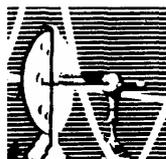


Clarissa Rodrigues Nascimento

ESTUDO DA DIFERENCIAÇÃO E ATIVAÇÃO DE
CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS *in vitro*

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE
JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ESTUDO DA DIFERENCIAÇÃO E ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS
HUMANAS *in vitro*

Clarissa Rodrigues Nascimento

1 volume

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Imunobiologia da Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências biológicas (Fisiologia).

Orientação: Dra. Vivian M. Rumjanek

Rio de Janeiro
Março de 2009

LOCAL DA PESQUISA E AGÊNCIAS DE FOMENTO

Este trabalho foi realizado no laboratório de Imunologia Tumoral sob orientação da Dra. Vivian M. Rumjanek. O laboratório é integrante do Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro. O trabalho foi desenvolvido na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Ficha catalográfica:

Nascimento, Clarissa Rodrigues

Estudo da diferenciação e ativação de células dendríticas humanas *in vitro*.

– Clarissa Rodrigues Nascimento. (Rio de Janeiro): UFRJ, IBCCF^o, 2009.

xx 147f.: 44il.; 2 cm

Orientador: Vivian M. Rumjanek.

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, IBCCF, Programa de Imunobiologia, 2009.

Referências bibliográficas: f. 151-167

1. Células dendríticas. 2. Diferenciação. 3. Ativação. 4. Butirato de Sódio.
5. Ouabaína.

I. Rumjanek, Vivian M II. Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho III. Estudo da diferenciação e
ativação de células dendríticas humanas *in vitro*.

Dedico esta tese aos meus pais, professores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Da feitura da tese vem que a tese nada mais é do que uma composição. E aos elementos dessa composição meus agradecimentos...

A minha orientadora Vivian Rumjanek, por aceitar meu período de mudança do mestrado para o doutorado, por estimular uma ciência criativa, livre, por possibilitar um doutorado mais complexo e mais completo, com saraus, aulas, cursos de férias e até experimentos secretos.

A Dra. Ottilia Mitidieri, tão suave e agradável, por me acompanhar desde o primeiro estágio na UFRJ, mostrando o valor de cada etapa, do primeiro seminário do laboratório (que até hoje ela exagera na descrição) até a defesa do doutorado (sem parar por aí é claro). Agradeço a ela por ser um exemplo de trabalho, por alegrar o laboratório, etc, etc.

Aos amigos do laboratório de Imunologia Tumoral, Graça, Luciana, Eduardo, Mariana, Renata, Raquel, Lorena, Matheus, Kelli, Bruna, Gabriel, Daniel, Thiago, Chaquip, Paula pela convivência e pelo clima positivo de trabalho e de colaboração, pelas doações de sangue, pelos encontros animados na casa da Paula.

A Maria, que é uma aluna tão boa, que certamente terá sucesso com seu projeto (desafio) de trabalhar com células dendríticas humanas, por me ajudar nos experimentos, dos mais normais as invenções, pela dedicação ao trabalho e por ser sempre muito tranqüila.

A Marina pelas conversas agradáveis nas caronas, pela contribuição para o Núcleo de divulgação científica.

A Cláudia, por mostrar a importância da divulgação da ciência, pelas discussões produtivas, por sempre ter uma palavra de otimismo nas horas certas e pelas dicas mais variadas sempre felizes.

Ao Sebastião, por toda a ajuda, por tirar sangue das veias mais difíceis, e dos doadores mais complicados.

A Jacqueline, pela organização dos papéis e material do laboratório, por deixar tudo em ordem, funcionando.

Ao André, pela companhia cedinho no laboratório, por um café que ora é café ora é chá..., por ajudar sempre, por resolver problemas no computador, e outros.

Ao Paulinho, sempre pronto para ajudar, por me doar sangue, primeiro ele resiste, mas doa no final.

A Fernanda Kylita, pelo humor delicioso, por apreciar coisas tão simples como “chafurdar” na grama, pela companhia em momentos culturais e em aventuras, por ouvir com paciência as pequenas crises do nosso trabalho. Uma amiga que eu sinto falta quando está viajante, mas, ao mesmo tempo sinto presente.

A Nathalia, uma boa amiga, por aceitar todos os programas animados (mesmo tendo que viajar para Niterói depois), quase convencida de que o cinema é o primeiro deles, por ter uma risada tão gostosa, por tentar há tempos um plano de colaboração, por reservar um espaço na sua mesa para o meu celular, por passar horas comigo falando, falando...

A Alessandra, que merece agradecimentos até na véspera da entrega da tese (pelo índice), pelo período de colaboração, por me ensinar como fazer o ELISA (sem dependências), pelo entusiasmo contagiante com os assuntos de ciência, por todas as consultorias de culinária, por ser uma amiga especial, bastante sensível e muito inteligente, que entende até sobre raios e trovões.

A Juliana, que eu admiro pela dedicação e disciplina, capaz de ser tão séria e tão divertida ao mesmo tempo, pelos congressos que são sempre ótimos, pela colaboração, por trazer um assunto novo e interessante, por ajudar nas horas mais importantes, por me dar prazos quando eu não posso me perder, por contribuir para o amadurecimento dos alunos do laboratório.

A Andréia, que eu considero uma pessoa delicada e forte, capaz de muito ainda..., pelas conversas nas caronas, nas fugas, por ter sido uma parceira maravilhosa no curso de férias.

A Clarice, que é uma amiga muito especial, uma das pessoas mais diferentes que conheci na vida, quem a conhece pode explicar, que não estava por aqui no período da minha tese, mas, eu consigo imaginar o quanto ela teria feito por mim, a qualquer hora, sempre com aquele ar de que não fez nada.

Ao Raphael, que me deve quase uma fábrica de diamante negro, com suas frases prontas para os agradecimentos das teses, pela colaboração, pelas consultorias rápidas via internet, pelas conversas interessantes e muito muito divertidas.

Ao Flávio, por ser um amigo incrível, com os comentários mais inacreditáveis, por ser o único a reconhecer a minha calma e controle, pela companhia, pela paciência, por esquecer tudo menos de dizer uma palavra de apoio, pelo seu trabalho novo que é bonito de ver.

A Dra. Raquel Maia e ao Dr. Ernesto de Meis do INCA, pela primeira conversa sobre o projeto com células dendríticas.

Aos professores da Bioquímica e da Biofísica pela colaboração, mais próxima ou menos próxima, em especial ao Dr. Franklin Rumjanek, ao Dr. Julio Scharfstein, ao Dr. Célio Lima, ao Dr. Robson Coutinho e a Dra. Elisabeth Gestal da UFF.

A toda a minha família e, em especial aos meus pais, Gilberto e Leatrice, por me lembrarem sempre do valor das coisas simples da vida, pelo apoio as minhas decisões, por me darem tranquilidade nos momentos difíceis. Ao meu pai por mostrar que a educação está aí espalhada nas coisas do mundo, pelos valores da vida e por se interessar sempre pelo meu trabalho. A minha mãe por ser mãe no sentido mais emocional da palavra, pela bela história de trabalho que aconteceu sem fronteiras.

Ao meu irmão Gilberto, a minha cunhada Roberta e aos meus sobrinhos Maria Clara e Gilbertinho. Ao meu sobrinho por me fazer rir nas horas de pior estresse dizendo: "Titia quando eu crescer não quero fazer doutorado não...". E a minha sobrinha que diz: "Titia você está estudando tanto assim porque senão a sua professora briga?..."

Aos meus avós que estão sempre presentes nas minhas lembranças. A minha avó, Ivonne, que me apresentou a arte como sendo o mundo que passa pela nossa percepção Hoje eu diria a ela que este comentário também cabe para à Ciência. Ao meu avô, Celso, por me ensinar o fascínio dos livros, por contar as histórias ainda melhor do que alguns autores e por acreditar que a qualquer tempo eu chegaria em casa com um prêmio.

Ao meu marido, Anselmo, do qual eu tenho orgulho do caminho profissional..., e que apesar de estar fora da área de ciências descobriu (em algum lugar) o que são células dendríticas, linfócitos, etc, para comentar comigo com a maior naturalidade..., agradeço pela paciência e por me incentivar com tanta energia.

À Deus, por estarem estas pessoas tão perto de mim.

O Olho é uma espécie de globo é um pequeno planeta com pinturas do lado de fora (...)

Mas por dentro há outras pinturas, que não se vêem:

umas são imagens do mundo, outras são inventadas.

O Olho é um teatro por dentro.

(...)

Cecília Meireles

Resumo

NASCIMENTO C.R. Estudo da diferenciação e ativação de células dendríticas humanas *in vitro*. 2009. (Doutorado em Ciências Biológicas - Fisiologia). Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, Rio de Janeiro, 2009.

As células dendríticas (DCs) induzem a resposta imunológica por sua capacidade de capturar, processar e apresentar antígenos a linfócitos T. O resultado da interação destas duas células depende do subtipo e do estado de maturação das DCs; assim, estas células podem definir o destino da resposta a ser formada. O objetivo do nosso trabalho foi estabelecer, *in vitro*, os processos de diferenciação e ativação de células dendríticas humanas; investigar esses processos sob a influência do inibidor de desacetilases de histonas, butirato de sódio (NaB), e do hormônio ouabaína (Oua). A diferenciação das DCs foi estabelecida a partir de monócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis, em cultura com IL-4 e GM-CSF, e a ativação com o estímulo subsequente do TNF- α . A diferenciação foi avaliada, principalmente, pela expressão de CD14 e CD1a, e a ativação pela expressão de CD83. Os monócitos, quando estimulados a diferenciar, formaram colônias e apresentaram morfologia associada a células dendríticas. Além disso, estas células perderam a expressão de CD14, passaram a expressar CD1a, diminuíram a secreção de IL-1 β e aumentaram a capacidade de capturar antígenos. Após o estímulo do TNF- α , as células passaram a expressar a molécula CD83, aumentaram a secreção de IL-12 e induziram intensa proliferação de linfócitos alógenéticos. Quando o NaB foi adicionado às culturas de diferenciação, foi possível observar que as células perderam CD14, apresentaram morfologia característica de células dendríticas e aumentaram a capacidade de fagocitose. Porém, a expressão de CD1a foi afetada. Além disso, quando estas células foram estimuladas com TNF- α a expressão de CD83 foi parcialmente inibida, sem que houvesse alteração na expressão de HLA-DR e CD86. O mesmo foi observado quando o NaB era adicionado no tempo de ativação (ao mesmo tempo que o TNF- α) após diferenciação com IL-4 e GM-CSF. A fim de explorar os possíveis efeitos da Oua na ativação das DCs, nós adicionamos o hormônio durante a ativação. A expressão de CD83 induzida por TNF- α foi inibida na presença da Oua, assim como a expressão basal; além disso, a secreção de IL-12 foi reduzida quando a Oua estava presente nas culturas. Contudo, a expressão de outras moléculas relacionadas à ativação, como o HLA-DR e CD86, foi bastante elevada pela Oua, excedendo inclusive o aumento induzido pelo estímulo do TNF- α . Os dados em conjunto sugerem que células dendríticas com características de células imaturas foram geradas a partir de monócitos, em cultura com IL-4 e GM-CSF; o estímulo do TNF- α nestas culturas foi capaz de promover a ativação das células. O inibidor de desacetilases de histonas, NaB, regulou a expressão de CD1a sem comprometer o processo de diferenciação, mas afetou a expressão de CD83 durante a ativação induzida por TNF- α . Por fim, o hormônio ouabaína foi capaz de modular moléculas essenciais para a atividade de células dendríticas, porém, de forma independente do estímulo de ativação.

Abstract

NASCIMENTO C.R. Study of the differentiation and activation of human dendritic cells *in vitro*. 2009. (Doutorado em Ciências Biológicas - Fisiologia). Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, Rio de Janeiro, 2009.

Dendritic cells (DCs) are professional antigen-presenting cells with attributes for priming/activating T cells and mediating immune responses. DCs are heterogeneous and, depending on their subtype and maturation stage, these cells can induce different T-cell fate. The aim of our study was to establish, *in vitro*, DCs differentiation and activation; and to investigate these processes under the influence of sodium butyrate (NaB), a histone deacetylase inhibitor, as well as the effects of the hormone ouabain (Oua). Monocytes from healthy individuals were differentiated into immature DCs with IL-4 and GM-CSF; these cells were further stimulated with TNF- α for activation. DC differentiation was evaluated mainly by CD14 and CD1a expression, whereas activation, induced by TNF- α , was evaluated by CD83 expression. Monocytes stimulated to differentiate displayed colony formation and dendritic cell morphology. Moreover, cells lost CD14, acquired CD1a, and showed decreased secretion of IL-1 β and increased phagocytic capacity. After TNF- α stimulation, cells expressed CD83, increased IL-12 secretion and were able to induce intense allogeneic lymphocyte proliferation. We found that monocytes stimulated to differentiate in the presence of NaB lost CD14, acquired DC morphology and increased their phagocytic capacity. The acquisition of CD1a, however, was impaired. On exposure to NaB during differentiation, followed by TNF- α stimulus, DCs exhibited comparable levels of the co-stimulatory molecule CD86 and of HLA-DR, whereas the induction of CD83 was partially inhibited. When NaB was given at the same time as TNF- α , inhibition was also observed. To explore possible effects of Oua on dendritic cells activation the hormone was given during activation at the same time as TNF- α . CD83 expression induced by TNF- α or basal expression was inhibited in the presence of Oua; moreover, IL-12 secretion was also reduced when Oua was present in the culture. However, the expression of other molecules related to DC activation, such as HLA-DR and CD86, was increased by Oua, an increment even higher than that observed with TNF- α . These findings suggest that immature dendritic cells were generated from monocytes in culture with IL-4 and GM-CSF; and the presence of TNF- α induced their activation. The histone deacetylase inhibitor, NaB, regulated CD1a expression without impairing DC differentiation, but affected CD83 during activation induced by TNF- α . And the hormone ouabain was able to modulate molecules essential for DC activity, in both immature and activated cells.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC – ATP *binding cassette*

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrópico

AICD - Morte induzida por ativação

APC – Célula apresentadora de antígeno

ATP – Adenosina trifosfato

CD – Agregado de diferenciação, do inglês *cluster of differentiation*

Ctrl – Controle

DC – Célula dendrítica

DMSO – Dimetil sulfoxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EGF – Fator de crescimento epidermal

EGFR – Receptor do Fator de crescimento epidermal

ELISA – Ensaio de imunodeteção ligado à enzima

ERK – Cinase regulada por sinais extracelulares

FasL – Ligante de Fas

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

FLT3L – Ligante do receptor tirosina quinase tipo FMS 3

GM-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

Hsp – Proteína do choque térmico

ICAM – Molécula de adesão intercelular 1

IFN – Interferon

IL – Interleucina

JNK – Jun N-terminal cinase

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPK – Proteína cinase ativada por mitógenos

MTT – Brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazol

MHC – Complexo de histocompatibilidade principal

NaB – Butirato de Sódio

Na,K-ATPase – Proteína sódio-potássio ATPase

NF- κ B – Fator nuclear Kappa B

NK – “Natural killer”

Oua – Ouabaína

PBS – Solução salina fosfatada

PE – Ficoeritrina

PGE₂ - Prostaglandina E₂

PI3K – Fosfatidil-inositol-3 cinase

RPMI – Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

RNA – Ácido Ribonucléico

RTK – Receptor tirosina cinase

SFB – Soro fetal bovino

Src – Proteína tirosina cinase homóloga à identificada no vírus de sarcoma de Rous

STAT – Transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição

TAP – Transportador associado ao processamento de antígenos

TCR – Receptor de célula T

Th – Célula T *helper*

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TSA – Tricostatina-A

UV - Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem de uma célula dendrítica fixada isolada de baço de camundongo.	23
Figura 2. Esquema de diferenciação de células dendríticas convencionais e plasmacitóides.....	27
Figura 3. Apresentação de antígenos – via do MHC classe I e via do MHC classe II ...	30
Figura 4. Apresentação cruzada	32
Figura 5. Esquema da interação DCs – linfócitos, com detalhe para os 3 sinais	39
Figura 6. Ciclo de vida das células dendríticas	42
Figura 7. Esquema dos processos de diferenciação e ativação de células dendríticas in vitro a partir de monócitos	44
Figura 8. Esquema da estrutura dos nucleossomos – unidades formadoras da cromatina.....	47
Figura 9. Classes de HDACs e seus respectivos inibidores.....	53
Figura 10. Fórmula estrutural da ouabaína	56
Figura 11. Fotografia das plantas <i>Strophanthus gratus</i> e <i>Acocanthera oblongifolia</i> , representante do gênero <i>Acocanthera</i>	57
Figura 12. Sinalização disparada pela ligação da Ouabaína à Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	62
Figura 13. Desenvolvimento de células dendríticas após cultura com IL-4 + GM-CSF..	77
Figura 14. Viabilidade celular após cultura com IL-4 + GM-CSF.....	78
Figura 15. Morfologia celular após cultura com IL-4 + GM-CSF	79

Figura 16. Expressão de CD14 e CD1a após cultura com IL-4 + GM-CSF.....	81
Figura 17. Expressão de CD14 e CD1a após cultura com IL-4 + GM-CSF (24h).	83
Figura 18. Captação de partículas de dextran após cultura com IL-4 + GM-CSF.	85
Figura 19. Desenvolvimento de células dendríticas após estímulo com TNF- α	87
Figura 20. Expressão de CD83 após estímulo com TNF- α	88
Figura 21. Produção de IL-12 por células dendríticas após estímulo com TNF- α	89
Figura 22. Proliferação de linfócitos após interação com células dendríticas.	91
Figura 23. Expressão de CD14 em monócitos cultivados com butirato de sódio (NaB). ..	93
Figura 24. Expressão de CD14 e CD1a em células dendríticas cultivadas com butirato de sódio (NaB).	95
Figura 25. Desenvolvimento e morfologia de células dendríticas em cultura com butirato de sódio (NaB).	97
Figura 26. Viabilidade de células dendríticas cultivadas com butirato de sódio (NaB)...	98
Figura 27. Produção de IL-1 β por monócitos e células dendríticas cultivados com butirato de sódio (NaB).	99
Figura 28. Captação de partículas de dextran por células dendríticas cultivadas com butirato de sódio (NaB).	100
Figura 29. Expressão de CD11b e CD11c em células dendríticas cultivadas com butirato de sódio (NaB).	102
Figura 30. Expressão de CD83 em células dendríticas cultivadas com butirato de sódio (NaB).....	103

Figura 31. Expressão de CD83, CD86 e HLA-DR em células dendríticas cultivadas com butirato de sódio (NaB).	105
Figura 32. Expressão de CD14 em monócitos cultivados com Ouabaína (Oua).....	106
Figura 33. Expressão de CD1a em monócitos cultivados com Ouabaína (Oua).....	107
Figura 34. Produção de TNF- α por monócitos cultivados com Ouabaína (Oua).....	108
Figura 35. Produção de TNF- α por células dendríticas cultivados com Ouabaína (Oua)	110
Figura 36. Expressão de CD83 por células dendríticas cultivados com o inibidor da p38	112
Figura 37. Expressão de CD83 por células dendríticas cultivados com Ouabaína (Oua)	114
Figura 38. Expressão de CD83 por células dendríticas cultivados com Ouabaína (Oua)	116
Figura 39. Produção de IL-12p40 por células dendríticas cultivados com Ouabaína (Oua)	118
Figura 40. Expressão de CD83 por células dendríticas cultivados com EGF	120
Figura 41. Expressão de HLA-DR por células dendríticas cultivados com Ouabaína (Oua)	122
Figura 42. Expressão de CD86 por células dendríticas cultivados com Ouabaína (Oua)	124
Figura 43. Expressão de CD80 por células dendríticas cultivados com Ouabaína (Oua)	126
Figura 44. Desenho esquemático de células dendríticas e suas múltiplas funções	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das enzimas HDACs	49
Tabela 2. Viabilidade de células dendríticas cultivados com Ouabaína (Oua)	109

SUMÁRIO

1. Introdução	21
1.1 Células dendríticas 21	
1.1.1 História	21
1.1.2 Origem e subtipos	24
1.1.3 Captura e processamento de antígenos	28
1.1.4 Ativação e migração.....	32
1.1.5 Apresentação de antígenos	37
1.1.6 Cultivo in vitro.....	42
1.2 Regulação da expressão gênica 45	
1.2.1 A organização da cromatina.....	45
1.2.2 Os inibidores de desacetilases de histonas	47
1.2.3 Os inibidores de desacetilases de histonas no sistema imunológico	53
1.3 A Ouabaína 55	
1.3.1 Características da Ouabaína.....	55
1.3.2 A Ouabaína endógena	58
1.3.3 Vias de sinalização ativadas pela Ouabaína.....	60
1.3.4 A Ouabaína no sistema imunológico.....	62
2. Objetivos	
2.1 Objetivo geral 65	
2.2 Objetivos específicos 65	
3. Material e Métodos.....	66
3.1 Material 66	
3.1.1 Soluções	66
3.1.2 Anticorpos	66
3.1.3 Reagentes.....	68

3.2 Métodos	70
3.2.1 Obtenção de monócitos de sangue periférico	70
3.2.2 Diferenciação e ativação de células dendríticas	70
3.2.3 Desenvolvimento das culturas e morfologia celular	71
3.2.4 Avaliação fenotípica	72
3.2.5 Análise da viabilidade celular	72
3.2.6 Ensaio de fagocitose	73
3.2.7 Capacidade funcional	73
3.2.8 Produção de citocinas	74
3.2.9 Análise estatística	74
4. Resultados	76
4.1 Diferenciação de células dendríticas in vitro	76
4.2 Ativação de células dendríticas in vitro	85
4.3 Efeito do butirato de sódio na diferenciação e ativação de células dendríticas	92
4.4 Modulação da ativação de células dendríticas pelo hormônio Ouabaína	105
4.5 Resumo dos resultados	128
5. Discussão	129
5.1 Diferenciação e ativação de células dendríticas	129
5.2 Efeitos do butirato de sódio nos processos de diferenciação e ativação de células dendríticas	135
5.3 Modulação da ativação de células dendríticas pelo hormônio Ouabaína	141
5.4 Considerações finais	146
6. Conclusões	149
7. Referências bibliográficas	150

8. Anexos	168
-----------------	-----

1. Introdução

1.1 Células dendríticas

1.1.1 História

As células dendríticas (DCs) foram descobertas por volta de 1970, o que é relativamente recente. Dois grupos em paralelo identificaram estas células: o grupo do Steinman e o grupo da Balfour (STEINMAN, 2007). Os contextos eram bastante distintos. Para o primeiro grupo o interesse girava em torno do que haveria no caminho entre o antígeno e a formação da resposta imunológica. Eles estudavam a produção de anticorpos em suspensões de células do baço de camundongos, quando observaram que a produção de anticorpos estimulada por antígenos (hemácias de carneiro) só acontecia quando uma população de células era adicionada, células ditas “acessórias”. E dentro desta população havia células diferentes das células do sangue que eram conhecidas até então, com uma forma nova, com expansões citoplasmáticas e motilidade. Logo estas células, por terem tantas projeções de citoplasma, receberam o nome de “dendríticas”, do grego “dendron” que significa árvore (STEINMAN e COHN, 1973). Os autores acreditaram que estas células eram necessárias para as respostas a antígenos que eram observadas no baço e nos linfonodos, assim era esperado que o número de células dendríticas estivesse aumentado nestes órgãos sob estímulo antigênico. Porém, o aumento no número de células totais observado naquelas condições não coincidia com um aumento no número de células dendríticas. Outra

possibilidade vislumbrada foi a de que as células dendríticas pudessem reter antígenos, contudo, comparando com outras células, os macrófagos, os autores concluíram que aquelas células eram incapazes de realizar a endocitose de antígenos (STEINMAN e COHN, 1974). Assim, os meios pelos quais as células dendríticas participavam das respostas imunológicas pareciam uma incógnita. A figura 1 mostra uma imagem publicada naquela época de uma célula dendrítica isolada do baço de camundongo, e também uma célula de sangue humano em meio líquido onde é possível observar, em imagens sucessivas, sua motilidade.

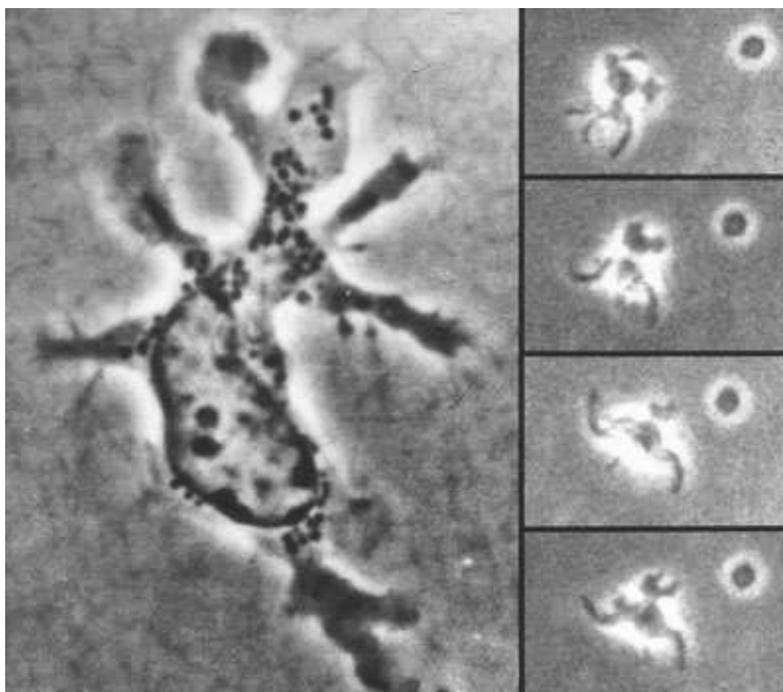


Figura 1. Imagem (microscopia de contraste de fase) de uma célula dendrítica fixada isolada de baço de camundongo. No detalhe a direita, imagens sucessivas de uma célula dendrítica de sangue humano (retirado de STEINMAN, 2007).

O grupo de pesquisa da Balfour investigava a presença de células na linfa aferente e o possível aparecimento das mesmas nos linfonodos correspondentes, após o estímulo da pele de coelhos com um sensibilizador de contato. Eles observaram, neste modelo, a presença de células com diversos prolongamentos que pareciam véus, na linfa e um percentual expressivo nos linfonodos. Considerando a impressão causada pela forma das células, os autores passaram a se referir a elas como células “veladas”. Além disso, foi revelado um potencial fagocítico em parte destas células, e características em comum com as já descritas células de Langerhans da pele, sugerindo uma relação com as mesmas. A hipótese que foi formulada com base nestes

estudos foi que estas células faziam o transporte de antígenos (KELLY e cols, 1978; DREXHAGE e cols, 1979). Seguindo nesta linha, linfócitos de animais previamente estimulados com antígenos foram cultivados e estimulados *in vitro*. A adição às culturas de pequenos números de células veladas era suficiente para aumentar a resposta proliferativa dos linfócitos, e quando isto ocorria era possível observar que os linfócitos estavam “cercados” pelos prolongamentos daquelas células (KNIGHT e cols, 1982).

1.1.2 Origem e subtipos

As células dendríticas (DCs) formam uma população heterogênea de células que compreende subtipos com diferenças no fenótipo de superfície, função e localização. Três subtipos foram definidos: células de Langerhans (LCs), presentes na epiderme e também em outros epitélios, como o intestinal e respiratório; DCs da derme; DCs intersticiais; e plasmacitóides, encontradas na circulação sanguínea. As três primeiras também são denominadas DCs convencionais, ou mielóides quando se faz referência à origem hematopoética destas células, enquanto as plasmacitótides teriam origem a partir da linhagem linfóide. Assim como todas as células sanguíneas, as DCs são originadas a partir de células tronco hematopoéticas na medula óssea (SHORTMAN e NAIK, 2007). Muitos fatores são importantes para o processo total de desenvolvimento das DCs, alguns aparecem em etapas do desenvolvimento de outras células hematopoéticas, e outros são mais específicos para a geração de DCs e seus subtipos. A citocina FLT3L é considerada indispensável para o desenvolvimento das DCs convencionais e plasmacitóides, pois animais deficientes dessa citocina têm níveis baixos de DCs (MCKENNA e cols, 2000), assim como os animais deficientes de STAT3,

que é uma molécula importante na sinalização do FLT3L (LAOUAR e cols, 2003). Por outro lado, a administração de FLT3L induz a produção de altos níveis de DCs, tanto em humanos quanto em camundongos (MARASKOVSKY e cols, 1996; MARASKOVSKY e cols, 2000). O fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) também tem sido apontado como um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento das DCs, porém não está claro se esta citocina participaria da geração de DCs em estado de repouso ou em condições de inflamação, já que seus níveis são baixos no estado de repouso e aumentam durante a inflamação (CHEERS e cols 1988, CEBON e cols, 1994). E diferentemente do que se observa para o FLT3L, animais deficientes de GM-CSF ou seu receptor não perdem a produção de DCs, sugerindo que outros fatores podem desempenhar o mesmo papel (VREMEC e cols, 1997). Cabe ressaltar que no estudo de Vremec e colaboradores, apenas as populações residentes foram avaliadas.

O fato das células dendríticas terem origem a partir de células CD34⁺ na medula óssea não é controvertido, porém a origem de cada subtipo dentro das linhagens da medula tem sido extensamente discutido. A origem linfóide foi atribuída às células plasmacitóides, por estas terem a expressão de “marcadores” linfóides, como por exemplo, a enzima RAG (CORCORAN e cols, 2003); por outro lado, as DCs convencionais expressam moléculas comuns às células mielóides, como o CD11c e CD33 (SALLUSTO e LANZAVECCHIA, 1994). Contudo, Ishikawa e colaboradores separaram progenitores linfóides comuns e progenitores mielóides comuns e mostraram que ambos podem dar origem a células convencionais e a células plasmacitóides (ISHIKAWA e cols, 2007). Ainda neste estudo os autores compararam a expressão

gênica das células convencionais originadas do progenitor linfóide com a do mesmo tipo celular originado do progenitor mielóide e observaram um padrão idêntico, sugerindo que o desenvolvimento das DCs segue uma via comum independente das vias tradicionais de diferenciação linfóide e mielóide. A figura 2 mostra o esquema proposto para o desenvolvimento das DCs na medula óssea, onde a separação dos tipos DCs convencionais e plasmacitóides se daria em uma fase mais tardia da diferenciação, a partir de um precursor comum que ainda não foi definido, mas que deve responder ao estímulo do FLT3L.

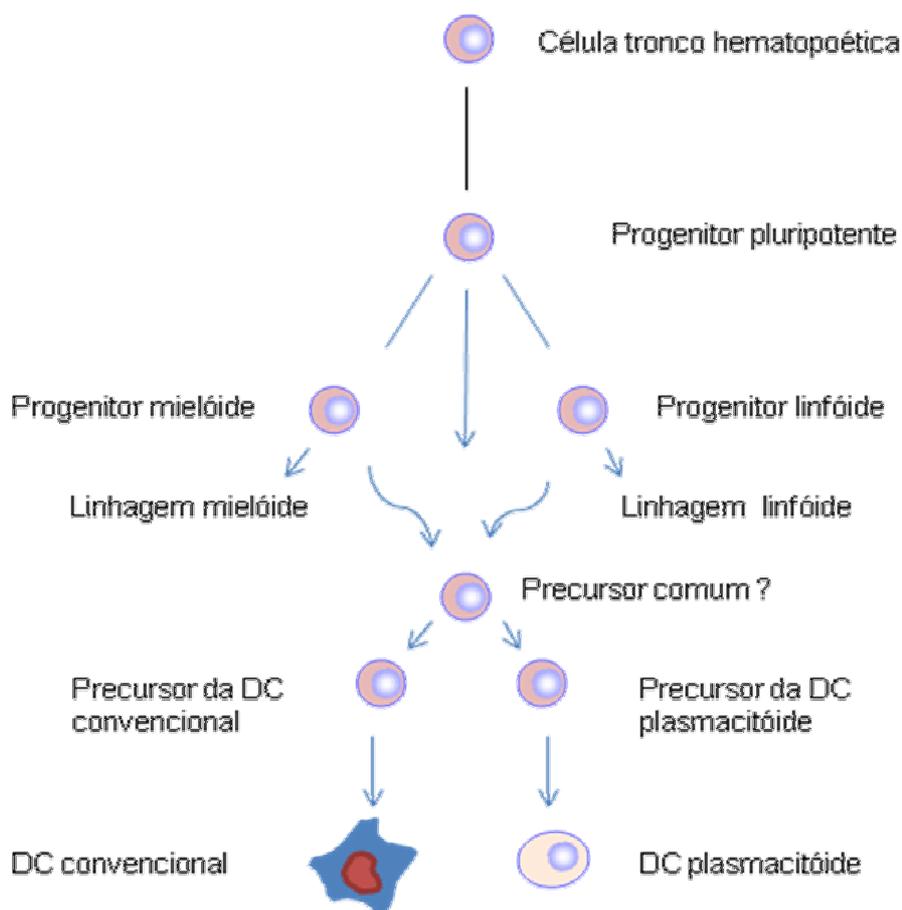


Figura 2. Esquema de diferenciação de células dendríticas convencionais e plasmacitóides (adaptado de ISHIKAWA e cols, 2007).

As células dendríticas respondem com plasticidade a diversos estímulos endógenos, como citocinas, mediadores inflamatórios, neuropeptídeos e hormônios. As modificações decorrentes de tais estímulos e a ampla distribuição pelos tecidos têm levado a uma classificação ainda mais complexa das DCs, que podem ser subdivididas com base em características fenotípicas, de migração, presença na inflamação, estágios de desenvolvimento, entre outros. Os estágios de desenvolvimento, por

exemplo, fazem a distinção entre células denominadas pré-DCs, DCs imaturas e DCs ativadas (STEINMAN, 1991; NAIK, 2008). As células plasmacitóides são exemplos de pré-DCs, pois precisam de estímulo (vírus, bactérias) para apresentar a forma e a função típicas de células dendríticas. Estas células têm como característica peculiar a capacidade de produzir grandes quantidades de interferons do tipo I (O'KEEFFE e cols, 2002).

As células dendríticas (DCs) desempenham o papel de indução da resposta imunológica, principalmente por apresentarem antígenos a linfócitos T, e têm sido apontadas como reguladoras dessa resposta. Esta função das DCs está separada em duas etapas, a captura e processamento dos antígenos e a interação com linfócitos e apresentação desses antígenos, correspondendo aos estágios de células imaturas e ativadas, respectivamente (STEINMAN, 1991).

1.1.3 Captura e processamento de antígenos

As células dendríticas imaturas são muito eficientes na captura de antígenos, e o fazem por diversas vias, como: macropinocitose, endocitose mediada por receptor e fagocitose. Na macropinocitose as células são capazes de formar vacúolos e englobar quantidades de líquido do seu entorno, o que permite a internalização de antígenos de uma forma não específica; com os processos de fagocitose é possível capturar fragmentos de células, células necróticas/apoptóticas, mediado por CD36 e pelas integrinas $\alpha\beta3$ e $\alpha\beta5$, além de vírus, bactérias e parasitas; tanto a macropinocitose quanto a fagocitose são dependentes de actina. Quando ocorre a endocitose mediada por receptores, como os receptores do tipo lectina-C (receptor de manose e DEC-205),

receptores Fc γ (para porções Fc das imunoglobulinas) tipos I (CD64) e II (CD32), e o receptor de complemento C3bi (CD11b), a captura é de macromoléculas, imunocomplexos e partículas opsonizadas e há formação de vesículas endocíticas (GUERMONPREZ e cols, 2002). As DCs também são capazes de endocitar complexos de proteínas de choque térmico (HSPs) com peptídeos através dos receptores “scavenger” CD91 e SR-A (BASU e cols, 2001; BERWIN e cols, 2003). Neste último caso a origem do antígeno é a célula a qual pertenciam as HSPs; então se as HSPs foram liberadas, por exemplo por células tumorais, a origem dos antígenos será tumoral (UDONO e SRIVASTAVA, 1993). Além disso, as DCs neste estado produzem uma série de citocinas (ex. IL-12) que podem modular a atividade de outras células do sistema imunológico que estejam no local, como macrófagos, eosinófilos e células NK (BANCHEREAU e cols, 2000). Desta forma as DCs percebem modificações em seu meio e levam a informação adiante.

As DCs acumulam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade II (MHC II) em compartimentos intracelulares (endossomos). Na via do MHC de classe II o material internalizado (antígenos de origem extracelular) é processado em endossomos/lisossomos e os peptídeos resultantes encontram os compartimentos ricos em moléculas de MHC. Porém, estas moléculas de MHC têm a porção de ligação aos peptídeos ocupada por proteínas denominadas cadeias invariantes. Sob estímulo de ativação ocorre a remoção das cadeias invariantes e a associação dos peptídeos formados a moléculas de MHC classe II, só então o complexo MHC-peptídeo será exportado para a superfície da célula onde permanece estável durante dias. Na via do MHC de classe I os antígenos de origem intracelular, que podem ser proteínas de

microorganismos intracelulares ou proteínas normais da célula, são processados em estruturas denominadas proteossomos e os peptídeos formados são transportados, através das proteínas TAP (transportadores dependentes de ATP, da família ABC de transportadores), para dentro do retículo endoplasmático. Neste ambiente os peptídeos se ligam a moléculas de MHC classe I, que estão aptas para serem transportadas para a superfície da célula (GUERMONPREZ e cols, 2002). A figura 3 mostra as vias de MHC classe I e MHC classe II.

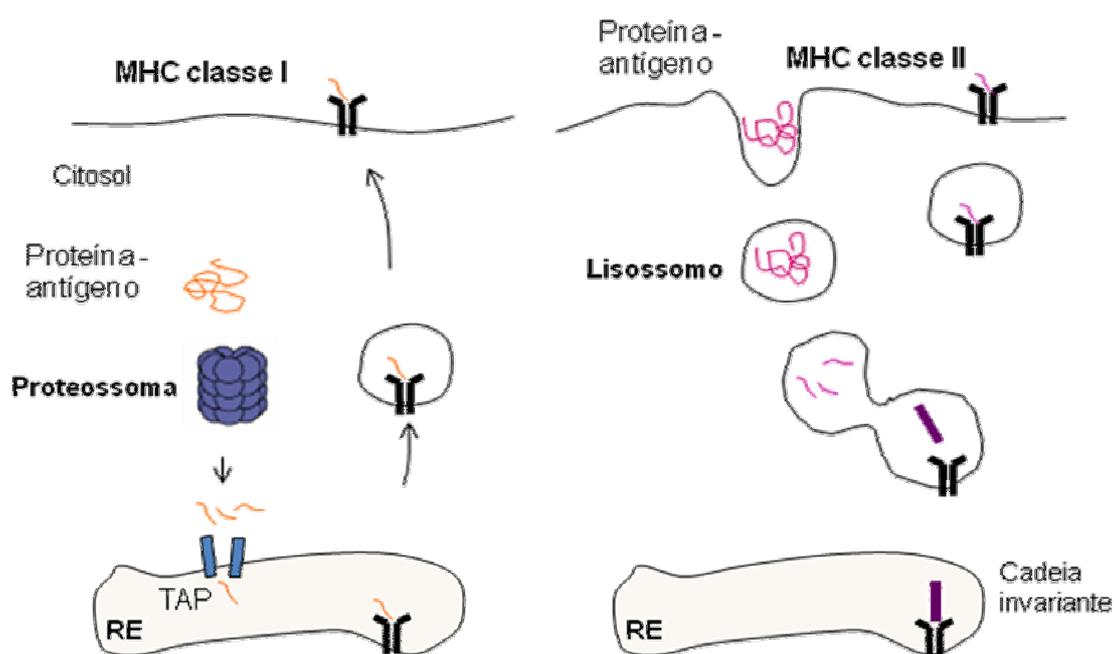


Figura 3. Apresentação de antígenos – via do MHC classe I (esquerda) e via do MHC classe II (direita) (adaptado de MONU e TROMBETTA, 2007).

Linfócitos T CD8⁺ e linfócitos T CD4⁺ respondem a antígenos associados a moléculas de MHC classes I e II, respectivamente (LIPSCOMB e MASTEN, 2002). Por esta relação as DCs só poderiam apresentar aos linfócitos T CD8⁺ antígenos de origem intracelular, por exemplo vírus que estivessem infectando as DCs e induzindo estas células a produzirem proteínas virais, as quais entram na via do MHC de classe I. Porém, esta visão clássica foi contrariada por experimentos que demonstravam respostas de linfócitos CD8⁺ contra antígenos de origem extracelular, como aqueles originados de células tumorais. Atualmente, sabe-se que antígenos capturados do meio extracelular podem entrar na via do MHC de classe I, e ser assim apresentados por células apresentadoras de antígenos (APCs) a linfócitos CD8⁺, em um tipo de apresentação que recebeu o nome de “apresentação cruzada” (BEVAN, 1976; MONU e TROMBETTA, 2007). Os mecanismos pelos quais os antígenos internalizados têm acesso a via do MHC de classe I ao invés de seguir pela via do MHC de classe II, o que seria uma tendência, não estão esclarecidos. A figura 4 mostra o escape de uma proteína para o citosol e a consequente exposição do peptídeo na membrana em associação ao MHC I.

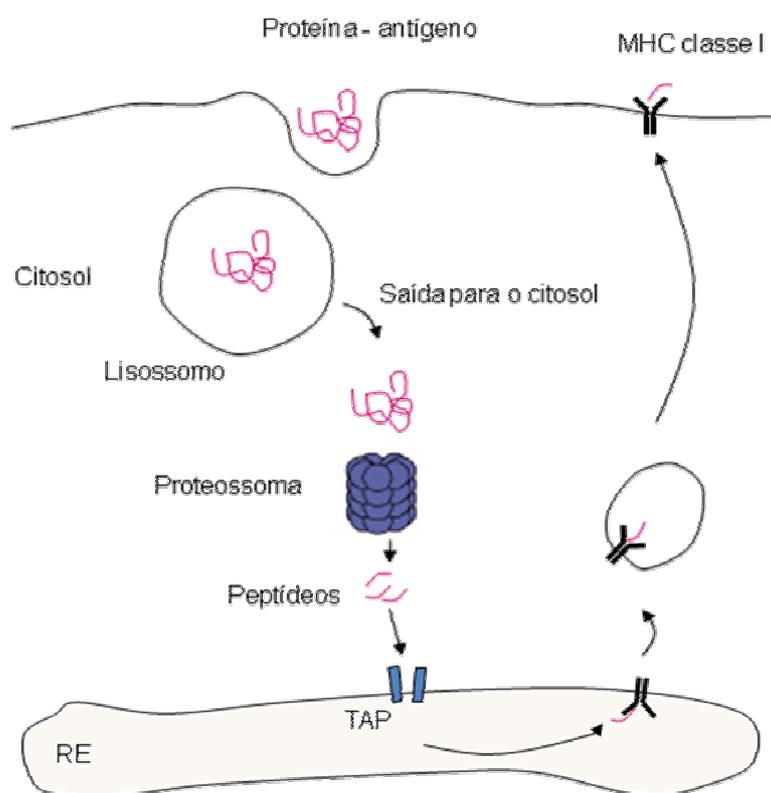


Figura 4. Apresentação cruzada (adaptado de MONU e TROMBETTA, 2007).

A captura de antígenos pode ser um sinal de ativação para as células dendríticas. Na ativação a habilidade de capturar antígenos diminui e uma série de modificações tem início (GUERMONPREZ e cols, 2002).

1.1.4 Ativação e migração

A ativação das DCs é um processo contínuo que tem início na periferia e pode ser intensificado ou regulado nos órgãos linfóides secundários. Segundo Matzinger, as

DCs respondem a diversos tipos de sinais, os quais são denominados “sinais de perigo”, podendo ser de origem endógena ou exógena (MATZINGER, 1994). Estas células podem perceber patógenos através dos receptores do tipo Toll, que reconhecem padrões comuns a diversos patógenos, como o LPS de bactérias e o RNA de dupla fita dos vírus. Fatores endógenos considerados sinais de ativação incluem a estimulação do CD40 pelo CD40L (expresso por linfócitos ativados) e o balanço entre citocinas e mediadores inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e prostaglandinas no microambiente (GUERMONPREZ e cols, 2002). Também pode ser percebida a presença de componentes do meio intracelular como, por exemplo, o ATP, heme e as proteínas de choque térmico (HSPs), que podem ser liberados em condições de estresse celular ou quando ocorre a necrose de células (BASU e cols, 2000; SCHNURR e cols, 2000; FIGUEIREDO e cols, 2007). Além disso, hormônios como a bradicinina podem induzir a ativação de DCs via receptores de bradicinina (ALIBERTI e cols, 2003). Assim, de acordo com o conceito de “sinais de perigo” a resposta imunológica pode ser iniciada por moléculas causadoras de danos ao organismo, o que contrapõe a idéia mais antiga de que o sistema imunológico responde, simplesmente, a agentes invasores. E, a função das DCs no novo conceito seria captar os sinais do seu entorno e transmitir essa informação para outras células do sistema imunológico.

O processo de ativação envolve diversas mudanças nas células, incluindo: (a) perda dos receptores endocíticos e fagocíticos (ex. receptores de manose, DEC-205, CD64, CD32), (b) regulação positiva de moléculas co-estimulatórias e de adesão (ex. CD40, CD58, CD80, CD83, CD86), (c) mudanças na expressão de receptores de quimiocinas (ex. expressão de CCR7) (d) secreção de padrões de citocinas (ex. IL-12,

IL-4, IL-10) (e) mudanças nos compartimentos lisossomais com a regulação negativa de CD68 e positiva de proteínas de membrana do lisossomo (ex. DC-LAMP), (f) alterações nos compartimentos de MHC II e (g) alterações na morfologia da célula (ex. perda de estruturas adesivas, reorganização do citoesqueleto) (BANCHEREAU e cols, 2000). Uma molécula importante na reorganização do citoesqueleto e na motilidade das DCs é a proteína fascina, a qual participa da organização de filamentos de actina (ADAMS, 2004).

As células dendríticas parecem ser as únicas entre as células apresentadoras de antígenos (APCs) que têm a capacidade de estimular células T *naive*, o que permite o contato das células T com antígenos, iniciando uma resposta imunológica primária. Este atributo particular das DCs ficou claro a partir de estudos que compararam a habilidade de estimular linfócitos de DCs, macrófagos e linfócitos B. Nestes estudos as DCs induziram uma proliferação intensa dos linfócitos, a qual só foi conseguida por macrófagos e células B quando estes foram adicionados como re-estímulo (INABA e STEINMAN, 1984).

As células *naive* não são encontradas em tecidos periféricos, assim, seu encontro com as DCs acontece nos linfonodos após migração destas últimas. Os sinais que estimulam a migração das DCs são muitas vezes os mesmos que induzem a ativação destas células, assim como TNF- α , IL-1 β e LPS (RANDOLPH, 2001); isto provavelmente porque estes sinais atuam em seus respectivos receptores em uma sequência de sinalização que converge em pontos comuns, como a ativação do fator de transcrição NF- κ B. Foi demonstrado que a inibição do NF- κ B, assim como a inibição da p38 MAPK, bloqueiam a ativação das DCs induzida por LPS ou por antígenos de

contato. De fato a via da p38 é ativada pelo estímulo das citocinas TNF- α , IL-1 β e do LPS, além de condições de estresse (ex. calor, irradiação UV) (ARDESHNA e cols, 2000; ARRIGHI e cols, 2001). Em um modelo de hipersensibilidade de contato, foi demonstrado que camundongos tratados com anticorpos neutralizantes contra TNF- α e IL-1 β apresentam alterações na mobilização dessas células para os linfonodos drenantes (CUMBERBATCH e cols, 1997). Este fato vincula a ativação e a capacidade migratória por um lado, mas não explica a presença de células consideradas imaturas nos linfonodos por outro lado (WILSON e cols, 2003). Para explicar este fato tem sido sugerido que a maturação pode não ser necessária para a migração de todas as subpopulações de DCs, o que parece coerente, pois também ocorre migração, apesar de menos intensa, em estado de repouso.

Muito do que se conhece acerca da migração das DCs foi estudado em células de Langerhans da pele, pela possibilidade de se acompanhar a saída e chegada destas células. Com a iminência da migração, as DCs iniciam eventos necessários para sua saída do tecido. Por exemplo, a E-caderina expressa por células de Langerhans permite a permanência destas células no epitélio. A ativação das células de Langerhans induz o desaparecimento dessas moléculas da superfície, permitindo que estas células se soltem dos queratinócitos vizinhos (TANG e cols, 1993), ocorre ainda a ativação de moléculas de adesão como $\alpha 6\beta 1$ e CD44, a indução de enzimas como a metaloproteinase-9, e liberação de colagenases do tipo IV que facilitam a passagem pelas membranas basais, características que em conjunto permitem eventos que culminam com a migração da pele para os órgãos linfóides secundários (RANDOLPH, 2001). As DCs chegam aos linfonodos pelos vasos linfáticos aferentes, possivelmente

com exceção para o subtipo plasmacitóide que pode chegar pelo sangue, assim como fazem os linfócitos (KUPIEC-WEGLINSKI e cols, 1988).

Dentre as modificações provenientes da ativação que estão associadas à migração está a expressão do receptor de quimiocinas CCR7, cuja importância também tem sido comprovada para a entrada de células T *naive* nos linfonodos. Este receptor tem como ligantes as quimiocinas CCL19 e CCL21, e as células migram a favor de um gradiente de tais quimiocinas (RANDOLPH, 2001). Camundongos *plt/plt* têm uma mutação que abole a expressão de CCL19 e limita a expressão de CCL21 ao endotélio dos vasos linfáticos, nestes animais as DCs e as células T *naive* pouco chegam aos linfonodos. A CCL21 tem expressão constitutiva em células endoteliais de vasos linfáticos e também está expressa em vênulas e em células estromais da zona T dos linfonodos, e a CCL19 é produzido por células do estroma do linfonodo (revisado por FÖRSTER e cols, 2008). A expressão constitutiva da CCL21 pode ser um indicativo do seu envolvimento na migração das DCs em estado de repouso. Mas, a questão que ainda está aberta é se células que migram em estado de repouso expressam CCR7, pois assim seriam capazes de responder a CCL21 constitutiva, ou se migram utilizando outros meios. As DCs quando se tornam ativadas começam a secretar quimiocinas, e a migração pode ter o envolvimento de mecanismos autócrinos (SALLUSTO e cols, 1999). Os mediadores lipídicos, os quais podem ser transportados pelas próprias DCs, também atuam como moduladores da migração destas células para os linfonodos. A responsividade do CCL19 é elevada por leucotrienos e prostaglandinas através da modulação da expressão de CCR7 (RANDOLPH, 2001). Tem sido sugerido que as quimiocinas CCL19 e CCL21 podem não só direcionar a migração para os linfonodos,

mas também o destino das células dentro do órgão. Nesta linha, foi demonstrado que a adição de CCL19 em co-culturas de DCs com linfócitos aumentava a proliferação dos linfócitos, sugerindo que a quimiocina tenha atuado como um estímulo de aproximação entre as células (MARSLAND e cols, 2005).

1.1.5 Apresentação de antígenos

Há algumas suposições de que as DCs que chegam aos linfonodos transferem os antígenos às células residentes ao invés de apresentá-los diretamente a linfócitos, e as DCs residentes é que teriam essa função, ou ambas teriam. Esta transferência poderia ocorrer pela liberação de exossomos contendo antígenos, corpos apoptóticos das DCs ou até pela passagem de antígenos para células vizinhas através de junções comunicantes (CARBONE e cols, 2004). Esta hipótese foi ainda mais motivada por alguns estudos que mostraram imagens de DCs residentes nos linfonodos formando redes de células e as imigrantes integrando essas redes (LINDQUIST e cols, 2004). Outras células dendríticas consideradas residentes são as encontradas no timo e no baço (WILSON e cols, 2003). Estas exerceriam suas funções nos locais onde estão sem o envolvimento da migração, capturando e apresentando antígenos solúveis que são drenados para os órgãos linfóides.

Durante o reconhecimento de antígenos, em uma interação DC-cel T, se observa uma organização de moléculas na interface das duas células. Esta junção, a qual resulta da organização de receptores de células T (TCRs), complexos MHC-peptídeo, moléculas co-estimulatórias e de adesão, sinalização e citoesqueleto foi denominada “sinapse imunológica” (DUSTIN e cols, 2006). Em uma região de sinapse a ativação

dos linfócitos envolve 3 sinais enviados pelas DCs. O sinal 1 corresponde a interação do complexo MHC-peptídeo com o TCR; o sinal 2 é aquele dado pela ligação de moléculas co-estimulatórias como CD80, CD86, CD40 e seus ligantes correspondentes nos linfócitos, este sinal é capaz de amplificar a sinalização disparada pela interação do complexo MHC-peptídeo com o TCR; e finalmente o sinal 3 é produzido pelo efeito de citocinas liberadas entre as células, principalmente a IL-12 (DIEBOLD, 2008). A ausência de um destes sinais tem conseqüências importantes para os linfócitos, a ausência do sinal 2 pode levar os linfócitos a anergia (estado de não responsividade) (revisado por KEIR e SHARPE, 2005). Por outro lado, a composição de citocinas do sinal 3 determina a diferenciação dos linfócitos em células efetoras, por exemplo a presença de IL-12 está associada a diferenciação de linfócitos do tipo Th1 (WATFORD e cols, 2003). Um esquema destes sinais está apresentado na figura 5.

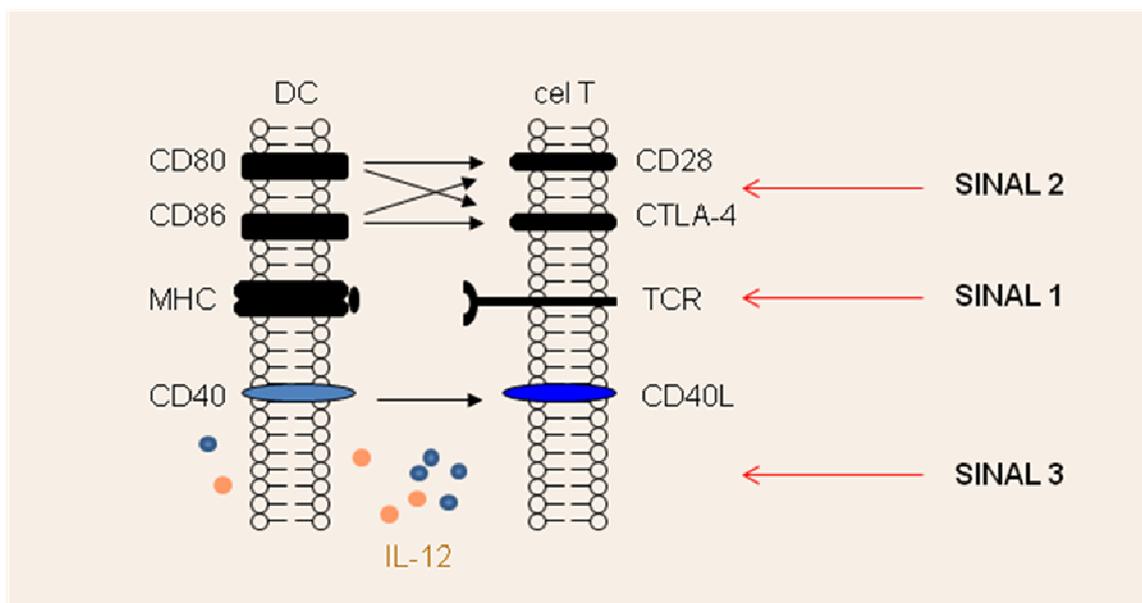


Figura 5. Esquema da interação DCs – linfócitos, com detalhe para os 3 sinais (adaptado de ZOU e CHEN, 2008).

A expressão de moléculas co-estimulatórias incluindo CD58, CD80, CD86 e CD40, moléculas de adesão como ICAMs I (CD54) e II (CD50) permite a interação com linfócitos e sua estimulação. A adesão inicial é mediada por integrinas (ex. LFA-1 (célula T) - ICAM-1 (DC)) e outras moléculas de adesão (ex. CD2 (célula T) - CD48 (DC), ICAM-3 (célula T) – DC-SIGN (DC)), as quais superam a barreira imposta pelas cargas negativas do glicocálix presentes nas superfícies celulares das células T e DCs (BROMLEY e cols, 2001). Contudo, a interação só ocorrerá com linfócitos que tenham receptores (TCRs) relevantes, correspondentes aos antígenos que estiverem complexados a moléculas de MHC na superfície das DCs. Quando este é o caso, as moléculas CD80 e CD86 se ligam ao CD28 em linfócitos, um sinal que promove a sobrevivência dos linfócitos e progressão no ciclo celular; porém as mesmas moléculas

podem se ligar ao CTLA-4, que é uma molécula induzida em linfócitos, cuja ligação está associada à regulação negativa da resposta destes linfócitos, limitando ou diminuindo essa resposta (KEIR e SHARPE, 2005). Além do CTLA-4 outras moléculas estão envolvidas na regulação da ativação dos linfócitos. A família B7 de moléculas co-estimulatórias, entre as quais podemos citar o CD80 (B7-1) e o CD86 (B7-2), também apresenta membros denominados co-inibitórios, de descoberta mais recente, como o B7-H1 (DONG e cols, 1999) e B7-H4 (PRASAD e cols, 2003; ZANG e cols, 2003). A interação destes com seus ligantes ou contra-receptores em células T, PD-1, por exemplo, pode desencadear inclusive a morte destas células (HORI e cols, 2006). Uma diferença importante entre as moléculas co-estimulatórias e as co-inibitórias é a expressão das primeiras, que é restrita a APCs e a células hematopoéticas, enquanto a expressão das moléculas co-inibitórias é mais ampla, ocorre em diversos tecidos, inclusive em células tumorais. As moléculas B7-H1 têm expressão induzida em muitos tecidos, porém, estão expressas de forma constitutiva em sítios de imunoprivilégio, como o olho e a placenta, onde as respostas imunológicas ficam controladas ou suprimidas (ZOU e CHEN, 2008). Apesar de ser bem estabelecido que as interações de DCs com linfócitos são necessárias para a imunidade, evidências recentes revelaram que este contato também é essencial para a indução de tolerância periférica e regulação das respostas por células T regulatórias (Tregs) (REIS e SOUSA, 2006).

Na interação das DCs com linfócitos estes últimos não estão passivos e também enviam sinais essenciais para as DCs, por exemplo através da ligação do CD40L-CD40, a qual aumenta a sobrevivência das DCs, regula positivamente a expressão de CD80 e CD86, a secreção de IL-12 e a liberação de quimiocinas como IL-8, MIP-1 α e β .

Além disto, a ligação CD40L-CD40 confere as DCs a habilidade de ativar linfócitos T CD8⁺. As DCs também contribuem para a ativação e diferenciação de linfócitos B, diretamente pela produção e sinergismo de citocinas e indiretamente pela ativação dos linfócitos T (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998).

O processo de ativação da célula T envolve uma seqüência de eventos intracelulares que culmina na transcrição de genes específicos, na entrada da célula T no ciclo celular e na diferenciação da célula T efetora, as quais migram para um local de inflamação que tende a ser o local de origem do antígeno (revisado por BROMLEY e cols, 2001).

As DCs não são encontradas nos vasos linfáticos eferentes o que levou à suposição de que estas células terminam seu ciclo morrendo por apoptose. O que de fato deve ocorrer, considerando os estudos que mostram que as DCs maduras, apesar de resistentes a morte mediada por receptores como Fas (CD95) ou TRAIL, morrem por apoptose quando tratadas com diferentes tipos de anticorpos anti-MHC II (LOKSHIN e cols, 2002; LEVERKUS e cols, 2003).

A figura 6 ilustra o ciclo de vida das células dendríticas.

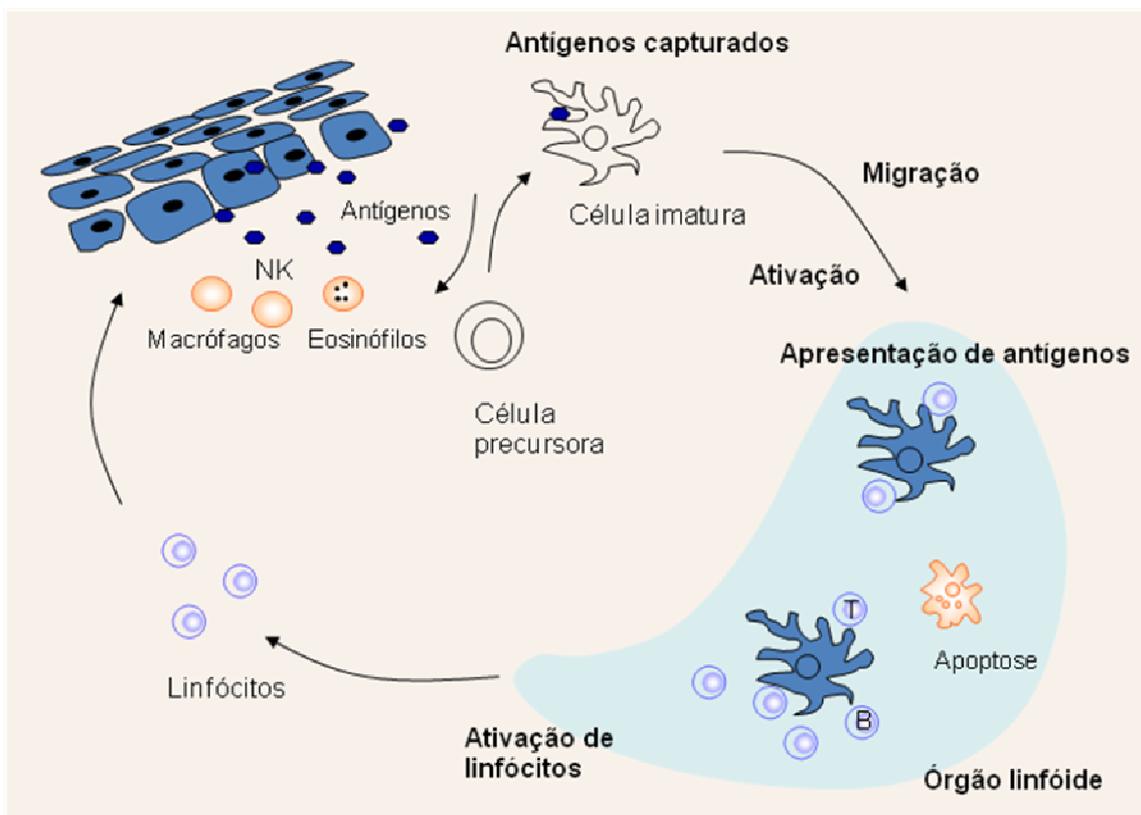


Figura 6. Ciclo de vida das células dendríticas (adaptado de BANCHEREAU e cols, 2000).

1.1.6 Cultivo *in vitro*

As DCs são células raras, distribuídas por diversos tecidos e de difícil isolamento. Representam de 0,1-0,5% das células mononucleares sanguíneas em humanos (Van VOORHIS e cols, 1982). Portanto, os estudos sobre estas células, principalmente as humanas, foram limitados por um longo período desde sua descoberta. Após as primeiras descrições de que precursores CD34⁺ da medula óssea e monócitos circulantes no sangue periférico quando manipulados *in vitro* podem dar

origem a células dendríticas (CAUX e cols, 1996), houve uma grande mudança neste de cenário, o que permitiu grande parte do conhecimento sobre o ciclo de vida das DCs mencionado até aqui. Romani e colaboradores, em 1994, concluíram que os monócitos estimulados com GM-CSF se diferenciam em macrófagos a menos que esta tendência seja inibida pela presença de IL-4. Nesta última condição (cultura com GM-CSF e IL-4) os autores observaram que os monócitos se diferenciam em células dendríticas não por terem a tendência, mas o potencial para tal diferenciação (ROMANI e cols, 1994). Em paralelo, Sallusto e Lanzavecchi confirmaram estes dados e mostraram que além de obter DCs *in vitro* a partir de monócitos era possível ter células com características de imaturas ou de ativadas dependendo da combinação de citocinas utilizada. A presença de GM-CSF e IL-4 nas culturas promove a diferenciação de células imaturas, e quando adiciona-se TNF- α , as células adquirem diversas características de células ativadas (SALLUSTO e LANZAVECCHIA, 1994). Os primeiros estudos de caracterização de DCs isoladas de tecidos e diferenciadas *in vitro* a partir de precursores se basearam, principalmente, no aspecto das culturas e nas peculiaridades morfológicas daquelas células. Atualmente, as características fenotípicas são mais freqüentemente utilizadas para avaliar a diferenciação de monócitos em células dendríticas. No processo de maturação, as DCs passam a expressar moléculas da família CD1, em particular o CD1a; esta família de proteínas está relacionada à apresentação de antígenos lipídicos (BECKMAN e cols, 1994; MORI e DE LIBERO, 2008). E deixam de expressar outras moléculas como o CD14, uma molécula de superfície associada à fagocitose e importante para a ligação do LPS ao Toll 4 (TAPPING e TOBIAS, 1997; GREGORY, 2000). Sob estímulo de ativação as DCs modulam outras moléculas relacionadas à

migração e a apresentação de antígenos, como o MHC II, as moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, e o receptor de quimiocinas CCR7. Além disto, as células quando ativadas expressam CD83, que apesar de ter função ainda desconhecida permanece como a principal molécula característica da maturação final, ou ativação das DCs (ZHOU e TEDDER, 1996). A figura 7 mostra um esquema de diferenciação de monócitos em DCs imaturas seguido da ativação destas células, com uma lista exemplificando as moléculas que são moduladas durante os dois processos.

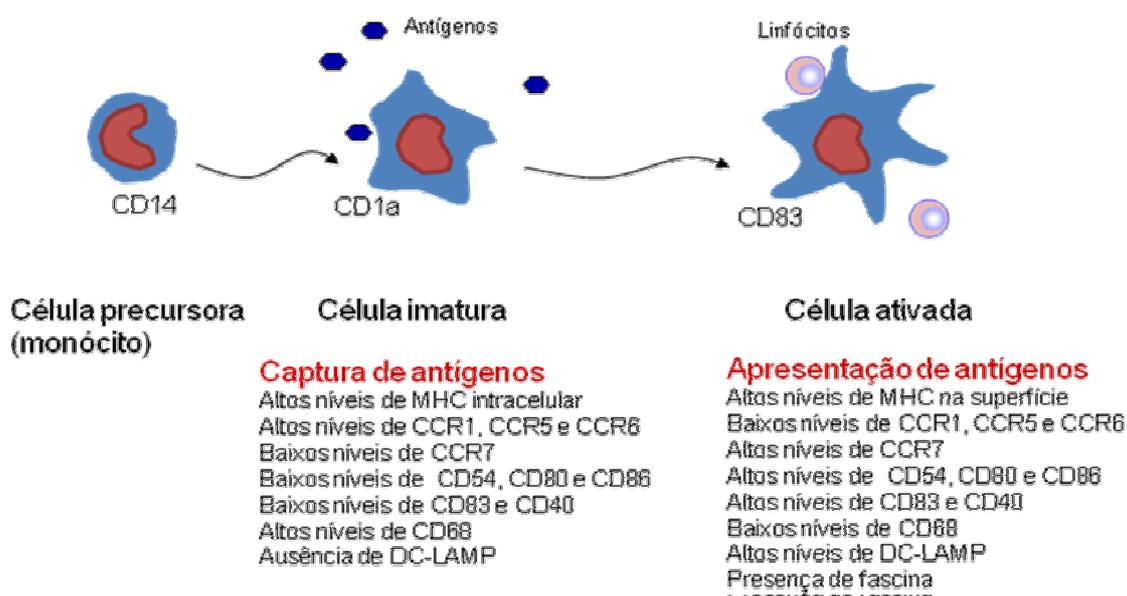


Figura 7. Esquema dos processos de diferenciação e ativação de células dendríticas in vitro a partir de monócitos (adaptado de BANCHEREAU e cols, 2000).

Segundo diversos estudos, os monócitos seriam intermediários na diferenciação das células dendríticas a partir de um precursor inicial da medula óssea, sendo classificados atualmente, por alguns autores, como pré-DCs (NAIK, 2008). Ainda assim, a relevância deste modelo de diferenciação de células dendríticas é bastante discutida, e muito se questiona sobre a correspondência das células dendríticas geradas dessa forma com as subpopulações encontradas *in vivo*. Todavia, trabalhos recentes na literatura revelaram que os monócitos são precursores de subtipos de DCs importantes, encontradas em estado de repouso e na inflamação, como as células de Langerhans e as DCs das mucosas intestinal e respiratória (GINHOUX e cols, 2006; VAROL e cols, 2007; LANDSMAN e cols, 2007).

De uma forma geral, a diferenciação de monócitos em células dendríticas é acompanhada por mudanças intensas na expressão de genes, muitos dos quais estão relacionados à estrutura da célula, motilidade e função.

1.2 Regulação da expressão gênica

1.2.1 A organização da cromatina

A expressão de genes pode ser regulada pela metilação do DNA e pela arquitetura da cromatina, é o que se denomina regulação epigenética da expressão gênica. O remodelamento da cromatina entre os estados “aberto” e “fechado” é uma característica central na regulação epigenética da expressão gênica. O estado “aberto” tem sido associado à ativação de genes, enquanto o estado “fechado” tem sido

associado à repressão. A cromatina é um polímero complexo. É formada por unidades repetidas, nucleossomos, que são arranjos de 4 pares de histonas (octâmeros de histonas), dos tipos H3-H4 e e quatro H2A-H2B, circundados por duas voltas de DNA. Algumas histonas (H1 - histonas de ligação) que não compõem os octâmeros fazem a ligação dos nucleossomos formando estruturas que podem ser cada vez mais organizadas e compactadas (JENUWEIN e ALLIS, 2001).

As histonas são proteínas básicas pequenas, com um domínio globular e um domínio amino terminal mais flexível, que sai do núcleo principal (JENUWEIN e ALLIS, 2001). A figura 8 esquematiza a estrutura dos nucleossomos com detalhe para os domínios amino terminais das histonas, os quais são denominados “caudas de histonas”.

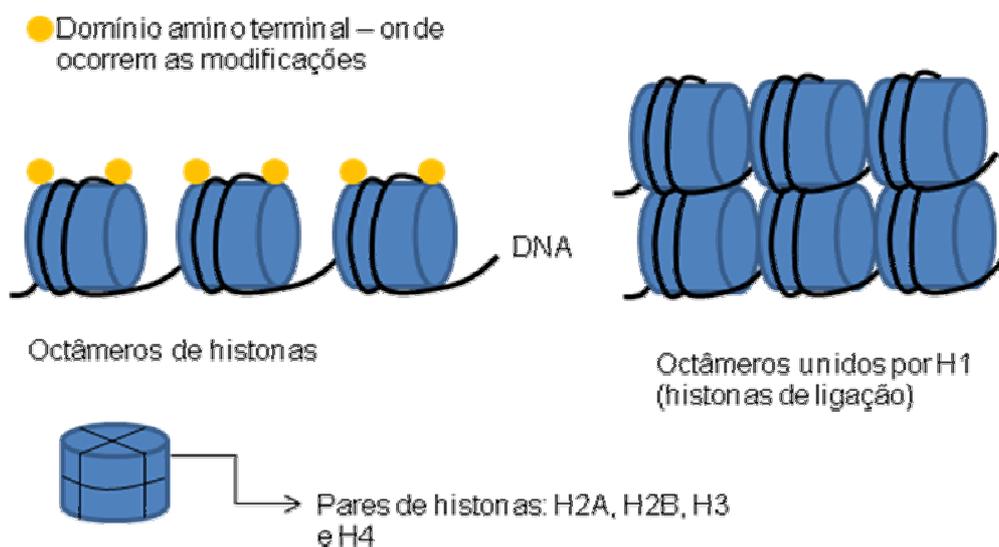


Figura 8. Esquema da estrutura dos nucleossomos (octâmeros de histonas e DNA) – unidades formadoras da cromatina. As histonas H1 não estão representadas na figura (adaptado de JENUWEIN e ALLIS, 2001).

As cinco classes principais de histonas: H1, H2A, H2B, H3 e H4, possuem uma grande proporção de resíduos com carga positiva (Arg e Lis); essas proteínas podem, portanto, se ligar aos grupos fosfato negativamente carregados do DNA por meio de interação eletrostática (FISCHLE e cols, 2003).

1.2.2 Os inibidores de desacetilases de histonas

O domínio amino terminal das histonas é passível de modificações, como fosforilação, metilação e acetilação. As modificações de histonas permitem a regulação dos contatos com o DNA. A acetilação tem sido bastante estudada nas classes de

histonas que compõe os nucleossomos, porém, esta modificação nas histonas H3 e H4 está mais bem caracterizada, e tem correlação com o aumento da transcrição gênica. A acetilação é o resultado da ação oposta de duas enzimas, acetil transferases (HATs) e desacetilases (HDACs). As HATs transferem grupamentos acetil para resíduos de lisina das histonas, o que resulta na redução das cargas positivas, alteração da interação histona-DNA, expansão local da cromatina e em um aumento da acessibilidade ao DNA; as HDACs retiram os grupamentos acetil, condensando a cromatina e reprimindo a transcrição (BOLDEN e cols, 2006).

Os tipos de HDACs em humanos têm sido identificados e classificados com base na homologia que apresentam com as enzimas de fungos, localização subcelular e atividade enzimática (BOLDEN e cols, 2006). A tabela 1 mostra a referida classificação.

Tabela 1. Classificação das enzimas HDACs (adaptado de BOLDEN e cols, 2006).

Classes de HDACs	Tipos	Características
Classe I	1,2,3 e 8	Localizadas no núcleo e expressas em diversos tecidos.
Classe IIa	4,5,7 e 9	Localizadas entre o núcleo e o citoplasma.
Classe IIb	6 e 10	Encontradas no núcleo e no citoplasma, contêm dois domínios de desacetilação, desacetilam tubulina.
Classe III	SIRT 1,2,3,4,5,6 e 7	Esta classe requer NAD ⁺ para sua atividade, desacetilam p53.
Classe IV	11	Pouco se sabe sobre esta classe. Tem semelhanças com a classe I.

As histonas, desde que deixaram de ser consideradas apenas elementos estruturais, têm sido estudadas principalmente no que se refere ao câncer. Isto porque além das alterações genéticas que governam o processo tumoral, diversas alterações epigenéticas têm sido evidenciadas. Atualmente, há fortes evidências da importância das enzimas HDACs no câncer. Diversos estudos têm mostrado o recrutamento

anormal de HDACs para promotores através da associação destas enzimas com proteínas de fusão (produtos de oncogenes) ligadas ao DNA, formando complexos repressores. Em leucemias promielocíticas, a oncoproteína produzida pela fusão do gene PML (*promyelocytic leukaemia*) e pelo gene do receptor do ácido retinóico, suprime a expressão de genes específicos ligados a diferenciação celular, através do recrutamento de HDACs (INSINGA e cols, 2005). Além disso, tem sido observado que a atividade de HDACs está aumentada em células tumorais, o que leva a alterações na forma da cromatina em locais determinados, modificações na transcrição gênica e prejuízo na função celular (ZHU e cols, 2004; ZHANG e cols, 2005; WILSON e cols, 2006).

Ao contrário das alterações genéticas, que são irreversíveis, as alterações epigenéticas podem ser, em tese, revertidas por inibidores farmacológicos das desacetilases de histonas. Atualmente, diversos tipos de inibidores de desacetilases de histonas de origem natural e sintéticos são conhecidos. Estes inibidores, cujas estruturas são bastante variadas, têm em comum a propriedade de induzir a acetilação de histonas indiretamente, por se ligarem as enzimas desacetilases (BI e JIANG, 2006); portanto, o uso desses inibidores no tratamento de tumores sólidos e de leucemias tem sido considerado em diversos estudos, inclusive em testes clínicos (LIU e cols, 2006). Em células tumorais, a liberação da transcrição que estava inibida parece ser suficiente para induzir respostas biológicas como diferenciação, inibição do ciclo celular e apoptose. Estas respostas foram observadas depois que linhagens celulares de diversos tipos de tumores foram tratadas com RNA de interferência para HDACs (GLASER e cols, 2003; ZHU e cols, 2004; HUANG e cols, 2005; WILSON e cols, 2006).

Em leucemias agudas, os inibidores de HDACs exercem seus efeitos antitumorais, possivelmente, através da reversão dos complexos repressores induzidos por oncogenes quiméricos, e liberação da transcrição gênica. Desta liberação da transcrição pode resultar a diferenciação celular ou até a morte por apoptose (BOLDEN e cols, 2006). Porém, estes inibidores podem induzir uma acetilação excessiva de promotores e regulação positiva de receptores ligados a morte celular e seus ligantes, como Fas, FasL e receptores da família do TNF- α , e estas vias também podem contribuir para a resposta final aos inibidores (KWON e cols, 2002; NEBBIOSO e cols, 2005; SUTHEESOPHON e cols, 2005). Recentemente, outros substratos das HDACs além das histonas foram identificados, alguns exemplos são as proteínas tubulina, p53, HSP90, STAT3 e NF- κ B, indicando novas possibilidades de mecanismos de ação para os inibidores de HDACs (GU e ROEDER, 1997; CHEN e cols, 2001; YUAN e cols, 2005; ZHANG e cols, 2008).

O primeiro inibidor a ser descrito foi o butirato de sódio (NaB), um ácido graxo de cadeia curta, produzido a partir da fermentação de bactérias do cólon. Outro inibidor bastante estudado é a Tricostatina A (TSA), isolado do fungo *Streptomyces higroscopicus*, a qual está incluída no grupo dos compostos derivados do ácido hidroxâmico, assim como o suberoilânilda do ácido hidroxâmico (SAHA). Dentre os inibidores sintéticos podemos citar o MS-275. E alguns tetrapeptídeos cíclicos (ex. FK228) também fazem parte da lista de inibidores de HDACs (BI e JIANG, 2006).

O NaB teve sua capacidade anti-tumoral atribuída, inicialmente, ao seu potencial de indução de diferenciação celular. Depois disto foi descoberto que o NaB induz indiretamente a acetilação de histonas por inibir a atividade das desacetilases.

Os efeitos dos inibidores de HDACs são dependentes do tipo celular analisado, e há evidências de que inibidores diferentes têm efeitos distintos no mesmo tipo celular; o que pode ser explicado, em parte, pelo fato de que cada inibidor tem uma especificidade para classes de HDACs. A figura 9 apresenta os inibidores de HDACs e as classes de HDACs sobre as quais eles atuam. Com destaque para o NaB que inibe as classes I e IIa (BI e JIANG, 2006).

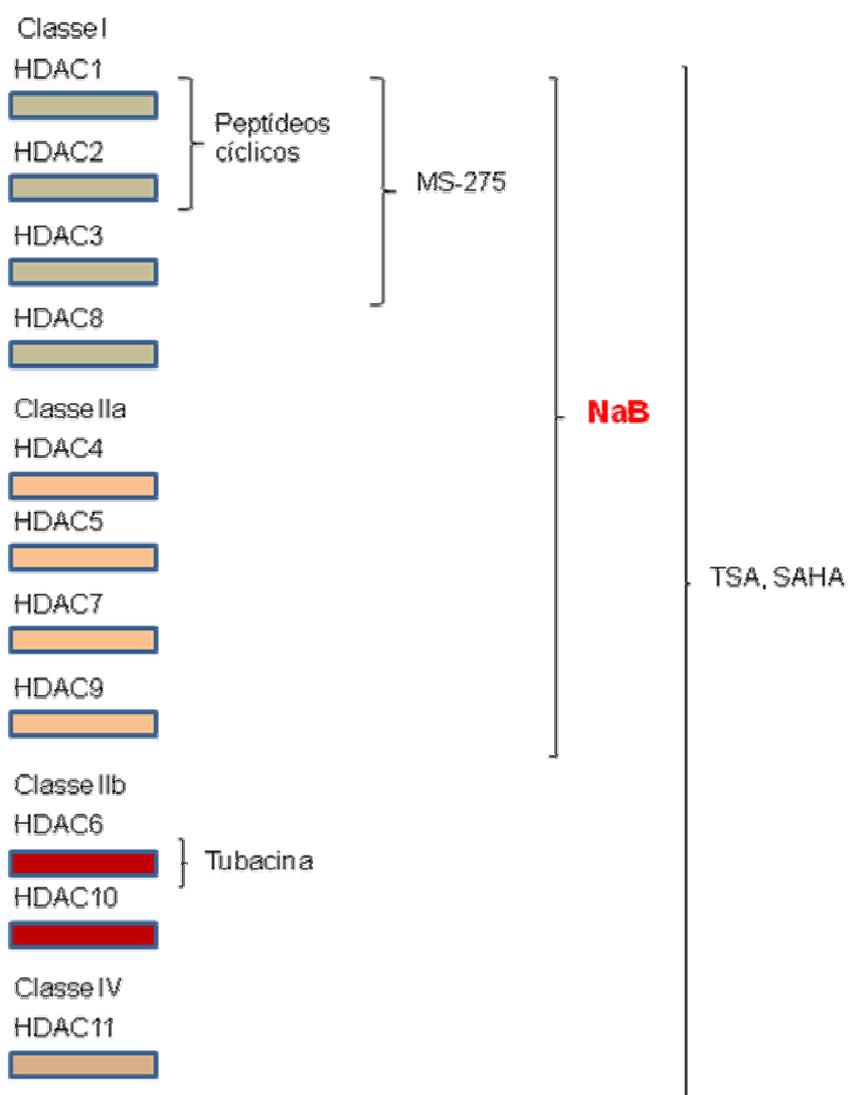


Figura 9. Classes de HDACs e seus respectivos inibidores (adaptado de BOLDEN e cols, 2006).

1.2.3 Os inibidores de desacetilases de histonas no sistema imunológico

As respostas induzidas pelos inibidores de HDACs também têm sido observadas quando células normais são tratadas com estes inibidores. Os efeitos dos inibidores de

desacetilases, e a importância dessas enzimas e das histonas nos processos celulares têm sido investigados mais recentemente no sistema imunológico. A expressão da histona H1^o, um tipo de histona de ligação, foi investigada durante a diferenciação de DCs, macrófagos, granulócitos e linfócitos. Os autores verificaram que o VEGF, um fator que inibe a diferenciação das DCs, diminui a expressão da histona H1^o, sugerindo um possível envolvimento desta histona no processo de diferenciação. E o que foi mais conclusivo, animais deficientes de H1^o apresentaram uma produção de DCs inferior aos selvagens, sem alterações em macrófagos, granulócitos ou linfócitos (GABRILOVICH e cols, 2002). Em linfócitos, a superexpressão de HDAC6, a qual desacetila além das histonas a proteína tubulina, do citoesqueleto, é capaz de desorganizar a formação da sinapse imunológica (SERRADOR e cols, 2004). Em um estudo com DCs de camundongo e de humanos, a HDAC11 foi identificada como um regulador negativo da expressão de IL-10 (VILLAGRA e cols, 2009). Ainda neste contexto, foi demonstrado que o SAHA inibe a secreção de TNF- α , IL-1- β , e IFN- γ em células mononucleares de sangue periférico de humanos estimuladas por LPS; e foi demonstrado também, em camundongos, que a concentração plasmática de TNF- α elevada pela administração de LPS fica diminuída quando os animais são previamente tratados com SAHA (LEONI e cols, 2002). A presença do inibidor MS-275 em culturas de células dendríticas estimuladas com poli(I-C) limita a migração das destas células em resposta a quimiocina CCL19 e diminui a secreção de TNF- α , IL-6, e IL-12. Ainda neste estudo os autores investigaram os efeitos do MS-275 em vias de sinalização que controlam a diferenciação e a função das DCs, e eles observaram, principalmente, um bloqueio da sinalização do NF- κ B, mas, quando o fator de transcrição PU.1 (relacionado a

diferenciação das DCs) foi analisado, sua expressão estava inalterada (NENCIONI e cols, 2007). Outro inibidor de desacetilases, a TSA, em combinação com as citocinas IL-4, GM-CSF e TNF- α e com o estímulo do CD40L induz a diferenciação *in vitro* de células leucêmicas em células dendríticas (MOLDENHAUER e cols, 2004). Outro grupo, utilizando blastos leucêmicos e TSA, observou que este inibidor por si só não é capaz de induzir a diferenciação das células, mas, em combinação com o ácido retinóico tem um efeito potente de indução da diferenciação (KITAMURA e cols, 2000). Porém, pouco se conhece sobre os efeitos dos referidos inibidores no processo de diferenciação de células dendríticas a partir de monócitos.

1.3 A Ouabaína

1.3.1 Características da Ouabaína

Como mencionado anteriormente (1.1.4) as células dendríticas respondem a vários tipos de sinais presentes no microambiente; podemos citar além das citocinas, prostaglandinas, bradicinina e outros hormônios. Uma substância classificada recentemente como hormônio é a Ouabaína (Oua) que pode desencadear vias de sinalização que regulam a transcrição gênica (KOMETIANI e cols, 1998).

A Ouabaína é um glicosídeo, cuja estrutura consiste de uma genina (esteróide) e uma ramnose (domínio glicídico), ligados por um átomo de oxigênio (SCHONER, 2002).

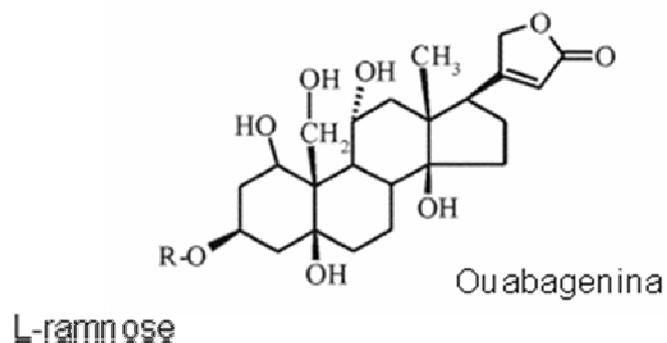


Figura 10. Fórmula estrutural da ouabaína. O R a esquerda se refere à ramnose (adaptado de SCHONER, 2002).

A Ouá foi inicialmente extraída de plantas, principalmente, das raízes e cascas da árvore Ouabaio (*Acocanthera ouabaio*) e das sementes do *Strophanthus gratus*, ambas espécies da família das Apocynaceae. Muitas destas plantas produzem substâncias cardioativas (MOREIRA e cols, 2004).



Strophanthus gratus



Acokanthera oblongifolia

Figura 11. Fotografia das plantas *Strophanthus gratus* e *Acokanthera oblongifolia*, representante do gênero *Acokanthera*. Retirado de <http://www.giftplanzen.com> e <http://pharm1.pharmazie.unigreifswald.de>, em 15/12/2008.

A Ouabaína, assim como outros digitálicos que são substâncias extraídas da planta *Digitalis purpúrea*, possui afinidade pelo domínio extracelular da enzima Na^+, K^+ -ATPase (GOTO e cols, 1992). A Na^+, K^+ -ATPase é composta por três subunidades: α , β e γ , e a afinidade da Ouá pela enzima depende da isoforma da subunidade α que é expressa pelo tecido, possuindo maior afinidade pela α_3 , afinidade intermediária pela α_2 e baixa pela α_1 (MOBASHERI e cols, 2000). A Na^+, K^+ -ATPase catalisa o transporte de Na^+ e K^+ através da membrana plasmática de células de mamíferos (JORGENSEN e cols, 2003). Em cardiomiócitos, a inibição da enzima pela Ouá causa um aumento do Na^+ no meio intracelular, o qual afeta o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, levando a um aumento importante no Ca^{2+} intracelular e tem como saldo o aumento na força de contração (GOTO e cols, 1992). Este efeito inotrópico positivo da Ouá foi a base de sua utilização

na terapia da insuficiência cardíaca, assim como foi para outros digitálicos utilizados para este fim.

1.3.2 A Ouabaína endógena

A existência de um equivalente endógeno da Ouá para os efeitos dos digitálicos foi por muitos anos sugerida e investigada. Hamlyn e seus colaboradores foram os primeiros a demonstrar uma correlação entre a concentração de um fator circulante no plasma, que inibia a Na^+, K^+ -ATPase, e a pressão arterial dos indivíduos (HAMLYN e cols, 1982). Um análogo da Ouá extraída de plantas foi finalmente identificado no plasma humano (HAMLYN e cols, 1991), e também no plasma e tecidos de animais de diferentes espécies. Nestes animais a Ouá estava concentrada nas glândulas adrenais, em especial no córtex, o que foi sugestivo de que era este o local de produção da Ouá circulante (LUDENS e cols, 1992). Níveis consideráveis de Ouá também foram encontrados no hipotálamo e na hipófise (FERRANDI e cols, 1997). A secreção da Ouá endógena pelas adrenais tem sido confirmada por estudos *in vivo* e *in vitro*. A adrenalectomia bilateral de animais diminui os níveis circulantes de Ouá endógena em aproximadamente 50% (LUDENS e cols, 1992). Células do córtex da adrenal em cultura liberam Ouá em resposta ao estímulo de angiotensina II. E a secreção da Ouá parece seguir a regulação do cortisol e da corticosterona, sendo dependente de ACTH (LAREDO e cols, 1994). A Ouá também é capaz de modular a produção de hormônios da adrenal como a aldosterona e o cortisol (ANTONIPILLAI e cols, 1996; KAU e cols, 2005).

Sob determinadas condições fisiológicas a Oua pode ter seus níveis plasmáticos aumentados. Há evidências, em ratos, cães e humanos, de que o estresse agudo causado por exercício físico intenso é capaz de aumentar os níveis de Oua na circulação e este aumento parece ser induzido pela angiotensina II, já que o uso do inibidor da enzima conversora de angiotensina previne este efeito (GOTO e cols, 1995; SCHONER e cols, 2003). Além disso, com o fim do exercício os níveis de Oua retornaram gradualmente aos valores normais, sugerindo uma resposta hormonal ao estresse. Foi demonstrado, também, um aumento dos níveis de Oua do primeiro ao último trimestre da gravidez, seguido do retorno aos níveis normais logo após o parto, e essas modificações foram semelhantes aquelas do cortisol analisado nesse mesmo período de acompanhamento (VAKKURI e cols, 2000). Em algumas patologias também se observa o aumento dos níveis plasmáticos de Oua, como por exemplo a insuficiência cardíaca, insuficiência renal, hipotireoidismo, pré-eclâmpsia e hipertensão arterial (HASEGAWA e cols, 1987; GOTTLIEB e cols, 1992; BLAUSTEIN, 1993; HAMLYN e cols, 1998).

Os efeitos da Oua parecem depender do tipo celular estudado e da concentração utilizada. Entre os mais caracterizados podemos citar o estímulo à produção de hormônios, modulação da comunicação celular, indução de morte celular e proteção contra a mesma. Em células renais a Oua (10^{-6} M) é capaz de modular junções comunicantes entre as células, através de um aumento na expressão da conexina 32 (LARRE e cols, 2006). Concentrações extremamente baixas (1-3 nM) promovem um efeito de inibição de apoptose em células ganglionares de ratos (De REZENDE CORRÊA e cols, 2005). Por outro lado, em um modelo de cultura de neurônios corticais

de camundongos foi demonstrado um sinergismo da Ouá (em concentrações nanomolares) com a ceramida e com a proteína β -amilóide na apoptose dos neurônios (XIAO e cols, 2002). A partir da utilização de células endoteliais de cordão umbilical foi verificado que a Ouá é capaz de estimular a liberação de endotelina, isto na ausência da inibição da Na^+, K^+ -ATPase (SAUNDERS e SCHEINER-BOBIS, 2004). As concentrações de Ouá que inibem a Na^+, K^+ -ATPase são em torno de 0,1 a 1 mM, e os trabalhos citados acima utilizaram concentrações de Ouá muito abaixo disto. Portanto, estes achados estão de acordo com o que tem sido sugerido sobre a capacidade da Ouá, em concentrações baixas, de interagir com a Na^+, K^+ -ATPase, e ativar eventos de sinalização independentes das alterações dos íons Na^+ e K^+ .

Neste contexto, podemos destacar a contribuição de Xie e colaboradores que relacionaram, em diversos estudos, os efeitos da Ouá com cascatas de sinalização (XIE, 2003). Em um estudo de Kometioni e colaboradores foi demonstrado que a hipertrofia de cardiomiócitos induzida pela Ouá envolve a ativação das MAPKs p42/44 e também da proteína Ras (KOMETIANI e cols, 1998).

1.3.3 Vias de sinalização ativadas pela Ouabaína

O fator de crescimento epidermal (EGF) é um fator de crescimento que se liga e ativa um receptor do tipo tirosina cinase (RTK). Dentre as vias ativadas por este receptor estão as vias de MAPK, PI3K, dos fatores de transcrição STAT e a fosfolipase C_γ . A família das proteínas MAPK consiste de 4 membros: ERK 1/2, JNK/SAPK, ERK5/BMK e p38 (KATZ e cols, 2007).

A ativação da p38 se dá pela sua fosforilação, o que frequentemente é induzido por estresse. As respostas resultantes da ativação dessa via são diversas, e muitas ocorrem em células do sistema imunológico, como indução de morte celular por apoptose, proteção contra morte por apoptose, ativação celular, entre outras (KARIN, 1998).

Atualmente sabe-se que a ligação da Ouabaína com a proteína Na^+, K^+ -ATPase induz a transativação do receptor do EGF, através da ativação da Src cinase, e muitos de seus efeitos podem ter o envolvimento destas vias (XIE, 2003). No entanto, outras vias podem ser estimuladas ou inibidas pela Oua. Foi demonstrado pelo nosso grupo que a Oua pode ativar ou inibir a p38, dependendo do tipo celular (RODRIGUES-MASCARENHAS e cols, 2008; VALENTE, 2008, tese de doutorado). A figura 12 mostra a complexidade da sinalização desencadeada pela ligação da Oua à Na^+, K^+ -ATPase. Esta sinalização induz a ativação de fatores de transcrição o que culmina com a transcrição gênica.

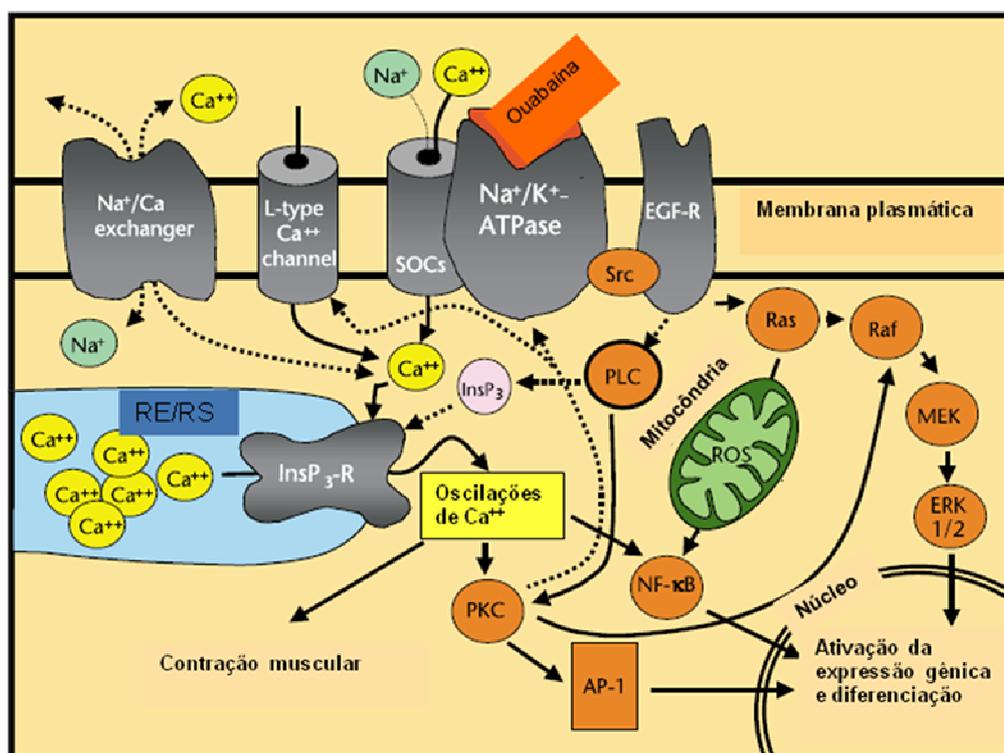


Figura 12. Sinalização disparada pela ligação da Ouabaína à Na^+, K^+ -ATPase (adaptado de SCHEINER-BOBIS e SCHONER, 2001).

1.3.4 A Ouabaína no sistema imunológico

Células do sistema imunológico expressam as isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ da Na^+, K^+ -ATPase (RODRIGUES-MASCARENHAS e cols, 2009). Inúmeras ações da Ouabaína no sistema imunológico já foram relatadas por nosso grupo e por outros grupos, sugerindo que este hormônio atue como um imunomodulador (ECHEVARRIA-LIMA e RUMJANEK, 2006).

Em um estudo sobre os efeitos de hormônios no timo, nosso grupo verificou, depois de administrar Oua e glicocorticóides em animais, que a Oua por si só não tinha efeitos sobre os timócitos porém, era capaz de sinergizar com glicocorticóides aumentando a morte espontânea dos timócitos (RODRIGUES-MASCARENHAS e cols, 2006). Além disso, a Oua, quando estudada em concentrações nanomolares, induz um aumento no Ca^{2+} citosólico, mobilizado do meio extracelular e dos estoques intracelulares, sugerindo um efeito da Oua, ao menos em parte, independente da inibição da Na^+,K^+ -ATPase (ECHEVARRIA-LIMA e cols, 2003). Os timócitos tratados com Oua em concentrações nanomolares apresentam um aumento de expressão de CD69, uma molécula relacionada com a ativação destas células (RODRIGUES-MASCARENHAS e cols, 2003). Já foi relatado que a Oua inibe a proliferação de linfócitos induzida por diversos estímulos, como mitógenos e anticorpos anti-CD3, por exemplo (QUASTEL e KAPLAN, 1968; SZAMEL e cols, 1995); os linfócitos $TCD4^+$ e $TCD8^+$ são igualmente inibidos. Concentrações nanomolares de Oua inibem a proliferação de linfócitos induzida por Concanavalina A. Nesse caso não se observa ativação da p38 nem do fator de transcrição NFAT (RODRIGUES-MASCARENHAS e cols, 2008).

Os linfócitos quando ativados iniciam um processo interno que culmina com a morte por apoptose. Este processo de morte induzida por ativação (AICD) é um mecanismo fisiológico que cessa a resposta de linfócitos. A Oua aumenta a AICD em linfócitos, o que pode contribuir ou pode ser uma explicação para os efeitos de inibição da proliferação (OLEJ e cols, 1998; ESTEVES e cols, 2005). Além disto, foi realizado um estudo sobre a proliferação e diferenciação de células progenitoras da medula

óssea, e a influência da Oua nestes processos foi investigada. Neste estudo, observou-se que o tratamento das células da medula com Oua diminuía a proliferação de progenitores de granulócitos e aumentava, por outro lado, a proliferação de progenitores de eritrócitos, sugerindo que este hormônio possa modular a hematopoese e que tenha efeitos inclusive opostos dependendo do tipo celular analisado (SPIVAK e cols, 1980).

A produção de citocinas, a qual é decisiva para tantos processos do sistema imunológico, também foi abordada em investigações dos efeitos da Oua nessa sistema. Neste contexto, foi observado que monócitos tratados com Oua (10^{-6} M) tem um aumento na secreção IL-1 α , IL-1 β e IL-6 (MATSUMORI e cols, 1997). No entanto, verificou-se que uma concentração mais baixa de Oua, 10^{-7} M em células mononucleares eleva a produção de IL-1 β e TNF- α e diminui a de IL-6 (FOEY e cols, 1997). Em monócitos em cultura, o tratamento com Oua (10^{-7} M) induz a diminuição da expressão de CD14 e neste caso o efeito da Oua é via fosforilação de p38 (VALENTE, 2008, tese de doutorado). Até o momento não há dados na literatura sobre os efeitos desse hormônio em células dendríticas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo do nosso trabalho foi estudar os processos de diferenciação e ativação de células dendríticas humanas, sob a influência do inibidor de desacetilases de histonas, butirato de sódio (NaB), e do hormônio ouabaína (Oua).

2.2 Objetivos específicos

- 1) Estabelecer, *in vitro*, o processo de diferenciação de células dendríticas a partir de monócitos de sangue periférico, em cultura com IL-4 e GM-CSF, assim como a ativação das células dendríticas induzida por TNF- α .
- 2) Investigar se o NaB é capaz de diferenciar monócitos em células dendríticas ou de modular a diferenciação estimulada por citocinas, e se modifica, quando presente na cultura, a ativação induzida por TNF- α .
- 3) Verificar se a adição de Oua durante a ativação induzida por TNF- α é capaz de modular este processo.

3. Material e Métodos

3.1 Material

3.1.1 Soluções

Solução salina tamponada (PBS) – 8,0 g/L NaCl (Vetec), 0,2 g/L KCl (Reagen), 2,17 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ (Reagen), 0,2 g/L KH_2PO_4 (Reagen). Água Milli-Q q.s.p 1 Litro foi adicionada, e a solução teve o pH ajustado para 7,2, utilizando NaOH ou HCl.

Meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 – (Sigma – EUA). Diluído em água Milli-Q q.s.p 1 Litro, e suplementado com 0,05 mM β -mercaptoetanol (Sigma), 25 mM HEPES (Sigma), 60 mg/mL penicilina (Sigma), 100 mg/mL estreptomicina (Sigma) e 2 g/L NaHCO_3 (Cinética Química). Mantido a -20°C até o uso.

3.1.2 Anticorpos

Anticorpo contra CD1a humano (conjugado à ficoeritrina), gerado em camundongo – (BD Pharmingen – EUA). Mantido a 4°C até o uso.

Anticorpo contra CD14 humano (conjugado à isotiocianato de fluoresceína), gerado em camundongo – (BD Pharmingen – EUA). Mantido a 4°C até o uso.

Anticorpo contra CD11c humano (conjugado à isotiocianato de fluoresceína), gerado em camundongo – (BD Pharmingen – EUA). Mantido a 4°C até o uso. Produto gentilmente cedido por Célio Freire de Lima.

Anticorpo contra CD11b de camundongo (reage contra humano) (conjugado à isotiocianato de fluoresceína), gerado em rato - (BD Pharmingen – EUA). Mantido a 4°C até o uso. Produto gentilmente cedido por Julio Scharfstein.

Anticorpo contra CD83 humano (conjugado à ficoeritrina), gerado em camundongo – (BD Pharmingen – EUA). Mantido a 4°C até o uso.

Anticorpo contra CD80 humano (conjugado à ficoeritrina), gerado em camundongo – (BD Pharmingen – EUA). Mantido a 4°C até o uso. Produto gentilmente cedido por Célio Freire de Lima.

Anticorpo contra CD86 humano (conjugado à ficoeritrina), gerado em camundongo – (BD Pharmingen – EUA). Mantido a 4°C até o uso. Produto gentilmente cedido por Célio Freire de Lima.

Anticorpo contra HLA-DR humano (conjugado à isotiocianato de fluoresceína), gerado em camundongo – (BD Pharmingen – EUA). Mantido a 4°C até o uso. Produto gentilmente cedido por Célio Freire de Lima.

3.1.3 Reagentes

Dextran-FITC FD-40S (40 kDa) - (Sigma – EUA). Estoque 25 mg/mL, diluído em PBS e mantido a 4°C até o uso.

Dimetil sulfóxido (DMSO) - (Sigma – EUA). Mantido a temperatura ambiente.

Butirato de sódio (NaB) - (Sigma – EUA). Estoque 1 M, diluído em água Milli-Q e mantido a -20°C até o uso. Produto gentilmente cedido por Franklin Rumjanek.

Ficoll-paque plus (GE Healthcare lifesciences – Brasi). Densidade 1.077 mg/mL. Mantido a 4°C até o uso. Utilizado na proporção 3:4 (Ficoll/sangue).

Heparina sódica 5000 U/mL – (Roche – Brasil). Mantida a 4°C até o uso.

Inibidor de p38 MAPK (SB202190) - (Sigma – EUA). Estoque 5 mM, diluído em DMSO e mantido a -20°C até o uso. Produto gentilmente cedido por Elizabeth Giestal de Araújo.

MTT (Brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazol) – (Sigma – EUA). Solução estoque 5 mg/mL diluída em PBS. Mantida a 4°C até o uso.

Ouabaína (sintética) - (Sigma – EUA). Diluído em PBS para o uso imediato.

Soro fetal bovino (SFB) – (Gibco – EUA). Inativado e mantido a -20°C até o uso.

Fator de crescimento epidermal (EGF) humano – (PeproTech – EUA). Estoque 50 μ M, diluído em água Milli-Q e mantido a -20°C até o uso. Produto gentilmente cedido por Elizabeth Giestal de Araújo.

GM-CSF recombinante humano – (R&D systems). Estoque 0,1 mg/mL, diluído em PBS e mantido a -20°C até o uso.

IL-4 recombinante humano – (PeproTech – EUA). Estoque 0,1 mg/mL, diluído em PBS e mantido a -20°C até o uso.

TNF α recombinante humano – (R&D systems). Estoque 0,1 mg/mL, diluído em PBS e mantido a -20°C até o uso.

Kit de ELISA IL-1 β humano – (R&D systems). Armazenado e utilizado conforme instruções do fabricante. Produto gentilmente cedido por Julio Scharfstein.

Kit de ELISA TNF α humano – (R&D systems). Armazenado e utilizado conforme instruções do fabricante.

Kit de ELISA IL-12p40 humano – (PeproTech). Armazenado e utilizado conforme instruções do fabricante.

Kit de coloração panótico - (Laborclin, Brasil). Mantido a temperatura ambiente até o uso. Utilizado conforme instruções do fabricante.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção de monócitos de sangue periférico

Amostras de sangue periférico de voluntários sadios foram coletadas em seringas com heparina, em volumes de 40-60 mL. As células foram separadas por centrifugação (30 min a 400g) em gradiente de densidade com Ficoll-Histopaque (na proporção 3 de Ficoll para 4 de sangue). A camada de células mononucleares foi retirada, e centrifugada 3 vezes com PBS, por 10 min a 200g. As células foram ressuspendidas em meio RPMI com 10% de SFB, colocadas em placas de 24 poços, 5×10^6 células/poço (volume final 1 mL), e incubadas por 2 h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. Os linfócitos foram separados dos monócitos por aderência destes últimos.

Os experimentos com células humanas foram realizados após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (INCA).

3.2.2 Diferenciação e ativação de células dendríticas

Os monócitos foram cultivados em meio RPMI com 10% de SFB (volume final 0,5 mL) contendo GM-CSF e IL-4 (50 ng/ml) por 5 dias (tempo de diferenciação), sempre a

37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. Em alguns experimentos o inibidor de desacetilases de histonas, butirato de sódio (NaB – 12,5, 25, 50, 100 e 200 µM), foi adicionado a cultura, com ou sem GM-CSF e IL-4, durante o tempo de diferenciação.

Após a diferenciação das células dendríticas, o TNF-α (50 ng/ml) foi adicionado, mantendo no meio GM-CSF e IL-4 (50 ng/ml), e as células foram cultivadas por mais 48 h (tempo de ativação). Em alguns experimentos o NaB (200 µM), a ouabaína (Oua – 10⁻⁷, 10⁻⁹ e 10⁻¹¹ M), o EGF (1 e 10 nM) ou o inibidor da p38 (SB202190) (20 µM) foram adicionados no tempo de ativação.

Em alguns experimentos com monócitos foi realizado um protocolo de 24h de incubação com Oua 10⁻⁷ M.

Para os experimentos de diferenciação com um tempo mais curto de estímulo, o protocolo consistia de um estímulo inicial com IL-4 e GM-CSF por 24h seguido de mais 4 dias de cultura em meio livre de citocinas.

Em um dos experimentos de ativação o TNF-α foi adicionado na concentração de 5 ng/ml.

3.2.3 Desenvolvimento das culturas e morfologia celular

Os monócitos foram estimulados a diferenciar com IL-4 e GM-CSF, como detalhado acima, porém, em placas contendo lamínulas. Após o tempo de diferenciação as células foram coradas com o kit panótico de acordo com as instruções do fabricante, e as lamínulas transferidas para lâminas. As imagens foram captadas em microscopia óptica, objetivas de 20x ou 100x.

Além disso, as imagens das culturas de diferenciação e ativação (que não foram coradas) foram captadas em microscopia de contraste de fase, objetiva de 20x.

3.2.4 Avaliação fenotípica

Após os períodos de cultura, 5 dias para diferenciação e mais 2 para ativação, as placas foram centrifugadas (7 min a 200g) e os sobrenadantes retirados. As células foram recolhidas em PBS gelado, centrifugadas com PBS 5% SFB (7 min a 200g) e incubadas com os anticorpos: anti-CD14-FITC (diluição 1:50), anti-CD1a-PE (diluição 1:15), anti-CD11b-FITC (diluição 1:50), anti-CD11c-FITC (diluição 1:15), anti-CD83-PE (diluição 1:15), anti-CD80-PE (diluição 1:15), anti-CD86-PE (diluição 1:25), anti-HLA-DR-FITC (diluição 1:15) no volume final de 50 μ L, por 30 min a 4°C protegidas da luz. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas com PBS 5% SFB, ressuspendidas na mesma solução e a fluorescência celular foi medida por citometria de fluxo (FACSCalibur). Os dados foram analisados no programa Summit v4.3.

3.2.5 Análise da viabilidade celular

Os monócitos foram estimulados a diferenciar com IL-4 e GM-CSF, seguido ou não do estímulo do TNF- α , como detalhado acima (2. Diferenciação e ativação de células dendríticas), porém, em placas de 96 poços e em triplicatas. Ao final de 5 dias (diferenciação) ou 7 dias (ativação) foi adicionado MTT (5 μ g/mL) e as células foram incubadas por 4h a 37°C protegidas da luz. Como resultado do ensaio, as células viáveis que são capazes de reduzir o MTT a cristais de formasana, um produto de cor,

acumularam estes cristais no fundo da placa; caso ocorra proliferação celular a quantidade de cristais será maior, por isto o ensaio de redução do MTT mede indiretamente a proliferação celular. As placas foram centrifugadas (7 min a 200g), os sobrenadantes desprezados e os cristais formados foram dissolvidos com 200 μ L de DMSO. A absorbância foi medida a 490 nm de comprimento de onda em um leitor de microplacas.

3.2.6 Ensaio de fagocitose

Após 5 dias de diferenciação, as placas foram centrifugadas por 7 min a 200g, os sobrenadantes desprezados e as células incubadas em meio RPMI com 10% de SFB (volume final 0,5 mL) contendo partículas (40 kDa) de dextran-FITC (0,5 mg/mL), por 1 h a 37°C. Uma parte das células foi incubada nas mesmas condições, porém a 4°C para separar o que foi adsorvido à membrana daquilo que foi de fato fagocitado pelas células. Após este tempo, as células foram centrifugadas (3 vezes) em PBS gelado, por 7 min a 200g, recolhidas na mesma solução e a intensidade de fluorescência celular foi medida por citometria de fluxo.

3.2.7 Proliferação de linfócitos

Após 7 dias (cultura de ativação), as placas foram centrifugadas por 7 min a 200g, os sobrenadantes desprezados. As células foram ressuspensas em meio RPMI com 10% de SFB e co-cultivadas com linfócitos alogênicos (10^5 cels/poço) em placa de 96 poços fundo U (triplicatas - volume final 200 μ L), por 5 dias. As proporções

utilizadas foram de 1:100, 1:10 e 1:1 (DC:linfócito). Foi feito um controle de DCs sem linfócitos para excluir este *background*. Ao final da co-cultura foi adicionado [H^3]-timidina (0,5 μ Ci) e as células foram incubadas por 6h a 37°C. Como resultado do ensaio, as células que proliferaram incorporam [H^3]-timidina. As placas foram congeladas e, posteriormente, o conteúdo de cada poço foi transferido para papéis de filtro os quais foram colocados em frascos. Adicionou-se, então, 1 mL de líquido de cintilação e a incorporação de [H^3]-timidina foi determinada em cintilador líquido (contador de partículas β).

3.2.8 Produção de citocinas

Após 5 dias de diferenciação os sobrenadantes das culturas foram coletados e armazenados a -20°C para utilização posterior. A concentração de IL-1 β foi medida através de um ensaio imuno-enzimático de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância foi medida a 450 nm de comprimento de onda em um leitor de microplacas.

Após 7 dias de cultura de ativação os sobrenadantes das culturas foram coletados e o mesmo procedimento citado acima para IL-1 β foi realizado para as medidas das concentrações de IL-12p40 e TNF- α . A concentração desta última citocina também foi medida em monócitos cultivados por 24h.

3.2.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prisma. Os dados foram comparados utilizando teste-t pareado. Adotou-se o nível de significância mínimo de 5% ($p \leq 0.05$).

4. Resultados

4.1 Diferenciação de células dendríticas *in vitro*

Como mencionado anteriormente (1.1.6), os monócitos, precursores de macrófagos, também podem se diferenciar em células dendríticas (DCs) em determinadas condições. A IL-4 e o GM-CSF são citocinas conhecidas por promover essa diferenciação (ROMANI e cols, 1994).

Os monócitos obtidos de sangue periférico de doadores saudáveis foram estimulados com IL-4 e GM-CSF, por 5 dias. Após este tempo de cultura, as células foram observadas por microscopia de contraste de fase. As células que não foram estimuladas estavam dispersas e aderidas (figura 13-A). Porém, na presença das citocinas houve uma perda parcial da adesão à superfície e a formação de colônias, com células entre as colônias (figura 13-B).

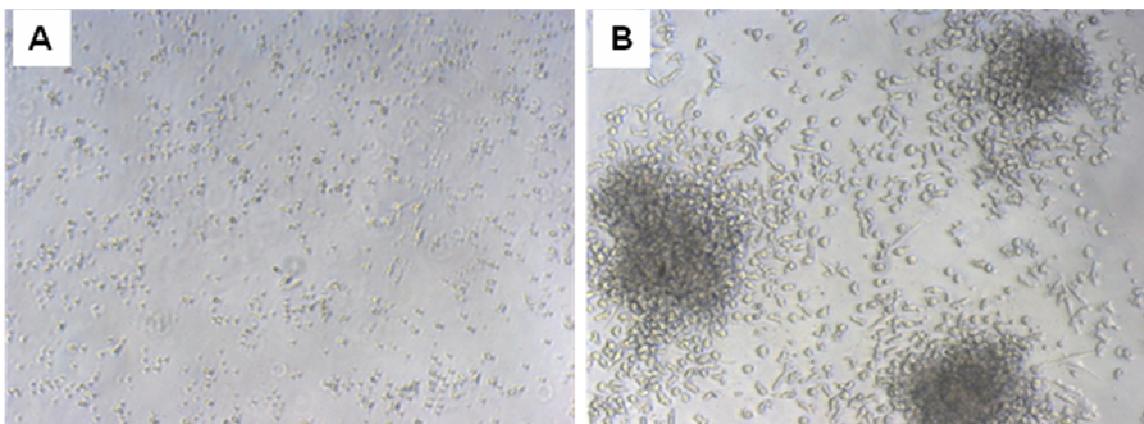


Figura 13. Desenvolvimento de células dendríticas após cultura com IL-4 + GM-CSF. As células foram incubadas com meio (monócitos - A) ou com meio e IL-4 + GM-CSF (50 ng/mL) (DCs – B), por 5 dias. Após este período, as células foram avaliadas por microscopia de contraste de fase (lente objetiva de 20x). Foto ilustrativa.

A formação de colônias está associada, freqüentemente, à proliferação e diferenciação celular e tem sido atribuída a fatores de crescimento como o GM-CSF (HAMILTON, 2008). Para testar se a formação de colônias observada (figura 13-B) estava relacionada a um aumento no número de células e não apenas ao agrupamento de células, realizamos um ensaio de redução do MTT e a viabilidade dos monócitos que não foram estimulados foi comparada com a de monócitos estimulados a diferenciar. Observamos um aumento no número de células em resposta ao estímulo das citocinas (figura 14), o que sugere que as células proliferaram entre o dia 0 e o dia 5 e que as colônias eram formadas por células em proliferação.

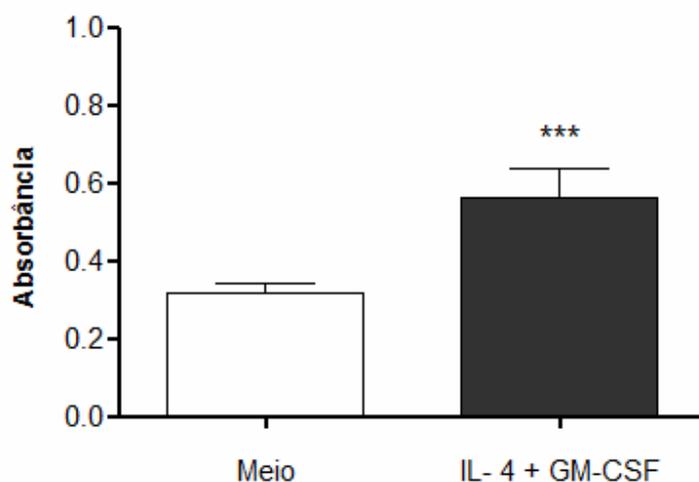


Figura 14. Viabilidade celular após cultura com IL-4 + GM-CSF. As células foram incubadas com meio na ausência ou presença de IL-4 + GM-CSF (50 ng/mL), por 5 dias. Após este período, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT. O gráfico de barras apresenta a média da absorbância \pm erro padrão da média de 9 experimentos independentes. *** $P < 0,001$, IL-4 + GM-CSF *versus* meio.

No curso da diferenciação de células dendríticas, ocorrem grandes mudanças na morfologia das células. As células adquirem novas características que são relacionadas a uma “forma de dendrítica”, principalmente um novo contorno formado por projeções citoplasmáticas (FREUDENTHAL e STEINMAN, 1990). Após o tempo de diferenciação, as células foram coradas e analisadas por microscopia óptica. Foi possível observar diferenças claras na forma das células tratadas com as citocinas em comparação àquelas que não foram tratadas. A figura 15 mostra os monócitos com forma arredondada e regular, e as células estimuladas com IL-4 e GM-CSF com forma mais irregular, alongada, com expansões citoplasmáticas. Tem sido relatado, em estudos realizados *in vitro* e *in vivo*, que as características descritas acima estão acompanhadas de motilidade, com extensão e retração contínua das expansões citoplasmáticas

(STEINMAN e COHN, 1974; FREUDENTHAL e STEINMAN, 1990; LINDQUIST e cols, 2004).

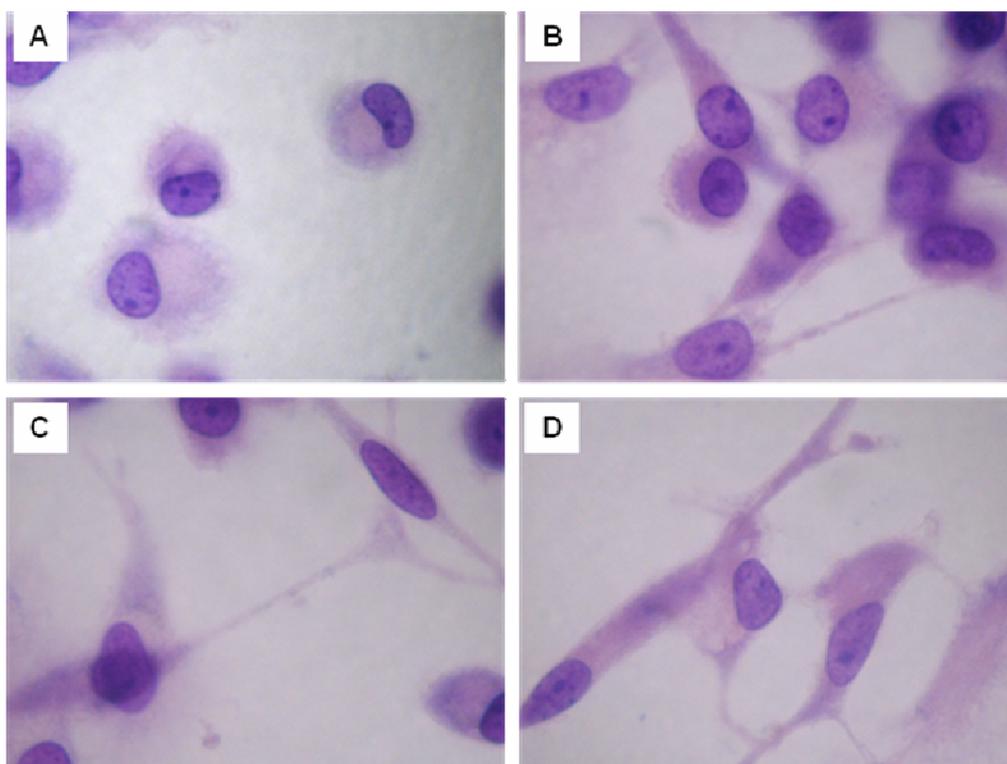


Figura 15. Morfologia celular após cultura com IL-4 + GM-CSF. As células foram incubadas com meio (monócitos - A) ou com IL-4 + GM-CSF (50 ng/mL) (DCs – B, C e D), por 5 dias. Após este período, as células foram coradas com o kit panótico de acordo com as instruções do fabricante. A morfologia celular foi visualizada em microscopia óptica (lente objetiva de 100x). Foto ilustrativa.

Os monócitos expressam a molécula de superfície CD14, e mantêm esta expressão quando se diferenciam em macrófagos. Porém, células dendríticas

diferenciadas a partir de monócitos não expressam CD14 na superfície ou expressam em baixos níveis, e passam a expressar uma molécula ausente em monócitos - o CD1a (SALLUSTO & LANZAVECCHIA, 1994). Os primeiros estudos de caracterização de DCs isoladas de tecidos e diferenciadas *in vitro* a partir de precursores se basearam, principalmente, no aspecto das culturas e nas peculiaridades morfológicas daquelas células. Atualmente, a perda de expressão do CD14 e o aparecimento do CD1a têm sido utilizados como as principais características fenotípicas em uma série de estudos que tem por objetivo identificar a diferenciação de monócitos em células dendríticas.

Aproximadamente 90% dos monócitos de 5 dias de cultura expressam CD14, e não expressam CD1a; porém, as células que foram cultivadas na presença de IL-4 e GM-CSF apresentaram uma grande perda de expressão de CD14 e o aparecimento do CD1a: o percentual de células CD14⁺ diminuiu para 20%, e aproximadamente 70% das células passaram a expressar CD1a (figura 16). Estes dados sugerem que os monócitos estimulados a diferenciar tem, ao final de 5 dias, características fenotípicas de uma célula dendrítica (figura 16), além do aspecto de uma cultura de diferenciação (figura 13) e da forma peculiar de tal célula (figura 15).

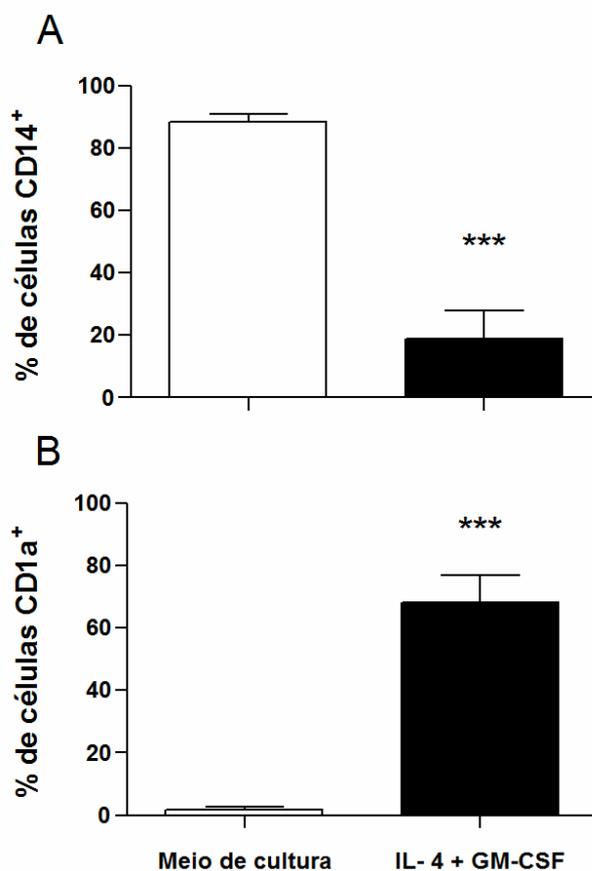


Figura 16. Expressão de CD14 e CD1a após cultura com IL-4 + GM-CSF. As células foram incubadas com meio na ausência ou presença de IL-4 + GM-CSF (50 ng/mL), por 5 dias. Após este período, a expressão de CD14 e CD1a foi avaliada por citometria de fluxo. O gráfico de barras apresenta o percentual de células CD14⁺ (A), CD1a⁺ (B) ± erro padrão da média de 7 experimentos independentes. *** P<0,001, IL-4 + GM-CSF *versus* meio de cultura.

A fim de analisar a diferenciação após um tempo mais curto de estímulo, nós testamos um protocolo de diferenciação que consistia de um estímulo inicial com IL-4 e GM-CSF por 24h seguido de mais 4 dias de cultura em meio livre de citocinas. Nestas

condições, tanto a perda de expressão do CD14 quanto o aparecimento do CD1a foram bastante menores do que o observado quando as citocinas permaneciam na cultura por 5 dias (figura 17). O percentual de células expressando CD14 que era de 99% em monócitos, diminuiu para 1% após cultura com IL-4 e GM-CSF por 5 dias, e para 65% com as citocinas presentes só por 24h, o CD1a que não estava expresso em monócitos, apareceu em 87% das células com IL-4 e GM-CSF (5 dias) e em 44% das células expostas as citocinas por 24h (figura 17), sugerindo uma diferenciação parcial. Portanto, de acordo com estes resultados a presença das citocinas por todo o tempo de cultura é importante para sustentar o processo de diferenciação.

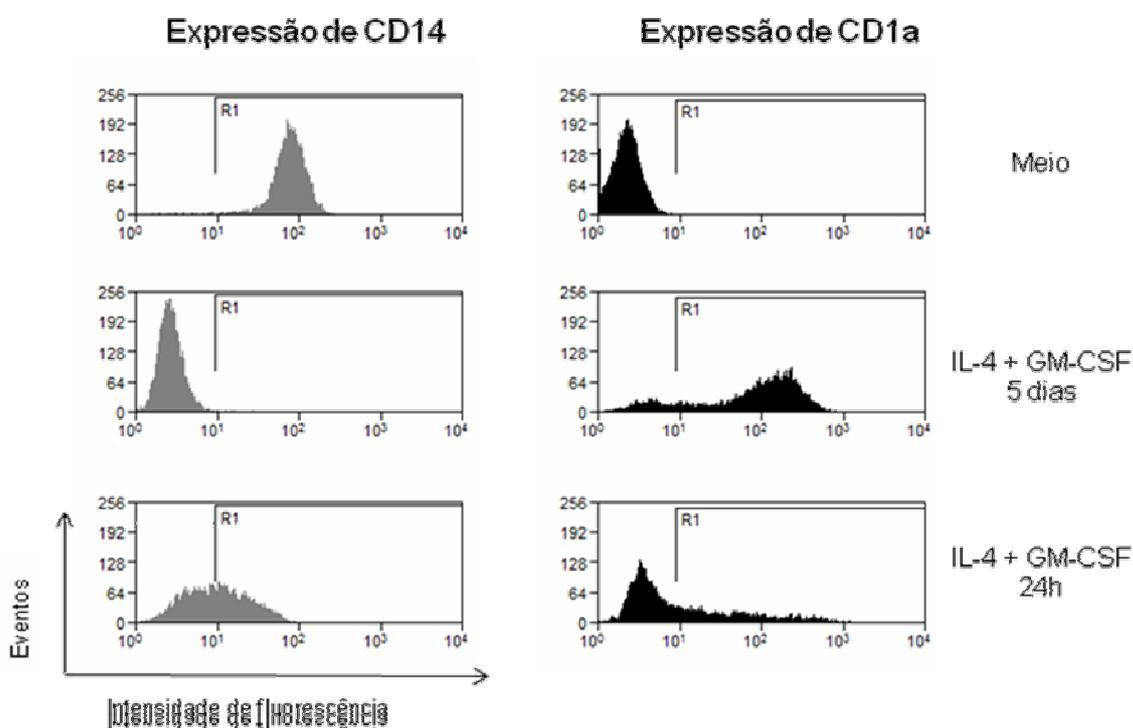


Figura 17. Expressão de CD14 e CD1a após cultura com IL-4 + GM-CSF (24h). As células foram incubadas com meio na ausência ou presença de IL-4 + GM-CSF (50 ng/mL), por 24h. Após este período, o meio foi substituído por meio fresco sem citocinas, as células foram incubadas por mais 4 dias (para completar o tempo de diferenciação – 5 dias), e a expressão de CD14 e CD1a foi avaliada por citometria de fluxo. Histogramas representativos de 2 experimentos independentes mostrando os padrões de expressão de CD14 e CD1a de monócitos, DCs diferenciadas com IL-4 + GM-CSF todo o tempo de cultura (IL-4 + GM-CSF 5 dias) e DCs diferenciadas com IL-4 + GM-CSF nas primeiras 24h de cultura (IL-4 + GM-CSF 24h). R1 é a região de células positivas para CD14 ou CD1a.

As células dendríticas na ausência de sinais que induzem sua ativação são consideradas, ou denominadas, imaturas e têm como função a captura de antígenos. Para testar a funcionalidade das células geradas nós realizamos um ensaio de fagocitose com partículas de dextran-FITC. Neste ensaio as células eram expostas às

partículas por 1h e a intensidade de fluorescência era medida por citometria de fluxo. Aproximadamente 80% das células dendríticas fagocitaram as partículas comparado a 40% dos monócitos (figura 18). Além disto, analisamos a intensidade de fluorescência das células positivas para FITC (dentro das populações de monócitos e DCs), a qual corresponde ao número de partículas fagocitadas no tempo do ensaio. Como pode ser observado na figura 18 eixo à direita, as células dendríticas apresentaram uma média de intensidade de fluorescência maior do que a dos monócitos, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa ($P=0,06$). Estes dados sugerem que durante a diferenciação há um aumento significativo no número de células com a capacidade de capturar antígenos, e que essa capacidade tende a exceder a de monócitos em cultura.

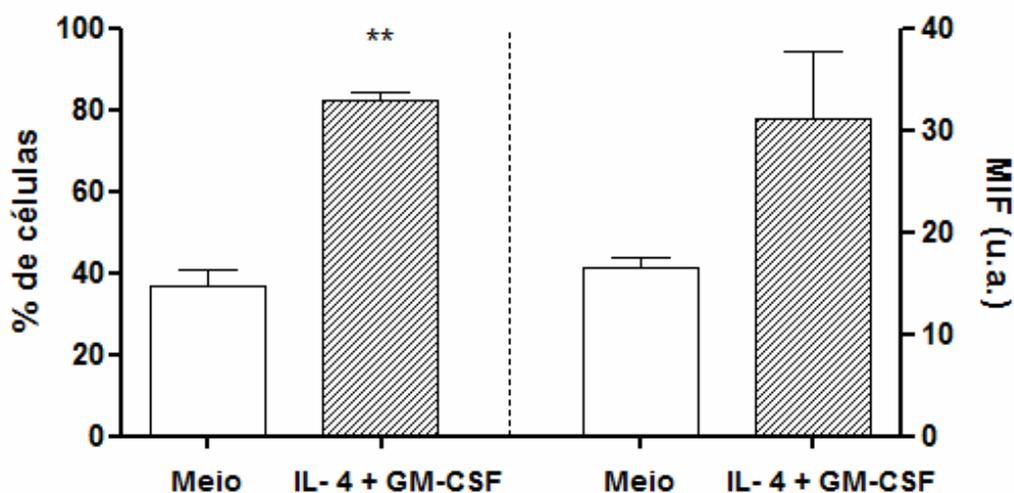


Figura 18. Captação de partículas de dextran após cultura com IL-4 + GM-CSF. As células foram incubadas com meio na ausência ou presença de IL-4 + GM-CSF (50 ng/mL), por 5 dias. Após este período, as células foram incubadas com dextran-FITC (0,5 mg/mL) por 1h à 37°C, e analisadas por citometria de fluxo. O gráfico de barras apresenta o percentual de células positivas para dextran-FITC (esquerda) e a média de intensidade de fluorescência das células positivas (direita) \pm erro padrão da média de 5 experimentos independentes. ** Significativamente diferente do controle (monócitos) ($P < 0,01$).

Esse conjunto de resultados demonstra que células dendríticas foram geradas *in vitro* a partir de monócitos, em cultura com IL-4 e GM-CSF.

4.2 Ativação de células dendríticas *in vitro*

A ativação das células dendríticas imaturas é um processo contínuo, que tem início nos tecidos e se completa quando ocorre a interação com linfócitos. Diversos

fatores e condições são capazes de induzir ou iniciar a ativação das células dendríticas (GUERMONPREZ e cols, 2002). Como alguns destes estímulos de ativação estão conectados ao TNF- α , por induzir a sua produção, ou por regular sua expressão e atividade, decidimos utilizar o TNF- α em nosso estudo (RANDOLPH, 2001).

As células dendríticas (células denominadas imaturas) geradas após cultura com IL-4 e GM-CSF, foram estimuladas com TNF- α por 48 horas, mantendo IL-4 e GM-CSF no meio. Após 7 dias de cultura, as células cultivadas com IL-4 e GM-CSF continuavam apresentando a formação de colônias (figura 19-A). Entretanto, as células estimuladas com TNF- α tinham colônias aparentemente menores e células mais aderidas e espaiadas entre as colônias (figura 19-B).

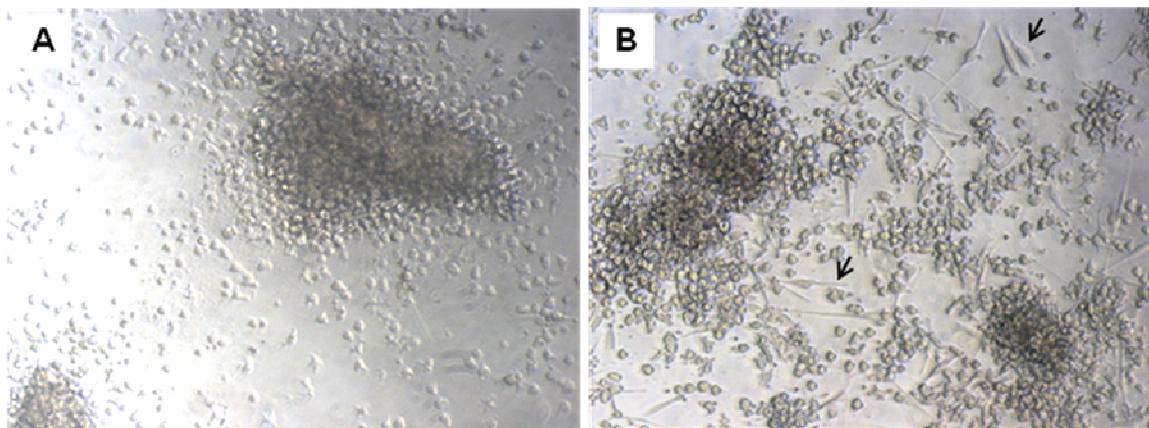


Figura 19. Desenvolvimento de células dendríticas após estímulo com TNF- α . Após 5 dias de diferenciação, as células foram incubadas na ausência (A) ou presença (B) de TNF- α (50 ng/mL), mantendo IL-4 + GM-CSF (50 ng/mL) no meio, por mais 48h. Após este período, as células foram avaliadas por microscopia de contraste de fase (lente objetiva de 20x). Notar, em B, a presença de células espalhadas (setas). Foto ilustrativa.

O CD83 é uma molécula de superfície pertencente a super família Ig de receptores (ZHOU & TEDDER, 1995). As células dendríticas quando ativadas passam a expressar esta molécula, portanto, apesar de ter a função ainda pouco conhecida, sua expressão é utilizada para avaliar a ativação destas células (ZHOU & TEDDER, 1996). A expressão de CD83 na população CD14⁻ foi avaliada por citometria de fluxo. Em 7 dias de cultura foi possível observar que um pequeno percentual de células dendríticas (aproximadamente 20%), mesmo sem a adição de qualquer estímulo de ativação, expressava CD83 (figura 20). E na presença de TNF- α , quando foi possível observar células mais aderidas e de morfologia bastante diferente (figura 19), o percentual de células que expressavam CD83 aumentou para aproximadamente 70% (figura 20).

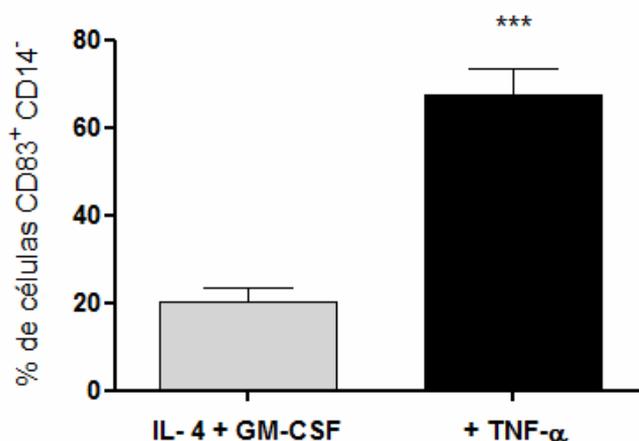


Figura 20. Expressão de CD83 após estímulo com TNF- α . Após cinco dias de diferenciação, as células foram incubadas na ausência ou presença de TNF- α (50 ng/mL), mantendo IL-4 + GM-CSF (50 ng/mL) no meio, por mais 48h. Após este período, a expressão de CD83 foi avaliada por citometria de fluxo. O gráfico de barras apresenta o percentual de células CD83⁺CD14⁻ \pm erro padrão da média de 12 experimentos independentes. *** Significativamente diferente do controle (IL-4+GM-CSF) (P<0,001).

As células dendríticas quando ativadas produzem diversos fatores, entre eles se destaca a citocina IL-12 por seus efeitos na diferenciação de linfócitos T e ativação de células NK (BANCHEREAU e cols, 2000). Após 7 dias de cultura, observamos que as células tratadas com IL-4 e GM-CSF produziram IL-12p40 em pequenas quantidades, e aquelas estimuladas com TNF- α secretaram aproximadamente 4 vezes mais desta citocina (figura 21), o que foi consistente com os dados descritos para o CD83 (figura 20) e sugere que as células foram ativadas.

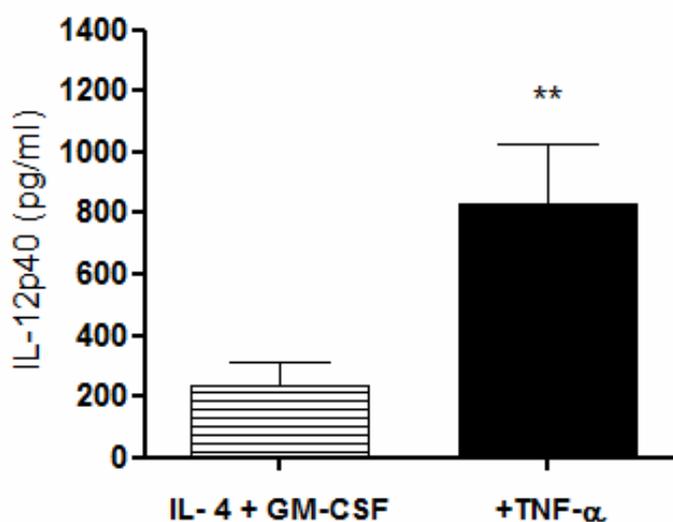


Figura 21. Produção de IL-12 por células dendríticas após estímulo com TNF- α . Após 5 dias de diferenciação, as células foram incubadas na ausência ou presença de TNF- α (50 ng/mL), mantendo IL-4 + GM-CSF (50 ng/mL) no meio, por mais 48h. Após este período, os sobrenadantes foram coletados e a presença de IL-12p40 foi medida por ensaio de ELISA. O gráfico de barras apresenta a concentração de IL-12p40 em pg/mL \pm erro padrão da média de 8 experimentos independentes. ** Significativamente diferente do controle (IL-4+GM-CSF) ($P < 0,01$).

A capacidade de estimular linfócitos alogênicos, em uma reação linfocitária mista, é uma característica das DCs que aumenta com a ativação (Van VOORHIS e cols, 1982; BANCHEREAU e STEINMAN, 1998).

Realizamos uma co-cultura comparando a habilidade de monócitos, células dendríticas imaturas e células dendríticas ativadas com TNF- α , de induzir a proliferação de linfócitos. As proporções estudadas de células consideradas como estímulo e aquelas consideradas como respondedoras (linfócitos) foram de 1:100, 1:10 e 1:1, e o número de linfócitos foi sempre o mesmo (10^5 células por poço). As células dendríticas induziram uma grande proliferação de linfócitos quando comparadas aos monócitos, e

este efeito era maior de acordo com o aumento no número de DCs na co-cultura. Porém, a maior proliferação de linfócitos pode ser observada quando estes foram estimulados por DCs previamente ativadas com TNF- α ; e o efeito máximo se deu com a proporção de 1:10 (figura 22).

Outros autores mostraram que a capacidade das DCs ativadas *in vitro* de estimular linfócitos foi comparável a das células CD83⁺ isoladas de sangue periférico, o que confirma a maturidade funcional daquelas células (ZHOU & TEDDER, 1995).

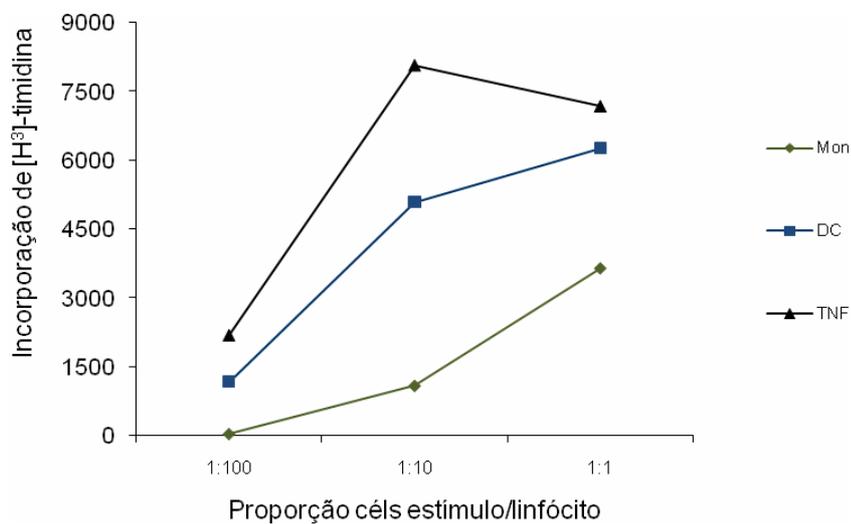


Figura 22. Proliferação de linfócitos após interação com células dendríticas. Após 5 dias de diferenciação e 48h de ativação, as células foram co-cultivadas com linfócitos alogênéticos por mais 5 dias. Após este período, a proliferação dos linfócitos foi medida por ensaio de incorporação de [H³]-timidina. O gráfico apresenta a incorporação de [H³]-timidina nas proporções de células estímulo (mon – monócitos, DC – células dendríticas imaturas e TNF – células dendríticas ativadas) para linfócitos (células resposta) 1:100, 1:10 e 1:1. Experimento representativo (N=3 para a proporção 1:10).

Esse conjunto de resultados demonstra que células dendríticas ativadas foram geradas *in vitro* a partir de monócitos, em cultura com IL-4, GM-CSF e TNF- α .

4.3 Efeito do butirato de sódio na diferenciação e ativação de células dendríticas

Após a confirmação da diferenciação e ativação das DCs em cultura, nosso primeiro interesse foi avaliar se o inibidor de desacetilases de histonas, butirato de sódio (NaB), o qual é conhecido como um agente diferenciador, principalmente de células tumorais, mas também de células normais (BOLDEN e cols, 2006), seria capaz de diferenciar diretamente monócitos em células dendríticas. Para tal, os monócitos obtidos de sangue periférico foram cultivados por 5 dias apenas com meio de cultura, sem o estímulo de diferenciação, na ausência ou presença do NaB (12,5, 25, 50, 100 e 200 μ M). Essas concentrações foram escolhidas por serem mais baixas do que aquelas conhecidas por induzir a morte de células tumorais (BERNHARD e col, 1999), ou do que as citotóxicas para monócitos e células dendríticas (dados não mostrados e MILLARD e col, 2002). Após o tempo de cultura, foi possível observar que o percentual de células expressando CD14 não foi alterado pelo NaB (figura 23-A); porém, houve uma pequena diminuição na intensidade de fluorescência na presença de 200 μ M de NaB (figura 23-B), indicando níveis diminuídos da proteína. O NaB não foi capaz de induzir a expressão de CD1a nem mesmo na concentração que diminui a expressão de CD14 (dados não mostrados).

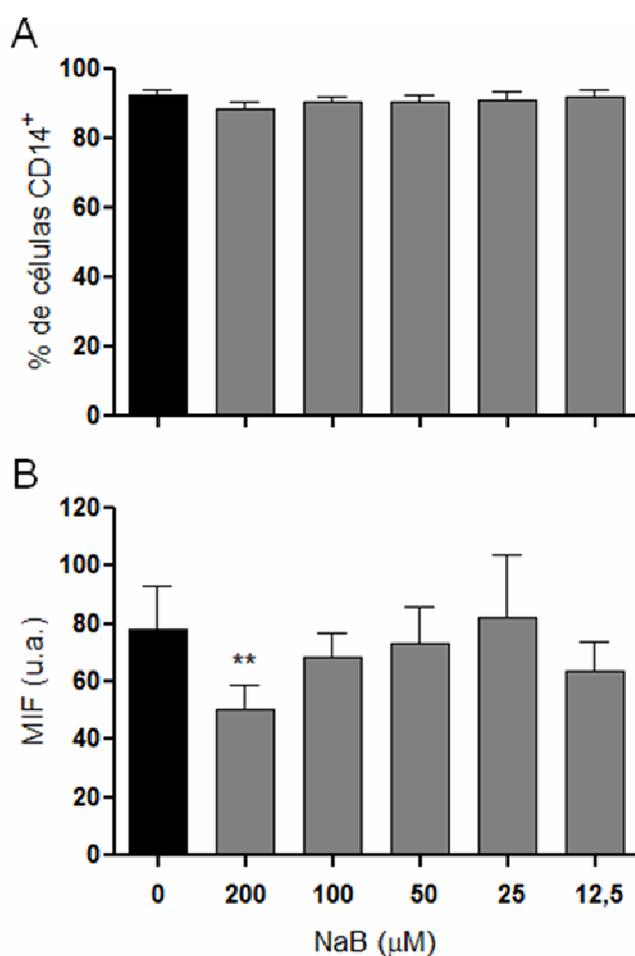


Figura 23. Expressão de CD14 em monócitos cultivados com butirato de sódio (NaB). As células foram incubadas com meio, na presença ou ausência de NaB (200, 100, 50, 25, 12,5 μM), por 5 dias. Após este período, a expressão de CD14 foi avaliada por citometria de fluxo. O gráfico de barras apresenta o percentual de células CD14⁺ (A) e a média de intensidade de fluorescência (B) \pm erro padrão da média de 4 experimentos independentes. ** Significativamente diferente do controle ($P < 0,01$).

Apesar do NaB por si só não ter diferenciado os monócitos em células dendríticas, este inibidor poderia modular a diferenciação iniciada por IL-4 e GM-CSF. Quando as células foram estimuladas a diferenciar na presença das citocinas e também

do NaB (12,5, 25, 50, 100 e 200 μ M) pelo tempo de 5 dias, observamos que a perda de expressão de CD14 ocorreu mesmo na presença do NaB (figura 24-A e 24-C). Entretanto, o percentual de células expressando CD1a estava menor na presença do inibidor nas concentrações de 100 e 200 μ M (figura 24-B), e a expressão de CD1a por célula foi bastante diminuída nas mesmas concentrações (figura 24-D).

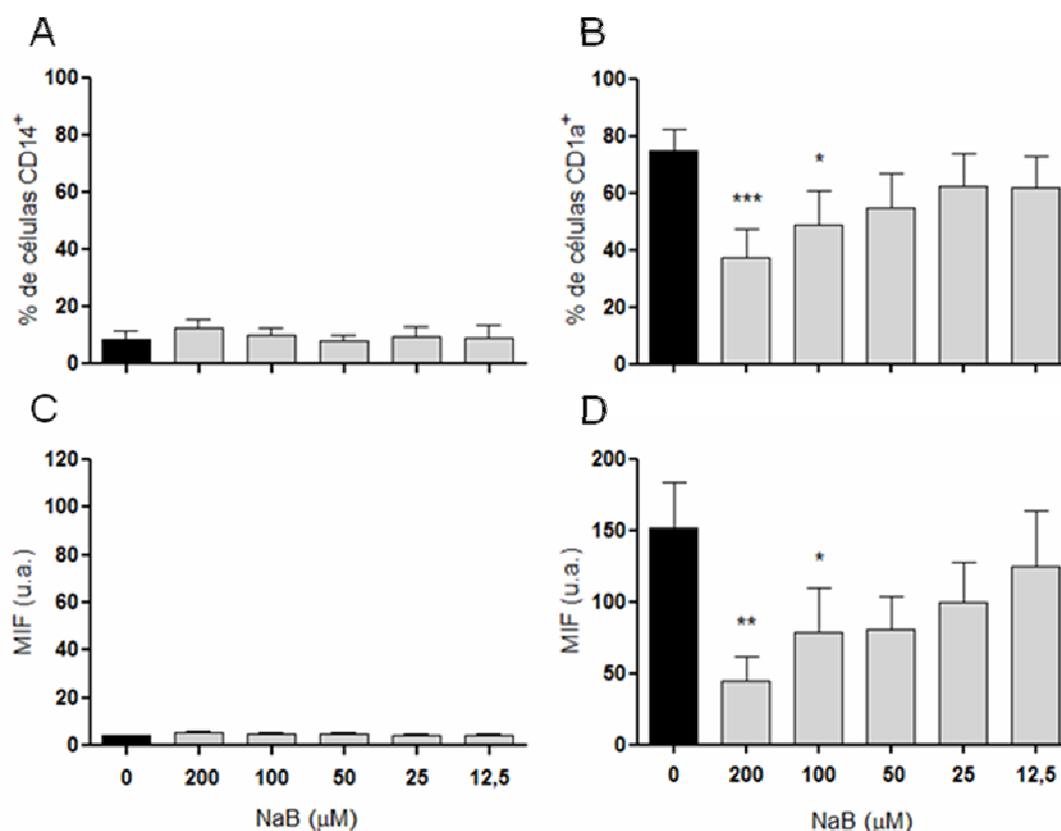


Figura 24. Expressão de CD14 e CD1a em células dendríticas cultivadas com butirato de sódio (NaB). As células foram incubadas com IL-4 + GM-CSF (50 ng/mL), na ausência ou presença de NaB (200, 100, 50, 25, 12,5 μM), por 5 dias. Após este período, a expressão de CD14 e CD1a foi avaliada por citometria de fluxo. O gráfico de barras apresenta o percentual de células CD14⁺ (A), CD1a⁺ (B), e a média de intensidade de fluorescência (C para o CD14), (D para o CD1a) ± erro padrão da média de 6 experimentos independentes. * Significativamente diferente do controle (P<0,05), ** significativamente diferente do controle (P<0,01), *** significativamente diferente do controle (P<0,001).

A expressão de CD1a é utilizada, freqüentemente, para identificar células dendríticas. Portanto, era necessário responder se a diminuição desta molécula nas células incubadas com NaB revelava uma inibição do processo de diferenciação. Para

isto, abordamos outros aspectos da diferenciação além do fenótipo analisado inicialmente. Quando analisamos o desenvolvimento das culturas, observamos que os monócitos cultivados apenas com meio ficam dispersos na cultura, enquanto aqueles estimulados com IL-4 e GM-CSF formavam colônias (figura 25-A). Foi possível verificar a persistência dessa formação de colônias, induzida por IL-4 e GM-CSF, mesmo na presença do NaB (200 μ M) (figura 25-A).

A aquisição de uma morfologia característica de células dendríticas é mais um aspecto da diferenciação a partir de monócitos. Ainda na figura 25 é possível observar em maior detalhe as expansões citoplasmáticas das células cultivadas com IL-4 e GM-CSF na ausência ou na presença de 200 μ M NaB (figura 25-B).

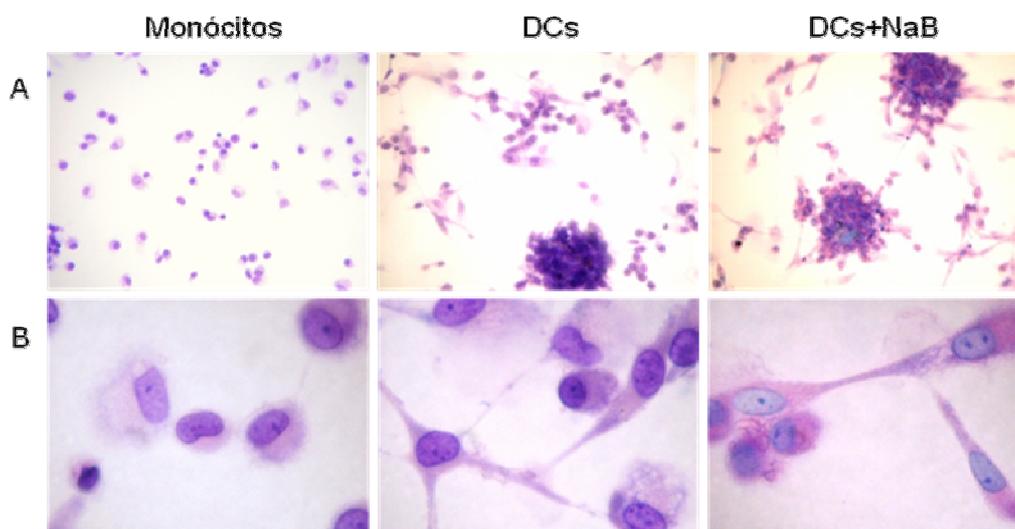


Figura 25. Desenvolvimento e morfologia de células dendríticas em cultura com butirato de sódio (NaB). As células foram incubadas com meio (monócitos) ou com IL-4 + GM-CSF (50 ng/mL) (DCs) na presença ou ausência de NaB (200 μ M), por 5 dias. Após este período, as células foram coradas com o kit panótico. A formação de colônias (A) (lente objetiva de 20x) e a morfologia celular (B) (lente objetiva de 100x) foram visualizadas em microscopia óptica. Foto ilustrativa.

Para confirmar se a formação de colônias observada na figura 25-A refletia um aumento no número de células, nós realizamos um ensaio de viabilidade baseado na redução do MTT. E como apresentado na figura 26, houve de fato um aumento no número de células em resposta as citocinas; e a presença de NaB não afetou este aumento (figura 26).

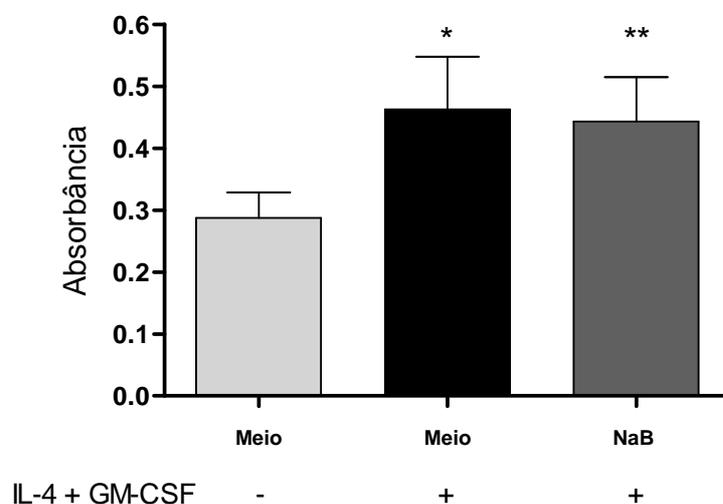


Figura 26. Viabilidade de células dendríticas cultivadas com butirato de sódio (NaB). As células foram incubadas com meio ou com IL-4 + GM-CSF (50 ng/mL) na presença ou ausência de NaB (200 μ M), por 5 dias. Após este período, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT. O gráfico de barras apresenta a média da absorbância \pm erro padrão da média de 4 experimentos independentes. * Significativamente diferente dos monócitos (meio) ($P < 0,05$), ** significativamente diferente dos monócitos ($P < 0,01$).

Como a produção de determinadas citocinas pode ser modificada quando monócitos são estimulados a diferenciar em células dendríticas, nós buscamos avaliar como se dava a produção de IL-1 β durante a diferenciação e sob a influência do NaB. Após 5 dias, os sobrenadantes das culturas foram coletados, e a produção de IL-1 β foi medida por ensaio de ELISA. Houve produção desta citocina nos sobrenadantes dos monócitos, a qual foi suprimida nas culturas com IL-4 e GM-CSF, independente da ausência ou presença de 200 μ M de NaB (figura 27). Foi detectada uma diminuição na produção de IL-1 β dos monócitos incubados com NaB, portanto, não podemos excluir a

possibilidade de o NaB, quando presente, ter contribuído para a diminuição observada nas culturas com IL-4 e GM-CSF (figura 27).

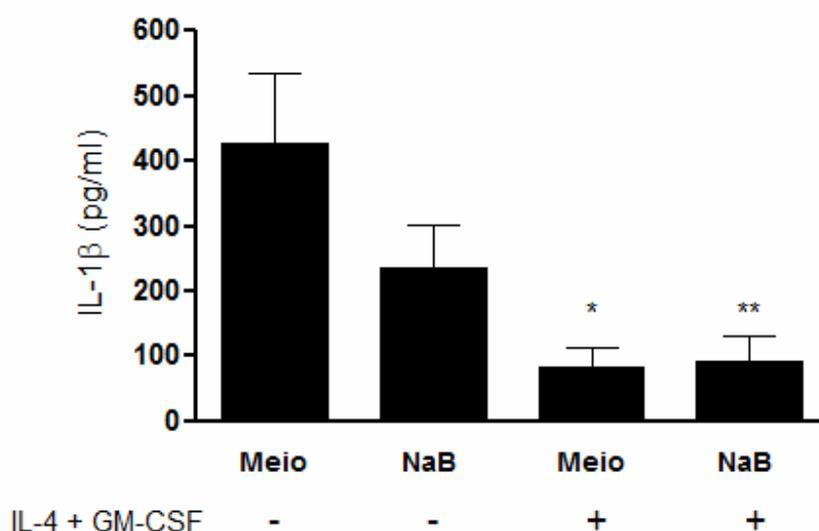


Figura 27. Produção de IL-1 β por monócitos e células dendríticas cultivados com butirato de sódio (NaB). As células foram incubadas com meio ou IL-4 + GM-CSF (50 ng/mL), na presença ou ausência de NaB (200 μ M), por 5 dias. Após este período, os sobrenadantes foram coletados e a presença de IL-1 β foi medida por ensaio de ELISA. O gráfico de barras apresenta a concentração de IL-1 β em pg/mL \pm erro padrão da média de 5 experimentos independentes. Valores de P em relação ao controle (monócitos). * P=0,05, **P=0,03.

Uma função fundamental das células dendríticas na fase em que são denominadas células “imaturas” é a captura de antígenos. Por isto, nós avaliamos esta capacidade nas células diferenciadas na ausência ou presença de NaB (200 μ M) através de um ensaio de fagocitose de partículas de dextran-FITC. Aproximadamente

40% dos monócitos fagocitaram as partículas; porém, esse percentual aumentou para próximo de 80% na população de células dendríticas, assim como nas células diferenciadas com NaB (figura 28). Quando analisamos a capacidade de fagocitose, dada pela intensidade de fluorescência das células positivas para FITC, verificamos, em comparação aos monócitos, um aumento nas células dendríticas e nas células diferenciadas com NaB, sem diferenças entre as mesmas (figura 28).

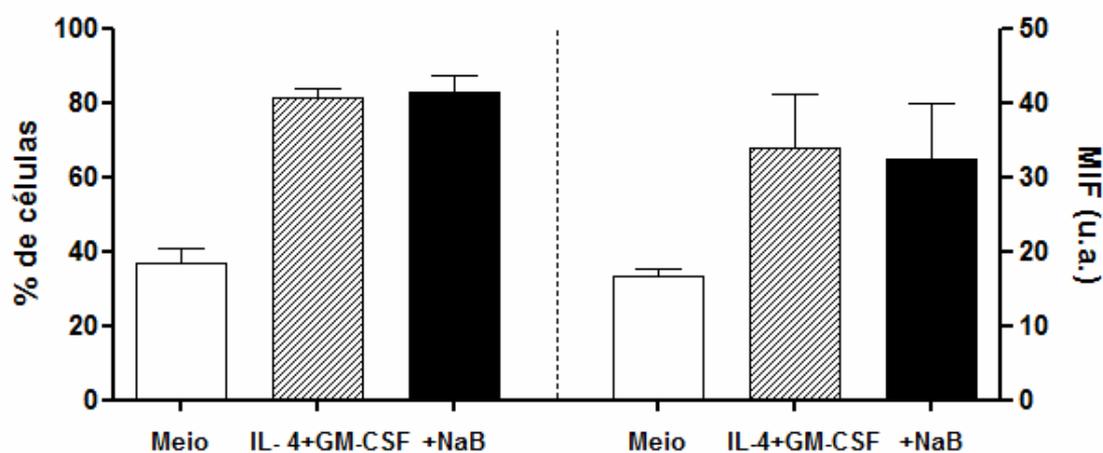


Figura 28. Captação de partículas de dextran por células dendríticas cultivadas com butirato de sódio (NaB). As células foram incubadas com meio ou IL-4 + GM-CSF (50 ng/mL) na presença ou ausência de NaB (200 μ M), por 5 dias. Após este período, as células foram incubadas com dextran-FITC (0,5 mg/mL), por 1h à 37°C, e analisadas por citometria de fluxo. O gráfico de barras apresenta o percentual de células positivas para dextran-FITC (esquerda) e a média de intensidade de fluorescência das células positivas (direita) \pm erro padrão da média de 5 experimentos independentes.

Os dados acima mostram que quando os monócitos são estimulados a diferenciar na presença de NaB ocorre a perda de CD14 sem o aumento concomitante de CD1a. Além disto, outras características morfológicas e funcionais das DCs foram semelhantes com e sem NaB na cultura, o que nos sugere que o NaB afeta a expressão de CD1a sem interferir com o processo de diferenciação.

Com o intuito de explorar se o NaB tinha uma efeito seletivo na indução de CD1a ou poderia afetar a expressão de moléculas que permanecem inalteradas durante a diferenciação, nós testamos a expressão de CD11b e CD11c.

Aproximadamente 100% das células expressavam CD11b e CD11c após todas as condições de cultura: meio, IL-4 e GM-CSF, IL-4 e GM-CSF mais NaB (200 μ M) (figura 29). A figura 29 mostra um histograma representativo indicando a expressão (dada pela intensidade de fluorescência) do CD11b e CD11c. Não houve diferenças entre as células incubadas com IL-4 e GM-CSF e aquelas incubadas na presença de NaB (figura 29). Assim, esse resultado reforça a possibilidade de que o NaB teria uma ação seletiva sobre a expressão do CD1a.

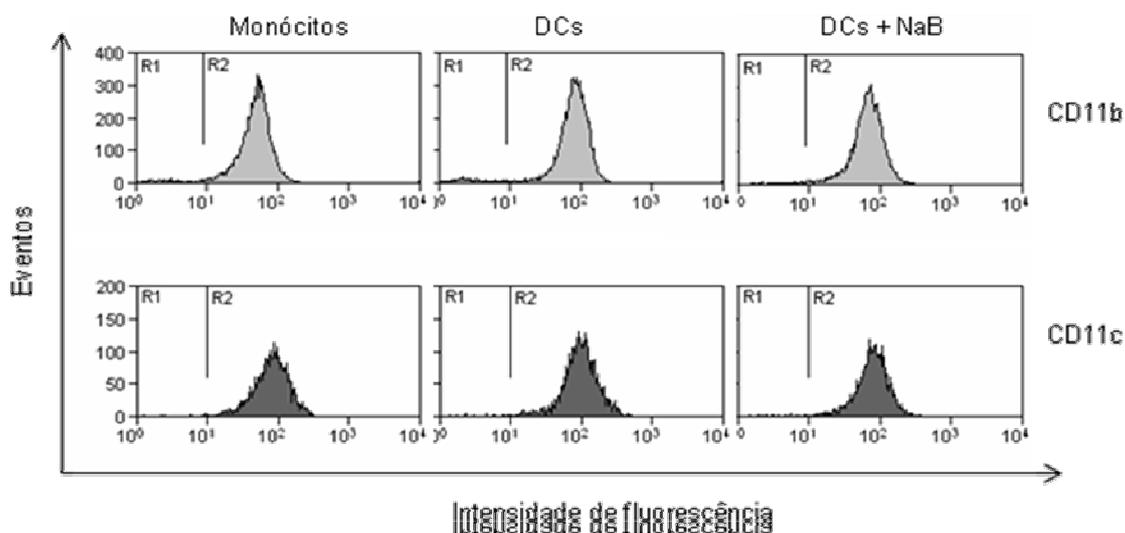


Figura 29. Expressão de CD11b e CD11c em células dendríticas cultivadas com butirato de sódio (NaB). As células foram incubadas com meio ou IL-4 + GM-CSF (50 ng/mL) na presença ou ausência de NaB (200 μ M), por 5 dias. Após este período, a expressão de CD11b e CD11c foi avaliada por citometria de fluxo. Histogramas representativos de 3 (CD11b) e 4 (CD11c) experimentos independentes mostrando os padrões de expressão de CD11b e CD11c de monócitos, DCs e DCs tratadas com NaB (200 μ M). R1 – região de autofluorescência. R2 – região de células positivas para CD11b ou CD11c.

As células dendríticas diminuem a expressão de CD1a, como um dos resultados de sua ativação (ZHOU e TEDDER, 1996). Assim, nós consideramos a hipótese de que o NaB estivesse induzindo a ativação das células e diminuindo a expressão de CD1a em decorrência disto. Se esta suposição fosse verdadeira as células cultivadas com NaB teriam maior expressão de CD83 (molécula associada a ativação de DCs).

Como mostrado na figura 30, o protocolo utilizado promove a geração de células relativamente imaturas, não ativadas, com uma pequena expressão de CD83. E esta

expressão não foi modificada pela presença de NaB (200 μ M), sugerindo que este inibidor não induziu ativação nas células dendríticas.

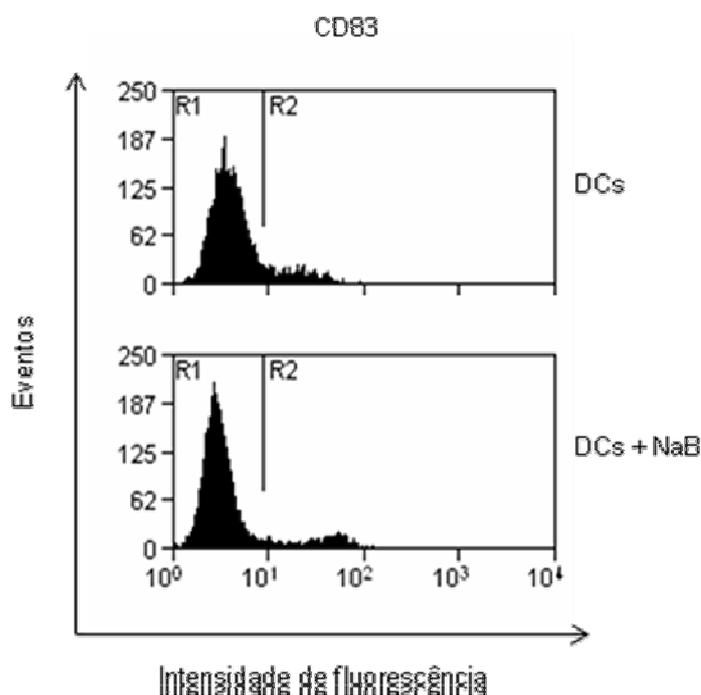


Figura 30. Expressão de CD83 em células dendríticas cultivadas com butirato de sódio (NaB). As células foram incubadas com IL-4 + GM-CSF (50 ng/mL), na ausência ou presença de NaB (200 μ M), por 5 dias. Após este período, a expressão de CD83 foi avaliada por citometria de fluxo. Histogramas representativos de 3 experimentos independentes mostrando os padrões de expressão de CD83 de DCs e DCs tratadas com NaB (200 μ M). R1 – região de autofluorescência. R2 – região de células positivas para CD83.

Células dendríticas quando ativadas passam a expressar CD83, como mencionado. Além disto, a ativação é caracterizada pela modulação de moléculas co-

estimulatórias, como o CD86, e aumento de HLA-DR (MHC II em humanos). Como os resultados acima indicam que a diferenciação ocorreu na cultura com IL-4, GM-CSF e NaB, a nossa pergunta foi se essas células responderiam normalmente ao estímulo de ativação do TNF- α , e mais do que isso se a presença do inibidor durante o processo de ativação poderia influenciar a resposta de células diferenciadas com IL-4 e GM-CSF. Para responder a estas questões nós analisamos a expressão de CD83, CD86 e HLA-DR em células dendríticas após duas condições: diferenciação com IL-4, GM-CSF e NaB seguido de ativação com TNF- α , e diferenciação com IL-4, GM-CSF seguido de ativação com TNF- α e NaB.

As células que foram expostas ao NaB durante a diferenciação, seguido do estímulo com TNF- α expressaram níveis comparáveis de CD86 e de HLA-DR, porém a indução de CD83 foi parcialmente inibida, como pode ser observado pelo deslocamento da curva para a esquerda (figura 31). Esta inibição também ocorreu quando o NaB foi adicionado no tempo de ativação com o TNF- α (figura 31). O NaB não foi capaz de alterar a expressão de nenhuma das moléculas em células que não foram estimuladas com TNF- α (dados não mostrados).

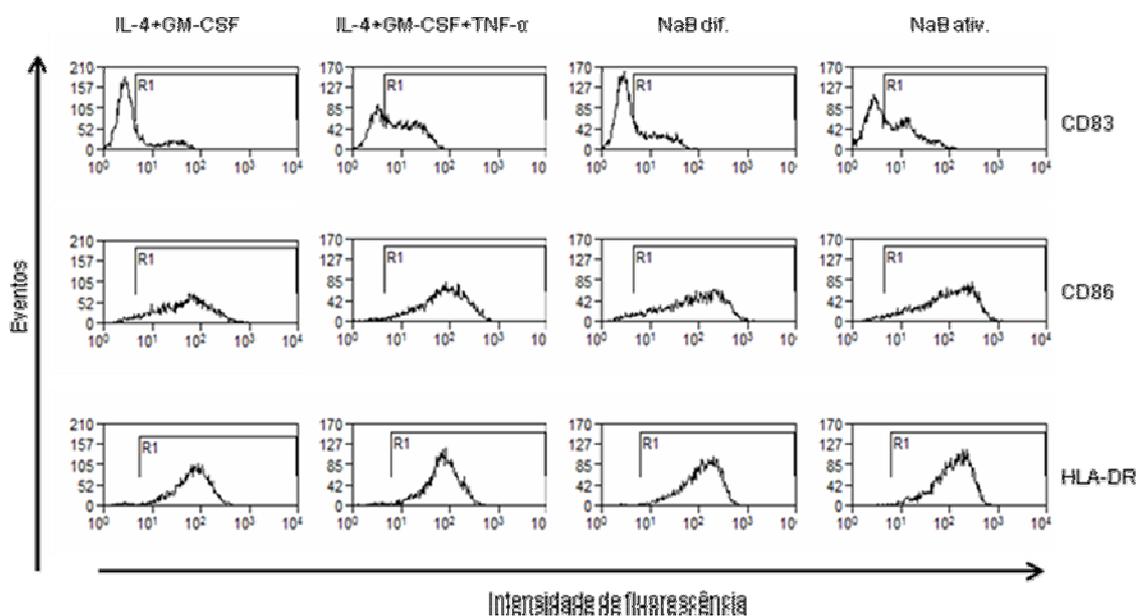


Figura 31. Expressão de CD83, CD86 e HLA-DR em células dendríticas cultivadas com butirato de sódio (NaB). IL-4+GM-CSF+TNF- α - as células foram incubadas com IL-4 + GM-CSF (50ng/ml) por 5 dias e estimuladas com TNF- α por mais 48h. NaB dif.– diferenciação com IL-4+GM-CSF na presença de 200 μ M de NaB, por 5 dias, mais 48h de estímulo com TNF- α . NaB ativ.– diferenciação com IL-4+GM-CSF, por 5 dias, mais 48h de estímulo com TNF- α na presença de 200 μ M de NaB. Após 7 dias, a expressão de CD83, CD86 e HLA-DR foi avaliada por citometria de fluxo. Histogramas representativos de 5 (CD83 e CD86) ou 4 (HLA-DR) experimentos independentes mostrando os respectivos padrões de expressão. R1 – região de células positivas para CD83, CD86 ou HLA-DR.

4.4 Modulação da ativação de células dendríticas pelo hormônio Ouabaína

Nos últimos anos nosso grupo e outros grupos têm investigado o papel fisiológico da Ouabaína (Oua) no sistema imunológico (ECHEVARRIA-LIMA e RUMJANEK, 2006). Desde então diversos efeitos desse hormônio vem sendo descritos; porém, pouco se sabe sobre a resposta de monócitos ao estímulo da Oua e até o momento não há

dados na literatura sobre os efeitos desse hormônio em células dendríticas. Nesta parte do estudo, nós investigamos os possíveis efeitos da Oua, desde monócitos até células dendríticas em fase de ativação.

Analisamos inicialmente a expressão de CD14 e CD1a em monócitos tratados com Oua (10^{-7} M), por 24h. Após este tempo, observamos uma diminuição significativa no percentual de células com alta expressão de CD14 na membrana (aproximadamente 85% *versus* 45%) (figura 32).

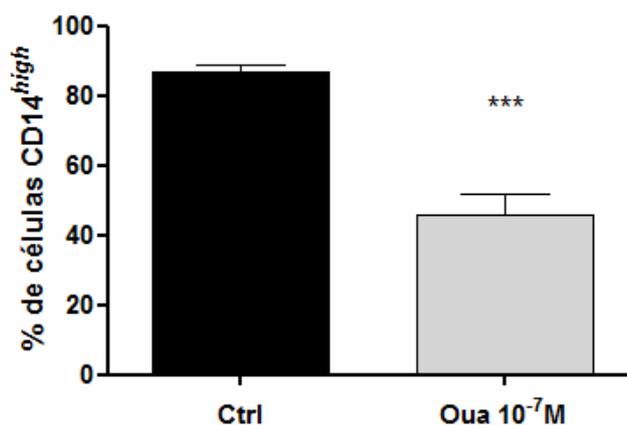


Figura 32. Expressão de CD14 em monócitos cultivados com Ouabaína (Oua). Os monócitos foram incubados com meio na ausência ou presença de Oua (10^{-7} M), por 24h. Após este período, a expressão de CD14 foi avaliada por citometria de fluxo. O gráfico de barras apresenta o percentual de células CD14^{high} \pm erro padrão da média de 11 experimentos independentes. *** Significativamente diferente do controle ($P < 0,001$).

Na figura 33 é possível notar, pela sobreposição das duas curvas, que a expressão de CD1a não foi induzida nos monócitos tratados com Oua. Este resultado

sugere que a diminuição de CD14 relatada na figura anterior não significou o início de uma diferenciação para células dendríticas. Para ratificar esta sugestão seria necessário repetir os experimentos das figuras 32 e 33 no tempo de diferenciação (5 dias), o que não foi possível pois a Oua 10^{-7} M em tempo prolongado de incubação se mostrou tóxica para as células (dados não mostrados).

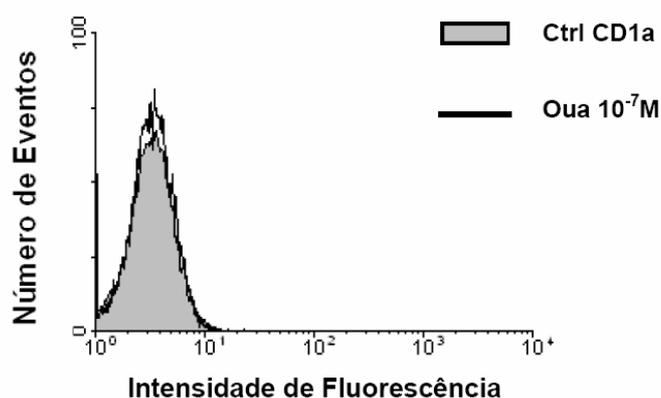


Figura 33. Expressão de CD1a em monócitos cultivados com Ouabaína (Oua). Os monócitos foram incubadas com meio na ausência ou presença de Oua (10^{-7} M), por 24h. Após este período, a expressão de CD1a foi avaliada por citometria de fluxo. Histograma representativo de 3 experimentos independentes mostrando os padrões de expressão de CD1a de monócitos tratados com Oua (10^{-7} M).

Já foi verificado por outros autores que monócitos tratados com Oua (10^{-6} M) têm uma elevação na secreção de IL-1 α , IL-1 β e IL-6 (MATSUMORI e cols, 1997); em outro estudo utilizando células mononucleares e uma concentração mais baixa de Oua, 10^{-7}

M, os autores verificaram uma elevação na produção de IL-1 β e TNF- α e uma diminuição de IL-6 (FOEY e cols, 1997). Repetimos o protocolo dos experimentos anteriores, no qual os monócitos são incubados com Oua (10^{-7} M) por 24h. Os sobrenadantes das culturas foram então coletados, e a produção de TNF- α foi medida por ensaio de ELISA. Observamos um aumento importante (aproximadamente 3 vezes) na secreção desta citocina na presença de Oua (figura 34), o que está de acordo com os dados da literatura. Considerando que o TNF- α é capaz de diminuir a expressão de CD14 (dados não mostrados), o aumento da secreção desta citocina induzido pela Oua poderia estar relacionado à diminuição de CD14.

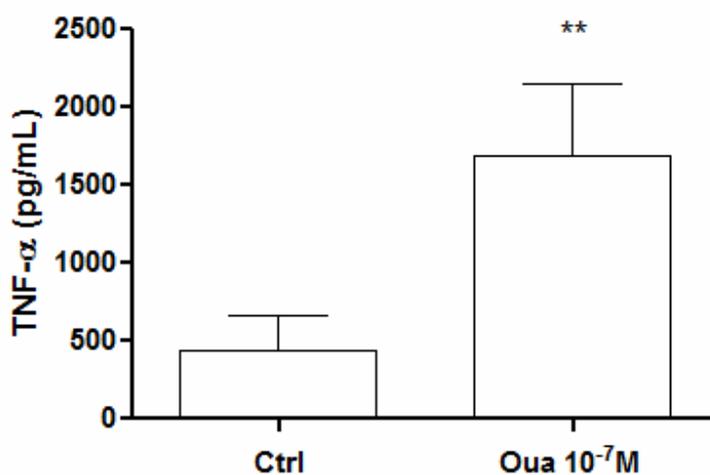


Figura 34. Produção de TNF- α por monócitos cultivados com Ouabaína (Oua). Os monócitos foram incubadas com meio na ausência ou presença de Oua (10^{-7} M), por 24h. Os sobrenadantes foram coletados e a presença de TNF- α foi medida por ensaio de ELISA. O gráfico de barras apresenta a concentração de TNF- α em pg/mL \pm erro padrão da média de 10 experimentos independentes. ** Significativamente diferente do controle (P<0,01).

Considerando que a Oua (10^{-7} M) foi tóxica para monócitos em culturas de 48h e 5 dias (dados não mostrados), nós testamos se as concentrações de 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} M de Oua alteravam a viabilidade das células dendríticas quando este hormônio era adicionado após 5 dias de cultura de diferenciação, e permanecia por 48h com ou sem TNF- α (protocolo para os próximos experimentos).

A tabela 2 apresenta a média dos valores de absorbância da leitura após o ensaio do MTT. Com base nesses valores é possível concluir que a viabilidade celular não foi afetada pela Oua, em nenhuma das concentrações ou condições de cultura estudadas.

Tabela 2. Viabilidade de células dendríticas cultivados com Ouabaína (Oua).

	Ctrl	Oua 10^{-7}M	Oua 10^{-9}M	Oua 10^{-11}M
DCs	0,719 \pm 0,118	0,729 \pm 0,155	0,738 \pm 0,159	0,764 \pm 0,196
DCs + TNF- α	0,852 \pm 0,184	0,797 \pm 0,150	0,820 \pm 0,166	0,801 \pm 0,222

A viabilidade foi medida pelo método do MTT. Metodologia descrita em material e métodos. DCs – células cultivadas com IL-4 + GM-CSF por 7 dias, DCs + TNF- α – células cultivadas com IL-4 + GM-CSF por 5 dias, seguido de 48h com TNF- α , mantendo IL-4 + GM-CSF. Ctrl – controle sem Oua. Os valores da tabela se referem as médias \pm erro padrão das médias da absorbância de 3 experimentos independentes.

Nós decidimos então, investigar se células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos também responderiam ao tratamento com Oua elevando sua secreção de

TNF- α . As células dendríticas diferenciadas *in vitro* na presença de IL-4 e GM-CSF (5 dias) foram incubadas com ou sem Oua nas concentrações de 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} M mantendo as citocinas no meio, por 48h. Estes dados preliminares mostraram que diferentemente do observado com monócitos (figura 34), a secreção basal de TNF- α não foi elevada por Oua 10^{-7} M, e a Oua nas concentrações mais baixas, 10^{-9} e 10^{-11} M, induziu um aumento na secreção de TNF- α (figura 35).

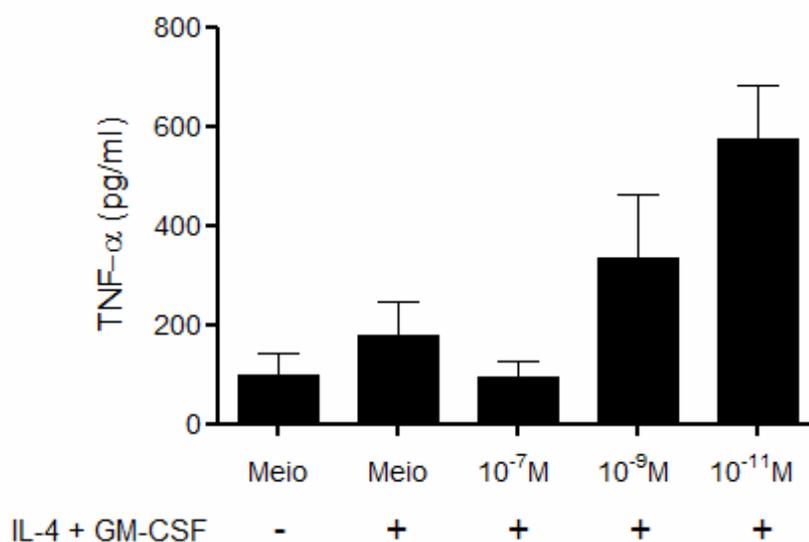


Figura 35. Produção de TNF- α por células dendríticas cultivadas com Ouabaína (Oua). Após cinco dias de diferenciação, as células foram incubadas com meio (monócitos) ou IL-4 + GM-CSF (50 ng/mL) na ausência ou presença de Oua (10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} M), por mais 48h. Os sobrenadantes foram coletados e a presença de TNF- α foi medida por ensaio de ELISA. O gráfico de barras apresenta a concentração de TNF- α em pg/mL \pm erro padrão da média de 3 experimentos independentes.

Dados recentes do nosso grupo mostraram que a Oua é capaz de aumentar ou diminuir a ativação da cinase p38, dependendo do tipo celular considerado (RODRIGUES-MASCARENHAS e cols, 2008; VALENTE, 2008, tese de doutorado). Até o momento não há dados sobre as ações da Oua em células dendríticas. Contudo, sabe-se que a p38 é importante para a atividade de citocinas como IL-1 β e TNF- α , e que está envolvida nos sinais desencadeados pelo LPS. Foi demonstrado, em um modelo também de células dendríticas humanas derivadas de monócitos, que os estímulos de LPS ou TNF- α induzem a fosforilação da p38; e que a presença de um inibidor da p38 inibe a ativação das DCs induzida por estes estímulos (ARRIGHI e cols, 2001).

Para confirmar os dados da literatura sobre a importância da p38 no processo de ativação das DCs, as células foram estimuladas com TNF- α na presença do inibidor da p38, e a expressão de CD83 (molécula que passa a ser expressa em DCs ativadas) foi medida por citometria de fluxo. Nós observamos, pelo deslocamento da curva para a esquerda, que a expressão CD83 induzida por TNF- α foi diminuída quando o inibidor de p38 foi adicionado à cultura (figura 36). E mesmo a pequena expressão de CD83 que tem sido observada por nós em sete dias de cultura com IL-4 e GM-CSF foi abolida na presença do inibidor (figura 36).

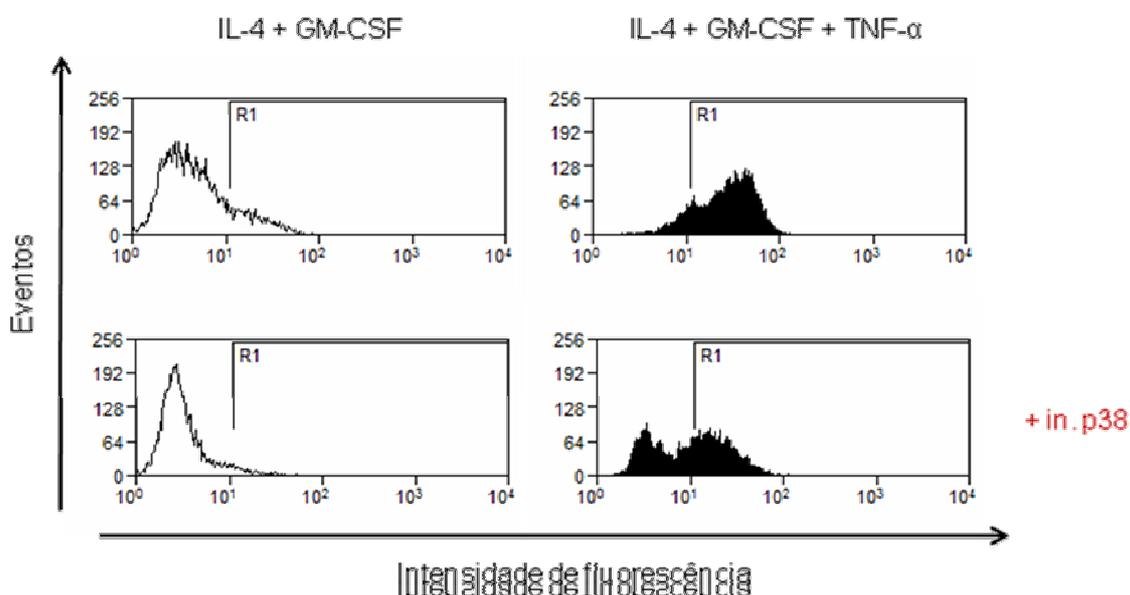


Figura 36. Expressão de CD83 por células dendríticas cultivadas com o inibidor da p38. Após cinco dias de diferenciação, as células foram incubadas com ou sem TNF- α (50 ng/mL), na ausência ou presença do inibidor da p38 (SB202190) (20 μ M), por mais 48h. Após este período, a expressão de CD83 foi avaliada por citometria de fluxo. Histograma representativo de 3 experimentos independentes mostrando os padrões de expressão de CD83 de células dendríticas tratadas com o inibidor da p38 (SB202190) (20 μ M). R1 – região de células positivas para CD83.

Considerando a hipótese de que a Oua poderia influenciar a ativação das células dendríticas por modificar nestas células a ativação da p38, e com base nos dados da figura anterior, nós fomos avaliar a presença da Oua substituindo o inibidor da p38. Após 5 dias de diferenciação, as células dendríticas imaturas foram estimuladas com TNF- α por 48 horas e/ou Oua nas concentrações de 10⁻⁷, 10⁻⁹ e 10⁻¹¹ M, mantendo IL-4 e GM-CSF no meio. A expressão de superfície do CD83 foi avaliada na população CD14⁺. Foi observado que na presença de Oua 10⁻⁷ M a expressão de CD83 induzida por TNF- α foi inibida, quando analisado o percentual de células (figura 37-A) e também

a intensidade de fluorescência (figura 37-B). Além disto, um pequeno percentual de células cultivadas com IL-4 e GM-CSF expressa CD83, mesmo sem o estímulo do TNF- α ; e esta expressão foi diminuída pela presença da Oua 10^{-7} M (figura 37-A e B).

O fato dos efeitos observados com Oua (10^{-7} M) na expressão de CD83 (figura 37-A e B) também terem sido observados quando a p38 estava inibida (figura 24) nos sugere uma ligação da ação da Oua com a ativação da p38 em células dendríticas. Entretanto, sem avaliar o efeito direto da Oua na fosforilação da p38 não podemos confirmar essa sugestão.

Nas concentrações mais baixas de Oua (10^{-9} e 10^{-11} M) não houve diferença na expressão de CD83 induzida ou não por TNF- α (figura 37-A e B).

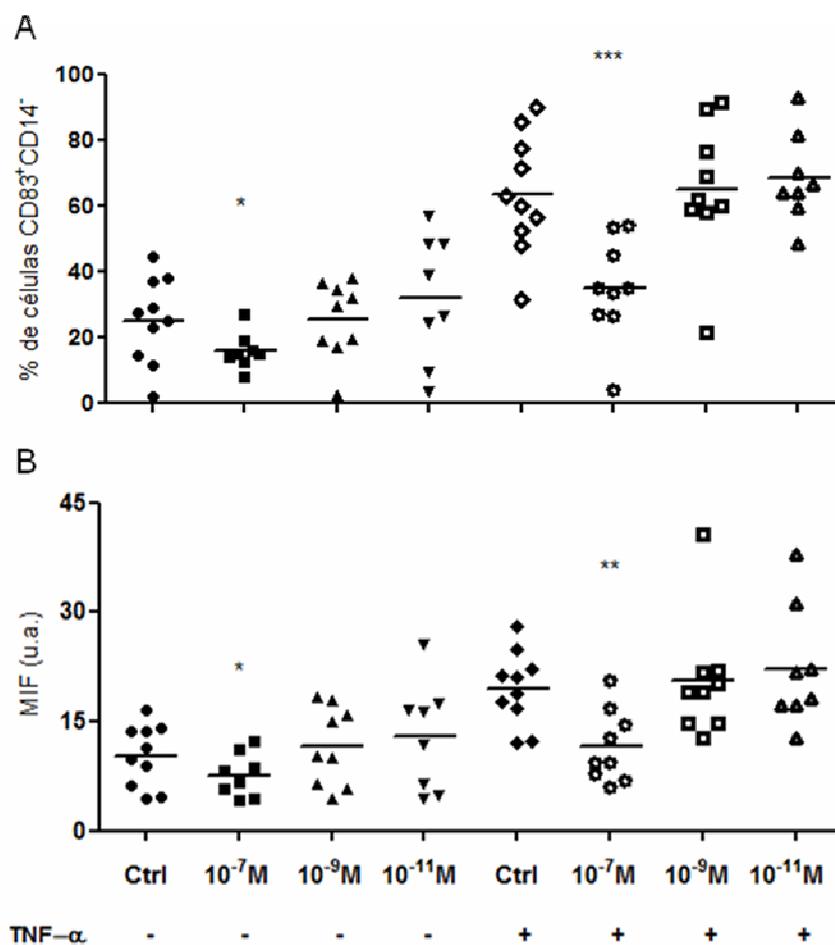


Figura 37. Expressão de CD83 por células dendríticas cultivadas com Ouabaína (Oua). Após cinco dias de diferenciação, as células foram incubadas com IL-4 + GM-CSF (50 ng/mL) com ou sem TNF- α (50 ng/mL) mantendo as citocinas no meio, na ausência ou presença de Oua (10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} M), por mais 48h. Após este período, a expressão de CD83 foi avaliada por citometria de fluxo. O gráfico de distribuição apresenta o percentual de células CD14⁻CD83⁺ (A), a média de intensidade de fluorescência (B) e as linhas representam as médias de 12 experimentos independentes. * Significativamente diferente do controle (Ctrl) ($P < 0,05$). ** Significativamente diferente do controle (Ctrl) ($P < 0,01$). *** Significativamente diferente do controle (Ctrl) ($P < 0,001$).

Conforme descrito na figura 37, as concentrações de Oua (10^{-9} e 10^{-11} M) que induziram um aumento na secreção de TNF- α (figura 35) não foram capazes de modular a expressão de CD83. Uma possibilidade para essa ausência de efeito poderia ser a concentração de TNF- α utilizada para o estímulo de ativação que estaria induzindo o máximo de expressão de CD83. Portanto, em uma condição de menor estímulo com TNF- α a Oua (10^{-9} e 10^{-11} M), por induzir a secreção de mais TNF- α poderia aumentar a expressão de CD83. Após o estímulo com uma concentração 10x menor de TNF- α a expressão de CD83 foi menor do que a observada na figura 37 e a Oua (10^{-9} , 10^{-11} M) não alterou esta expressão (figura 38).

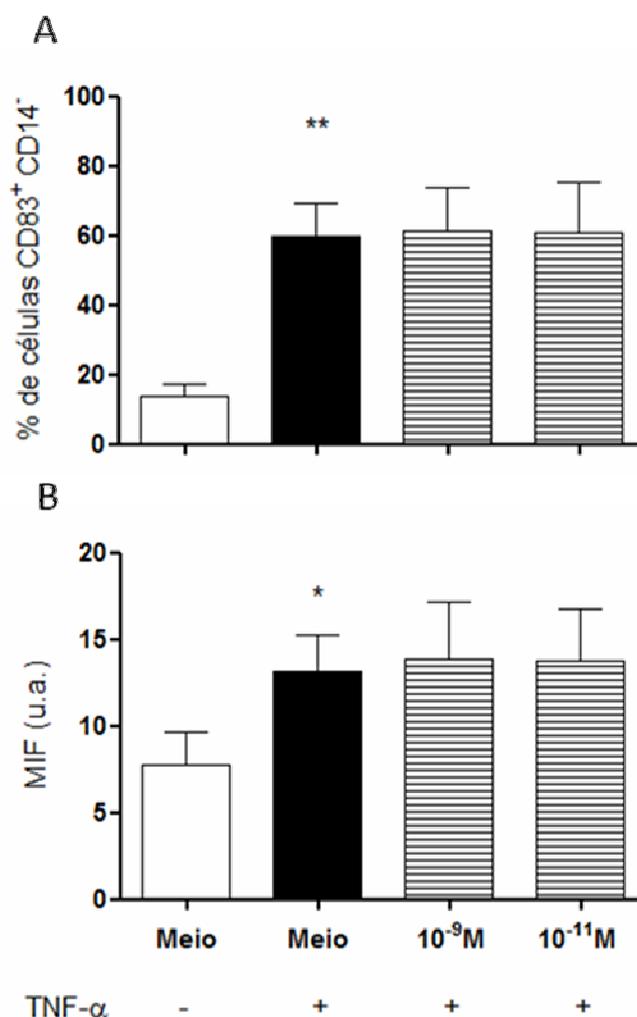


Figura 38. Expressão de CD83 por células dendríticas cultivadas com Ouabaína (Oua). Após cinco dias de diferenciação, as células foram incubadas com ou sem TNF- α (5 ng/mL), na ausência ou presença de Oua (10^{-9} , 10^{-11} M), por mais 48h. Após este período, a expressão de CD83 foi avaliada por citometria de fluxo. O gráfico de barras apresenta o percentual de células CD14⁻ CD83⁺ (A), a média de intensidade de fluorescência (B) \pm erro padrão da média de 4 experimentos independentes. * Significativamente diferente do controle (células na ausência de TNF- α) ($P < 0,05$). ** Significativamente diferente do controle (células na ausência de TNF- α) ($P < 0,01$).

Uma das resultantes da ativação de células dendríticas é a produção e secreção de citocinas como a IL-12. Considerando o efeito observado com a Oua 10^{-7} M na

expressão de CD83 como uma possível regulação da ativação das células dendríticas, inclusive envolvendo a diminuição da atividade da p38, decidimos avaliar a influência da Oua na secreção de IL-12p40 por estas células. Ainda neste protocolo de ativação, foi observado que na presença de Oua 10^{-7} M, a secreção de IL-12 p40 induzida por TNF- α foi bastante diminuída (figura 39-B). Observamos também que entre os seis doadores analisados, quatro tiveram a produção de IL-12p40 diminuída na presença de uma concentração mais baixa de Oua (10^{-9} M) (figura 39-C).

Tem sido demonstrado que a atividade da p38 é essencial para a produção de IL-12 em macrófagos e células dendríticas (HÄCKER e cols, 1998), o que reforça a sugestão de que a Oua esteja exercendo seus efeitos através da diminuição da atividade da p38.

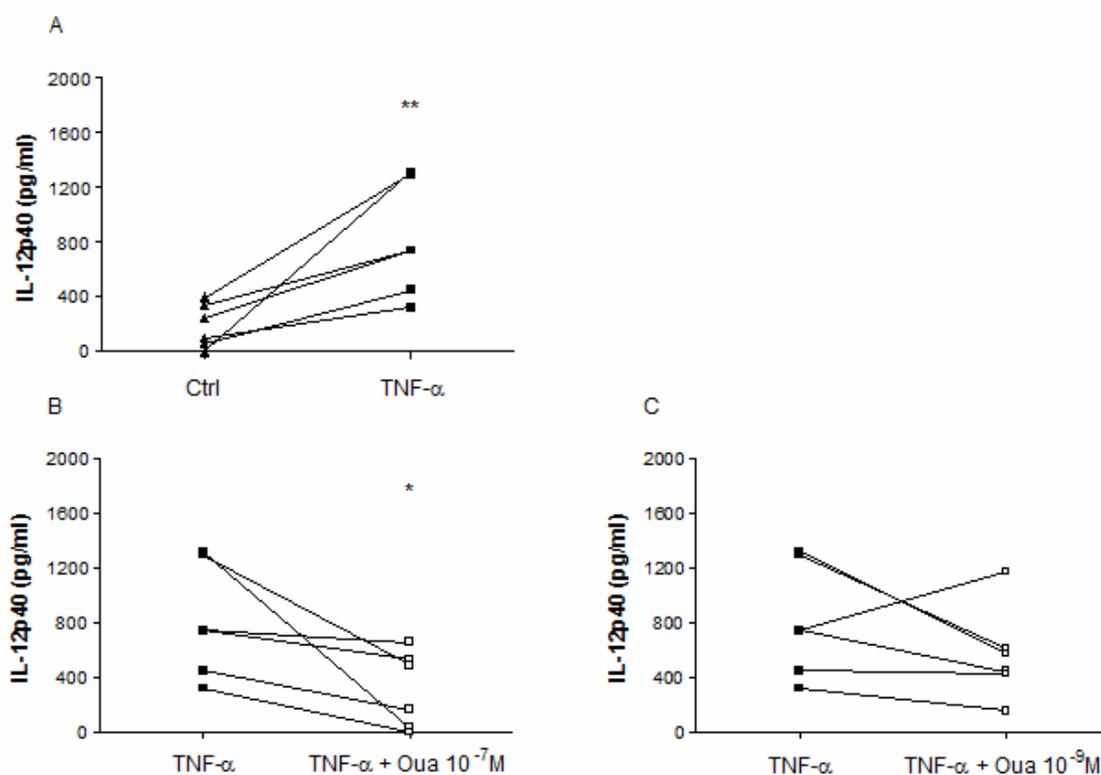


Figura 39. Produção de IL-12p40 por células dendríticas cultivadas com Ouabaína (Oua). Após cinco dias de diferenciação, as células foram incubadas com IL-4 + GM-CSF (50 ng/mL) com ou sem TNF- α mantendo as citocinas no meio na ausência ou presença de Oua (10^{-7} , 10^{-9} M), por mais 48h. Os sobrenadantes foram coletados e a presença de IL-12p40 foi medida por ensaio de ELISA. O gráfico apresenta a concentração de IL-12p40 em pg/mL com as curvas de cada indivíduo. N=6. * ($P<0,05$) TNF- α versus IL-4 + GM-CSF. ** ($P<0,01$) Oua 10^{-7} M versus TNF- α .

Nesta seqüência de experimentos nós utilizamos concentrações fisiológicas de Oua (10^{-9} e 10^{-11} M) e também a concentração farmacológica (10^{-7} M), a qual pode ser alcançada em determinadas condições como o estresse agudo decorrente de exercício físico intenso (GOTO e cols, 1995; SCHONER e cols, 2003). A maior parte dos efeitos da Oua, na concentração de 10^{-7} M, foram de supressão, porém, com base nos dados

da tabela 2 foi possível excluir que estes efeitos estivessem relacionados a diminuição da viabilidade celular. Fato que reitera a possibilidade de que a Oua estivesse exercendo os efeitos observados para células dendríticas através das vias de sinalização que já foram descritas para os seus efeitos em outras células.

Os efeitos da Oua tem sido associados a sua capacidade de modular a atividade da p38, e também à transativação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGF) (XIE, 2003). Portanto, a fim de avaliar a importância do receptor do EGF no efeito da Oua de inibição da expressão de CD83, nós testamos essa expressão em células estimuladas com TNF- α e tratadas com EGF, o ligante natural daquele receptor.

Conforme mostrado na figura 40, o EGF (1 nM) aumentou um pouco a expressão de CD83 e não foi capaz de modular o efeito da Oua, quando este foi co-incubado com o hormônio. A concentração de 10 nM de EGF só foi utilizada em duas amostras, sugerindo que talvez possa induzir um aumento na expressão de CD83, no entanto apenas a repetição destes resultados permitirá uma conclusão.

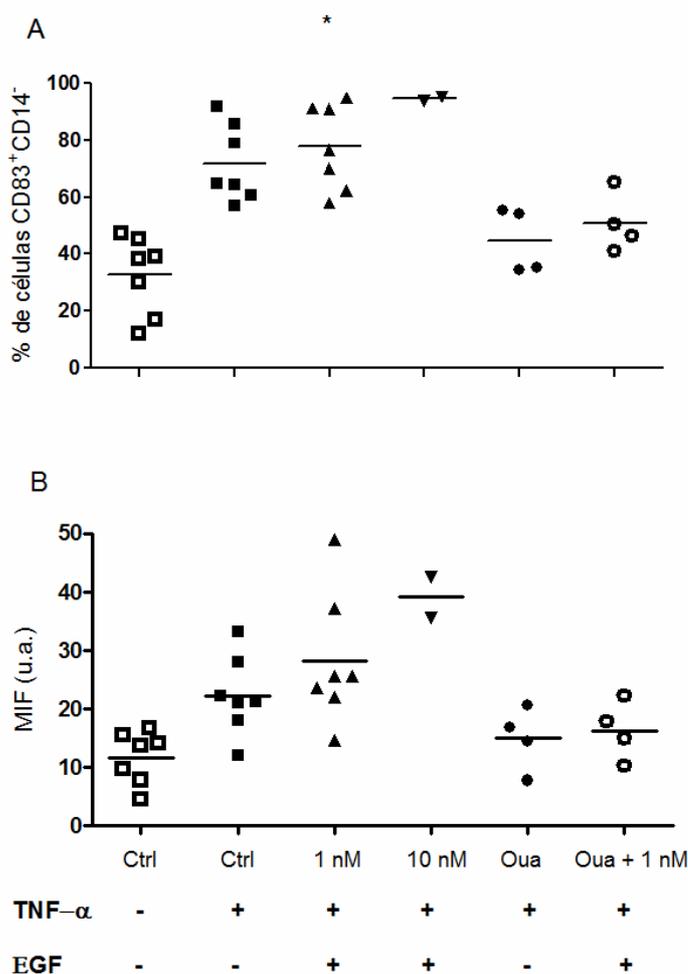


Figura 40. Expressão de CD83 por células dendríticas cultivadas com EGF. Após cinco dias de diferenciação, as células foram incubadas com IL-4 + GM-CSF (50 ng/mL) com ou sem TNF- α (50 ng/mL) mantendo as citocinas no meio, na ausência ou presença de EGF (1 e 10 nM) e/ou Oua (10^{-7} M), por mais 48h. Após este período, a expressão de CD83 foi avaliada por citometria de fluxo. O gráfico de distribuição apresenta o percentual de células CD14⁻ CD83⁺ (A), a média de intensidade de fluorescência (B) e as linhas representam as médias de 7 (1 nM), 2 (10 nM) ou 4 (Oua) experimentos independentes. * ($P < 0,05$) TNF- α +EGF *versus* TNF- α .

Os dados acima em conjunto mostram que a ouabaína foi capaz de inibir a expressão de CD83, com ou sem a adição de um estímulo de ativação, e diminui a

secreção de IL-12 induzida por TNF- α . Apesar da expressão do CD83 ser utilizada com grande frequência para identificar um processo de ativação, o contrário não é necessariamente verdadeiro, e só poderíamos concluir que o hormônio inibiu a ativação das células se houvesse uma diminuição de outras moléculas imprescindíveis para se considerar uma célula dendrítica como ativada, tais como HLA-DR, e moléculas co-estimulatórias.

Para abordar esta questão nós analisamos os efeitos da Oua (10^{-7} M) na expressão de HLA-DR, CD86 e CD80 (duas moléculas co-estimulatórias) de células dendríticas estimuladas ou não com TNF- α .

Após 7 dias de cultura, próximo de 100% das células expressavam HLA-DR independentemente do estímulo do TNF- α , e não observamos nenhuma diminuição desse percentual na presença de Oua (figura 41-A). Quando avaliamos os níveis de expressão da molécula, notamos que houve um pequeno aumento na presença do TNF- α , e a Oua foi capaz de elevar essa expressão nas células mantidas com IL-4 e GM-CSF e naquelas estimuladas com TNF- α (figura 41-B).

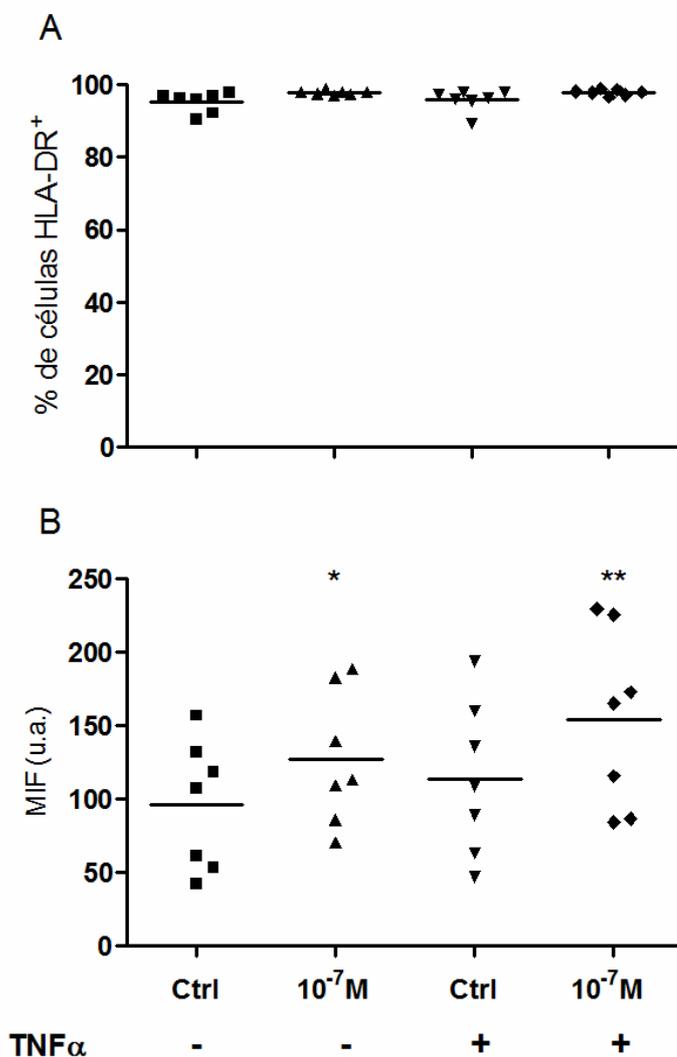


Figura 41. Expressão de HLA-DR por células dendríticas cultivadas com Ouabaína (Oua). Após cinco dias de diferenciação, as células foram incubadas com IL-4 + GM-CSF (50 ng/mL) com ou sem TNF- α (50 ng/mL) mantendo as citocinas no meio, na ausência ou presença de Oua (10^{-7} M), por mais 48h. Após este período, a expressão de HLA-DR foi avaliada por citometria de fluxo. O gráfico de distribuição apresenta o percentual de células HLA-DR⁺ (A), a média de intensidade de fluorescência (B) e as linhas representam as médias de 7 experimentos independentes. * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$), Oua versus Ctrl.

Diferente do que foi observado com a expressão do HLA-DR (figura 41-A), 50% das células expressavam CD86 e esse percentual aumentou para aproximadamente 80% sob estímulo do TNF- α (figura 42-A), modulação que também foi evidente na análise dos níveis de expressão (figura 42-B). A Oua quando presente nas culturas, tanto com IL-4 e GM-CSF quanto com TNF- α , foi capaz de aumentar o percentual de células expressando CD86 (figura 42-A) e os níveis desta proteína por célula (figura 42-B), neste último aspecto o aumento excedeu inclusive aquele promovido pelo TNF- α (aumento de 3,4 vezes Oua *versus* 2,5 vezes TNF- α).

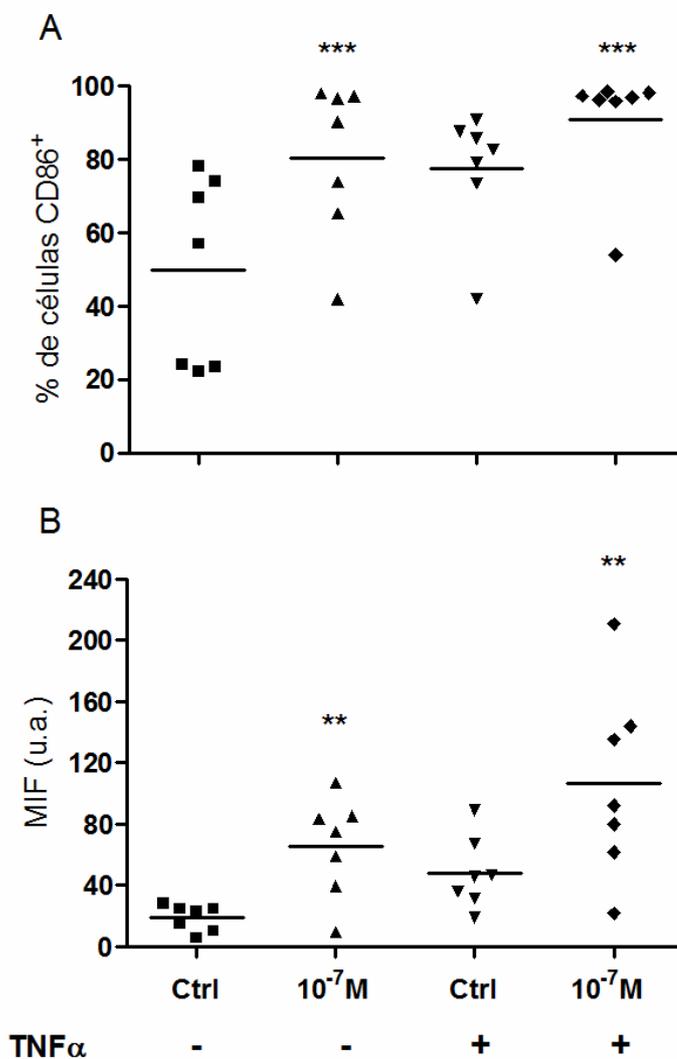


Figura 42. Expressão de CD86 por células dendríticas cultivadas com Ouabaína (Oua). Após cinco dias de diferenciação, as células foram incubadas com IL-4 + GM-CSF (50 ng/mL) com ou sem TNF- α (50 ng/mL) mantendo as citocinas no meio, na ausência ou presença de Oua (10^{-7} M), por mais 48h. Após este período, a expressão de CD86 foi avaliada por citometria de fluxo. O gráfico de distribuição apresenta o percentual de células CD86⁺ (A), a média de intensidade de fluorescência (B) e as linhas representam as médias de 7 experimentos independentes. * (P<0,05), ** (P<0,01), *** (P<0,001), Oua *versus* Ctrl.

As modificações na expressão de CD80 sob estímulo do TNF- α foram semelhantes aquelas observadas para o CD86; aumento no percentual de células e nos níveis de expressão (figura 43-A e B, respectivamente); porém, a Oua não alterou percentual ou níveis de expressão desta molécula em nenhuma das condições de cultura onde esteve presente.

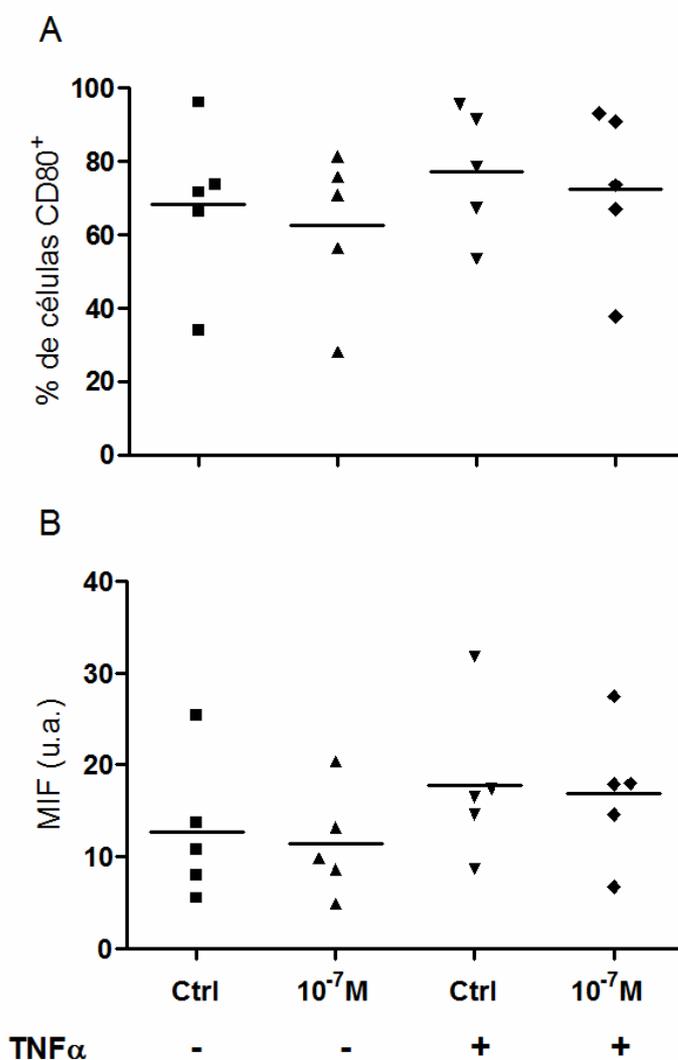


Figura 43. Expressão de CD80 por células dendríticas cultivadas com Ouabaína (Oua). Após cinco dias de diferenciação, as células foram incubadas com IL-4 + GM-CSF (50 ng/mL) com ou sem TNF- α (50 ng/mL) mantendo as citocinas no meio, na ausência ou presença de Oua (10^{-7} M), por mais 48h. Após este período, a expressão de CD80 foi avaliada por citometria de fluxo. O gráfico de distribuição apresenta o percentual de células CD80⁺ (A), a média de intensidade de fluorescência (B) e as linhas representam as médias de 5 experimentos independentes.

Podemos sugerir com este grupo de resultados que a ouabaína, ao contrário do que poderia se esperar com os resultados da expressão de CD83 e secreção de IL-12 não inibiu a ativação das células dendríticas; porém teve uma ação moduladora sobre moléculas essenciais para a atividade destas células.

4.5 Resumo dos resultados

	IL-4+GM-CSF	+NaB (200 μ M)	+Oua (10^{-7} M)
Dendrítica imatura	CD14-	CD14-	CD14-
	CD1a+	CD1a↓	CD1a NA
	CD83 <i>low</i>	CD83 <i>low</i>	CD83↓
	CD80+	CD80 NA	CD80+
	CD86+	CD86+	CD86↑
	HLA-DR+	HLA-DR+	HLA-DR↑
Dendrítica ativada	CD14-	CD14-	CD14-
	CD1a NA	CD1a NA	CD1a NA
	CD83+	CD83↓	CD83↓
	CD80++	CD80 NA	CD80++
	CD86++	CD86++	CD86↑
	HLA-DR++	HLA-DR++	HLA-DR↑

NA – não foi avaliado. *Low* – baixa expressão.

	IL-4+GM-CSF	+NaB (200 μ M)	+Oua (10^{-7} M)
Dendrítica imatura	IL-1 β <i>low</i>	IL-1 β <i>low</i>	IL-1 β NA
Dendrítica ativada	TNF- α <i>low</i>	TNF- α NA	TNF- α <i>low</i>
	IL-12+	IL-12 NA	IL-12↓

NA – não foi avaliado. *Low* – baixa secreção.

5. Discussão

No presente trabalho nosso interesse foi estudar a diferenciação e a ativação de células dendríticas humanas. Para tal nós estabelecemos, *in vitro*, o processo de diferenciação a partir de monócitos circulantes e, em seguida o processo de ativação. Na primeira parte do trabalho foi possível reproduzir os dados dos primeiros estudos que descreveram o desenvolvimento dessas células em cultura (ROMANI e cols, 1994; SALLUSTO e LANZAVECCHIA, 1994), e, além disso, obter dados novos. Considerando a importância dos estados epigenéticos e da regulação hormonal no desenvolvimento das DCs buscamos avaliar, em um segundo momento, os efeitos do inibidor de acetilases de histonas, NaB, na maturação das DCs; e finalmente investigamos se o hormônio Ouabaína, o qual vem sendo estudado como um imunomodulador, poderia influenciar etapas do desenvolvimento destas células.

5.1 Diferenciação e ativação de células dendríticas

Nosso primeiro objetivo foi estabelecer os processos de diferenciação e ativação de células dendríticas *in vitro*.

Os monócitos liberados na circulação sanguínea a partir da medula óssea são células que não proliferam, e parte destas células deixa a circulação a cada 24h, portanto, estes monócitos têm sido apontados como precursores de diferenciação. Isto se referia, inicialmente, a diferenciação de monócitos em populações de macrófagos (HAMILTON, 2008).

Os monócitos têm sido considerados, mais recentemente, também como intermediários na diferenciação de células dendríticas (NAIK, 2008). Em humanos há dois subtipos principais de monócitos circulantes: CD14^{high}CD16⁻, o qual tem sido associado a inflamação, e CD14^{low}CD16⁺. Esta classificação se baseia, principalmente, nas diferenças de migração apresentadas pelos subtipos. O primeiro subtipo expressa os receptores de quimiocinas CCR2, CCR5 e CCR6, e através do sinal dos ligantes destes receptores os monócitos são recrutados para sítios periféricos inflamados como intestino, pulmão e epiderme (GEISSMANN e cols, 2003). Neste estudo, nós analisamos as células aderentes entre as células mononucleares, o que inclui ambas as subpopulações de monócitos (dados não mostrados). A população total de monócitos quando estimulada com IL-4 e GM-CSF foi capaz de se diferenciar em células dendríticas, o que está de acordo com a descrição de que tanto monócitos “inflamatórios” quanto monócitos “não-inflamatórios” têm o potencial de diferenciação em células dendríticas *in vitro* (NAIK, 2008).

Em nossos experimentos de diferenciação, quando estimulamos monócitos em cultura com IL-4 e GM-CSF, observamos que as células formavam colônias, e que estas colônias revelavam a proliferação celular, a qual tem sido atribuída a fatores de crescimento como o GM-CSF. O GM-CSF está presente em diversos sistemas de diferenciação de DCs *in vitro*, além dos que utilizam monócitos de sangue periférico como precursores. Esta citocina foi utilizada em estudos que usam células CD34⁺ da medula óssea e do sangue de cordão umbilical, e aqueles que usam a medula total (em camundongos) (INABA e cols, 1992; CAUX e cols, 1996). Assim, é provável que o GM-CSF tenha um papel importante no desenvolvimento de DCs *in vivo*. Em contrapartida,

os modelos *in vitro* de diferenciação de monócitos em macrófagos também utilizam o GM-CSF (HAMILTON, 2008). Assim nossa primeira observação, apesar de sugerir, não comprovava a diferenciação em células dendríticas. Incluímos no nosso estudo uma análise da morfologia celular e do fenótipo, e observamos que as células apresentavam morfologia característica de células dendríticas, além de um fenótipo compatível com a diferenciação, perda de expressão de CD14 com aparecimento concomitante de CD1a. Estes resultados remetem as descrições de Romani e colaboradores, que em 1994 concluíram que os monócitos estimulados com GM-CSF se diferenciam em macrófagos a menos que esta tendência seja inibida pela presença de IL-4 (ROMANI e cols, 1994). A importância da IL-4 *in vivo* no sistema de diferenciação de células dendríticas não foi comprovada. Atualmente, a função atribuída a esta citocina na diferenciação *in vitro* ainda é a inibição da diferenciação para macrófagos; porém, nos experimentos que mostram monócitos diferenciando em células dendríticas *in vivo* ocorre também a diferenciação para macrófagos, sugerindo que a diferenciação de monócitos em células dendríticas não seja acompanhada da inibição da diferenciação para macrófagos, e que os modelos *in vitro* sejam uma amplificação do processo (RANDOLPH e cols, 1999; GINHOUX e cols, 2006).

Uma hipótese sobre a diferenciação de monócitos é a de que um sinal de sobrevivência ou um estímulo de proliferação seria o suficiente para que monócitos utilizassem um programa interno e diferenciassem em macrófagos (KORN e cols, 1973). No nosso estudo nós estimulamos monócitos com GM-CSF e IL-4 nas primeiras 24h de cultura (total 5 dias), a fim de investigar se estes dois sinais em um tempo mais curto seriam o suficiente para desencadear a diferenciação em DCs. Porém, o que

observamos foi que nessa condição a diferenciação em DCs era parcial, as células perdiam menos CD14 e expressavam menos CD1a, sugerindo a necessidade da presença do estímulo para sustentar o processo de diferenciação, diferente do que deve ocorrer com os macrófagos.

Como mencionado anteriormente (ver 1.1.3) as células dendríticas imaturas têm grande capacidade de capturar antígenos, e com a ativação esta capacidade diminui. Com o intuito de analisar uma característica funcional de DCs imaturas, nós testamos a capacidade fagocítica das células diferenciadas e comparamos com os monócitos. Houve um aumento expressivo principalmente no percentual de células na cultura com a referida capacidade. Isto junto com a baixa expressão de CD83 destas células sugere que a geração de células relativamente imaturas foi o resultado das nossas culturas.

Por um longo período houve a dúvida se a ativação das DCs era um processo espontâneo ou induzido. Os sistemas de cultura é que permitiram essa resposta, pois as DCs se desenvolviam a partir de seus precursores com o estado de maturação controlado, e os potenciais ativadores eram adicionados separadamente às células ainda imaturas. A constatação de que a ativação das DCs é um processo induzido está de acordo com o conceito de “sinais de perigos”, no qual determinados sinais enviados pelo microambiente, por exemplo, em situações de injúria tecidual ou infecção, ativariam as DCs (MATZINGER, 1994). O LPS induz a produção de TNF- α , e tem sido observado que o anticorpo neutralizante anti TNF- α abole os efeitos do LPS, sugerindo que esses efeitos aconteçam a partir da atividade do TNF- α (MACPHERSON e cols, 1995). A ligação CD40-CD40L parece induzir a ativação de DCs por regular a expressão e atividade do TNF- α , já que esta citocina foi capaz de reverter as alterações

de ativação em camundongos deficientes de CD40L (MOODYCLIFFE e cols, 2000). Portanto, o TNF- α parece ser fundamental no processo de ativação de células dendríticas desde o seu início nos tecidos, quando as próprias DCs imaturas produzem essa citocina, até ser intensificado no encontro com os linfócitos.

Neste trabalho utilizamos o TNF- α como estímulo de ativação e demonstramos que células dendríticas imaturas, sob este estímulo, apresentam características morfológicas, fenotípicas e funcionais de células dendríticas ativadas. Estas células se apresentaram mais aderidas e espreiadas em cultura, passaram a expressar CD83, foram capazes de estimular a maior proliferação de linfócitos, quando comparado as células que não receberam o estímulo do TNF- α , e produziram IL-12. As DCs influenciam outras células do sistema imunológico, como os linfócitos B, macrófagos e células NK através da produção de diversas citocinas, o que dá as DCs o potencial de induzir e regular a resposta imunológica. A produção de IL-12 por estas células tem implicações substanciais, por exemplo, na ativação de células NK, na estimulação da produção de IFN- γ por macrófagos, e na indução da diferenciação de linfócitos T CD4⁺ para o tipo Th1 (BANCHEREAU e cols, 2000).

Esse sistema de cultura tem tornado factível a produção de conhecimento sobre o desenvolvimento das DCs e sobre a função destas células, além de ser uma fonte de células para a imunoterapia.

Nos últimos anos, a imunoterapia, cujo objetivo central é regular positivamente respostas de células T tumor-específicas, tem sido desenvolvida como uma alternativa ao tratamento convencional do câncer (ENGLEMAN, 2003). Uma das abordagens envolve a retirada de precursores de células dendríticas do indivíduo portador do tumor

ou de um indivíduo normal, manipulação dessas células *in vitro*, exposição a antígenos tumorais e a posterior administração destas células ao paciente. Com essa abordagem se espera que as células manipuladas sejam capazes de induzir uma resposta imune funcionando como “vacinas” anti-tumorais (Di NICOLA e cols, 2008).

No entanto, a relevância das células dendríticas geradas a partir de monócitos foi bastante questionada até a demonstração de sua ocorrência *in vivo*.

Em um estudo onde camundongos foram expostos a uma lesão na pele, com conseqüente perda das células de Langerhans, observou-se que monócitos previamente transferidos para estes animais migram para o local inflamado, proliferam e diferenciam em macrófagos na derme e em células de Langerhans na epiderme, o que levou os autores a sugerir que os monócitos circulantes são precursores de DCs na epiderme, *in vivo* (GINHOUX e cols, 2006).

Randolph e colaboradores abordaram esta questão utilizando um modelo de migração transendotelial. Neste modelo, monócitos humanos passavam por uma camada de células endoteliais humanas e chegavam a uma matriz de colágeno, mimetizando o movimento de células do sangue para os tecidos. A partir de então, os autores observaram que a maior parte dos monócitos se tornava macrófagos; porém, parte dos monócitos fazia o movimento reverso, como o movimento de migração da saída dos tecidos para os vasos linfáticos, e adquiriam características de células dendríticas (RANDOLPH e cols, 1998). Pouco tempo depois, pesquisadores do mesmo grupo injetaram microesferas fluorescentes em camundongos. Os monócitos logo fagocitavam as microesferas e parte deles se diferenciava em macrófagos no local; a outra parte era encontrada nos linfonodos drenantes onde as células apresentavam

características de DCs (RANDOLPH e cols, 1999). Considerando os resultados obtidos em ambos os estudos fica claro que monócitos se diferenciam em DCs *in vivo*. Contudo paira a dúvida fundamental do que levaria os monócitos para um caminho de diferenciação ou outro.

5.2 Efeitos do butirato de sódio nos processos de diferenciação e ativação de células dendríticas

Como dito anteriormente (ver 1.2), o processo de acetilação e desacetilação de histonas regula a transcrição gênica. E os inibidores das enzimas desacetilases, por induzirem a acetilação, podem modular a expressão gênica, levando a respostas biológicas como a diferenciação celular.

Presumindo que a diferenciação de monócitos em células dendríticas pudesse ser induzida ou modulada por agentes diferenciadores como os inibidores de desacetilases de histona, nós iniciamos esta parte do trabalho.

Quando os monócitos foram tratados com NaB na ausência do estímulo de IL-4 e GM-CSF, estas células não foram capazes de diferenciar em células dendríticas. Os monócitos tendem a se diferenciar em macrófagos, e a diferenciação em células dendríticas depende de um estímulo que inibe aquela diferenciação (ROMANI e cols, 1994). Portanto, mesmo que o NaB tivesse um efeito nos genes relacionados a diferenciação, isto dificilmente resultaria em uma diferenciação para células dendríticas na ausência de outro estímulo. Em um estudo em que se avaliou o potencial de diferenciação de blastos leucêmicos, verificou-se que o TSA, outro inibidor de HDACs

tinha um efeito potente de diferenciação destas células apenas quando era adicionado em combinação com outro agente diferenciador, o ácido retinóico, mas não por si só (KITAMURA e cols, 2000).

Portanto fomos investigar a presença do NaB durante a diferenciação estimulada por IL-4 e GM-CSF. Considerando que o estímulo das citocinas reprogramme as células e desvie a diferenciação para células dendríticas, a inibição das HDACs poderia levar a célula nessa direção, e potencializar os efeitos da citocinas. Porém, esta hipótese não foi confirmada, pois observamos que as células estimuladas a diferenciar na presença do NaB (em todas as concentrações) perdiam CD14 normalmente, o que é um sinal da diferenciação, e por outro lado expressavam pouco CD1a (NaB - 100 e 200 μ M).

O TSA em combinação com as citocinas GM-CSF, TNF- α e com o estímulo do CD40L, em linhagens de leucemia, aumenta a expressão de moléculas de superfície relacionadas à diferenciação de células dendríticas (MOLDENHAUER e cols, 2004). As diferenças entre os efeitos de inibidores de HDAC na diferenciação de células normais e de células tumorais ainda não foram esclarecidas; porém, é razoável concluir que as diferenças epigenéticas que são fundamentais entre células normais e células tumorais sejam um dos porquês de inibidores de HDCA terem efeitos de diferenciação em células tumorais, mas não em monócitos. É importante destacar que no estudo citado, o CD1a, que não era expresso nas linhagens estudadas, não foi induzido em nenhuma condição.

Como o NaB inibe a atividade de HDACs e induz a acetilação de histonas, o resultado da ação deste inibidor é o relaxamento da cromatina e o aumento da acessibilidade ao DNA, e o esperado é uma ativação da transcrição gênica (BI e JIANG,

2006). Sob esse aspecto a diminuição na expressão de CD1a observada em nossos estudos surpreende. Porém, já foi relatado em macrófagos que quando as HDACs estão inibidas diversos genes são suprimidos, sugerindo que a atividade destas enzimas possa ser importante para a expressão de determinados genes (BROGDON e cols, 2007). Muito embora a acetilação esteja frequentemente relacionada a ativação da transcrição, alguns eventos específicos de acetilação podem reprimir ao invés de estimular a expressão gênica. Foi demonstrado em *Drosófilas* que a acetilação da lisina 12 na histona H4 está correlacionada a uma forma condensada da cromatina (TURNER e cols, 1992). Além disto, as histonas não são os únicos alvos das HDACs e seus inibidores. Por exemplo, os fatores de transcrição STAT1, STAT3 e NF- κ B podem ser modulados através de acetilação e desacetilação direta, e essas proteínas são hiperacetiladas em resposta aos inibidores de HDACs (CHEN e cols, 2001; YUAN e cols, 2005). Isto pode explicar também os efeitos de inibidores de HDACs em células do sistema imunológico, nas quais a importância daqueles fatores de transcrição já está comprovada.

Wang e colaboradores descreveram que os monócitos estimulados a diferenciar em células dendríticas na presença de NaB perdem CD14 normalmente, mas com uma diminuição na expressão de CD1a (WANG e cols, 2008). Estes resultados são semelhantes ao que já havia sido descrito com outro inibidor de HDACs, MS-275, o qual também não altera a perda de CD14, que acontece durante a diferenciação de monócitos em células dendríticas, mas diminui a expressão de CD1a (NENCIONI e cols, 2007). Com base na expressão diminuída de CD1a, sem aprofundar os estudos

de diferenciação, estes autores concluíram que os inibidores de HDACs tinham um efeito de inibição da diferenciação.

Se isto fosse verdadeiro nós deveríamos observar alterações em outros aspectos da diferenciação sob influência do NaB. Porém, nós observamos que, mesmo na presença desse inibidor (200 μ M) durante a diferenciação, ocorre a proliferação celular, aquisição de morfologia típica de DCs, e diminuição na secreção de IL-1 β . A capacidade fagocítica das DCs diferenciadas sob influência do NaB foi comparável a das células diferenciadas na ausência do inibidor, sugerindo que uma função essencial da célula imatura foi mantida. Millard e seus colaboradores observaram o aumento da fagocitose, após o tratamento de DCs com o NaB, porém, a concentração utilizada nestes estudos foi bastante superior a utilizada por nós o que deve ser a causa das diferenças entre os resultados (MILLARD e cols, 2002).

As concentrações de NaB utilizadas neste estudo não afetaram a viabilidade das DCs, sugerindo que o efeito de modulação observado está desvinculado de uma citotoxicidade potencial. As concentrações que diminuíram a viabilidade de monócitos e das DCs foram aquelas acima de 800 μ M em 5 dias de tratamento (dados não mostrados).

Consistente com os achados de Bosisio e colaboradores, os quais mostraram que TSA e SAHA não afetam a diferenciação de DCs (BOSISIO e cols, 2008), nossos achados sugerem que os monócitos diferenciam em células dendríticas na presença de NaB, apesar dos baixos níveis de expressão de CD1a. Isto implica em uma dissociação da expressão de CD1a da diferenciação das células dendríticas.

Foi descrito um subtipo de célula dendrítica, diferenciado a partir de monócitos, que não expressa CD1a, denominado mDC2. Estas células são CD11c⁺ e se caracterizam pela secreção de IL-10 em altos níveis e por não produzirem IL-12 (CHANG e cols, 2000). Diversos autores, quando utilizaram o NaB e outros inibidores de HDACs como TSA, SAHA e MS-275, mostraram que as DCs deixavam de produzir IL-12 (SÄEMANN e cols, 2000; NENCIONI e cols, 2007; BOSISIO e cols, 2008). No nosso trabalho verificamos que características, outras além da produção de IL-12 foram modificadas pelo NaB. A adição deste inibidor no período de diferenciação ou durante a ativação levou a uma inibição parcial na expressão de CD83 induzida pelo estímulo de ativação do TNF- α . Semelhante a estes dados, são aqueles de Millard e colaboradores que relataram a diminuição da expressão de CD83 induzida por TNF- α em combinação com PGE₂ em DCs, sob influência do NaB (MILLARD e cols, 2002). Nossos dados também estão de acordo com a descrição de que o subtipo mDC2 expressa níveis baixos de CD83 após o estímulo do LPS e do IFN- γ (CHANG e cols, 2000). Nossos resultados sugerem então que o NaB ao invés de inibir a diferenciação, regula a expressão de CD1a e direciona a diferenciação para o subtipo mDC2.

Na concentração de 200 μ M o NaB parece regular a expressão de CD1a e de CD83. Considerando que ambas as proteínas são neoexpressas pelas células, e que moléculas como o CD11b, CD11c, CD86 e HLA-DR, que são mantidas ou moduladas durante a maturação, não foram afetadas pelo tratamento com NaB, podemos especular que o NaB seja capaz de alterar mecanismos de indução de expressão.

As proteínas da família CD1, entre as quais se inclui o CD1a, apresentam antígenos lipídicos a linfócitos T. A resposta de um clone definido de células T é

determinada pelo reconhecimento de complexos CD1-antígeno lipídico. Os compartimentos de ligação aos antígenos diferem entre as isoformas de CD1 (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d e CD1e) o que permite a ligação de lipídeos diferentes. Humanos expressam todas as isoformas de CD1 (CD1a-CD1e), enquanto murinos expressam apenas o CD1d, portanto a expressão de CD1a é uma característica de DCs humanas (BARRAL e BRENNER, 2007). Nestas células verificou-se que nenhuma das isoformas de CD1 é regulada positivamente com o estímulo de ativação do TNF- α , assim como ocorre com o MHC II (CAO e cols, 2002). Então, acredita-se que a apresentação via CD1 ocorre em um tempo diferente da apresentação via MHC, e talvez seja uma função das DCs imaturas.

A diminuição na expressão de CD1a após o tratamento com NaB observada em nosso estudo pode ter como impacto a diminuição na capacidade de apresentação de antígenos pelas DCs, não só os antígenos apresentados via CD1a mas também aqueles apresentados pelas moléculas CD1b e CD1d, já que outros autores mostraram a diminuição destas últimas pelo efeito do NaB (WANG e cols, 2008). No que se refere ao CD1a, esta hipótese está de acordo com os estudos de Hunger e colaboradores, que isolaram uma população de células T definida como CD4⁻CD8⁻CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺, co-cultivaram estas células com DCs na presença de antígenos de *Mycobacterium leprae*, o que induzia a proliferação das células T; porém, estes autores observaram que quando anticorpos neutralizantes para CD1a eram adicionados a estas culturas a proliferação era inibida (HUNGER e cols, 2004).

É provável que a expressão de CD1a possua implicações além daquela de apresentação de antígenos, e realmente classifique um subtipo de células dendríticas

como sugerido por Chang e colaboradores (CHANG e cols, 2000). Estas células afinal seriam capazes de apresentar pelas moléculas clássicas de MHC, mas, induzindo respostas outras e não a ativação de linfócitos Th1 (REIS e SOUSA, 2006).

5.3 Modulação da ativação de células dendríticas pelo hormônio Ouabaína

O processo de ativação de células dendríticas imaturas ocorre *in vivo* e depende do microambiente. Para essa ativação participam citocinas liberadas e presentes na proximidade dessas células, além de outras substâncias como hormônios.

Os efeitos da Ouabaína em células do sistema imunológico têm sido investigados, pelo nosso grupo e por outros grupos, no que tange a ativação celular, produção de citocinas, entre outros aspectos (ECHEVARRIA-LIMA e RUMJANEK, 2006). Neste contexto diversas células foram estudadas, todavia, não há dados sobre células dendríticas.

A primeira observação dos efeitos da Oua sobre a produção de citocinas por monócitos aconteceu em 1984, quando observou-se que estas células tratadas com Oua apresentavam um aumento de IL-1 β (DORNAND e cols, 1984). Mais tarde sugeriu-se que esse aumento fosse resultado de uma diminuição de K⁺ intracelular e aumento de atividade de caspases levando a uma elevação dos níveis desta citocina (PERREGAUX e cols, 1994; WALEV e cols, 1995; HUGHES e cols, 1997). No entanto, foi verificado por outros grupos que células mononucleares tratadas com Oua (10⁻⁷M) têm uma elevação na produção de IL-1 β e TNF- α e uma diminuição na produção de IL-6, porém este estudo não permitiu aos autores identificar qual era a contribuição de

monócitos ou linfócitos para esta produção (FOEY e cols, 1997). Em outro estudo utilizando monócitos tratados com Oua em uma concentração mais alta, 10^{-6} M, os autores verificaram uma elevação na secreção de IL-1 β , IL-1 α e IL-6 (MATSUMORI e cols, 1997).

Nós avaliamos a secreção de TNF- α em monócitos tratados com Oua (10^{-7} M) e também observamos um aumento nesta secreção. A Oua ainda na mesma concentração teve um efeito de diminuição da expressão de CD14 nos monócitos, sem o aparecimento concomitante de CD1a, o que sugere que a Oua é capaz de modular características fenotípicas e funcionais dos monócitos, sem os levar à diferenciação.

Monócitos depois de diferenciados em DCs apresentam uma resposta diferente a Oua. Estas células não modificam a secreção de TNF- α quando tratadas com Oua (10^{-7} M), e concentrações mais baixas de Oua (10^{-9} e 10^{-11} M) induzem um aumento na secreção de TNF- α .

A hipótese levantada por nós foi de que as concentrações de Oua, 10^{-9} e 10^{-11} M, pudessem induzir a ativação das DCs por estimularem a produção de TNF- α . Porém, a Oua nestas concentrações não aumentou a expressão de CD83, o que seria um sinal de ativação, e não foi capaz de modificar a expressão desta molécula induzida pela adição de TNF- α às culturas. A concentração de 10^{-7} M, por outro lado, inibiu parcialmente a expressão de CD83 induzida por ativação e diminuiu a secreção de IL-12 por estas células, o que representa outro sinal de ativação. Com relação a viabilidade das células, nós observamos que o tratamento com Oua, nas concentrações utilizadas neste estudo, não levava a alterações de viabilidade, o que sugere uma dissociação dos efeitos de inibição da expressão de CD83 e diminuição da secreção de

IL-12 da indução de morte celular. As concentrações de 10^{-9} e 10^{-11} M de Oua remetem a faixa de concentrações plasmáticas, enquanto a concentração de 10^{-7} M pode ser alcançada em determinadas condições, inclusive em situações de estresse (GOTO e cols, 1995; SCHONER e cols, 2003).

A ativação de células dendríticas, ao menos aquela induzida pelos estímulos do LPS e do TNF- α é dependente da ativação da cinase p38 (ARRIGHI e cols, 2001). Desta ativação depende, por exemplo, a produção de citocinas como a IL-12 (HÄCKER e cols, 1998). Dados recentes do nosso grupo mostraram que a Oua é capaz de aumentar ou diminuir a ativação da p38, dependendo do tipo celular considerado. A diminuição da fosforilação da p38 pela Oua foi demonstrada em um estudo no qual tímócitos eram ativados com o mitógeno Concanavalina A, e a fosforilação da p38 induzida pelo estímulo de ativação era diminuída pela presença de Oua (RODRIGUES-MASCARENHAS e cols, 2008). Em outro estudo mais recente verificou-se que a Oua é capaz de diminuir a fosforilação da p38 em monócitos (VALENTE e cols, *in press*).

Não realizamos uma análise da fosforilação da p38 em DCs tratadas com Oua. No entanto, tanto a Oua como o inibidor da p38 diminuíram a expressão de CD83. Estes resultados sugerem, indiretamente, a possibilidade de que os efeitos da Oua, ao menos no que se refere a expressão de CD83 e produção de IL-12, sejam dependentes de uma diminuição da atividade da p38.

A família da IL-12 é constituída de citocinas heterodiméricas, cujo seu protótipo, a citocina IL-12p70, é formado pelas subunidades IL-12p40 e IL-12p35. Além de associar-se com IL-12p35, a subunidade IL-12p40 pode formar dímeros com IL-12p19, dando origem a citocina IL-23 (WATFORD e cols, 2003). Nós analisamos neste estudo

a secreção de IL-12p40, portanto a diminuição desta, observada nos tratamentos com Oua, pode ter um impacto na produção de IL-12p70 e IL-23.

Embora a expressão de CD83 e a produção de IL-12 sejam definidas por diversos estudos como características de ativação das DCs, o contrário não é necessariamente verdadeiro (ZHOU e TEDDER, 1996). As DCs podem estar ativadas sem produzir IL-12 (BOSISIO e cols, 2008). Então a análise da expressão de outras moléculas relacionadas a ativação das DCs se fez necessária para responder se a Oua estava de fato inibindo o processo de ativação.

Durante a ativação estimulada pelo TNF- α ocorreu uma regulação positiva na expressão de HLA-DR e das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, como já era de se esperar. Na presença de Oua (10^{-7} M), observamos um aumento ainda maior na expressão de HLA-DR e CD86, sem modificações na expressão de CD80. Porém, esse aumento não parece depender dos efeitos do TNF- α , pois as células tratadas com Oua, na ausência do estímulo de ativação também apresentaram aquele aumento, sugerindo que a Oua foi capaz de modular as mesmas moléculas em células imaturas e células sob estímulo de ativação.

Esta parte dos resultados, em que CD86 e HLA-DR se encontram aumentados, não reafirma a hipótese de que os efeitos da Oua passem pela inibição da p38. Os estudos que adicionaram o inibidor da p38 durante a ativação das DCs mostraram uma diminuição na expressão de HLA-DR e CD86 nesta condição (ARRIGHI e cols, 2001). Então outra possibilidade que explicaria nossos resultados é a de que a Oua exercesse seus efeitos via inibição da p38 e por vias paralelas, ou ainda que seu efeito na atividade da p38 fosse reversível, diferente do efeito do inibidor farmacológico da p38,

e, portanto resultasse em uma inibição da atividade da p38, apenas inicial, seguida de um aumento compensatório desta atividade.

Existem indícios na literatura que a Oua ao se ligar a Na⁺,K⁺-ATPase, ativa a proteína Src, uma proteína que induz a transativação do receptor do EGF (XIE, 2003). Dessa maneira, buscamos avaliar se esta via estaria envolvida nos efeitos da Oua no nosso sistema. A adição de EGF (1 nM) às culturas de DCs, resultou em um aumento na expressão de CD83 induzida por TNF- α , o oposto do que foi verificado na presença de Oua. E o EGF, quando presente, não foi capaz de modificar os efeitos da Oua no que se refere a expressão de CD83. Para tentar avaliar se há interseção entre os sinais disparados pela Oua e aqueles disparados pelo EGF será necessário, posteriormente, avaliar a inibição do receptor de EGF neste contexto. Além disto, este estudo precisa incluir a expressão de HLA-DR e CD86.

Nesta tese nós mostramos pela primeira vez que o hormônio Ouabaína modula a expressão de moléculas que refletem o estado de maturação de células dendríticas. O envolvimento das moléculas CD80 e CD86 na diferenciação de linfócitos T CD4⁺ para os tipos Th1/Th2 não está clara. Porém alguns estudos mostram que o CD80 promove respostas do tipo Th1, enquanto o CD86 promove respostas do tipo Th2 (THOMPSON, 1995). O aumento da expressão de CD86, sem modificações na expressão de CD80, e a ausência do sinal 3 de ativação dado por citocinas como a IL-12 poderia criar nas células expostas a Oua um favorecimento a indução do tipo Th2 de linfócitos. Além disto, alguns estudos vêm quebrando o paradigma de que as DCs que induzem tolerância são imaturas, quando mostram que o fenótipo de uma DC imunogênica é semelhante aquele de uma DC tolerogênica. Por exemplo, as DCs capazes de induzir

tolerância expressam moléculas co-estimulatórias em altos níveis (REIS e SOUSA, 2006).

5.4 Considerações finais

Entre os conceitos, que surgem como uma tentativa de integrar as informações sobre a fisiologia das DCs, um bastante plástico diz o seguinte: células dendríticas maduras são aquelas que podem induzir diferentes tipos de respostas em linfócitos, dependendo da natureza do sinal de ativação, do comprometimento funcional imposto por sua origem ou dependendo dos moduladores presentes no microambiente (REIS e SOUSA, 2006).

Nesses últimos 30 anos a complexidade da biologia de células dendríticas aumentou enormemente. É possível admitir hoje que existam subtipos de DCs ou que DCs desempenhem papéis diferentes em seus vários estágios de desenvolvimento e ativação. A figura 44 ilustra as múltiplas funções resultantes do encontro da DC com os linfócitos T; no entanto, se desconhece quais as características da DC que está interagindo.

Nos nossos modelos foi possível produzir DCs com características que diferiram das DCs clássicas, isto é, daquelas que tendem a ativar células CD4⁺ e encaminhá-las para um perfil Th1. As células dendríticas obtidas na presença de NaB durante a diferenciação ou com Oua durante a ativação possuem características que, em outros modelos, levam à ativação de células CD4⁺ com um perfil Th2 (CHANG e cols, 2000; PENDSE e cols, 2006). Serão necessários mais experimentos para definir a capacidade

funcional dessas células, mas, as condições para gerar as células e para tais experimentos já foram estabelecidas por nós.

Nós partimos deste princípio para propor que o hormônio Ouabaína seja um fator presente no microambiente capaz de modular as células imaturas, e que o butirato de sódio esteja envolvido no comprometimento das células desde sua origem.

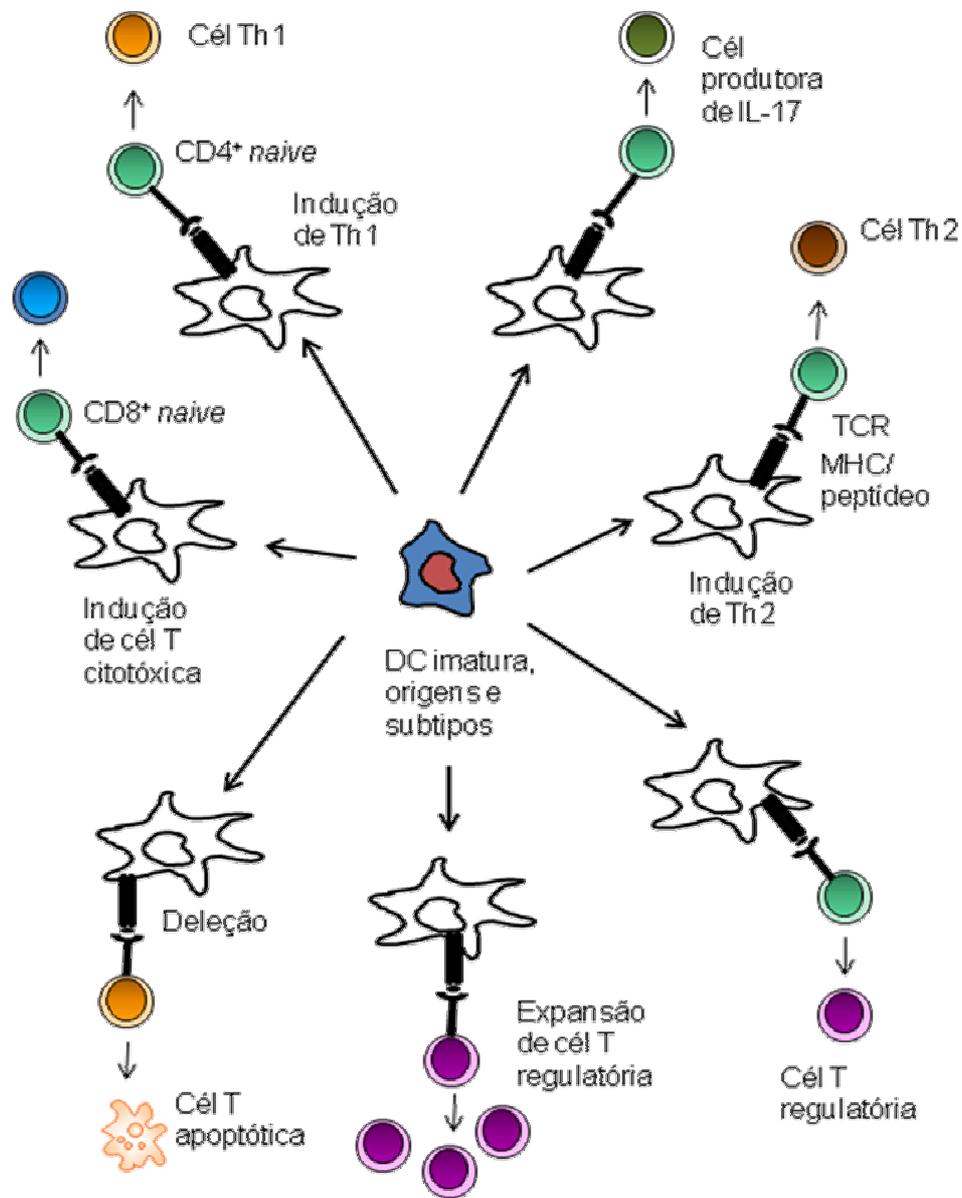


Figura 44. Desenho esquemático de células dendríticas e suas múltiplas funções (adaptado de REIS e SOUSA, 2006).

6. Conclusões

Vários estudos sugerem que as células dendríticas formam um grupo heterogêneo de células. Os diversos subtipos de células dendríticas vêm sendo bastante estudados, porém, as características de tais subtipos e principalmente os fatores que influenciam seu desenvolvimento ainda não estão claros. Neste trabalho conseguimos gerar células dendríticas humanas imaturas a partir de monócitos, em cultura com IL-4 e GM-CSF, e essas células foram ativadas pelo estímulo do TNF- α . Foi possível modular o perfil das células geradas através de duas estratégias: buscando modificar a diferenciação desde a sua origem, com o inibidor de desacetilases de histonas, NaB; ou em uma fase final da diferenciação (durante o processo de ativação) com o uso do hormônio Ouabaína. Então, um próximo passo importante será estudar a funcionalidade dessas células frente a linfócitos T.

7. Referências bibliográficas

ADAMS JC. Roles of fascin in cell adhesion and motility. **Curr. Opin. Cell Biol.** 16(5): 590-596, 2004.

ALIBERTI J, VIOLA JP, VIEIRA-DE-ABREU A, BOZZA PT, SHER A, SCHARFSTEIN J. Cutting edge: Bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells: a danger signal that drives Th1 polarization. **J. Immunol.** 170: 5349-5353, 2003.

ANTONIPILLAI I, SCHICK K, HORTON R. Ouabain is a potent inhibitor of aldosterone secretion and angiotensin action in the human adrenal. **J Clin Endocrinol Metab.** 81(6):2335-2337, 1996.

ARDESHNA KM, PIZZEY AR, DEVEREUX S, KHWAJA A. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. **Blood.** 96(3):1039-1046, 2000.

ARRIGHI JF, REBSAMEN M, ROUSSET F, KINDLER V, HAUSER C. A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. **J Immunol.** 166(6):3837-45, 2001.

BANCHEREAU J, BRIERE F, CAUX C, DAVOUST J, LEBECQUE S, LIU YJ, PULENDRAN B, PALUCKA K. Immunobiology of dendritic cells. **Annu Rev Immunol.** 18:767-811, 2000.

BANCHEREAU J, STEINMAN RM. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature.** 392(6673):245-252, 1998.

BARRAL DC, BRENNER MB. CD1 antigen presentation: how it works. **Nat Rev Immunol.** 7(12):929-941, 2007.

BASU S, BINDER RJ, RAMALINGAM T, SRIVASTAVA PK. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. **Immunity.** 14(3): 303-313, 2001.

BASU S, BINDER RJ, SUTO R, ANDERSON KM, SRIVASTAVA PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. **Int Immunol.** 12(11): 1539-1546, 2000.

BECKMAN EM, PORCELLI SA, MORITA CT, BEHAR SM, FURLONG ST, BRENNER MB. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. **Nature.** 372(6507):691-694, 1994.

BERNHARD D, AUSSERLECHNER MJ, TONKO M, LÖFFLER M, HARTMANN BL, CSORDAS A, KOFLER R. Apoptosis induced by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in human leukemic lymphoblasts. **FASEB J.** 13:1991-2001, 1999.

BERWIN B, HART JP, RICE S, GASS C, PIZZO SV, POST SR, NICCHITTA CV. Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells. **EMBO J.** 22(22): 6127-6136, 2003.

BEVAN MJ. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. **J Exp Med.** 143(5):1283-1288, 1976.

BI G, JIANG G. The Molecular Mechanism of HDAC Inhibitors in Anticancer Effects. **Cellular & Molecular Immunology.**; 3:285-290, 2006.

BLAUSTEIN MP. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca²⁺ stores and cell responsiveness. **Am. J. Physiol.** 264 (Cell Physiol. 33), C1367–C1387, 1993.

BOLDEN JE, PEART MJ, JOHNSTONE RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. **Nat Rev Drug Discov.** 5(9):769-784, 2006.

BOSISIO D, VULCANO M, DEL PRETE A, SIRONI M, SALVI V, SALOGNI L, RIBOLDI E, LEONI F, DINARELLO CA, GIROLOMONI G, SOZZANI S. Blocking TH17-polarizing cytokines by histone deacetylase inhibitors *in vitro* and *in vivo*. **J Leukoc Biol.** 84:1540-1548, 2008.

BROGDON JL, XU Y, SZABO SJ, AN S, BUXTON F, COHEN D, HUANG Q. Histone deacetylase activities are required for innate immune cell control of Th1 but not Th2 effector cell function. **Blood**. 109:1123-1130, 2007.

BROMLEY SK, BURACK WR, JOHNSON KG, SOMERSALO K, SIMS TN, SUMEN C, DAVIS MM, SHAW AS, ALLEN PM, DUSTIN ML. The immunological synapse. **Annu Rev Immunol**. 19:375-396, 2001.

CAO X, SUGITA M, Van Der WEL N, LAI J, ROGERS RA, PETERS PJ, BRENNER MB. CD1 molecules efficiently present antigen in immature dendritic cells and traffic independently of MHC class II during dendritic cell maturation. **J Immunol**. 169(9):4770-4777, 2002.

CARBONE FR, BELZ GT, HEATH WR. Transfer of antigen between migrating and lymph node-resident DCs in peripheral T-cell tolerance and immunity. **Trends Immunol**. 25(12):655-658, 2004.

CAUX C, VANBERVLIET B, MASSACRIER C, DEZUTTER-DAMBUYANT C, DE SAINT-VIS B, JACQUET C, YONEDA K, IMAMURA S, SCHMITT D, BANCHEREAU J. CD34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. **J Exp Med**. 184(2):695-706, 1996.

CEBON J, LAYTON JE, MAHER D, MORSTYN G. Endogenous haemopoietic growth factors in neutropenia and infection. **Br J Haematol**. 86(2):265-274, 1994.

CHANG CC, WRIGHT A, PUNNONEN J. Monocyte-derived CD1a⁺ and CD1a⁻ dendritic cell subsets differ in their cytokine production profiles, susceptibilities to transfection, and capacities to direct Th cell differentiation. **J Immunol**. 165:3584-3591, 2000.

CHEERS C, HAIGH AM, KELSO A, METCALF D, STANLEY ER, YOUNG AM. Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separate determinations of macrophage-, granulocyte-, granulocyte-macrophage-, and multi-CSFs. **Infect Immun**. 56(1):247-251, 1988.

CHEN LF, FISCHLE W, VERDIN E, GREENE WC. Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. **Science**. 293(5535):1653-1657, 2001.

CORCORAN L, FERRERO I, VREMEC D, LUCAS K, WAITHMAN J, O'KEEFFE M, WU L, WILSON A, SHORTMAN K. The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells. **J Immunol.** 170(10):4926-4932, 2003.

CUMBERBATCH M, DEARMAN RJ, KIMBER I. Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta for migration. **Immunology.** 92(3):388-395, 1997.

De REZENDE CORRÊA G, ARAÚJO DOS SANTOS A, FREDERICO LEITE FONTES C, GIESTAL De ARAÚJO E. Ouabain induces an increase of retinal ganglion cell survival in vitro: the involvement of protein kinase C. **Brain Res.** 1049(1):89-94, 2005.

DIEBOLD SS. Determination of T-cell fate by dendritic cells. **Immunol Cell Biol.** 86(5):389-397. 2008.

Di NICOLA M, ZAPPASODI R, CARLOSTELLA C, MORTARINI R, PUPA SM, MAGNI M, DEVIZZI L, MATTEUCCI P, BALDASSARI P, RAVAGNANI F, CABRAS A, ANICHINI A, GIANNI AM. Vaccination with autologous tumor-loaded dendritic cells induces clinical and immunological responses in indolent B cell lymphoma patients with relapsed and measurable disease: a pilot study. **Blood.** Prepublished online 2008.

DONG H, ZHU G, TAMADA K, CHEN L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. **Nat Med.** 5(12):1365-1369, 1999.

DORNAND J, FAVERO J, BONNAFOUS JC, MANI JC. Paradoxical production of mouse thymocyte activating factor by ouabain-treated human mononuclear cells. **Cell Immunol.** 83(2):351-359, 1984.

DREXHAGE HA, MULLINK H, DE GROOT J, CLARKE J, BALFOUR BM. A study of cells present in peripheral lymph of pigs with special reference to a type of cell resembling the Langerhans cell. **Cell Tissue Res.** 202(3):407-430, 1979.

DUSTIN ML, TSENG SY, VARMA R, CAMPI G. T cell-dendritic cell immunological synapses. *Curr Opin Immunol.* 18(4):512-6, 2006.

ECHEVARRIA-LIMA J, De ARAÚJO EG, DE MEIS L, RUMJANEK VM. Ca²⁺ mobilization induced by ouabain in thymocytes involves intracellular and extracellular Ca²⁺ pools. **Hypertension**. 41(6):1386-1392, 2003.

ECHEVARRIA-LIMA J, RUMJANEK VM. Effect of Ouabain on the Immune System. **Current Hypertension Reviews**., 2:83-95, 2006.

ENGLEMAN EG. Dendritic cell-based cancer immunotherapy. **Semin Oncol**. 30(3 Suppl 8): 23-29, 2003.

ESTEVEZ MB, MARQUES-SANTOS LF, AFFONSO-MITIDIERI OR, RUMJANEK VM. Ouabain exacerbates activation-induced cell death in human peripheral blood lymphocytes. **An Acad Bras Cienc**. 77(2):281-292, 2005.

FERRANDI M, MANUNTA P, BALZAN S, HAMLIN JM, BIANCHI G, FERRARI P. Ouabain-like factor quantification in mammalian tissues and plasma: comparison of two independent assays. **Hypertension**. 30(4):886-896, 1997.

FIGUEIREDO RT, FERNANDEZ PL, MOURAO-SA DS, PORTO BN, DUTRA FF, ALVES LS, OLIVEIRA MF, OLIVEIRA PL, GRAÇA-SOUZA AV, BOZZA MT. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. **J Biol Chem**. 282(28):20221-20229, 2007.

FISCHLE W, WANG Y, ALLIS CD. Histone and chromatin cross-talk. **Curr Opin Cell Biol**. 15(2):172-183, 2003.

FOEY AD, CRAWFORD A, HALL ND. Modulation of cytokine production by human mononuclear cells following impairment of Na, K-ATPase activity. **Biochim Biophys Acta**. 1355(1):43-49, 1997.

FÖRSTER R, DAVALOS-MISSLITZ AC, ROT A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. **Nat Rev Immunol**. 8(5):362-371, 2008.

FREUDENTHAL PS, STEINMAN RM. The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 87:7698-7702, 1990.

GABRILOVICH DI, CHENG P, FAN Y, YU B, NIKITINA E, SIROTKIN A, SHURIN M, OYAMA T, ADACHI Y, NADAF S, CARBONE DP, SKOULTCHI AI. H1(0) histone and differentiation of dendritic cells. A molecular target for tumor-derived factors. **J Leukoc Biol.** 72(2):285-296, 2002.

GEISSMANN F, JUNG S, LITTMAN DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity.** 19(1):71-82, 2003.

GINHOUX F, TACKE F, ANGELI V, BOGUNOVIC M, LOUBEAU M, DAI XM, STANLEY ER, RANDOLPH GJ, MERAD M. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. **Nat Immunol.** 7(3):265-273, 2006.

GLASER KB, LI J, STAVER MJ, WEI RQ, ALBERT DH, DAVIDSEN SK. Role of class I and class II histone deacetylases in carcinoma cells using siRNA. **Biochem Biophys Res Commun.** 310(2):529-536, 2003.

GOTO A, YAMADA K, NAGOSHI H, TERANO Y, OMATA M. Stress-induced elevation of ouabainlike compound in rat plasma and adrenal. **Hypertension.** 26(6 Pt 2):1173-1176, 1995.

GOTO A, YAMADA K, YAGI N, YOSHIOKA M, SUGIMOTO T. Physiology and pharmacology of endogenous digitalis-like factors. **Pharmacol Rev.** 44(3):377-399, 1992.

GOTTLIEB SS, ROGOWSKI AC, WEINBERG M, KRICHTEN CM, HAMILTON BP, HAMLIN JM. Elevated concentrations of endogenous ouabain in patients with congestive heart failure. **Circulation.** 86(2):420-425, 1992.

GREGORY CD. CD14-dependent clearance of apoptotic cells: relevance to the immune system. **Curr Opin Immunol.** 12(1):27-34, 2000.

GUERMONPREZ P, VALLADEAU J, ZITVOGEL L, THÉRY C, AMIGORENA S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annu Rev Immunol.** 20:621-667, 2002.

GU W, ROEDER RG. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. **Cell.** 90(4):595-606, 1997.

HÄCKER H, MISCHAK H, MIETHKE T, LIPTAY S, SCHMID R, SPARWASSER T, HEEG K, LIPFORD GB, WAGNER H. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. **EMBO J.** 17(21):6230-6240, 1998.

HAMILTON JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. **Nat Rev Immunol.** 8:533-544, 2008.

HAMLYN JM, BLAUSTEIN MP, BOVA S, DUCHARME DW, HARRIS DW, MANDEL F, MATHEWS WR, LUDENS JH. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 88(14):6259-6263, 1991.

HAMLYN JM, LU Z, MANUNTA P, LUDENS JH, KIMURA K, SHAH JR, LAREDO J, HAMILTON JP, HAMILTON MJ, HAMILTON BP. Observations on the nature, biosynthesis, secretion and significance of endogenous ouabain. **Clin. Exp. Hypertens.** 20:523–533, 1998.

HAMLYN JM, RINGEL R, SCHAEFFER J, LEVINSON PD, HAMILTON BP, KOWARSKI AA, BLAUSTEIN MP. A circulating inhibitor of (Na⁺ + K⁺)ATPase associated with essential hypertension. **Nature.** 300(5893):650-652, 1982.

HASEGAWA T, MASUGI F, OGIHARA T, HUMAHARA Y. Increase in plasma ouabainlike inhibitor of Na⁺,K⁺-ATPase with high sodium intake in patients with essential hypertension. **J. Clin. Hypertens.** 3:419–429, 1987.

HORI J, WANG M, MIYASHITA M, TANEMOTO K, TAKAHASHI H, TAKEMORI T, OKUMURA K, YAGITA H, AZUMA M. B7-H1-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege of corneal allografts. **J Immunol.** 177(9):5928-5935, 2006.

HUANG BH, LABAN M, LEUNG CH, LEE L, LEE CK, SALTO-TELLEZ M, RAJU GC, HOOI SC. Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. **Cell Death Differ.** 12(4):395-404, 2005.

HUGHES FM JR, BORTNER CD, PURDY GD, CIDLOWSKI JA. Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. **J Biol Chem.** 272(48):30567-30576, 1997.

HUNGER RE, SIELING PA, OCHOA MT, SUGAYA M, BURDICK AE, REA TH, BRENNAN PJ, BELISLE JT, BLAUVELT A, PORCELLI SA, MODLIN RL. Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. **J Clin Invest.** 113(5):701-708, 2004.

INABA K, INABA M, ROMANI N, AYA H, DEGUCHI M, IKEHARA S, MURAMATSU S, STEINMAN RM. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **J. Exp. Med.** 176:1693-1702, 1992.

INABA K, STEINMAN RM. Resting and sensitized T lymphocytes exhibit distinct stimulatory (antigen-presenting cell) requirements for growth and lymphokine release. **J Exp Med.** 160(6):1717-1735, 1984.

INSINGA A, PELICCI PG, INUCCI S. Leukemia-associated fusion proteins. Multiple mechanisms of action to drive cell transformation. **Cell Cycle.** 4(1):67-69, 2005.

ISHIKAWA F, NIRO H, IINO T, YOSHIDA S, SAITO N, ONOHARA S, MIYAMOTO T, MINAGAWA H, FUJII S, SHULTZ LD, HARADA M, AKASHI K. The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways. **Blood.** 110(10):3591-3660, 2007.

JENUWEIN T, ALLIS CD. Translating the histone code. **Science.** 293:1074-1080, 2001.

JORGENSEN PL, HAKANSSON KO, KARLISH SJ. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. **Annu Rev Physiol.** 65:817-849, 2003.

KARIN M. Mitogen-activated protein kinase cascades as regulators of stress responses. **Ann N Y Acad Sci.** 851:139-146, 1998.

KATZ M, AMIT I, YARDEN Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. **Biochim Biophys Acta.** 1773(8):1161-1176, 2007.

KAU MM, KAN SF, WANG JR, WANG PS. Inhibitory effects of digoxin and ouabain on aldosterone synthesis in human adrenocortical NCI-H295 cells. **J Cell Physiol.** 205(3):393-401, 2005.

KEIR ME, SHARPE AH. The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity. **Immunol Rev.** 204:128-143, 2005.

KELLY RH, BALFOUR BM, ARMSTRONG JA, GRIFFITHS S. Functional anatomy of lymph nodes. II. Peripheral lymph-borne mononuclear cells. **Anat Rec.** 190(1):5-21, 1978.

KITAMURA K, HOSHI S, KOIKE M, KIYOI H, SAITO H, NAOE T. Histone deacetylase inhibitor but not arsenic trioxide differentiates acute promyelocytic leukaemia cells with t(11;17) in combination with all-trans retinoic acid. **Br J Haematol.** 108:696-702, 2000.

KNIGHT SC, BALFOUR BM, O'BRIEN J, BUTTIFANT L, SUMERSKA T, CLARKE J. Role of veiled cells in lymphocyte activation. **Eur J Immunol.** 12(12):1057-1060, 1982.

KOMETIANI P, LI J, GNUDI L, KAHN BB, ASKARI A, XIE Z. Multiple signal transduction pathways link Na⁺/K⁺-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases. **J Biol Chem.** 273(24):15249-15256, 1998.

KORN AP, HENKELMAN RM, OTTENSMEYER FP, TILL JE. Investigations of a stochastic model of haemopoiesis. **Exp. Hematol.** 1:362-375, 1973.

KUPIEC-WEGLINSKI JW, AUSTYN JM, MORRIS PJ. Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Traffic from the blood, and T cell-dependent and -independent entry to lymphoid tissues. **J Exp Med.** 167(2):632-645, 1988.

KWON SH, AHN SH, KIM YK, BAE GU, YOON JW, HONG S, LEE HY, LEE YW, LEE HW, HAN JW. Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis and Fas/Fas ligand expression in human acute promyelocytic leukemia cells. **J Biol Chem.** 277(3):2073-2080, 2002.

LANDSMAN L, VAROL C, JUNG S. Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. **J Immunol.** 178(4):2000-2007, 2007.

LAOUAR Y, WELTE T, FU XY, FLAVELL RA. STAT3 is required for Flt3L-dependent dendritic cell differentiation. **Immunity.** 19(6):903-912, 2003.

LAREDO J, HAMILTON BP, HAMLYN JM. LAREDO J, HAMILTON BP, HAMLYN JM. Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells. **Endocrinology**. 135(2):794-797, 1994.

LARRE I, PONCE A, FIORENTINO R, SHOSHANI L, CONTRERAS RG, CEREIJIDO M. Contacts and cooperation between cells depend on the hormone ouabain. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 103(29):10911-10916, 2006.

LEONI F, ZALIANI A, BERTOLINI G, PORRO G, PAGANI P, POZZI P, DONÀ G, FOSSATI G, SOZZANI S, AZAM T, BUFLER P, FANTUZZI G, GONCHAROV I, KIM SH, POMERANTZ BJ, REZNIKOV LL, SIEGMUND B, DINARELLO CA, MASCAGNI P. The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines. **Proc Natl Acad Sci**. 99:2995-3000, 2002.

LEVERKUS M, MCLELLAN AD, HELDMANN M, EGGERT AO, BRÖCKER EB, KOCH N, KÄMPGEN E. MHC class II-mediated apoptosis in dendritic cells: a role for membrane-associated and mitochondrial signaling pathways. **Int Immunol**. 15(8):993-1006, 2003.

LINDQUIST RL, SHAKHAR G, DUDZIAK D, WARDEMANN H, EISENREICH T, DUSTIN ML, NUSSENZWEIG MC. Visualizing dendritic cell networks in vivo. **Nat Immunol**. 5(12):1243-1250, 2004.

LIPSCOMB, M.F., MASTEN, B.J. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. **Physiol Rev**. 82(1): 97-130, 2002.

LIU T, KULJACA S, TEE A, MARSHALL GM. Histone deacetylase inhibitors: multifunctional anticancer agents. **Cancer Treat Rev**. 32(3):157-165, 2006.

LOKSHIN AE, KALINSKI P, SASSI RR, MAILLIARD RB, MÜLLER-BERGHAUS J, STORKUS WJ, PENG X, MARRANGONI AM, EDWARDS RP, GORELIK E. Differential regulation of maturation and apoptosis of human monocyte-derived dendritic cells mediated by MHC class II. **Int Immunol**. 14(9):1027-1037, 2002.

LUDENS JH, CLARK MA, ROBINSON FG, DUCHARME DW. Rat adrenal cortex is a source of a circulating ouabainlike compound. **Hypertension**. 19(6 Pt 2):721-724, 1992.

MACPHERSON GG, JENKINS CD, STEIN MJ, EDWARDS C. Endotoxin-mediated dendritic cell release from the intestine. Characterization of released dendritic cells and TNF dependence. **J Immunol.** 154(3):1317-1322, 1995.

MARASKOVSKY E, BRASEL K, TEEPE M, ROUX ER, LYMAN SD, SHORTMAN K, MCKENNA HJ. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. **J Exp Med.** 184(5):1953-1962, 1996.

MARASKOVSKY E, DARO E, ROUX E, TEEPE M, MALISZEWSKI CR, HOEK J, CARON D, LEBSACK ME, MCKENNA HJ. In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. **Blood.** 96(3):878-884, 2000.

MARSLAND BJ, BÄTTIG P, BAUER M, RUEDL C, LÄSSING U, BEERLI RR, DIETMEIER K, IVANOVA L, PFISTER T, VOGT L, NAKANO H, NEMBRINI C, SAUDAN P, KOPF M, BACHMANN MF. CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells. **Immunity.** 22(4):493-505, 2005.

MATSUMORI A, ONO K, NISHIO R, IGATA H, SHIOI T, MATSUI S, FURUKAWA Y, IWASAKI A, NOSE Y, SASAYAMA S. Modulation of cytokine production and protection against lethal endotoxemia by the cardiac glycoside ouabain. **Circulation.** 96(5):1501-1506, 1997.

MATZINGER P. Tolerance, danger, and the extended family. **Annu Rev Immunol.** 12:991-1045, 1994.

MCKENNA HJ, STOCKING KL, MILLER RE, BRASEL K, DE SMEDT T, MARASKOVSKY E, MALISZEWSKI CR, LYNCH DH, SMITH J, PULENDRAN B, ROUX ER, TEEPE M, LYMAN SD, PESCHON JJ. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. **Blood.** 95(11):3489-3497, 2000.

MILLARD AL, MERTES PM, ITTELET D, VILLARD F, JEANNESSON P, BERNARD J. Butyrate affects differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages. **Clin Exp Immunol.** 130:245-255, 2002.

MOBASHERI A, AVILA J, CÓZAR-CASTELLANO I, BROWNLEADER MD, TREVAN M, FRANCIS MJ, LAMB JF, MARTÍN-VASALLO P. Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. **Biosci Rep.** 20(2):51-91, 2000.

MOLDENHAUER A, FRANK RC, PINILLA-IBARZ J, HOLLAND G, BOCCUNI P, SCHEINBERG DA, SALAMA A, SEEGER K, MOORE MA, NIMER SD. Histone deacetylase inhibition improves dendritic cell differentiation of leukemic blasts with AML1-containing fusion proteins. **J Leukoc Biol.** 76:623-33, 2004.

MONU N, TROMBETTA ES. Cross-talk between the endocytic pathway and the endoplasmic reticulum in cross-presentation by MHC class I molecules. **Curr Opin Immunol.** 19(1):66-72, 2007.

MOODYCLIFFE AM, SHREEDHAR V, ULLRICH SE, WALTERSCHEID J, BUCANA C, KRIPKE ML, FLORES-ROMO L. CD40-CD40 ligand interactions in vivo regulate migration of antigen-bearing dendritic cells from the skin to draining lymph nodes. **J Exp Med.** 191(11):2011-20, 2000.

MOREIRA FF, MENDONÇA CBF, PEREIRA JF, GONÇALVES-ESTEVEES C. Palinotaxonomia de espécies de Apocynaceae ocorrentes na Restinga de Carapebus, Carapebus, RJ, Brasil. **Acta bot Brás.** 18(4):711-721, 2004.

MORI L, De LIBERO G. Presentation of lipid antigens to T cells. **Immunol Lett.** 117(1):1-8, 2008.

NAIK SH. Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. **Immunol Cell Biol.** 86(5):439-452, 2008.

NEBBIOSO A, CLARKE N, VOLTZ E, GERMAIN E, AMBROSINO C, BONTEMPO P, ALVAREZ R, SCHIAVONE EM, FERRARA F, BRESCIANI F, WEISZ A, DE LERA AR, GRONEMEYER H, ALTUCCI L. Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. **Nat Med.** 11(1):77-84, 2005.

NENCIONI A, BECK J, WERTH D, GRÜNEBACH F, PATRONE F, BALLESTRERO A, BROSSART P. Histone deacetylase inhibitors affect dendritic cell differentiation and immunogenicity. **Clin Cancer Res.** 13:3933-3941, 2007.

O'KEEFFE M, HOCHREIN H, VREMEC D, CAMINSCHI I, MILLER JL, ANDERS EM, WU L, LAHOUD MH, HENRI S, SCOTT B, HERTZOG P, TATARCZUCH L, SHORTMAN K. Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus. **J Exp Med.** 196(10):1307-1319, 2002.

OLEJ B, DOS SANTOS NF, LEAL L, RUMJANEK VM. Ouabain induces apoptosis on PHA-activated lymphocytes. **Biosci Rep.** 18(1):1-7, 1998.

PENDSE SS, BEHJATI S, SCHATTON T, IZAWA A, SAYEGH MH, FRANK MH. P-glycoprotein functions as a differentiation switch in antigen presenting cell maturation. **Am J Transplant.** 6(12):2884-2893, 2006.

PERREGAUX D, GABEL CA. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. **J Biol Chem.** 269(21):15195-15203, 1994.

PRASAD DV, RICHARDS S, MAI XM, DONG C. B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation. **Immunity.** 18(6):863-873, 2003.

QUASTEL MR, KAPLAN JG. Inhibition by ouabain of human lymphocyte transformation induced by phytohaemagglutinin in vitro. **Nature.** 219(5150):198-200, 1968.

RANDOLPH GJ. Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. **Semin Immunol.** 13(5):267-274, 2001.

RANDOLPH GJ, BEAULIEU S, LEBECQUE S, STEINMAN RM, MULLER WA. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. **Science.** 282(5388):424-425, 1998.

RANDOLPH GJ, INABA K, ROBBIANI DF, STEINMAN RM, MULLER WA. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. **Immunity.** 11(6):753-761, 1999.

REIS e SOUSA C. Dendritic cells in a mature age. **Nature Rev.** 6:476-483, 2006.

RODRIGUES-MASCARENHAS S, BLOISE FF, MOSCAT J, RUMJANEK VM. Ouabain inhibits p38 activation in thymocytes. **Cell Biol Int.** 32(10):1323-1328, 2008.

RODRIGUES-MASCARENHAS S, De OLIVEIRA AS, AMOEDO ND, AFFONSO-MITIDIERI OR, RUMJANEK FD, RUMJANEK VM. Modulation of the Immune System by Ouabain. **Neuroimmunomodulation: Ann. N. Y. Acad. Sci.** xxxx:1-11, 2009.

RODRIGUES-MASCARENHAS S, DOS SANTOS NF, RUMJANEK VM. Synergistic effect between ouabain and glucocorticoids for the induction of thymic atrophy. **Biosci Rep.** 26(2):159-169, 2006.

RODRIGUES MASCARENHAS S, ECHEVARRIA-LIMA J, FERNANDES DOS SANTOS N, RUMJANEK VM. CD69 expression induced by thapsigargin, phorbol ester and ouabain on thymocytes is dependent on external Ca²⁺ entry. **Life Sci.** 73(8):1037-1051, 2003.

ROMANI N, GRUNER S, BRANG D, KAMPGEN E, LENZ A, TROCKENBACHER B, KONWALINKA G, FRITSCH PO, STEINMAN RM, SCHULER G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. **J Exp Med.** 180:83-93, 1994.

SÄEMANN MD, BÖHMIG GA, OSTERREICHER CH, BURTSCHER H, PAROLINI O, DIAKOS C, STÖCKL J, HÖRL WH, ZLABINGER GJ. Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. **FASEB J.** 14:2380-2382, 2000.

SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. **J Exp Med.** 179(4):1109-1118, 1994.

SALLUSTO F, PALERMO B, LENIG D, MIETTINEN M, MATIKAINEN S, JULKUNEN I, FORSTER R, BURGSTAHLER R, LIPP M, LANZAVECCHIA A. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. **Eur J Immunol.** 29(5):1617-1625, 1999.

SAUNDERS R, SCHEINER-BOBIS G. Ouabain stimulates endothelin release and expression in human endothelial cells without inhibiting the sodium pump. **Eur J Biochem.** 271(5):1054-1062, 2004.

SCHEINER-BOBIS G, SCHONER W. A fresh facet for ouabain action. **Nat Med.** 7(12):1288-1289, 2001.

SCHNURR M, THEN F, GALAMBOS P, SCHOLZ C, SIEGMUND B, ENDRES S, EIGLER A. Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. **J. Immunol.** 165: 4704-4709, 2000.

SCHONER W. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. **Eur J Biochem.** 269(10):2440-2448, 2002.

SCHONER W, BAUER N, MÜLLER-EHMSEN J, KRÄMER U, HAMBARCHIAN N, SCHWINGER R, MOELLER H, KOST H, WEITKAMP C, SCHWEITZER T, KIRCH U, NEU H, GRÜNBAUM EG. Ouabain as a mammalian hormone. **Ann N Y Acad Sci.** 986:678-684, 2003.

SERRADOR JM, CABRERO JR, SANCHO D, MITTELBRUNN M, URZAINQUI A, SÁNCHEZ-MADRID F. HDAC6 deacetylase activity links the tubulin cytoskeleton with immune synapse organization. **Immunity.** 20(4):417-428, 2004.

SHORTMAN K, NAIK SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. **Nat Rev Immunol.** 7:19-30, 2007.

SPIVAK JL, MISITI J, STUART R, SHARKIS SJ, SENSENBRENNER LL. Suppression and potentiation of mouse hematopoietic progenitor cell proliferation by ouabain. **Blood.** 56(2):315-317, 1980.

STEINMAN RM. Dendritic cells: understanding immunogenicity. **Eur J Immunol.** Suppl 1:S53-60, 2007.

STEINMAN R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annu Rev Immunol.** 9:271-296, 1991.

STEINMAN RM, COHN ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. **J Exp Med.** 139(2):380-397, 1974.

STEINMAN RM, COHN ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. MORPHOLOGY, QUANTITATION, TISSUE DISTRIBUTION. **J Exp Med.** 137(2):1142-1162, 1973.

SUTHEESOPHON K, NISHIMURA N, KOBAYASHI Y, FURUKAWA Y, KAWANO M, ITOH K, KANO Y, ISHII H, FURUKAWA Y. Involvement of the tumor necrosis factor (TNF)/TNF receptor system in leukemic cell apoptosis induced by histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228). **J Cell Physiol.** 203(2):387-397, 2005.

SZAMEL M, LEUFGEN H, KURRLE R, RESCH K. Differential signal transduction pathways regulating interleukin-2 synthesis and interleukin-2 receptor expression in stimulated human lymphocytes. **Biochim Biophys Acta.** 1235(1):33-42, 1995.

TANG A, AMAGAI M, GRANGER LG, STANLEY JR, UDEY MC. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. **Nature.** 361:82–85, 1993.

TAPPING RI, TOBIAS PS. Cellular binding of soluble CD14 requires lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein. **J Biol Chem.** 272(37):23157-23164, 1997.

THOMPSON CB. Distinct roles for the costimulatory ligands B7-1 and B7-2 in T helper cell differentiation?. **Cell.** 81(7):979-982, 1995.

TURNER BM, BIRLEY AJ, LAVENDER J. Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. **Cell.** 69(2):375-384, 1992.

UDONO H, SRIVASTAVA PK. Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. **J Exp Med.** 178(4):1391-1396, 1993.

VAKKURI O, ARNASON SS, POUTA A, VUOLTEENAHO O, LEPPÄLUOTO J. Radioimmunoassay of plasma ouabain in healthy and pregnant individuals. **J Endocrinol.** 165(3):669-677, 2000.

VALENTE RC. Estudo da ação do hormônio ouabaína em linhagens celulares renais e em monócitos humanos. 2008. (Doutorado em Química Biológica). Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, Rio de Janeiro, 2008.

VALENTE RC, NASCIMENTO CR, ARAUJO EG, RUMJANEK VM. mCD14 expression in human monocytes is downregulated by ouabain via transactivation of EGFR and activation of p38 MAPK. **Neuroimmunomodulation: in press**, 2009.

Van VOORHIS WC, HAIR LS, STEINMAN RM, KAPLAN G. Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood. **J Exp Med.** 155(4):1172-1187, 1982.

VAROL C, LANDSMAN L, FOGG DK, GREENSHTein L, GILDOR B, MARGALIT R, KALCHENKO V, GEISSMANN F, JUNG S. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. **J Exp Med.** 204(1):171-180, 2007.

VILLAGRA A, CHENG F, WANG HW, SUAREZ I, GLOZAK M, MAURIN M, NGUYEN D, WRIGHT KL, ATADJA PW, BHALLA K, PINILLA-IBARZ J, SETO E, SOTOMAYOR EM. The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance. **Nat Immunol.** 10(1):92-100, 2009.

VREMEC D, LIESCHKE GJ, DUNN AR, ROBB L, METCALF D, SHORTMAN K. The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs. **Eur J Immunol.** 27(1):40-44, 1997.

WALEV I, RESKE K, PALMER M, VALEVA A, BHAKDI S. Potassium-inhibited processing of IL-1 beta in human monocytes. **EMBO J.** 14(8):1607-1614, 1995.

WANG B, MORINOBU A, HORIUCHI M, LIU J, KUMAGAI S. Butyrate inhibits functional differentiation of human monocyte-derived dendritic cells. **Cell Immunol.** 253:54-58, 2008.

WATFORD WT, MORIGUCHI M, MORINOBU A, O'SHEA JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. **Cytokine Growth Factor Rev.** 14(5):361-368, 2003.

WILSON AJ, BYUN DS, POPOVA N, MURRAY LB, L'ITALIEN K, SOWA Y, ARANGO D, VELCICH A, AUGENLICHT LH, MARIADASON JM. Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. **J Biol Chem.** 281(19):13548-13558, 2006.

WILSON NS, EL-SUKKARI D, BELZ GT, SMITH CM, STEPTOE RJ, HEATH WR, SHORTMAN K, VILLADANGOS JA. Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. **Blood.** 102(6):2187-2194, 2003.

XIAO AY, WANG XQ, YANG A, YU SP. Slight impairment of Na⁺,K⁺-ATPase synergistically aggravates ceramide- and beta-amyloid-induced apoptosis in cortical neurons. **Brain Res.** 955(1-2):253-259, 2002.

XIE Z. Molecular mechanisms of Na/K-ATPase-mediated signal transduction. **Ann N Y Acad Sci.** 986:497-503, 2003.

YUAN ZL, GUAN YJ, CHATTERJEE D, CHIN YE. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. **Science.** 307(5707):217-218, 2005.

ZANG X, LOKE P, KIM J, MURPHY K, WAITZ R, ALLISON JP. B7x: a widely expressed B7 family member that inhibits T cell activation. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 100(18):10388-10392, 2003.

ZHANG Y, KWON S, YAMAGUCHI T, CUBIZOLLES F, ROUSSEAU S, KNEISSEL M, CAO C, LI N, CHENG HL, CHUA K, LOMBARD D, MIZERACKI A, MATTHIAS G, ALT FW, KHOCHBIN S, MATTHIAS P. Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. **Mol Cell Biol.** 28(5):1688-1701, 2008.

ZHANG Z, YAMASHITA H, TOYAMA T, SUGIURA H, ANDO Y, MITA K, HAMAGUCHI M, HARA Y, KOBAYASHI S, IWASE H. Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast*. **Breast Cancer Res Treat.** 94(1):11-16, 2005.

ZHOU LJ, TEDDER TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. **J Immunol.** 154(8):3821-3835, 1995.

ZHOU LJ, TEDDER TF. CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 93:2588-2592, 1996.

ZHU P, MARTIN E, MENGWASSER J, SCHLAG P, JANSSEN KP, GÖTTLICHER M. Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. **Cancer Cell.** 5(5):455-463, 2004.

ZOU W, CHEN L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. **Nat Rev Immunol.** 8(6):467-477, 2008.

8. Anexos

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](#)