diferenciação um processo regulado de maneira complexa e dependente de fatores de crescimento e diferenciação específicos para cada linhagem linfocitária (ZHUNG & EMERSON, 2002). Após a diferenciação, os linfócitos sofrem o processo de maturação final, que pode ocorrer na própria medula óssea ou em outro tecido. As células maduras, de acordo com seu papel fisiológico, podem ser classificadas como linfócitos T, que sofrem maturação no timo; linfócitos B e linfócitos *natural killers* (NK) as quais, no homem, sofrem maturação na medula óssea (LÉCUYER & HOANG, 2004).

As células T desempenham várias funções imunes que podem ser divididas em duas categorias chamadas de reguladora e de efetora. As funções reguladoras são realizadas por células T auxiliares (CD4+) as quais produzem importantes linfocinas. O linfócito Th1 é responsável pela produção de IL-2, que atua na ativação de células TCD4+ e TCD8+, e INF- γ , o qual ativa macrófagos. Os linfócitos Th2 são responsáveis pela produção de IL-4 e IL-5, as quais induzem nas células B a produção de anticorpos (imunoglobulinas), além de IL-6 e IL-10. As funções efetoras são desempenhadas por células TCD8+ ativadas que eliminam as células infectadas por vírus, células tumorais e enxertos (LANGSTON et al., 2003; ZAGO, 2004).

As células B desempenham duas funções importantes: a primeira é que quando ativadas por linfócitos T auxiliares diferenciam-se em plasmócitos secretores de anticorpos; a segunda é que atuam também como células apresentadoras de antígenos (APCs) a exemplo de macrófagos, células dendríticas do baço e células de Langerhans da pele, que são responsáveis pela apresentação de antígenos aos linfócitos T auxiliares (LEVINSON et al., 1998; ZAGO et al., 2004).

O desenvolvimento da tecnologia de anticorpos monoclonais levou ao descobrimento de um grande número de novas moléculas da superfície dos leucócitos. Assim surgiu a classificação de grupo de diferenciação (CD, do inglês “cluster of differentiation”). Dentre os marcadores de diferenciação encontramos além do CD39, foco deste estudo, outros marcadores com estrutura molecular, linhagem e funções diferentes, que são classificados desde o CD1. Podemos exemplificar o CD73, (Ecto-5' nucleotidase), de linhagem dos subgrupos de linfócitos B e T e que regula a captação de nucleotídeos, o CD 71 receptor de

transferina, linhagem de linfócitos T e B ativados e de muitos tipos de células B entre outros (ISSELBACHER et al., 1995).

2.4 FUNÇÕES DA NTPDase NAS CÉLULAS LINFÓIDES

A NTPDase 1 é a principal ectonucleotidase presente na rede vascular, podendo também estar presente a NTPDase 2 (ROBSON et al., 2006). Esta enzima foi identificada como o antígeno de superfície CD39 das células linfóides, sendo que a sua expressão leva a um aumento nas atividades de ATPase e ADPase nestas células. O CD39 tem sido reconhecido como um marcador de ativação de linfócitos T (KANSAS et al., 1991. ZEBISCH et al., 2007), e também como capaz de gerar sinais que amplificam as interações célula-célula (MALISZEWSKI et al., 1994; KACZMAREK et al., 1996).

A NTPDase é capaz de gerar sinais que amplificam interações célula-célula (MALASZEWSKI et al., 1996). Tem sido sugerido que a NTPDase desempenha um importante papel no controle da função dos linfócitos (FILIPPINI et al., 1990), incluindo o reconhecimento do antígeno e/ou ativação de atividades efetoras das células T-citotóxicas. Alterações na atividade e distribuição desta enzima têm sido relacionadas a várias condições patológicas tais como na formação de trombos (PILLA et al., 1996) na isquemia do miocárdio (MARCUS et al., 2003), no câncer de mama (ARAÚJO et al., 2005), em diabetes (LUNKES et al., 2003) em melanomas (DZHANDZHUGAZYAN et al., 1993) na SIDA (LEAL et al., 2005) e em doenças inflamatórias pancreáticas (KÜNZLI et al., 2008).

Leal et al. (2005), sugere que nucleotídeos extracelulares e seu metabolismo podem estar envolvidos na resposta imune na infecção pelo vírus HIV. Durante a infecção crônica por este vírus há aumento de ATP extracelular devido à apoptose dos linfócitos onde a hidrólise deste nucleotídeo pela NTPDase1 é de grande importância, pois foi verificado um aumento na atividade da enzima em linfócitos de pacientes HIV positivos, confirmados por um acentuado aumento da expressão de CD39 na superfície destas células.

A alteração da atividade em linfócitos de pacientes com ALL e B-CLL evidencia que NTPDase pode ter um importante papel na modulação destas doenças, via hidrólise de ATP e ADP (VIELE, 2003; KOKHAEL et al.; 2005). Kokhael et al (2005) observou que a atividade da enzima NTPDase está alterada em linfócitos de pacientes com leucemia linfocítica crônica-B. As alterações observadas estão relacionadas com o estágio da doença. A hidrólise de ATP nos linfócitos de pacientes foi aumentando de maneira proporcional ao avanço da doença, com a maior hidrólise no estágio C em relação aos estágios A, B e grupo controle. A hidrólise

de ADP foi similar à hidrólise de ATP.

Viele (2003) observou que a atividade da NTPDase está alterada em pacientes com leucemia linfocítica aguda, dando a evidência que a NTPDase é importante na modulação desta doença, via hidrólise de ATP e ADP.

Vuaden e cols. (2007) demonstraram alteração na atividade das nucleotidases de linfócitos e soros de ratos na presença de lipopolissacarídeos. O autor sugere que as mudanças na atividade da enzima agem na regulação dos nucleosídeos e nucleotídeos extracelulares no modelo capaz para iniciar o processo inflamatório.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES UTILIZADOS

- Sulfato de níquel a 5,0% em vaselina sólida
- Vaselina sólida
- Comassie Blue
- Verde de Malaquita
- Tampão hemolítico
- ATP
- ADP
- Poly (Σ -caprolactone) (PM: 80.000)
- Polisorbato 80, Sigma- Aldrich
- Monooleato de sorbitano Sigma-Aldrich
- Dexametasona (base) Henrifarma
- Triglicerídio do ácido cáprico e caprílico da Viafarma
- Acetona P.A da Nuclear
- Cera autoemulsionante aniônica (Lanette N®)
- Óleo de rosa mosqueta Galena
- Álcool cetílico
- Glicerina
- Cetiol V®
- Trietanolamina e germal® (imidazolidinil urea) da Alpha Química (Brasil).
- Formol a 10%
- Hematoxilina-eosina
- Parafina

3.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

- Espectrofotômetro
- Freezer a -20°C
- Centrífuga de mesa refrigerada

- Banho Maria a 37°C
- Vórtex
- Vidrarias
- Homoginizador
- Pipetas automáticas e pipetas de vidro
- Histotécnico
- Micrótopo
- Microscópio Óptico

3.3 ANIMAIS

Foram utilizadas 60 ratas da raça *Wistar*, fêmeas (280-300 g), com idade média de 12 semanas, mantidos em ciclo claro/escuro natural e em sala com controle de temperatura de 20°C - 25°C, com água e ração padrão, oriundos do biotério da Universidade Federal de Santa Maria. O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Santa Maria/RS.

3.4 INDUÇÃO DE DERMATITE DE CONTATO

Foram acompanhados quatro grupos formados cada um por 15 ratas (fêmeas de 12 semanas de idade). Um grupo foi o grupo controle (C), e não recebeu a sensibilização com o produto químico, apenas a aplicação do veículo do fármaco e ficou sob as mesmas condições ambientais e alimentares dos demais grupos. O segundo grupo (DC), o terceiro grupo (DL) e o quarto grupo (DN) foram sensibilizados na região do abdômen com a aplicação tópica de 4,0 g de sulfato de níquel a 5,0% utilizando vaselina sólida como veículo. Seis dias após a sensibilização foi aplicado em cada orelha dos ratos 6,0 g de sulfato de níquel a 5,0% com vaselina sólida (Figura 4), em 5 aplicações com intervalos de 72 h entre cada aplicação. Após 72 h da última sensibilização o segundo grupo (DC) foi submetido à punção cardíaca, o terceiro grupo (DL) foi tratado com dexametasona livre a 0,42 mg/g de creme gel e o quarto (DN) grupo foi tratado com dexametasona nanoestruturada a 0,42 mg/g de creme gel por 5 dias com uma aplicação diária de 6,0 g.

A evolução das lesões dérmicas foram monitoradas diariamente. Três dias após a última aplicação de sulfato de níquel nas orelhas, foram coletados 8,0 ml de sangue com

EDTA das ratas do segundo grupo (DC) através de punção cardíaca (Figura 5). Três dias após o tratamento, o terceiro (DL) e o quarto grupo (DN) foram submetidos à punção cardíaca onde foram coletados 8,0 ml de sangue com EDTA para a determinação da atividade da NTPDase.

3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NTPDase

3.5.1 Isolamento de Células Mononucleadas do Sangue dos Animais

Os linfócitos foram isolados do sangue total coletado com EDTA e 5 h após a coleta foram separados em Ficoll-Hystopaque em gradientes de densidade (BÖYUM, 1968).

3.5.2 Determinação de Proteínas

A proteína foi determinada pelo o método de Coomassie Blue, usando albumina bovina como padrão conforme descrito por BRADFORD (1976).

3.5.3 Hidrólise de ATP e ADP

Após isolamento das células mononucleares, a hidrólise dos nucleotídeos foi determinada pela medida de fosfato inorgânico liberado na reação usando o método colorimétrico (CHAN et al., 1986) e padronizado em linfócitos (LEAL et al., 2005). O meio de reação continha 0,5 mM de CaCl_2 , 120 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 60 mM de glicose e 50 mM de Tris-HCl, em pH de 8,0 em um volume final de 200 μl . As amostras foram incubadas por 70 minutos e foram resfriadas por 10 minutos antes da análise da liberação do fosfato inorgânico (Pi) a 37 graus Celsius, usando Verde de Malaquita como reagente colorimétrico e KH_2PO_4 como padrão. As amostras foram analisadas em triplicatas para avaliar a atividade específica em nmol do Pi/ mim/mg proteína.



Figura 4 – Ratas sensibilizadas com níquel a 5% utilizando como veículo vaselina sólida.

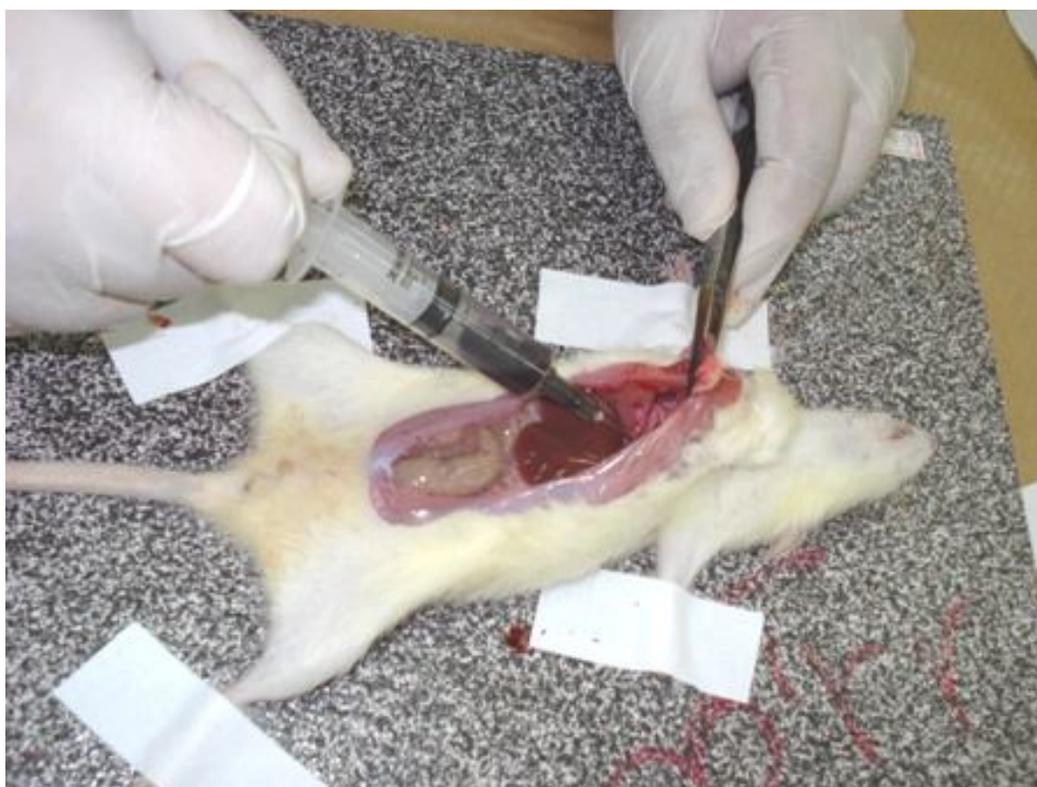


Figura 5 – Punção cardíaca para a coleta de amostras de sangue

3.6 OBTENÇÃO DE DEXAMETASONA NANOESTRUTURADA

3.6.1 Preparação das Nanopartículas

As nanopartículas foram preparadas através do método de nanoprecipitação de polímeros pré-formados (FESSI et al., 1989), utilizando-se a dexametasona como fármaco na sua forma base, em uma concentração final de 0,5 mg/ml de suspensão. As nanocápsulas contendo dexametasona foram desenvolvidas e caracterizadas por Friedrich e cols. (2008). A fase orgânica constituiu-se de Mygliol® (3,3 ml) poly (Σ -caprolactona) (1 g), Span 80® (0,776 ml), dexametasona base (0,05 g) e acetona (267 ml). A fase orgânica foi vertida, com agitação moderada, sobre a fase aquosa, contendo água (533 ml) e Polissorbato 80 (0,776 ml). A acetona e a água foram removidas através de evaporador rotatório e a suspensão foi concentrada até o volume final desejado. Nanocápsulas vazias, sem adição do fármaco também foram preparadas de acordo com a metodologia descrita.

3.6.2 Preparação do Creme Gel Contendo as Suspensões

O creme gel contendo nanocápsulas de dexametasona foi desenvolvido e caracterizado por Ferrony e cols. (2008) no laboratório de Nanociências do Centro Universitário Franciscano. As formulações, em triplicata, foram preparadas com carbopol 940®, álcool cetílico, Lanette® (cera auto-emulsionante aniônica), glicerina, Cetiol V® (oleato de decila), óleo de rosa mosqueta e imidazolidinil urea. O conteúdo de água presente na formulação do creme gel foi substituído pela suspensão contendo nanocápsulas de dexametasona. A formulação semi-sólida apresentou uma concentração final de dexametasona contendo 0,42 mg/g de creme Gel.

3.7 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

A avaliação histopatológica dos espécimes foi realizada no Serviço de Patologia do Hospital Universitário de Santa Maria.

Foram coletadas as orelhas de todas as ratas dos quatro grupos para a avaliação histopatológica. Após a coleta, foram fixadas em formol a 10% durante 24 h. Após a fixação em formol os espécimes foram processados e preparados para a confecção das lâminas. As lâminas foram coradas com a coloração de hematoxilina-eosina para posteriormente serem analisada.

3.8 ANALISE ESTATÍSTICA

Os dados da atividade enzimática foram representados pela média e erro padrão foram analisados pelo teste de hipóteses T entre o grupo com dermatite de contato e grupo controle, considerando um nível de 5% de significância. E os dados da atividade enzimática dos grupos tratados com dexametasona livre, dexametasona nanoestruturada e grupo controle foram representados pela média e erro padrão e foram analisados por um método de análise da variação estatística (ANOVA) de uma via seguindo o teste Kruskal-Wallis, considerando um nível de 5% de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo experimental utilizado para provocar a dermatite de contato foi elaborado a partir do protocolo experimental proposto por Fujii et al. (2002) onde foi utilizada a substância química oxazolina a 2% como hapteno na pele de ratas. A oxazolina foi substituída por sulfato de níquel a 5% no modelo proposto.

Neste trabalho, primeiramente, foi realizado a comprovação do modelo experimental utilizado para a provocação da dermatite de contato nas ratas utilizando como hapteno o níquel a 5%. Assim, foram realizados os exames histopatológicos dos espécimes de orelhas dos grupos controle e com dermatite de contato para confirmar o diagnóstico da reação inflamatória na pele.

Segundo Pereira et al. (2001), o exame histopatológico diagnóstico para dermatite de contato apresenta os seguintes critérios: nos eczemas agudos, o estrato córneo encontra-se normal, a epiderme pode estar normal ou espessada com a presença de edema entre queratinócitos, progredindo para a formação de vesículas intra-epidérmicas. Há a presença de exocitose de linfócitos (presença de linfócitos invadindo a epiderme), infiltrado linfocitário ao redor dos vasos superficiais. Os eosinófilos podem estar presentes tanto no infiltrado como nas áreas de espongiose (desorganização da camada basal devido a presença de edema intercelular), sendo que, dependendo do agente irritante pode ocorrer ulceração extensa, necrose e acantólise; nos eczemas subagudos, a epiderme encontra-se acantótica, com paraqueratose, pouca ou moderada espongiose e infiltrado inflamatório menos proeminente; no eczema crônico, há presença de hiperqueratose, paraqueratose, hipergranulose, acantose moderada e espongiose em focos mínimos, infiltrado inflamatório esparsos e presença de fibrose nas papilas dérmicas.

No grupo controle não foram detectadas alterações patológicas teciduais, a partir do exame histopatológico (Figuras 6 e 7), enquanto no grupo sensibilizado foi encontrada presença de espongiose (desorganização da membrana basal devido ao edema intercelular), espessamento da epiderme, exocitose de linfócitos (presença de linfócitos na epiderme), edema na derme e epiderme e infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos na derme (Figuras 8 a 11), o que comprovou a eficácia do protocolo de indução proposto..

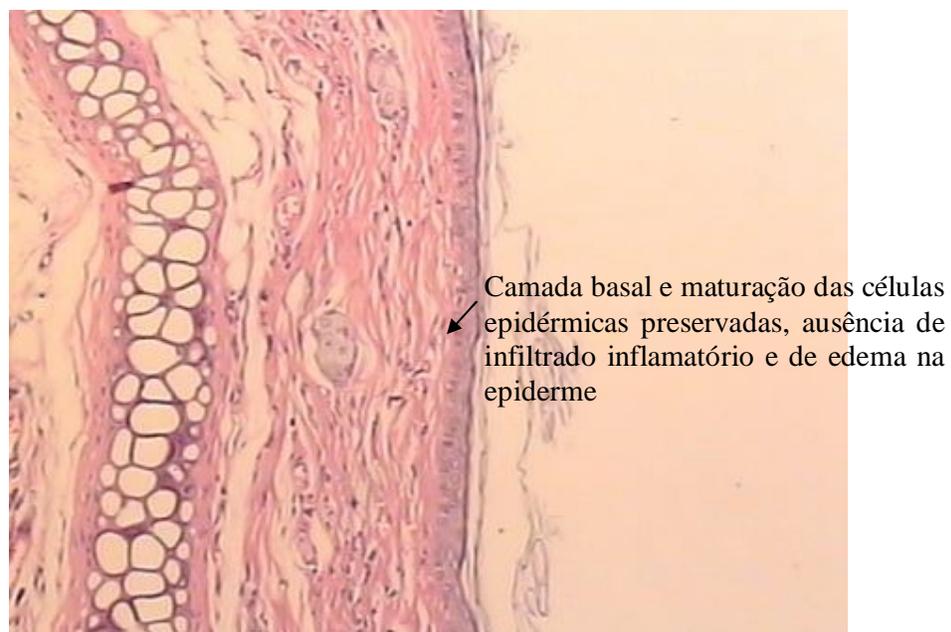


Figura 6 – Anatomo-patológico do grupo controle (C) mostrando ausência de dermatite de contato (aumento de 100x).

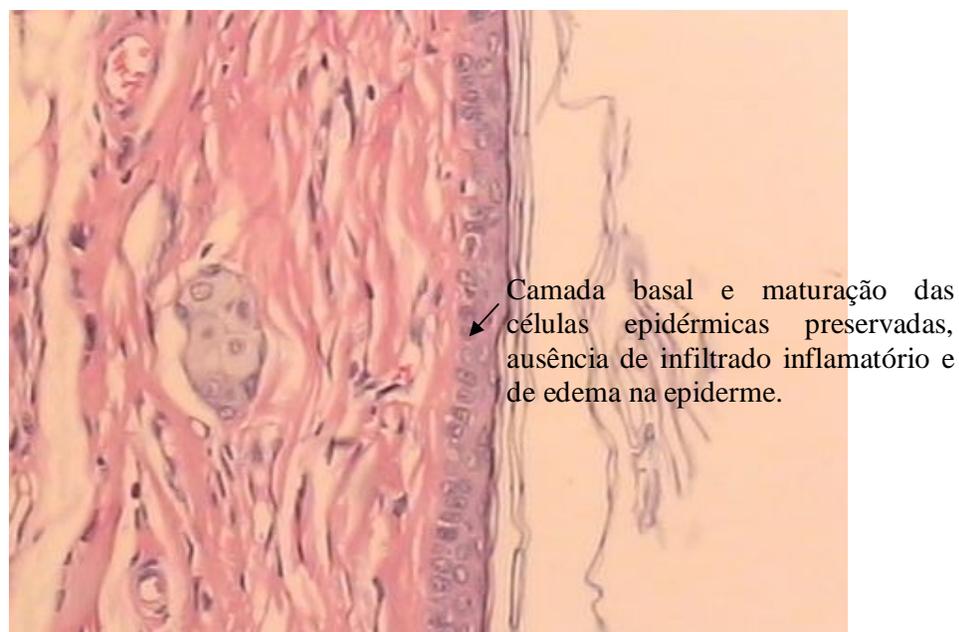


Figura 7 – Anatomo-patológico do grupo controle (C) mostrando ausência de dermatite de contato (aumento de 200x).

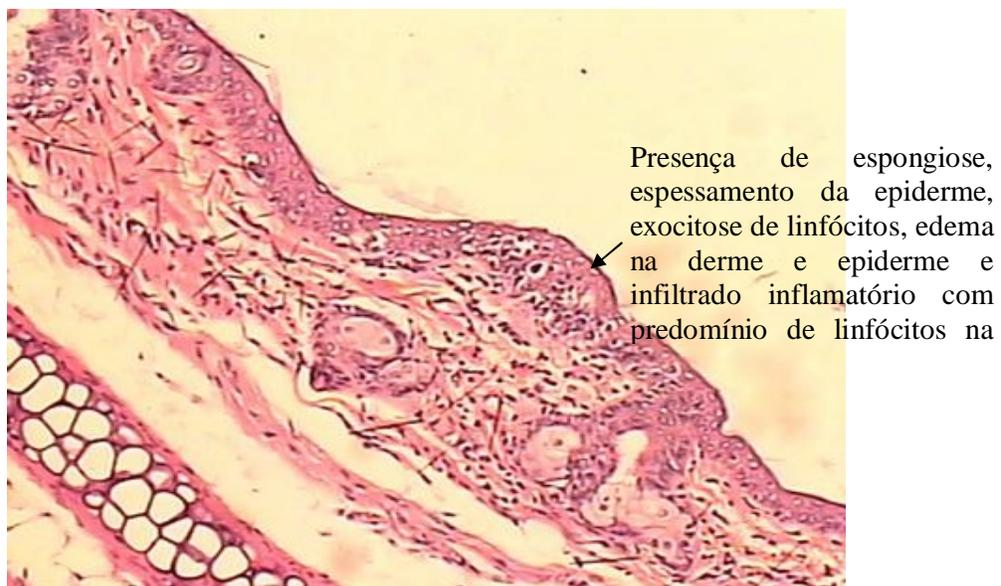


Figura 8 – Anatomo-patológico do grupo sensibilizado com níquel a 5% e não tratado (DC), mostrando características de dermatite de contato (aumento de 100x).

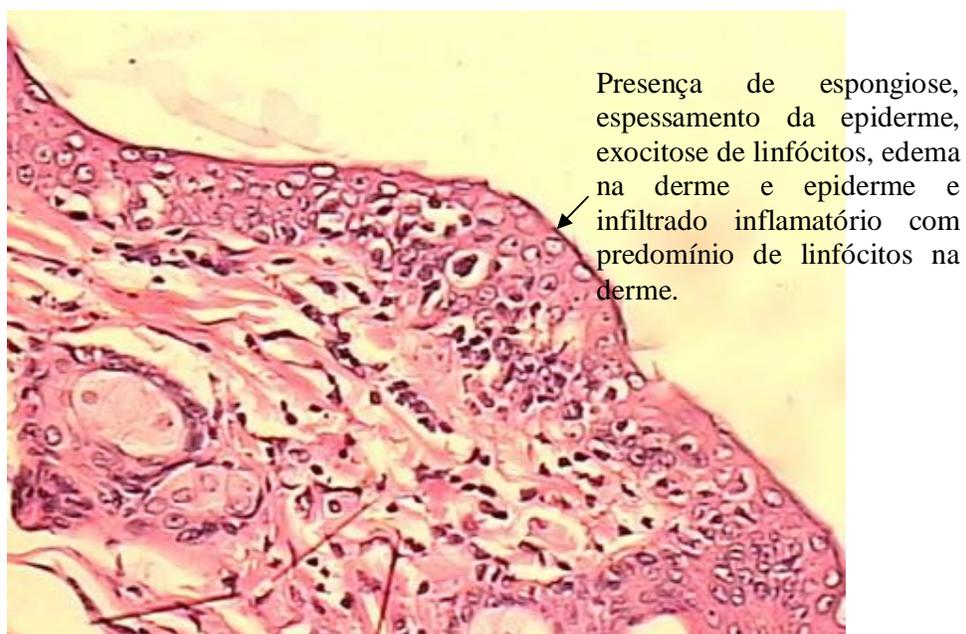


Figura 9 – Anatomo-patológico do grupo sensibilizado com níquel a 5% e não tratado (DC), mostrando características de dermatite de contato (aumento de 200x).

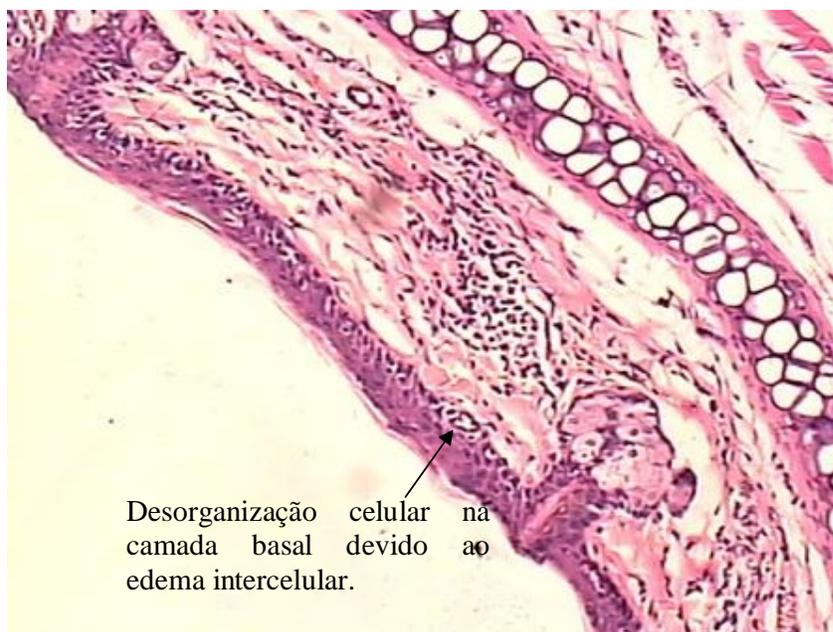


Figura 10 – Anatomo-patológico do grupo sensibilizado com níquel a 5% e não tratado (DC), mostrando características de espongiose (aumento de 100x).

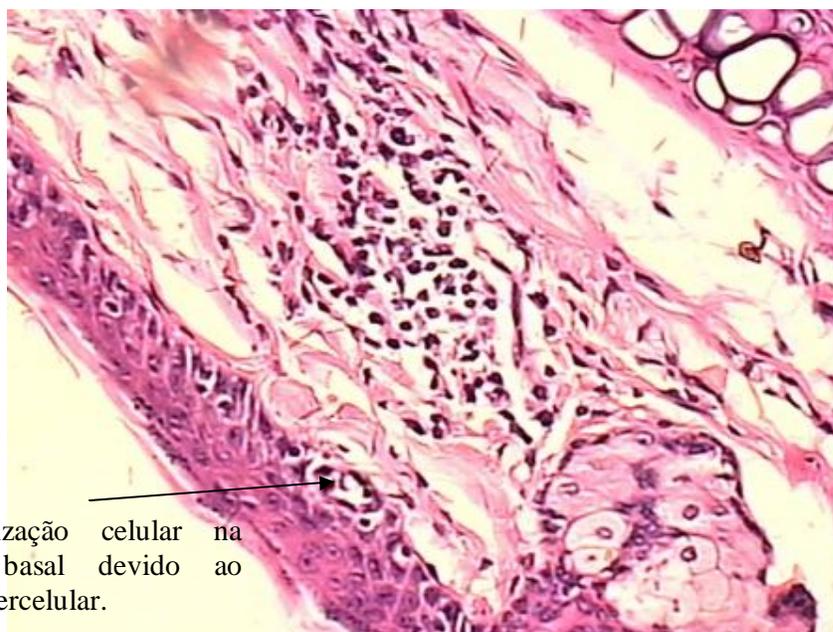


Figura 11 – Anatomo-patológico do grupo sensibilizado com níquel a 5% e não tratado (DC), mostrando características de espongiose (aumento de 200x).

Após a comprovação do modelo experimental de provocação da dermatite de contato foi avaliada a hidrólise de nucleotídeos da adenina, pela NTPDase (EC 3.6.1.5, nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase, CD39) em linfócitos de ratos com dermatite de contato sem e com

tratamento com fármaco imunossupressor. A dermatite de contato é induzida pelo contato da pele com substâncias químicas não protéicas denominadas haptenos, correspondendo a uma reação de hipersensibilidade retardada tipo IV, ou mediada por células T hapteno-específicas, através de um mecanismo imunológico que sensibiliza e provoca a ativação dos linfócitos T (BONNEVILLE et al., 2007). As células de Langerhans são membros da família das células dendríticas apresentadoras de antígenos da pele e a função enzimática da NTPDase após a apresentação antigênica pela célula dendrítica está envolvida no recrutamento, na ativação e na polarização das células T de memória (DWYER et al., 2007).

A NTPDase está amplamente distribuída nas células sanguíneas como em leucócitos e também em plaquetas e células endoteliais, participando de importantes interações celulares, agindo, por exemplo, na agregação plaquetária e em processos inflamatórios e imunes (PILLA et al., 1996; KOZIAK et al., 1999; ZIMMERMANN, 2001). Alguns trabalhos anteriores têm demonstrado que a atividade da NTPDase está alterada em patologias como na trombose (PILLA et al., 1996) na isquemia do miocárdio (MARCUS et al., 2003), no câncer de mama (ARAÚJO et al., 2005), em diabetes (LUNKES et al., 2003) em melanomas (DZHANDZHUGAZYAN et al., 1993) na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (LEAL et al., 2005) em doença isquêmica renal (GRENZ et al., 2007) e em doenças inflamatórias pancreáticas (KÜNZLI et al., 2008).

Primeiramente, comparou-se a hidrólise em dois grupos: grupo controle (C) e grupo com dermatite de contato (DC). Os resultados obtidos mostraram um aumento significativo da atividade da NTPDase no grupo com dermatite de contato em relação ao grupo controle. Na hidrólise do ATP a atividade enzimática média do grupo controle foi 54,7 (EPM \pm 7,7; n=15), enquanto no grupo com dermatite de contato, 232,4 (EPM \pm 12,4; n=15). Em relação à hidrólise do ADP, a atividade enzimática média do grupo controle foi 63,8 (EPM \pm 6,0; n=15), sendo que do grupo com dermatite de contato foi 124,4 (EPM \pm 24,9; n=15) (Figura 12).

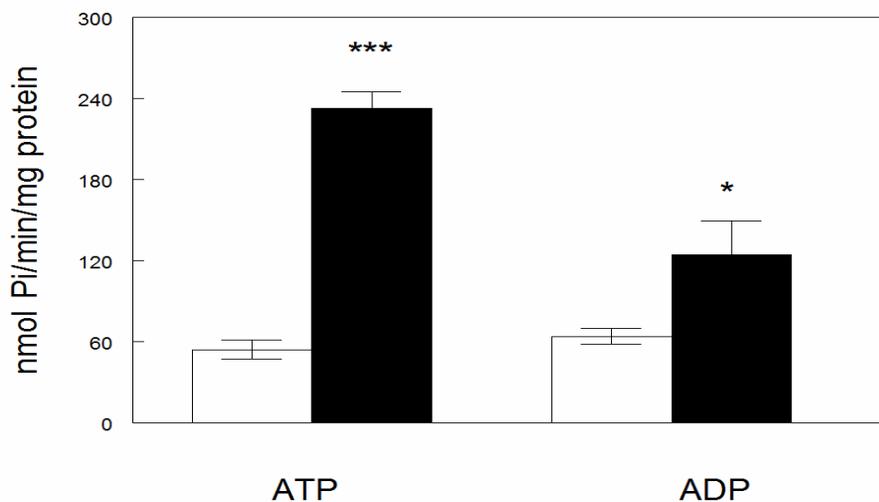


Figura 12 – Hidrólise de ATP e ADP no grupo com dermatite de contato (DC) e no grupo controle (DN). As condições de incubação foram descritas em Materiais e Métodos. As barras representam à média \pm EPM de atividade em nmol de Pi/min/mg de proteína. As barras brancas indicam o grupo controle (C) e as barras negras o grupo com dermatite de contato (DC). *Diferença significativa da atividade em relação ao controle por Teste estatístico T ($P < 0,001$). ***Diferença extremamente significativa da atividade em relação ao controle por Teste estatístico T ($P < 0,001$).

A atividade da NTPDase em linfócitos foi caracterizada por Leal et al. (2005a). Esta enzima tem sido descrita como um marcador de ativação necessário para a função efetora dos linfócitos, participando também dos processos de reconhecimento de antígeno (DOMBROWSKI et al., 1998; MUSI et al., 2007). A atividade enzimática e a expressão de CD39 estão presentes em graus variados em todos os tipos de leucócitos. Mizumoto et al. (2002) verificou que camundongos nocautes, com fenótipo CD39⁻, apresentavam supressão da resposta inflamatória a irritantes, deficiência na formação de células dendríticas e deficiências na apresentação de antígenos à célula T para respostas aos haptenos. Estes dados sugeriram que a expressão de CD39 seria necessária para obter uma estimulação das células T hapteno-reativas em camundongos (GRANSTEIN, 2002; MIZUMOTO et al., 2002).

Uma vez que a NTPDase serve como um marcador de ativação de linfócitos, os resultados aqui descritos sugerem que a presença do processo inflamatório de hipersensibilidade, onde há ativação dos linfócitos T, foi provavelmente um dos fatores responsáveis por uma atividade aumentada da enzima.

Sendo assim, os resultados obtidos estão de acordo com trabalhos realizados

anteriormente, que demonstraram um aumento de expressão de CD39 em processos inflamatórios desencadeados por agentes irritantes, como na dermatite de contato. Estes trabalhos sugerem também que as respostas inflamatórias resultam da liberação de ADP e ATP pela sensibilização dos queratinócitos, que funcionariam como mediadores pró-inflamatórios, ativando os linfócitos T. Esse processo seria regulado pelo CD39 através da hidrólise do ATP e ADP em AMP (GRANSTEIN, 2002).

Sanchez et al. (2005), demonstraram a ativação e a proliferação linfocitária em pacientes sensibilizados ao níquel, através do Teste de Proliferação Linfocitária (TPL). No TPL os linfócitos do sangue periférico do paciente são colocados em contato com o níquel. Se o paciente for sensibilizado ao metal, seus linfócitos de memória circulantes são ativados, sintetizando DNA e se dividindo. Nas cinco concentrações do níquel utilizadas, a diferença entre os resultados do TPL nos casos e controles foi estatisticamente significativa, pois 84,21% dos pacientes sensibilizados ao níquel apresentaram TPL positivo.

Dessa forma, sugere-se, neste estudo, que a atividade da NTPDase aumentada no grupo sensibilizado com níquel, provavelmente se deva também à proliferação e à estimulação linfocitária causada pelo elemento químico níquel.

Na segunda etapa do trabalho, foram avaliadas as possíveis alterações na atividade da NTPDase, frente a uma reação inflamatória de hipersensibilidade tipo IV tratada com dexametasona. Também procurou-se verificar a possível relação da apresentação do fármaco na formulação livre e nanoestruturada com a hidrólise de nucleotídeos da adenina.

Os resultados obtidos mostraram um aumento significativo da atividade da NTPDase nos grupos tratados com dexametasona, em relação ao grupo controle (Figuras 14 e 15). Na hidrólise do ATP a atividade enzimática média no grupo controle foi 54,7 (EPM \pm 7,7; n=15), enquanto no grupo tratado com dexametasona livre foi 733 (EPM \pm 129; n=15). No grupo tratado com dexametasona nanoestruturada, a atividade aumentou para 1028 (EPM \pm 270; n=15). A diferença de atividade da NTPDase nos grupos tratados com dexametasona em relação ao grupo controle foi estatisticamente significativa pelo teste ANOVA seguido pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0,001$), como indicado na Figura 13.

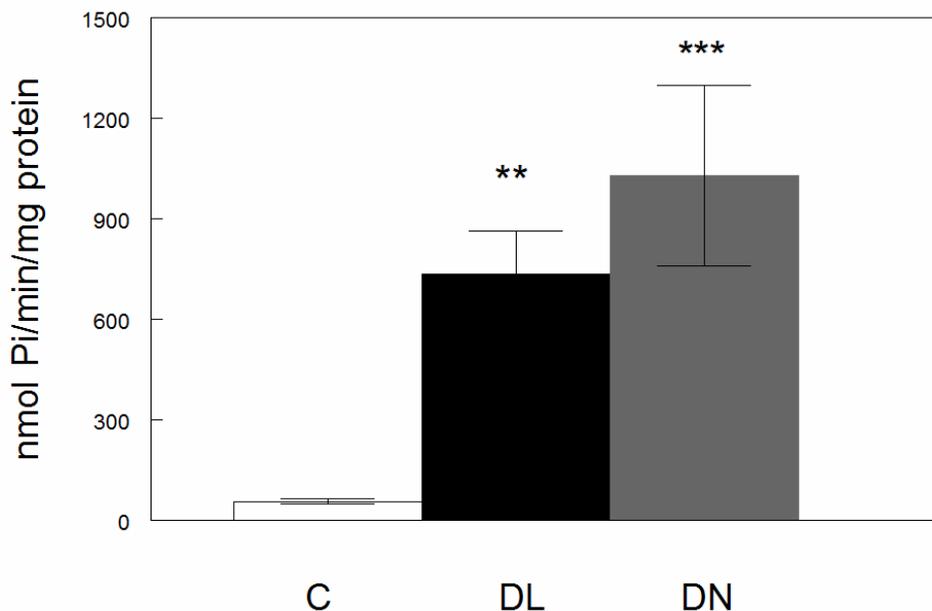


Figura 13 – Hidrólise do ATP nos grupos controle (C), tratado com dexametasona livre (DL) e tratado com dexametasona nanoestruturada (DN). As condições de incubação foram descritas em Materiais e Métodos. As barras representam à média \pm EPM de atividade em nmol de Pi/min/mg de proteína. ***Diferença extremamente significativa da atividade em relação ao controle por Teste de ANOVA seguido pelo Teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,001$).

Já na hidrólise do ADP a atividade enzimática média do grupo controle foi 63,8 (EPM \pm 6,0; $n = 15$). Quando analisados os grupos tratados, o grupo tratado com dexametasona livre apresentou uma atividade média de 259 (EPM \pm 63; $n = 15$), enquanto no grupo tratado com dexametasona nanoestruturada esta foi 477 (EPM \pm 108 $n = 15$), sendo estatisticamente diferente a atividade da NTPDase nos grupos tratados com dexametasona em relação ao grupo controle pelo teste ANOVA seguido pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,001$), como indicado na Figura 14.

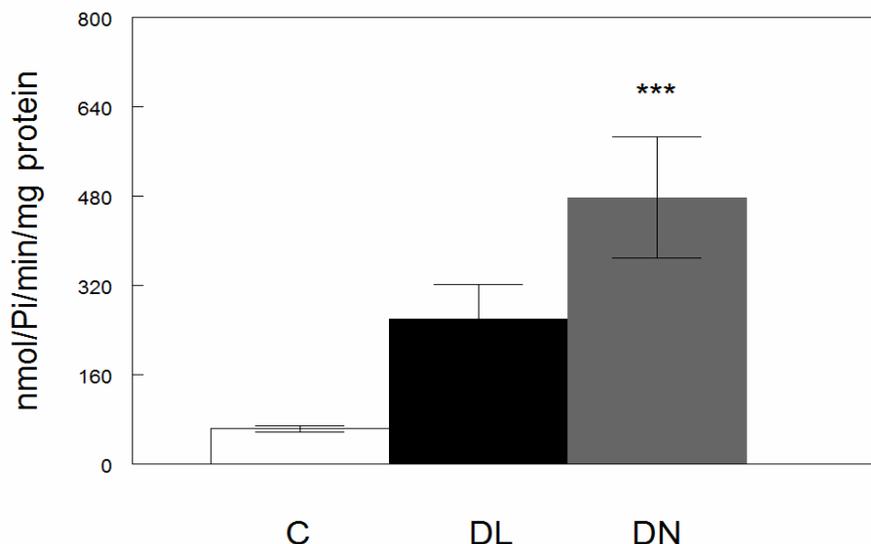


Figura 14 – Hidrólise do ADP nos grupos controle (C), tratado com dexametasona livre (DL) e tratado com dexametasona nanoestruturada (DN). As condições de incubação foram descritas em Materiais e Métodos. As barras representam a média \pm EPM de atividade em nmol de Pi/min/mg de proteína. **Diferença muito significativa da atividade em relação ao controle por Teste ANOVA seguido pelo Teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,001$). ***Diferença extremamente significativa da atividade em relação ao controle por Teste ANOVA seguido pelo Teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,001$).

A dexametasona é usada quando os efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores dos corticosteróides são desejados, especialmente para tratamentos intensivos durante períodos curtos (BRAUNWALD et al., 2003). Os glicocorticóides inibem as funções dos linfócitos, as respostas das células B e das células T a antígenos, com conseqüente comprometimento da imunidade tanto humoral como celular (GRAHAME-SMITH, 2002).

Um estudo recente sobre a administração da dexametasona em ratos com glioma cerebral C6 verificou que o fármaco estimulava a ação da ecto-5'-nucleotidase/CD73, mostrando ter menor efeito citotóxico e apresentando um efeito antiproliferativo nas células tumorais. A menor citotoxicidade deste fármaco pode, em parte, ser devido à estimulação da expressão do citocromo P450. A adenosina, produto final da hidrólise do ATP, representa uma importante molécula extracelular que está envolvida na modulação da sinalização celular. Ela é crucial para o funcionamento do sistema nervoso, pois possui importante papel na modulação da neurotransmissão, na neuroproteção celular e na sobrevivência ou morte celular (BAVARESCO et al., 2007). Os eventos ocasionados pela adenina extracelular são

controlados pela ação de uma nucleotidase. A Ecto-5'-nucleotidase/CD73 regula os níveis de AMP (adenosina monofosfato) extracelular e os níveis de adenosina, através da hidrólise do AMP, resultando na liberação do nucleosídeo. A dexametasona inibiu o crescimento das células tumorais do glioma de forma tempo e dose dependente, sendo esse efeito mais rápido em doses de 0.01 – 10 μ M e mais lento em concentrações de 0.001 μ M, provavelmente via receptores de glicocorticóides. A dexametasona diminuiu a viabilidade das células do glioma através da diminuição da atividade da membrana mitocondrial e estimulou a ação da ecto-5'-nucleotidase nas células gliomais. A utilização da dexametasona promove um significativo aumento dos níveis de adenosina pela hidrólise do AMP pela ecto-5'-nucleotidase e em maior grau pelo efeito antiproliferativo das células gliomais. Este glicocorticóide pode influenciar processos biológicos fundamentais como desenvolvimento e homeostase da proliferação celular, diferenciação celular, apoptose e expressão protéica (BAVARESCO et al., 2007).

Dwyer et al. (2007) sugere um adenosinergismo entre a CD39 e a CD73 na geração de adenosina, que contribui na imunorregulação das células Tregs e na resolução da inflamação, porque facilita a ação das células Th2, inibindo as células Th1 (linfócitos T ativados).

Deaglio et al. (2007) demonstraram que, funcionalmente, a co-expressão da CD39 e da CD73 (marcadores de superfície de células T reguladoras) está relacionada com a geração de adenosina pericelular que inibe a ação das células T, ocasionando um efeito imunossupressor.

Os resultados encontrados nos grupos tratados com dexametasona estão de acordo com trabalhos realizados anteriormente, que demonstraram um aumento da atividade enzimática da NTPDase durante tratamento com dexametasona injetável, como um possível efeito compensatório à diminuição no número de linfócitos (manuscrito em preparação). Além disso, trabalhos anteriores (BAVARESCO et al., 2007) mostram que a dexametasona estimula a ação da ecto-5'-nucleotidase, o que poderia justificar o papel imunossupressor do fármaco e a resolução da dermatite de contato nos grupos tratados, confirmada através dos exames anátomo-patológicos. A atividade maior no grupo tratado com dexametasona nanoestruturada poderia estar ligada ao efeito imunossupressor mais potente, necessitando de uma maior compensação por parte da NTPDase. A análise histopatológica destes grupos revelou que não havia critérios diagnósticos de dermatite de contato. Os achados histopatológicos nos grupos tratados com dexametasona evidenciaram ausência de infiltrado inflamatório, de espongiose, de espessamento da epiderme e de edema na derme e epiderme sugerindo ausência de dermatite de contato.

O uso tópico prolongado e em altas doses de corticosteróides pode causar atrofia da pele (HARDMAN et al., 2001). No grupo tratado com dexametasona livre foram observadas

áreas de atrofia com diminuição do estrato Malpighiano e áreas de preservação dos anexos da epiderme (Figuras 15 a 17). No grupo tratado com dexametasona nanoestruturada foram observadas áreas de atrofia mais acentuada com apenas duas camadas no estrato Malpighiano e uma diminuição do número de folículos pilosos e de vasos sanguíneos (Figuras 18 a 20).



Figura 15 – Anato-patológico do grupo sensibilizado com níquel a 5% e tratado com dexametasona livre (DL) (aumento de 25x).



Figura 16 – Anato-patológico do grupo sensibilizado com níquel a 5% e tratado com dexametasona livre (DL) (aumento de 100x).



Figura 17 – Anato-patológico do grupo sensibilizado com níquel a 5% e tratado com dexametasona livre (DL) (aumento de 200x).



Figura 18 – Anato-patológico do grupo sensibilizado com níquel a 5% e tratado com dexametasona nanoestruturada (DN) (aumento de 25x).

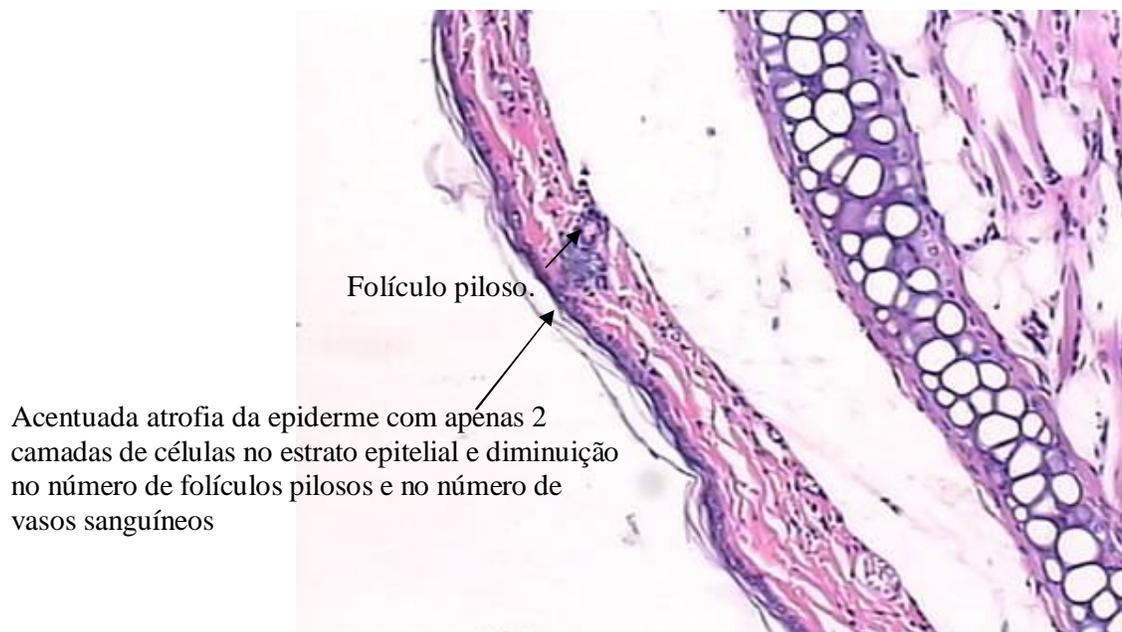


Figura 19 – Anatomo-patológico do grupo sensibilizado com níquel a 5% e tratado com dexametasona nanoestruturada (DN) (aumento de 100x).

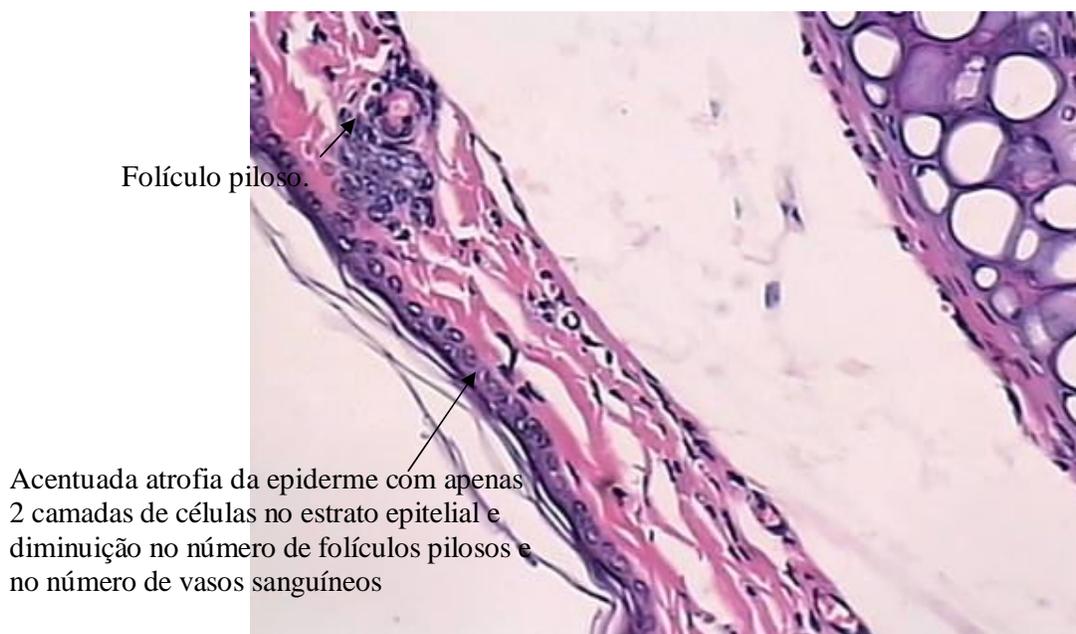


Figura 20 – Anatomo-patológico do grupo sensibilizado com níquel a 5% e tratado com dexametasona nanoestruturada (DN) (aumento de 200x).

A introdução de um novo fármaco no mercado, além de levar vários anos de pesquisa, envolve custos altíssimos. Uma alternativa encontrada para contornar os altos custos da introdução de novos fármacos, bem como atender os preceitos dos estudos de

biodisponibilidade, é o desenvolvimento de sistema de liberação controlada de fármaco. Estes sistemas têm permitido o aumento da eficiência de fármacos utilizados na terapêutica atual, a re-introdução de outros anteriormente descartados por suas propriedades indesejáveis e o aprimoramento de novos fármacos antes que sejam utilizados na terapêutica. Estudos recentes utilizaram sistemas de liberação controlada de fármacos, tais como as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) e as microemulsões. Mei et al. (2003) demonstraram que a atividade anti-inflamatória do Triptolide nanoestruturado em SLN foi mais forte do que o Triptolide em microemulsões em ratos com edema de pata induzidos pela carragenina.

Puglia et al. (2008), demonstrou que as nanopartículas lipídicas poliméricas quando utilizadas topicamente, possuem como característica uma redução e/ou supressão da permeação (liberação transdermal) do fármaco e aumentam a penetração (liberação na derme), permanecendo mais nas camadas superiores da pele. O grau maior de atrofia da pele encontrado no grupo tratado com dexametasona nanoestruturada pode ser atribuído a um maior tempo de ação da droga na pele, devido ao aumento da penetração e diminuição e/ou supressão da permeação do fármaco na pele. Essas características dos fármacos nanoestruturados quando utilizados topicamente, poderiam determinar uma maior potência do fármaco na pele.

Quanto à hidrólise de ADP no grupo tratado com dexametasona livre e no grupo tratado com dexametasona nanoestruturada, observou-se que a diferença entre os grupos não foi significativa para a hidrólise de ATP e ADP, havendo somente uma tendência ao aumento da atividade no grupo tratado com dexametasona nanoestruturada.

Em resumo, os resultados histopatológicos e enzimáticos obtidos neste estudo, sugerem um efeito imunossupressor maior da dexametasona nanoestruturada, provavelmente, devido à redução e/ou supressão da permeação (liberação transdermal) do fármaco e aumento da penetração (liberação na derme) do fármaco podendo levar à permanência maior do fármaco nas camadas superiores da pele. O aumento de atividade da NTPDase nos grupos tratados com dexametasona poderia estar relacionado a uma ativação da enzima por este fármaco, além da ativação linfocitária causada pela reação de hipersensibilidade.

5 CONCLUSÃO

O modelo experimental proposto para provocar dermatite de contato a partir do sulfato de níquel nos ratos obteve sucesso, o que foi constatado através da realização do exame histopatológico. Quanto a atividade da NTPDase, houve um aumento no grupo com dermatite de contato e nos grupos tratados com dexametasona livre e nanoestruturada. Provavelmente, esta alteração tenha ocorrido devido à ativação e proliferação linfocitária durante a dermatite de contato e a mecanismos compensatórios pela a inibição da proliferação dos linfócitos pela dexametasona. Os resultados histopatológicos e enzimáticos deste estudo sugerem que a dexametasona nanoestruturada pode possuir um efeito imunossupressor maior, o que pode ser o início da avaliação de um tratamento mais eficaz e seguro para a dermatite de contato. O aumento da atividade da NTPDase nos grupos com dermatite de contato tratados com dexametasona livre e nanoestruturada pode ser resultado da soma dos efeitos da ativação linfocitária na reação de hipersensibilidade e de um possível efeito ativador da dexametasona sobre a enzima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANTEA, S. L.; SANCHEZ, I.; PIVA, J. P. et al. **Controvérsias no manejo farmacológico da asma aguda infantil.** *Journal of Pediatric*, Rio de Janeiro, v. 78, supl. 2, p. 151-160, nov./dez. 2002.

ANDERSEN K. E.; MAIBACH H. I. Black and white skin differences. *Journal of the American of Dermatology*. 1: 276, 1979.

ANICH, M.; FANTA, N.; MANCILLA, M.; KETTLUN, A. M.; VALENZUELA, M. A. A transverso-cori apyrase activity and changes in metabolites during germination and tuberization of *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry*. 29: 1411-1415, 1990.

ARAÚJO, M. C.; MORSCH, A.; ZANIN, R.; BAUCHSPIESSR, R. J. B; MORSCH, V. M. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast câncer patiens. *Biochim biophys acta*. 1740: 421-426, 2005.

ARON, D. C.; SCHNALL, A. M.; SHEELER, L. R. Cushing's syndrome and pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Jan, 162(1): 244-52, 1990 .

ARONSON, J. K.; GRAHAME-SMITH, D. G. **Oxford textbook of clinical pharmacology and drug therapy**. 3. ed. Oxford: Oxford University Press, p. 83-109, 2002.

BASKETTER, D. A. Chemistry of contact allergens and irritants. *American Journal Contact Dermatitis*. 9(2): 119-24, 1998.

BATTASTINI, A. M. O.; ROCHA, J. B. T.; BARCELOS, C. K.; DIAS, R. D.; SARKIS, J. J. F. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5.) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rat. *Neurochemical Research*. 16: 1303-1310, 1991.

BAVARESCO, L.; BERNARDI, A.; BRAGANHOL, E.; WINK, M. R.; BATTASTINI, A. M. O. Dexametasona inhibits proliferation and stimulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 activity in C6 rat glioma cell line. *Journal of Neurooncology*. 84: 1-8, 2007.

BEI, R. D.; KERTESY, S. B.; AQUILINA, G.; DUBYAK, G. R. Oxidized ATP (oATP) attenuates proinflammatory signaling via P₂ receptor-independent mechanisms. *British Journal of Pharmacology*. 140: 507-519, 2003.

BELSITO, D. Allergic Contact Dermatitis. **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**. 5th ed. USA: McGraw-Hill, p. 1447-61, 1999.

BELSITO, D. V. Alergic contact dermatitis. In: FREEDBERG, I. M.; EISEN, A. Z.; WOLFF, K.; AUSTEN, K. F.; GOLDSMITH, L. A.; KATZ, S. I. eds. **Fitzpatrick's dermatology in general medicine**. 6th ed. New York: McGraw-Hill, p. 1164-77, 2003.

BERARDESCA, E. What's new in irritant dermatitis. *Clinical Dermatology*. 15(4): 561-3, 1997.

BERARDESCA, E.; MAIBACH, H. Racial differences in skin pathophysiology. *Journal American Academic Dermatology*. 34: 667-72, 1996.

BIGONESE, F.; LEVÉSQUE, S. A.; KULKUSKI, F.; LECKA, J.; ROBSON, S. C.; FERNANDES, M. J. et al. Cloning and characterization of mouse triphosphate diphosphohydrolase-8. **Bochemistry**. p. 5511-19, 2004.

BIREN, C. A.; BARR, R. J.; GANDERUP, G. S. Topical cyclosporine A: effects on allergic contact dermatitis in guinea pigs. **Contact Dermatitis**. 20: 10-6, 1989.

BONNEVILLE, M.; CHAVAGNAC, C.; VOCANSON, M.; ROZIERES, A.; BENETIERE, J.; PERNET, I.; DENIS, A.; NICOLAS, J. F.; HENNINO, A. Skin contact irradiation conditions the development and severity of allergic contact dermatitis. **Journal of Investigative Dermatology**. 127(6): 1430-5, 2007.

BRAND, C. H. Activated immunocompetent cells in hman skin limph derived from irritant contact dermatitis: a immunomorphological study. **British Journal Dermatology**. 132: 39-45, 1995.

BRAUNWALD, E.; FAUCI, A.; KASPER, D.; HAUSER, S.; LONGO D.; JAMESON J. H. **Manual de Medicina**. 15. ed. Portugal: Mc Graw Hill, 2003.

CAMPOS, R. A. et al. Cutaneous immunization rapidly activates liver invariant valpha14 NHT cells stimulanting B-1 to initiate T cell recruitment for elicitation of contact sensitivity. **Journal Experimental Medicine**. 198: 1785-96, 2003.

CASTELLI, D.; COLIN, L.; CAMEL, E.; RIES, G. Pretreatment of skin with a Ginkgo biloba extract/ sodium carboxymetil - beta -1, 3 – glucan formulation appears to inhibit the elicitation of allergic contact dermatitis in man. **Contact Dermatitis**, 38(3): 123-6, 1998.

CHAN, K.; DELFRET, D.; JUNGES, K. A direct colorimetric assay for Ca²⁺ ATPase activity. *Anal. Biochemist*. 157: 375-380, 1986.

CHRISTENSEN, L. D. CD73 (ecto-5'-nucleotidase) on blood mononuclear cells. Regulation of ecto-5'-nucleotidase activity and antigenic heterogeneity of CD73 on blood mononuclear cells from healthy donors and from patients with immunodeficiency. **APMIS**. 105: 5-28, 1997.

CHRISTOFORIDIS, S.; PAPAMARCAKI, T.; GALARIS, D.; KELLNER, R.; TSOLAS, O. Purification and properties of human placental ATP diphosphohydrolase. **European Journal Biochemistry**. 234: 66-74, 1995.

COSTA, A.; MACHADO, S.; SELORES M. **Corticóides tópicos-Considerações sobre a sua aplicação na patologia cutânea**. *Revista Portuguesa de Clínica Geral*. 21: 367-73, 2005.

CRAWFORD, P. A.; GADDIE, K. J.; SMITH, T. M.; KIRLEY, T. Characterization of an alternative splice variant of human nucleoside triphosphatediphosphohydrolase 3 (NTPDase3): A processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. **Journal of Biological Chemistry**. 269: 25710-25718, 2007.

CUMBERBATCH, M. et al. Epidermal langerhans cell migration and sensitization to chemical allergens. **Acta Phatologica, Microbiologica et Immunologica**. 111: 797-804, 2003.

DEAGLIO, S.; DWYER, K. M.; GAO, W.; FRIEDMAN, D.; USHEVA, A.; ERAT, A.; CHEN, J. F.; ENJOYOJI, K.; LINDEN, J.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K.; STROM, T. B.; ROBSON, S. C. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **Journal of Experimental Medicine**. v. 204, n. 6, p. 1257-1265, mai. 2007.

DENING, N. I.; HOKE, A. W.; MAIBACH, H. I. Irritant contact dermatitis - clues to causes, clinical characteristics and control. **Posgraduate Medicine**. 103(5): 199-213, 1998.

DI VIRGILIO, F. Dr. Jekyll / Mr. Hyde: the dual role of extracellular ATP. **Journal of the Autonomic Nervous System**. 81: 59-63, 2000.

DI VIRGILIO, F.; BOREA, P. A.; ILLES, P. P2 meet the immune system. **Trends in Pharmacological Science**. 22, 2001.

DI VIRGILIO, F.; CHIOZZI, P.; FERRARI, D.; FALZONI, S.; SANZ, M. J.; MORELLI, A.; TORBOLI, M.; BOLIGNESI, G.; BARICORDI, R. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**. 97: 587-600, 2001.

DOMBROWSKI, K. E.; KE, Y.; BREWER, K.; KAPP, J. A. Ecto-ATPase: na activation marker necessary for effector cell function. **Immunological Reviews**. 161: 111-118, 1998.

DUARTE, I.; AMORIN, J. R.; PERÁZZIO, E. F.; JUNIOR, R. S. Metal contact dermatitis: prevalence of sensitization to nickel, cobalt and chromium. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 80(2): 137-42, 2005.

DWYER, K. M.; DEAGLIO, S.; GAO, W.; FRIEDMAN, D.; STROM, T. B. ROBSON, S. C. CD39 and control of cellular immune responses. **Purinergic Signalling**. 3: 171-180, 2007.

DZHANDZHUGAZYAN, K. N. et al. Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is overex pressed in differentiated human melanomas. **FEBS. Letters**. 325: 86-89, 1993.

EDWARDS, N. L.; MAGILAVY, D. B.; CASSIDY, J. T.; FOX, L. H. Lymphocyte ecto-5'-nucleotidase deficiency in agammaglobulinemia. **Science**. 201: 628-30, 1978.

ELDER, D. et al. **Lever's Histopathology of the skin**. 8th ed. Lippincott-Raven Publishers: 209-15, 1997.

FARMACOPEIA PORTUGUESA. 8. ed. **Infarmed**. Lisboa, 2005.

FERNLEY, H. N. Mammalian alkaline phosphatases. In: BOYER, P. D. (Ed). **The enzymes**. New York: Academic Press, p. 417-47, 1971.

FERNLEY, H. N. **Mammalian Receptors**. Totowa, NJ: Humana Press, p. 43-61, 1998.

FERRONY, D.; ROGGIA, I.; NASCIMENTO, R. O.; JÄGER, A.; ALVES, M. P.; BECK, R. C. R.; TARSO, P.; MENDES FILHO, J. Preparação e caracterização de nanocápsulas contendo dexametasona. **XII Congresso de la Federación Farmacéutica Sudamericana: II Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas; XIV Jornadas Nacionales de Farmacia Hospitalaria; V Jornadas Nacionales de Farmacia Comunitaria**. Farmauruguay, 2008.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 55, p. 1-4, 1989.

FILIPPINI, A.; TAFFS, R. E.; SITVOSKY, M. V. Extracellular ATP in T lymphocyte activation: possible role in effector functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 87: 8267-8271, 1990.

FLORI, L.; PEROTTI, R.; MAZZATENTA, C. Cyclosporine A in the treatment of severe allergic contact dermatitis. **Journal of European Academy of Dermatology and Venereology**. 2: 200-6, 1993.

FOUSSERAUX, J. History of epicutaneous tests: the blotting-paper and other methods. **Contact Dermatitis**. 11: 219-23, 1984.

FRIEDRICH, B. R.; FONTANA, C. M.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, R. A.; GUTERRES, S. S.; Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. **Química Nova**. 2008.

FUJII, F.; TANABE, H.; KANNO, Y. Eosinophilic cellulitis as a cutaneous manifestation of idiopathic hypereosinophilic syndrome. **Journal of American Academy of Dermatology**. 49: 1174-7, 2003.

FUJII, Y., TAKEUCHI, H., TANAKA, K., SAKUMA, S., OHKUBO, Y., MUTOH, SEITARO. Effects of FK506 (tacrolimus hydrate) on chronic oxazolone-induced dermatitis in rats. **European journal of Pharmacology**. 456(1-3):115-121, 2002.

FUNK, J. O.; MAIBACH, H. I. Horizons in pharmacologic interventions in allergic contact dermatitis. **Journal of American Academy of Dermatology**. 31(6): 999-1024, 1994.

GALHACHER, G.; MAIBACH, H. I. Is atopic dermatitis a predisposing factor for experimental acute irritant contact dermatitis? **Contact Dermatitis**. 38: 1-4, 1998.

GODING, J. W.; GROBBEN, B.; SLEGGERS, H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. **Biochim Biophys Acta**. 1638: 1-19, 2003.

GOULD, J. W. et al. Cutaneous photosensitivity diseases induced by exogenous agents. **Journal of American Academy of Dermatology**. 33(4): 551-73, 1995.

GRABBE, S. et al. Immunoregulatory mechanisms in elicitation of allergic contact hypersensitivity. **Immuno Today**. 19: 37-44, 1998.

GRAHAME-SMITH, D.; ARONSON J. **Tratado da farmacologia clínica e farmacoterapia**. 3. ed. Guanabara koogan, 2002.

GRAINSTEIN, R. D. The skin on CD39 in immunity and inflammation. **Nature Medicine**. 8: 336-338, 2002.

GRENZ, A. et al. Contribution of E-NTPase/CD39 to renal protection from ischemia-reperfusion injury. **FASEB J**. 21: 1-11, 2007.

GRUPO BRASILEIRO EM ESTUDO EM DERMATITE DE CONTATO (GBEDC). Dermatite de contato em idosos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. p. 0365-0596, 2002.

GRUPO BRASILEIRO EM ESTUDO EM DERMATITE DE CONTATO (GBEDC). Estudo multicêntrico para elaboração de uma bateria-padrão brasileira de teste de contato. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 75: 147-56, 2000.

HAJJAR, L. A.; PINHEIRO, A. M. C. Ação do furoato de mometasona sobre as citocinas inflamatórias. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 74(1): 1-24, 1999.

HANDA, M.; GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 218: 916-23, 1996.

HARDMAN, J.; LIMBIRD, L.; GOODMAN e GILMAN'S. **The Pharmacological basis of therapeutics**. 10. ed. McGrawHill, p. 1655-1673, 2001.

HENNINO, A.; VOCANSON, M.; CHAVAGNAC, C.; SAINT-MEZARD, P.; DUBOIS, B.; KAISERLIAN, D.; NICOLAS, J. F. Update on the pathophysiology with special emphasis on CD8 effector T cells and CD4 regulatory T cells. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 80(4): 335-47, 2005.

HO, V. C.; ZLOTY, D. M. Immunosuppressive agents in dermatology. **Dermatology Clinical**. 11: 73-85, 1993.

HOLNESS, D. L.; NETHERCOTT, J. R. Is a worker's understanding of their diagnosis an important determinant of outcome in occupational contact dermatitis? **Contact Dermatitis**. 25: 296, 1991.

HOST NECK, J. J. Nickel-induced hypersensitivity: etiology, immune reaction, prevention and therapy. **Archives Dermatology Research**. 294: 249-67, 2002.

ISSELBACHER, K.; BRAUNWALD, E.; WILSON, J.; MARTIN, J.; FAUCI, A.; KASPER, D. **Harrison's / Principles of Internal Medicine**, 13th ed. México: Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V., 1994.

IVANENKOV, V. V.; MELLER, J.; KIRLEY, T. L. Characterization of disulfide bonds in human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 (NTPDase3): implications for NTPDase structural modeling. **Biochemistry**. 44: 8998-9012, 2005.

JEROLD, M. D.; FRANK, P. D. **Poisoning & Toxicology Handbook**. 3. ed. APhA, 2002.

KACZMAREK, K.; KOZIAK, J.; SEVIGNY, J. B.; SIEGEL, J.; ANRATHER, A. R.; BEAUDOIN, F. H.; BACH, S. C. R. Identification and Characterization of CD39/Vascular ATP Diphosphohydrolase. **Journal of Biological Chemistry**. 271(51): 33116-33122, 1996.

KALISH, R. S. et al. T-lymphocyte function in irritant contact dermatitis: a final common pathway with allergic contact dermatitis? Workshop on Irritant Contact Dermatitis. **American Journal of Contact Dermatitis**. 8(2): 88-9, 1997.

KANSAS, G. S.; WOOD, G. S.; TEDDER, T. F. Expression, distribution and biochemistry of human CD39: role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. **Journal of Immunology**. 146: 2235-2244, 1991.

KEUREN, J. F.; MAGDELEYNS, E. J.; BENNAGHMOUCH, A.; BEVERS, E. M.; CURVERS, J.; LINDHOUT, T. Microparticles adhere to collagen type I, fibrinogen, von Willebrand factor and surface immobilized platelets at physiological shear rates. **British Journal Haematology**. 138: 527-533, 2007.

KITTEL, A.; GARRIDO, M.; VARGA, G. Localization of NTPDase1/CD39 in normal and transformed human pancreas. **Journal Histochem Cytochem**. 50: 549-55, 2002.

KLASSEN, C.; CASARETT e DOULL'S. **Toxicology The basic science of poisons**. 6. ed. McGraw-Hill. P. 49-53, 185, 195, 628-629, 2001.

KOKHAEL, P. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. **An. Oncol**. 16: 113-123, 2005

KOZIAK, K.; SÉVIGNY, J.; ROBSON, S. C.; SIEGEL, J. B.; KACSMAREK, E. Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes. **Thromb Haemost**. 82: 1538-44, 1999.

KÜNZLI, B. M. et al. Disordered pancreatic inflammatory responses and inhibition of fibrosis in CD39-null mice. **Gastroenterology**. 134: 292-305, 2008.

KUKULSKI, F.; LÉVESQUE, S. A.; LAVOIE, É. G. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDase 1, 2, 3 and 8. **Purinergic Signalling**. 1: 193-204, 2005.

LAMMINTAUTA, K.; MAIBACH, H. I. Contact dermatitis due irritation. **In Adams Occupational Skin Disease**. 2nd ed. WB Saunders, p. 1-21, 1990.

LANGSTON, H. P.; KE, Y.; DOMBROWSKI, K. E.; GEWIRTZ, A. T.; KAPP, J. Secretion of IL-2 and IFN- α , but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. **Journal of Immunology**. 170: 2962-2970, 2003.

LAUERMA, A. I.; STEIN, B. D.; HOMEY, B.; LEE, C. H.; BLOOM, E.; MAIBACH, H. I. Topical FK 506: suppression of allergic and irritant contact dermatitis in the guinea pig. **Archives Dermatology Research**. 286(6): 337-40, 1994.

LE, T. K.; DE MON, P.; SCHALKIJK, J.; VALK, P. G. Effect of a topical corticosteroid, a retinoid and a vitamin D3 derivative on sodium dodecyl sulphate induced skin irritation. **Contact Dermatitis**. 37(1): 19-26, 1997.

LEAL, D. B. R.; STREHER, C. A.; BERTONCHELI, C. M.; CARLI, L. F. D.; LEAL, C. A. M.; DA SILVA, J. E. P.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C. HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39-positive lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1746: 129-134, 2005b.

LEAL, D. B. R.; STREHER, C. A.; NEU, T. N.; BITTENCOURT, F. P.; LEAL, C. A. M.; SILVA, J. E. P.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; E. C. 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1721: 9-11, 2005a.

LEBEL, D.; POIRIER, C. G.; PHANEUF, S.; ST-JEAN, P.; LALIBERTÉ JF BEAUDOIN AR. Characterization and purification of calcium-sensitive ATP diphosphohydrolase from pig pancreas. **Journal of Biological Chemistry**. 255: 1227-33, 1980.

LÉCUYER, E.; HOANG, T. SCL: From the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. **Experimental Hematology**. 32: 11-24, 2004

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. Microbiologia Médica e Imunológica-4^A ed. Porto Alegre, **ArtMed**, 1998.

LIMA, H. C. Facts and myths about immunomodulators. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 82(3): 207-21, 2007.

LUNKES, G. I.; LUNKES, D.; STEFANELLO, F.; MORSH, A.; MORSH, U. U. M.; MAZZANTTI, C. M.; SCHETINGER, M. R. C. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**. 109: 189-194, 2003.

MALISZESWSKI, C. R.; DELESPESE, G. L.; SCHOENBORN, M. A.; ARMITAGE, R. J.; FANSLAW, W. C.; NAKAJIMA, T. et al. The CD39 lymphoid cell activation antigen: molecular cloning and structural characterization. **Journal Immunology**. 153: 3574-83, 1994.

MARCUS, A. J.; BROEKMAN, M. J.; DROSOPOULOS, J. H. F.; ISLAM, N.; PINSKY, D. J.; SESTI, C.; LEVI, R. Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. 1: 2497-2509, 2003.

MATEO, J.; HARDEN, T. K.; BOYER, J. L. Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase. **British Journal Pharmacology**. 128: 396-402, 1999.

MATOS, J. A. A.; BORGES, F. P.; TASCA, T.; BOGO, M. R.; DE CARLI, G. A.; FAUTH, M. G.; DIAS, R. D.; BONAN, C. D. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (apyrase, E.C. 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*. **International Journal for Parasitology**. 31: 770-775, 2001.

MCDONALD, C. J. Dermatological problems in black skin. **Program Dermatology**. 4: 15, 1973.

MEI, Z. et al. Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 56 p. 189-196, 2003.

MINTERN, J. D.; DAVEY, G. M.; BELZ, G. T.; CARBONE, F. R.; HEATH, W. R. Cutting edge: precursor frequency affects the helper dependence of cytotoxic T cells. **Journal of Immunology**. 168: 977-80, 2002.

MIZUMOTO, N.; KUMAMOTO, T.; ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; MATSUE, H.; ENJYOJI, K.; TAKASHIMA, A. CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: Modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. **Nature Medicine**. 8: 358-365, 2002.

- MUSI, E.; ISLAM, N.; DROSOPOULOS, J. H. Constraints imposed by transmembrane domains affect enzymatic activity of membrane-associated human CD39/NTPDase1 mutants. **Archives Biochemistry Biophysical**. 461: 30-39, 2007.
- NILSON, R et al. A standard protocol for phototoxicity testing. **Contact Dermatitis**. 28: 285-90, 1993.
- OLSZEVER, E. **Radicais livres em medicina**. 2. ed. São Paulo: Fundo Editorial BYK, 1995.
- ONDER, M.; OZTAS, M. O. Allergic contact dermatitis in the elderly. **Journal European of Academy Dermatology and Venereology**. 16: 172, 2002.
- OPPENHEIN, J. J. et al. Citoquinas. **Basic and Clinic Immunology**. 7th ed. Sittes DP and Terr AI, 78-100, 1991.
- OSSWALD, W.; GUIMARÃES, S. **Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas**. 4. ed. Lisboa: Porto Editora. 49: 716-718, 2001.
- PEREIRA, J. M. **Dermatoscopia**. São Paulo: Atheneu. p. 45-8, 2001.
- PICHER, M.; BOUCHER, R. C. Biochemical evidence for an ecto alkaline phosphatase I in human airways. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. 23: 255-61, 2000.
- PIGUET, P. F. et al. Tumor necrosis factor is a critical mediator in hapten-induced irritant and contact hypersensitivity reactions. **Journal Experimental Medicine**. 173: 673-9, 1991.
- PILLA, C.; EMANUELI, T.; FRASSETTO, S. S.; BATTASTINI, A. M.; DIAS, R. D.; SARKIS, J. J. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase EC 3.6.1.5) in human blood platelets. **Platelets**. 6: 225-30, 1996.
- PLESNER, L. Ecto-ATPases: identities and functions. **International Reviews of Cytology**. 158: 141-214, 1995.
- PREARO, E.; NOJIMA, V. Y.; SATO, M. N.; REIS, V. M. S.; MARUTA, C. W. Aplicação do teste do soro autólogo nas urticárias crônicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 80, sup. 2, 2005.
- PUGLIA, C.; BLASI, P.; RIZZA, L.; SCHOUBBEN, A.; BONINA, F.; ROSSI, C.; RICCI, M. Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: An in vitro and in vivo investigation. **International Journal of Pharmaceutics**. 357: 295-304, 2008.
- RAJOGOPALAN, R.; ANDERSON, R. T.; SARMA, S. et al. An economic evaluation patch testing in the diagnosis and management of allergic contact dermatitis. **American Journal of Contact Dermatitis**. 9(3): 149-54, 1998.
- RAMSING, D. W.; AGNER, T. **Efficacy of topical corticosteroids on irritant skin reactions**. **Contact Dermatitis**. 32(5): 293-7, 1995.
- RESTA, R.; THOMPSON, L. F. T cell signaling through CD37. **Cell Signal**. 9: 131-9, 1997.

- RICO, E. P.; SENGER, M. R.; FAUTH, M. G.; DIAS, R. D.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). **Life Sciences**. 73: 2071-2082, 2003.
- RIETSCHHEL, R. L. Mecanismos in irritant contact dermatitis. **Clinical Dermatology**. 15(4): 557-9, 1997.
- ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic signalling**. 2: 409-430, 2006.
- ROSI, C. F.; MARINELLO, E. T. Ecto-5'-nucleotidase in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. 56: 100-4, 2002.
- SAINT-MEZARD, P. et al. Allergic contact dermatitis. **European Journal of Dermatology**. 14: 284-95, 2004.
- SAIZOU, C.; SACHS, P.; BENHAYOUN, M.; BEAUFILS, F. Antenatal corticosteroids: benefits and risks. **Journal of Gynecology and Obstetrics Biology Reproductive (Paris)**. Sup. 1: S111-7, 2006.
- SANCHEZ, A. P. G.; RIBEIRO, R. L.; DOS REIS, V. M. S.; MARUTA, C. W.; ZOMIGNAN, C. A.; SATO, M. N.; NUNES, R. S. Study on lymphocyte proliferation in nickel sensitive patients. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 80(2): 149-58, 2005.
- SANTUCCI, A.; CRISTAUDO, A.; MAHRABAN, M.; VALENZANO, C.; CÂMERA, E.; PICARDO, M. ZnSO₄ treatment of NiSO₄ - positive patients. **Contact Dermatitis**. 40: 281-2, 1999.
- SCHALKIJK, J.; LE, T. K.; DE MON, P.; VALK, P. G. Effect of a topical corticosteroid, a retinoid and a vitamin D₃ derivate on sodium dodecyl sulphate induced skin irritation. **Contact Dermatitis**. 37(1): 19-26, 1997.
- SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; BONAN, C. D.; WYSE, A. T. S. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: New perspectives for human health. **BioFactors**. 30: 1-22, 2007.
- SHI, J. D.; KULAR, T.; WANG, C. M.; LI, Q. Z.; CRUZ, P. E.; DAVAOODI-SEMIRONI, A. et al. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian endo-apyrase (LALP1). **Journal of Biology Chemistry**. 276: 17474-78, 2001.
- SITTART, J. A. S. ; PIRES, M. C. Eczemas. In: **Dermatologia para o Clínico**. 2. ed. São Paulo: Lemos Editora, 1998.
- SLOBODA, D. M.; CHALLIS, J. R.; MOSS, T. J.; NEWNHAM, J. P. Synthetic glucocorticoids: antenatal administration and long-term implications. **Current Pharmaceutical Des**. 11(11): 1459-72, 2005.
- SMITH, T. M.; LEWIS, C. S. A.; KIRLEY, T. L. Mutagenesis of two conserved tryptophan residues of the E-type ATPases: Inactivation and conversion of an ecto-apyrase to an ecto-NTPase. **Biochemistry**. 38: 5849-5857, 1999.

STORS, F. J. Irritant contact dermatitis: magnitude of the problem. **American Journal of Dermatitis**. 8(2): 83, 1997.

THOMPSON, A. W.; ALDRIDGE, R. D.; SEWELL, H. F. **Topical cyclosporine in alopecia areata and nickel contact dermatitis**. *Lancet*. 2: 971-2, 1986.

TOSTI, A.; PIRACCINI, B. M.; VAN NESTE, D. J. J. Telogen effluvium after allergic contact dermatitis of the scalp. **Archives of Dermatology**. 137: 187-90, 2001.

VALENZUELA, M. A.; LÓPEZ, J.; DEPIX, M.; MANCILHA, M.; KETTLUN, M.; CATALÁN, L.; CHIONG, M.; GARRIDO, J. Comparative subcellular distribution of apyrase from animal and plant source. Characterization of microsomal apyrase. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 93B: 911-919, 1989.

VAN DE BEEK, D.; DE GANS, J. **Dexamethasone in adults with community-acquired bacterial meningitis**, *Drugs*. 66(4): 415-27, 2006.

VAN, R. H. P. J.; FRANX, A.; SCHOBEN, A. F. et al. Corticosteroids, pregnancy, and HELLP syndrome: a review. **Obstetrical and Gynecological Survey**. Jan 60(1): 57-70, 2005.

VASCONCELOS, E. G.; NASCIMENTO, P. S.; MEIRELLES, M. N. L.; VERJOVSKI, S.; FERREIRA, S. T. Characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Shistosoma mansoni*. **Molecular Biochemistry Parasitology**. 58: 205-214, 1993.

VIELE, C. S. Diagnosis, treatment and nursing care of acute leukemia. **Semin. Oncol. Nurs.** 19:98-108, 2003.

VUADEN, F. C.; COGNATO, G. P.; BONORINO, C.; BOGO, M. R.; SARKIS, J. J. F.; BONAN, C. D. Lipopolysaccharide alters nucleotidases activities from lymphocytes and serum of rats. **Life Sci**. v. 80, p. 1784-1791, 2007.

WATANABE, H.; UNGER, M.; TUVEL, B.; WANG, B.; SAUDER, D. N. Contact hypersensitivity: the mechanism of immune responses and T cell balance. **Journal Interferon Cytokine Res**. 22: 407-12, 2002.

WHITE, M. P. Hypophosphatasia: nature's window on alkaline phosphatase function in man. In: BILEZKIAN, J.; RAISZ, L.; RODAN, G. **Principles of Bone Biology**. San Diego: Academic Press. p. 951-68, 1996.

YEGUTKIN, G. G.; HENTTINEN, T.; SAMBURSKI, S. S.; SPYCHALA, J.; JALKANEN, S. The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. **Biochemical Journal**. 367: 121-128, 2002.

ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Characterization of Rat NTPDase1, -2, and -3 Ectodomains Refolded from Bacterial Inclusion Badiest. **Biochemistry**. 46 (42): 11945-11956, 2007.

ZIMMERMANN H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Nauny-Schmiedeberg's Arch of Pharmacol**. 362: 299-309, 2000.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research**. 52: 44-56, 2001.

ZIMMERMANN, H.; BRAU, N. Ecto-nucleotidases: molecular structures, catalytic properties and functional roles in the nervous system. **Program Brain Research**. 120: 371-85, 1999.

ZHUNG, J; EMERSON S.G. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. **Oncogene**. 21: 3292-3313, 2002.

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](#)