SIMONE RODRIGUES CAMPELO

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

Belém

2008

SIMONE RODRIGUES CAMPELO

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Belém
2008

Dados Internacionais da Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca de Pós-Graduação do ICB-UFPA – Belém (PA)

Simone Rodrigues Campelo

Modulação imunológica *in vitro* de células de Langerhans e macrófagos por drogas utilizadas no manejo de reações hansênicas / Simone Rodrigues Campelo; orientador, Claudio Guedes Salgado. – 2008.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2008.

1. Drogas – Efeito fisiológico. 2. Células de Langerhans. 3. Macrófagos. 4. Citocinas. 5. Sistema imunológico. 6. Hanseníase - Tratamento. I. Título.

CDD – 22. ed. 615.704

SIMONE RODRIGUES CAMPELO

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Data de aprovação: 03/04/2008

Banca examinadora:

Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado – Orientador
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Prof. Dr. Norma Tiraboschi Foss
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Prof. Dr. José Augusto da Costa Nery
Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ

Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

A todos que estiveram próximos e que contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

As células de Langerhans (CLs) estão localizadas na epiderme e desempenham um papel chave na indução da resposta imune e da tolerância imunológica. Os macrófagos são células fagocíticas que atuam como primeira linha de defesa do organismo, e que estão envolvidos na formação de granulomas em pacientes com hanseníase. A imunopatogenia da resposta celular nos estados reacionais ainda é pouco estudada, porém, diversas evidências sugerem que as drogas prednisona, talidomida, ciclosporina e amitriptilina, utilizadas no controle das reações hansênicas, exercem seus efeitos pela modulação das funções de diferentes células imunocompetentes. O objetivo do presente estudo foi analisar a ação *in vitro* das drogas prednisona, talidomida, ciclosporina e amitriptilina sobre a produção de citocinas por CLs e macrófagos de camundongos BALB/c. As CLs foram isoladas, purificadas e cultivadas a partir da epiderme pela técnica de “panning” e os macrófagos foram isolados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c. Após 36 h de tratamento com as drogas, os níveis de TNF-α, IL-12 e IL-10 foram medidos por ELISA. Prednisona, talidomida, ciclosporina e amitriptilina inibiram os níveis de TNF-α produzidos pelas CLs, em ambas as concentrações, no entanto, não foi detectada alteração significativa na produção de IL-12. A produção de TNF-α e de IL-12 por macrófagos peritoneais também foi diminuída após o tratamento, porém os níveis de IL-10 não foram modificados por nenhuma das drogas testadas. Nossos resultados mostram que estas drogas podem modular a resposta imune através da regulação das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-12 por CLs purificadas da epiderme e por macrófagos peritoneais, indicando que as citocinas constituem importante alvo de drogas usadas no tratamento dos estados reacionais.

Palavras-chave: drogas imunossupressoras, células de Langerhans, macrófagos peritoneais, citocinas.

ABSTRACT

Langerhans cells (LCs) are localized in the epidermis and performs a key role in the induction of immune response and immunologic tolerance. Macrophages are phagocytic cells that act as first line of defense of the organism, and they are involved in the granuloma formation in patients with leprosy. The immunopathogeny of the cellular response in the reactional states is yet little studied, however, several evidences suggest that the drugs prednisone, thalidomide, cyclosporine and amitriptyline, used in the control of leprosy reactions, perform their effects by the modulation of different immunocompetent cells functions. The objective of the present study was to analyze *in vitro* action of prednisone, thalidomide, cyclosporine and amitriptyline on the cytokine production by LCs and macrophages of BALB/c mice. LCs were isolated, purified and cultivated from the epidermis by the panning technique and macrophages were isolated by the peritoneal cavity of BALB/c mice. After 36 h of treatment with the drugs, the levels of TNF-α, IL-12 and IL-10 were measured by ELISA. Prednisone, thalidomide, cyclosporine and amitriptyline inhibited TNF-α produced by LCs, in both concentrations, however no important alterations in IL-12 production were detected. TNF-α and IL-12 production by macrophages was also decreased after treatment, but IL-10 levels were not modified for none of the drugs tested. Our results show that these drugs can modulate the immune response by the regulation of pro-inflammatory cytokines TNF-α and IL-12 by purified epidermal LCs and peritoneal macrophages, indicating that they constitute an important target for the drugs used in treatment of leprosy reactional states.

Key-word: immunosuppressive drugs, Langerhans cells, peritoneal macrophages, cytokines.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Viabilidade das CLs após tratamento com as drogas imunomoduladoras. p.31

Tabela 2 - Efeitos das drogas imunomoduladoras na produção de TNF-α e IL-12 por CLs. p.33

Tabela 3 - Viabilidade dos macrófagos peritoniais após tratamento com as drogas imunomoduladoras. p.34

Tabela 4 - Efeitos das drogas imunomoduladoras na produção de TNF-α, IL-12 e IL-10 por macrófagos peritoniais. p.35

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Célula Apresentadora de Antígeno
CDs	Células Dendríticas
CLs	Células de Langerhans
DD	Hanseníase Dimorfa-Dimorfa
DT	Hanseníase Dimorfa-Tuberculóide
DV	Hanseníase Dimorfa-Virchowiana
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IP	Iodeto de Propídeo
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
NO	Óxido Nítrico
PQT	Poliquimioterapia
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-α
TT	Hanseníase Tuberculóide
VV	Hanseníase Virchowiana

SUMÁRIO

RESUMO v
ABSTRACT vi
LISTA DE TABELAS vii
LISTA DE ABREVIATURAS viii
1. INTRODUÇÃO 11
1.1. HANSENÍASE 11
1.2. REAÇÕES HANSÊNICAS 13
1.3. DROGAS IMUNOMODULADORAS 15
1.4. SISTEMA IMUNOLÓGICO 18
1.5. MACRÓFAGOS 20
1.6. CÉLULAS DENDRÍTICAS 22
1.7. CÉLULAS DE LANGERHANS 24
2. OBJETIVOS 27
2.1. OBJETIVO GERAL 27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 27
3. METODOLOGIA 28
3.1. REAGENTES 28
3.2. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO 28
3.3. ISOLAMENTO DAS CÉLULAS DE LANGERHANS 28
3.4. ISOLAMENTO DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS 29
3.5. TRATAMENTO COM AS DROGAS IMUNOMODULADORAS 29
3.6. VIABILIDADE CELULAR 30
3.7. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS 30
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA 31
4. RESULTADOS 32
4.1. VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE LANGERHANS 32
4.2. EFEITOS DAS DROGAS IMUNOMODULADORAS NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR CÉLULAS DE LANGERHANS 33
4.3. VIABILIDADE DOS MACRÓFAGOS PERITONIAIS 34

4.4.EFEITOS DAS DROGAS IMUNOMODULADORAS NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS PERITONIAIS 35

5. DISCUSSÃO 37
6. CONCLUSÕES 43
7. REFERÊNCIAS 44
8. ARTIGO PUBLICADO 56

1. INTRODUÇÃO

1.1. HANSENÍASE

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa crônica, causada pelo bacilo álcool-ácido resistente *Mycobacterium leprae*, uma bactéria intracelular obrigatória ainda não-cultivável em meios artificiais. Este organismo tem a capacidade de invadir os nervos periféricos, onde infecta e cresce dentro das células de Schwann, e este tropismo contribui para a patologia da doença (BRITTON & LOCKWOOD, 2004). A hanseníase constitui importante problema de saúde pública no Brasil e em vários países do mundo, e é a principal causa de incapacidade física permanente dentre as doenças infecto-contagiosas (AGRAWAL *et al.*, 2005;MOSCHELLA, 2004). O Brasil ocupa o segundo lugar em número absoluto de casos novos de hanseníase no mundo – perdendo apenas para a índia –, sendo que a região norte apresenta os mais elevados coeficientes de prevalência e detecção (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

Dentre as classificações, a mais utilizada em saúde pública é a classificação de Madri, que agrupa como formas paucibacilares as formas Indeterminada e Tuberculóide; e como multibacilares, as formas Dimorfa e Virchowiana. No entanto, a hanseníase não é estável em sua forma clínica, o que levou Ridley e Jopling a propor uma classificação com um sistema de cinco grupos que expressavam a imunidade dos pacientes em hanseníase Tuberculóide (TT) Dimorfo-Tuberculóide (DT), Dimorfo-Dimorfo (DD), Dimorfo-Virchowiano (DV) e Virchowiano (VV) (HASTINGS & CONVIT, 1989; (BRITTON & LOCKWOOD, 2004).

O pólo tuberculóide caracteriza-se pela resposta do tipo Th1 contra o bacilo, com manifestações relacionadas à exacerbação da resposta imune celular e, o pólo Virchowiano, por deficiência da resposta imune celular, com numerosas lesões na pele, e por imunidade humoral que exibe altos títulos de anticorpos contra

glicolipídeo fenólico-1 (PGL-1) (MOSCHELLA, 2004). PGL-1 e outras estruturas lipídicas da parede celular podem estar relacionadas no contexto de resistência à eliminação por macrófagos e atividade imunomoduladora. Além disso, outros estudos adicionaram evidencias de que PGL-1 pode estar envolvido na determinação da afinidade do *M. Leprae* pelos nervos periféricos (RAMBUKKANA, 2001).

O mecanismo preciso de transmissão do *M. leprae* é ainda desconhecido (SCOLLARD *et al.*, 2006), no entanto, alguns estudos indicam as vias aéreas superiores (VAN BEERS *et al.*, 1996) e a pele (GIRDHAR, 2005) como importantes rotas de transmissão da doença, principalmente através do contato domiciliar (BRITTON & LOCKWOOD, 2004;GOULART *et al.*, 2002).

Entre os aspectos imunopatológicos da hanseníase sabe-se que apesar da produção de anticorpos específicos contra o *M. leprae* em grande quantidade nas formas multibacilares, eles são ineficazes para a eliminação dos bacilos. A defesa é efetuada pela resposta imunológica celular, principalmente através da fagocitose e destruição os bacilos, mediada por citocinas (como TNF-α, IFN-γ) e mediadores da oxidação, como os reativos intermediários do oxigênio (ROI), e do nitrogênio (RNI) fundamentais na destruição bacilar no interior dos macrófagos (KIMURA *et al.*, 2004).

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

O tratamento do paciente com hanseníase é indispensável para alcançar a cura e quebrar a cadeia de transmissão da doença, sendo portanto estratégico no controle da endemia, e para eliminar a hanseníase enquanto problema de saúde pública. Na poliquimioterapia (PQT) três principais drogas são usadas: rifampicina, dapsona e clofazimina, com administração associada segundo os esquemas padronizados pelo MS e OMS. Essa associação evita a resistência medicamentosa do bacilo que ocorre, com freqüência, quando se utiliza apenas um medicamento, impossibilitando a cura da doença (FUNASA, 2002). Além disso, tem sido demonstrado em diversos países que a imunização com BCG concede variável eficácia protetora contra hanseníase, variando de 34% a 80% (BRITTON & LOCKWOOD, 2004).

1.2. REAÇÕES HANSÊNICAS

A hanseníase pode apresentar episódios agudos denominados estados reacionais, ou reações hansênicas, que são freqüentemente acompanhadas de quadros de neurite. Essas reações podem ocorrer em 25% ou mais dos pacientes com HT e HV, mais comumente durante o tratamento com PQT (JACOBSON & KRAHENBUHL, 1999). A neuropatia que ocorre na hanseníase é causada em parte pelo *M. leprae*, que tem a capacidade de invadir o sistema nervoso periférico (RAMBUKKANA, 2000), podendo ser aguda ou crônica, com presença ou ausência de dor, e pode ocorrer durante o processo inflamatório, associado ou não a compressão neural (SBH & SBD, 2003).

Dependendo da etiopatogênese, as reações são classificadas em tipo 1, ou reação reversa, e tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH). A reação tipo 1 é caracterizada por episódios de hipersensibilidade que se manifestam principalmente na pele e nervos. Essas reações ocorrem tipicamente em pacientes “imunologicamente instáveis”, como DT, DD e DV, e se manifestam clinicamente como lesões de pele infiltradas e neurite aguda. A reação tipo 2 resulta da deposição

de imunocomplexos em tecidos e no endotélio vascular, que se desenvolve em pacientes com alta carga antigênica, como resultado da produção aumentada de anticorpos nos tipos DV e VV. No entanto, esse processo não confere proteção em termos de limitação da infecção ou eliminação do *M. leprae* (AGRAWAL *et al.*, 2005). Além da pele e nervos, outros órgãos podem estar envolvidos: linfonodos, fígado, baço, peritônio, testículos, olhos, articulações, tendões, músculos e ossos. Pode haver febre, leucocitose e estimulação policlonal de anticorpos (GOULART *et al.*, 2002).

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

1.3. DROGAS IMUNOMODULADORAS

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

Os corticosteróides, como a prednisona ou a prednisolona, são as drogas de escolha para o tratamento das reações tipo I com comprometimento neurológico. São conhecidos por suprimirem processos inflamatórios, sendo frequentemente utilizados no tratamento de doenças auto-imunes e alérgicas, atuando principalmente através da inibição do fator nuclear κB (NF-κB), fator de transcrição que regula a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF-α. Os corticosteróides induzem a produção do inibidor IκB, o qual se liga ao NF-κB, impedindo sua translocação para o núcleo, onde se liga aos sítios promotores específicos que regulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias (STERNBERG, 2006). Seus efeitos são também mediados pelo receptor de glicocorticóide (RG), o qual está presente no citoplasma e após ativação por um ligante se transloca para o núcleo, funcionando como um fator de transcrição (HOETZENECKER *et al.*, 2004). Este receptor interage com o cAMP e eleva sua concentração, resultando na diminuição da secreção de TNF-α em vários tipos celulares (FRANCHIMONT *et al.*, 1999), como macrófagos peritoniais e CLs em suspensão epidérmica (SERRES *et al.*, 1996;ZHU *et al.*, 2007). Porém, seu papel na regulação da produção de citocinas antiinflamatórias é ainda contraditório (MOZO *et al.*, 2004), e pouco se sabe em relação aos seus efeitos sobre CLs.

Quando alguns pacientes não respondem bem ao tratamento com corticosteróides, outras terapêuticas podem ser utilizadas. Sena *et al*. (2006) avaliaram a eficácia da ciclosporina A no tratamento da neurite crônica, demonstrando que esta droga pode ser útil no controle da dor e dano neural, e que

seu mecanismo de ação parece estar relacionado à inibição de anticorpos anti-NGF, presentes no soro de pacientes (SENA *et al.*, 2006). A ciclosporina A é uma droga imunossupressora que inibe a via calcineurina/NFAT, que está envolvida na transcrição de genes que codificam citocinas como IL-2 e IL-4, além do receptor CD40L. As vias de sinalização JNK e p38, que podem ser ativadas quando respostas de células T são provocadas através dos receptores TCR e CD28 de co-estimulação, são também sensíveis a ciclosporina A (MATSUDA & KOYASU, 2000).

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

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

A amitriptilina é um antidepressivo tricíclico que é usado como adjuvante no tratamento de uma variedade de condições de dor crônica (BRYSON & WILDE, 1996). Esta droga pode ser usada no tratamento das dores persistentes em pacientes com reações hansênicas, já que possui ação analgésica e promove a recuperação da função neural (SBH & SBD, 2003), sendo relatados bons resultados com o uso de amitriptilina e imipramina, porém ainda não publicados (STUMP *et al.*, 2006). Os antidepressivos tricíclicos bloqueiam a recaptação de norepinefrina ou de serotonina pela membrana neuronal pressináptica, ocasionando o aumento de sua

concentração nas sinapses do sistema nervoso central (SANCHEZ & HYTTEL, 1999). Porém, a inibição da recaptação destes neurotransmissores é somente um dos mecanismos de ação da amitriptilina. Além dos efeitos analgésicos, já foram descritos efeitos neurotóxicos (KITAGAWA *et al.*, 2006;LIRK *et al.*, 2006) e anestésicos (SUDOH *et al.*, 2003), e outros trabalhos mostraram que a amitriptilina é um potente bloqueador de canais dependentes de voltagem, como canais de Na^+ (PANCRAZIO *et al.*, 1998;WANG *et al.*, 2004) e canais de K^+ (CASIS & SANCHEZ-CHAPULA, 1998).

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

Apesar dos avanços terapêuticos e dos estudos para prevenir e reverter os danos nos nervos (GIRDHAR *et al.*, 2007), pouco se sabe sobre o mecanismo de ação imunológico das drogas imunomoduladoras utilizadas no tratamento das reações hansênicas. A produção de citocinas é um evento chave tanto na iniciação como na regulação das respostas imunes e, por isso, diferentes drogas têm sido usadas rotineiramente para suprimir ou modificar sua produção, e consequentemente, alterar respostas imunes em um amplo espectro de doenças (ROWLAND *et al.*, 1998).

1.4. SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema imunológico tem como principal função distinguir o próprio do não-próprio, e essa habilidade é necessária para proteger o organismo de patógenos invasores e para eliminar células alteradas ou modificadas, tal como células malignas, células infectadas e células apoptóticas (PENG *et al.*, 2007). Duas principais subdivisões compõem o sistema imunológico, a imunidade inata e a adaptativa (também conhecida como adquirida). O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra patógenos, e seus mecanismos incluem a fagocitose por macrófagos e granulócitos, o sistema complemento, quimiocinas, citocinas e a ação de células matadoras naturais (*natural killer* ou NK) (STEINMAN, 2007b). A imunidade adaptativa está envolvida na eliminação do patógeno na fase tardia da infecção, bem como na geração de memória imunológica. Embora estas duas subdivisões do sistema imune apresentem funções distintas, e as conexões entre os vários componentes imunes não sejam ainda completamente conhecidas, ambas possuem componentes celulares e humorais os quais cooperam para proteger o organismo de infecções.

A ativação do sistema imune inato leva à captação de antígenos estranhos por células apresentadoras de antígenos (APC) profissionais, que podem migrar para órgãos linfóides secundários para apresentá-los aos linfócitos. Estes antígenos são processados em fragmentos menores chamados peptídeos e expostos na superfície de APC, ligados a moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC). O complexo MHC-peptídeo é então reconhecido pelo receptor de célula T (TCR), representando o primeiro sinal para a ativação (ABBAS & JANEWAY, Jr., 2000). Os antígenos localizados no citoplasma são processados por fagossomos, translocados para o retículo endoplasmático e apresentados por moléculas MHC classe I para o reconhecimento por células T citotóxicas (T $CD8^+$), enquanto que os antígenos extracelulares são fagocitados, processados e apresentados pelas APC pela via endocítica da molécula MHC classe II, para o reconhecimento por células T helper (T $CD4^+$) (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998).

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

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

Após ativação, as células T $CD4^+$ podem se diferenciar nos subtipos de Th1 ou Th2, distinguidas pelos tipos de genes de citocinas que elas expressam. Muitos fatores influenciam nessa diferenciação, incluindo a dose de antígeno, a natureza e o grau da co-estimulação, e as citocinas produzidas durante a diferenciação (FEILI-HARIRI *et al.*, 2005), como por exemplo, IL-12 e IL-4 que desempenham um papel dominante na diferenciação de células Th1 e Th2, respectivamente (O'GARRA & ARAI, 2000). A IL-12 é produzida por APCs e células fagocíticas, como monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendriticas (CDs), e atua principalmente em células T e NK, estimulando a proliferação, a produção de IFN-γ e o aumento das atividades citotóxicas destas células (WATFORD *et al.*, 2003). As células Th2, mastócitos e basófilos são os principais produtores de IL-4, o

qual além de promover a diferenciação de células T $CD4^+$ em Th2, também determina a produção de classes específicas imunoglobulinas por células B (NELMS *et al.*, 1999).

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

1.5. MACRÓFAGOS

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

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

A ativação dos macrófagos também ocorre em resposta à produção de IFN-γ pelas células T $CD4^+$ durante as respostas Th1, um processo chave na imunidade celular contra infecções com patógenos intracelulares, como o *Mycobacterium*. Além desta via de ativação, conhecida como via clássica, a ativação dos macrófagos também pode ocorrer pelas citocinas IL-4 e IL-13 do pólo Th2, resultando em macrófagos ativados que apresentam um fenótipo distinto, porém consistente com seu papel na imunidade humoral e reparo (GORDON, 2003). Portanto, estas células são críticas na defesa contra diversos tipos de infecções, apresentando uma variedade de mecanismos utilizados no reconhecimento e destruição de patógenos (RAVETCH & ADEREM, 2007). A ativação dos macrófagos é de fundamental importância, não somente na iniciação da resposta inflamatória, mas também na resolução desta resposta (ZHANG & MOSSER, 2008).

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

1.6. CÉLULAS DENDRÍTICAS

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

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

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

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

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

Durante condições patológicas, as áreas de células T recebem grandes quantidades de CDs altamente estimuladas, que são especializadas na apresentação de antígenos (SALLUSTO & LANZAVECCHIA, 2002), e que possuem em sua superfície moléculas como B7-1, B7-2 (SALGADO *et al.*, 1999a) e CD40 (SALGADO *et al.*, 1999b), dentre outras, e estas interagem com os receptores específicos presentes na superfície de células T, CD28 e CD40L (GUERMONPREZ *et al.*, 2002).

As CDs desempenham um papel essencial na indução e controle da imunidade mediada por células T, podendo também ativar a expansão e diferenciação de outras classes de linfócitos, como células B, NK e células T NK,

através da expressão de moléculas ou pela produção de citocinas (BANCHEREAU *et al.*, 2000;BANCHEREAU & STEINMAN, 1998;STEINMAN, 2003). A interação entre CDs e células T ocorre através da formação de sinapses imunológicas, onde a regulação estrutural do citoesqueleto das CDs parece ter um papel crucial (DUSTIN *et al.*, 2006). Além das diversas moléculas e ligantes envolvidos na ativação das células T, citocinas produzidas pelas CDs também estão envolvidas neste processo. As CDs são também importantes na polarização de células T $CD4^+$ em Th1 e Th2 e na indução de células T $CD8^+$ de memória (FUJII *et al.*, 2004;GUERMONPREZ *et al.*, 2002;MOSER & MURPHY, 2000;STEINMAN, 2003).

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

1.7. CÉLULAS DE LANGERHANS

As células de Langerhans (CLs) são um grupo de CDs derivadas da medula óssea que estão situadas principalmente em uma camada suprabasal da epiderme, e constituem 1-3% de todas as células epidérmicas**.** Elas foram as primeiras CDs a serem descobertas quando, em 1868, Paul Langerhans, então

estudante de medicina, descreveu células com morfologia dendrítica na epiderme humana (NAKAMURA *et al.*, 1999;ROMANI *et al.*, 2003).

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

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

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

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

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a ação *in vitro* das drogas prednisona, talidomida, ciclosporina A e amitriptilina sobre CLs e macrófagos peritoniais de camundongos BALB/c.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Tratar as culturas de CLs purificadas da epiderme e de macrófagos peritoniais de camundongos BALB/c com as drogas imunomoduladoras nas concentrações de 10^{-6} M e 10^{-8} M por 36 h;

- Avaliar a viabilidade das CLs e dos macrófagos antes e após tratamento com as drogas;

- Verificar a produção das citocinas TNF-α, IL-12 e IL-10 pelas CLs e pelos macrófagos após 36h de tratamento com as drogas através de ensaio imunoenzimático (ELISA);

3. METODOLOGIA

3.1. REAGENTES

Prednisona, talidomida, ciclosporina A e amitriptilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foram dissolvidos em DMSO ou metanol para preparar as soluções estoque (10^{-2}M). Para a detecção de TNF-α, IL-12 (p40/p70), e IL-10 foram utilizados kits comerciais para ELISA (BD PharMingen, San Diego, CA).

3.2. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

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

3.3. ISOLAMENTO DE CÉLULAS DE LANGERHANS

As células foram isoladas, purificadas e cultivadas conforme a método previamente descrito (SALGADO *et al*., 1999). Em resumo, os camundongos BALB/c foram sacrificados e a pele foi removida das regiões dorsal e ventral. Os fragmentos de tecido epitelial foram incubados em meio RPMI 1640 (Sigma) contendo 3000 U/ml de dispase II (Roche Company-Germany) a 37 °C, 5% de CO_2 por 3 h. A epiderme foi separada da derme e incubada com DNAse (0.025%, Sigma) por 20 minutos em temperatura ambiente e, após pipetagem, foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-Ia^d 1:600 (BD PharMingen, San Diego, CA) por 1 h à 4ºC. A suspensão de células epidérmicas marcada foi então incubada em placas previamente revestidas com anticorpo anti-IgG fração Fc 1:100 (Gappel, Durham,

NC) por uma hora à 4ºC. Após lavagem, as placas foram submetidas à pipetagens vigorosas para remover as CLs, que foram cultivadas em meio RPMI-1640, suplementado com soro fetal bovino a 10% (Gibco, Grand Island, NY), solução de estreptomicina/penicilina (Sigma) e 2β-mercaptoetanol (Merck, Darmstadt, Germany) e cultivadas em placas de 96 poços a 37 °C, em ambiente de 5% de CO_2.

3.4. ISOLAMENTO DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS

Os macrófagos foram obtidos por lavagem peritonial com 5 a 10 ml de soro fisiológico estéril gelado, e após massagear lentamente a região abdominal, o líquido foi aspirado e distribuído em tubos de 15 ml para centrifugação, a 1500 rpm por 3 minutos. As células foram ressuspendidas em RPMI 1640 (Sigma) suplementado com soro fetal bovino a 10% (Gibco), solução de penicilina/estreptomicina (Sigma) e 2β-mercaptoetanol (Merck) (TRIPATHI *et al.*, 2008). Em seguida, uma alíquota de 70 µl da suspensão de células foi distribuída em lamínulas de vidro de 5,0 x 5,0 mm, as quais foram incubadas durante 2 h em estufa a 37ºC e 5% de CO_2. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas com soro para remover as células não aderidas e os macrófagos aderidos foram incubados em placas de 24 poços contendo 500 µl de meio RPMI 1640 por 24 h. A quantidade obtida foi de aproximadamente 5 x 10^4 macrófagos/lamínula, sendo o cálculo realizado através da contagem em microscópio óptico após coloração com Giemsa.

3.5. TRATAMENTO COM AS DROGAS IMUNOMODULADORAS

Após isolamento e purificação, as culturas de CLs (2 x 10^5 células/poço) ou de macrófagos peritoniais (5 x 10^4 células/poço) foram incubadas na presença ou ausência de prednisona, talidomida, ciclosporina A ou amitriptilina em diferentes

concentrações (10^{-6} M, 10^{-8} M ou diluente) em meio RPMI-1640 completo por 36 h. Os macrófagos foram estimulados com LPS por 8 h, após o tratamento de 36 h com as drogas.

3.6. VIABILIDADE CELULAR

Após tratamento com prednisona, talidomida, ciclosporina A ou amitriptilina por 36 h, as culturas de CLs ou macrófagos foram lavadas três vezes com PBS e marcadas com iodeto de propídeo (10 µg/ml) imediatamente antes da análise por citometria de fluxo (Epics XL, Beckman Coulter, Miami, FL) ou por microscopia de fluorescência.

3.7. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

Os sobrenadantes das culturas de CLs e das culturas de macrófagos foram obtidos após 36 h de tratamento com as drogas imunomoduladoras. A concentração das citocinas TNF-α, IL-12 e IL-10 foi obtida por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), segundo protocolo dos fabricantes dos kits. A leitura das placas foi realizada na absorbância de 450nm em uma leitora de ELISA (MRX Revelation-DINEX MB/USA). Todas as amostras foram analisadas em triplicata e os resultados expressos em pg/mL.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

4. RESULTADOS

4.1. VIABILIDADE DAS CLs

A viabilidade das CLs cultivadas foi cuidadosamente checada em cada experimento. Através da técnica de panning, foram obtidas CLs com aproximadamente 95% de pureza e viabilidade acima de 90% (Tabela 1). Após 36 h de cultura, a viabilidade diminuiu para aproximadamente 70% (Tabela 1), e não foi afetada após tratamento com prednisona, talidomida, ciclosporina A ou amitriptilina nas concentrações de 10^{-6} M e 10^{-8} M (Tabela 1).

Tabela 1 - Viabilidade das CLs após tratamento com as drogas imunomoduladoras[a].

	Concentração	**Viabilidade (%)[b]**
CLs recém-isoladas	-	94.4 ± 2.1
CLs (36h)	-	73.3 ± 2.8
Prednisona	10^{-6} M	69.9 ± 3.7
	10^{-8} M	66.7 ± 5.5
Talidomida	10^{-6} M	63.5 ± 3.2
	10^{-8} M	61.4 ± 2.1
Ciclosporina A	10^{-6} M	62.2 ± 6.4
	10^{-8} M	61.2 ± 10.7
Amitriptilina	10^{-6} M	66.2 ± 2.2
	10^{-8} M	64.6 ± 1.7

[a]As CLs purificadas foram cultivadas por 36 h na presença ou ausência de prednisona, talidomida, ciclosporina A ou amitriptilina, a 10^{-6} M ou 10^{-8} M. As células foram marcadas com IP (10µg/mL). Os dados são representativos de três experimentos independentes.

[b] média ± desvio padrão.

4.2. EFEITOS DAS DROGAS IMUNOMODULADORAS NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR CLs

Para determinar se as citocinas TNF-α, IL-12 e IL-10 foram secretadas no meio de cultura pelas células durante 36 h de cultivo, os níveis de citocinas foram quantificados pelo método de ELISA. A produção de TNF-α (21.8 ± 1.4 pg/ml) foi reduzida para 10.8 pg/ml ($p<0.05$) após tratamento com prednisona 10^{-6} M, e para 9.5 pg/ml ($p<0.05$) após tratamento com prednisona 10^{-8} M, correspondendo a uma redução de quase 50% (Tabela 2). O tratamento das CLs com talidomida resultou em uma significante inibição da secreção de TNF-α, diminuindo de 21.8 ± 1.4 pg/ml para 7.8 ± 1.7 pg/ml a 10^{-6} M (redução de 64%, $p<0.05$) e para 4.2 ± 3.8 pg/ml a 10^{-8} M (80% de redução, $p<0.01$) (Tabela 2). No tratamento com ciclosporina A, a produção de TNF-α foi reduzida de 5.8 ± 0.4 pg/ml a 10^{-6} M (redução de 73%, $p<0.01$) e para 7.6 ± 0.5 pg/ml a 10^{-8} M (redução de 65%, $p<0.05$) (Tabela 2). Da mesma forma, a secreção de TNF-α pelas CLs foi diminuída após tratamento com amitriptilina, no entanto esta redução foi menor do que a observada com as outras três drogas no mesmo período de tempo. Especificamente, amitriptilina inibiu a secreção de TNF-α em torno de 55% na concentração de 10^{-6} M (9.7 ± 2.2 pg/ml, $p<0.05$) e 44% na concentração de 10^{-8} M (12.2 ± 0.6 pg/ml, $p<0.05$).

A produção de IL-12 (9.4 ± 0.5 pg/ml) foi diminuiu para 2.9 ± 0.7 pg/ml ($p<0.01$) após tratamento com prednisona na concentração de 10^{-6} M e para 4.0 ± 1.1 pg/ml ($p<0.01$) após tratamento com prednisona na concentração de 10^{-8} M, correspondendo a 69% e 75% de redução, respectivamente (Tabela 2). O tratamento das CLs com talidomida também resultou na inibição significativa da produção de IL-12, diminuindo de 9.4 ± 0.5 pg/ml para 4.8 ± 0.5 pg/ml a 10^{-6} M (49% de redução, $p<0.01$) e para 3.5 ± 1.8 pg/ml a 10^{-8} M (62% de redução, $p<0.01$) (Tabela 2). No tratamento com ciclosporina A não foi observada redução significativa da secreção de IL-12 em nenhuma das duas concentrações testadas (Tabela 2). Amitriptilina inibiu a secreção de IL-12 em aproximadamente 32% a 10^{-6} M (6.4 ± 0.3 pg/ml, $p<0.05$), enquanto que a menor concentração não apresentou efeito

estatisticamente significativo. Adicionalmente, não foi detectada liberação de IL-10 nos sobrenadantes das culturas incubadas por até 36 h (dados não mostrados).

Tabela 2 - Efeitos das drogas imunomoduladoras na produção de TNF-α e IL-12 por CLs[a].

	Concentração	**TNF-α (pg/ml)[b]**	**IL-12 (pg/ml)[b]**
Controle (36h)	-	21.8 ± 1.4	9.4 ± 0.5
Prednisona	10^{-6} M	10.8 ± 2.0*	2.9 ± 0.7**
	10^{-8} M	9.5 ± 0.9*	4.0 ± 1.1**
Talidomida	10^{-6} M	7.8 ± 1.7*	4.8 ± 0.5**
	10^{-8} M	4.4 ± 3.8**	3.5 ± 1.8**
Ciclosporina A	10^{-6} M	5.8 ± 0.4**	8.7 ± 0.4
	10^{-8} M	7.6 ± 0.5**	8.5 ± 0.6
Amitriptilina	10^{-6} M	9.7 ± 2.2*	6.4 ± 0.3*
	10^{-8} M	12.2 ± 0.6*	7.4 ± 2.7

[a]As CLs purificadas foram cultivadas por 36 h na presença ou ausência de prednisona, talidomida, ciclosporina A ou amitriptilina, a 10^{-6} M ou 10^{-8} M. Os níveis de TNF-α e IL-12 nos sobrenadantes foram quantificados por ELISA. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

[b]média ± desvio padrão.

*p<0.05 vs. controle.

**p<0.01 vs. controle.

4.3. VIABILIDADE DOS MACRÓFAGOS PERITONIAIS

Os macrófagos peritoniais foram cultivados e tratados com prednisona, talidomida, ciclosporina A ou amitriptilina por 36 h, e a viabilidade foi então checada após marcação com iodeto de propídeo. Nenhuma das drogas utilizadas afetou significativamente a viabilidade dos macrófagos em cultura (Tabela 3).

Tabela 3 - Viabilidade dos macrófagos peritoniais após tratamento com as drogas imunomoduladoras[a].

	Concentração	Viabilidade (%)[b]
Controle (36 h)	-	95.8 ± 1.5
Prednisona	10^{-6} M	84.2 ± 2.5
	10^{-8} M	86.1 ± 1.7
Talidomida	10^{-6} M	85.4 ± 3.2
	10^{-8} M	86.9 ± 2.2
Ciclosporina A	10^{-6} M	85.5 ± 2.3
	10^{-8} M	88.2 ± 3.7
Amitriptilina	10^{-6} M	83.8 ± 2.9
	10^{-8} M	87.7 ± 0.8

[a]Os macrófagos peritoniais foram cultivados por 36 h na presença ou ausência de prednisona, talidomida, ciclosporina A ou amitriptilina, a 10^{-6} M ou 10^{-8} M. As células foram marcadas com IP (10µg/mL). Os dados são representativos de três experimentos independentes.

[b] média ± desvio padrão.

4.4. EFEITOS DAS DROGAS IMUNOMODULADORAS NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS PERITONIAIS

Os macrófagos foram tratados com LPS por 36 h e secretaram os seguintes níveis de TNF-α, IL-12 e IL-10: 294 ± 33.9 pg/ml, 258 ± 27.7 pg/ml, and 195 ± 12.8 pg/ml. Uma significativa diminuição na produção de TNF-α pelos macrófagos foi observada após o tratamento com prednisona a 10^{-6} M e 10^{-8} M ($p<0.05$), correspondendo a uma redução de 56% e 53% (129.6 ± 33.0 pg/ml e 138.2 ± 6.0 pg/ml), respectivamente (Tabela 4). Talidomida na concentração de 10^{-6} M inibiu a secreção de TNF-α em 65.6% (100.9 ± 9.0 pg/ml; $p<0.01$), enquanto que os macrófagos tratados com talidomida 10^{-8} M exibiram uma pequena, porém estatisticamente insignificante, redução na liberação de TNF-α (Tabela 4). De modo semelhante, a ciclosporina A reduziu significativamente a secreção de TNF-α (117.4 ± 59.7 pg/ml), porém somente na maior concentração, enquanto que a menor concentração da mesma droga não apresentou efeito estatisticamente significante

(Tabela 4). Quando os macrófagos foram incubados com amitriptilina a 10^{-6} M, a liberação de TNF-α foi reduzida de 339.3 ± 82.3 pg/ml para 120.6 ± 16.9 pg/ml (redução de 60%, $p<0.05$), enquanto que amitriptilina a 10^{-8} M não causou efeitos significativos (Tabela 4).

A produção de IL-12 também foi significativamente alterada ($p<0,05$) por prednisona a 10^{-8} M (149.4 ± 7.5 pg/ml), talidomida a 10^{-6} M (139.0 ± 9.8 pg/ml), ciclosporina a 10^{-8} M (149.7 ± 9.1 pg/ml), e amitriptilina nas duas concentrações, 10^{-6} M e 10^{-8} M (150.0 ± 5.4 pg/ml e 148.6 ± 8.6 pg/ml), todas com redução em torno de 40% (Tabela 4). Os níveis de IL-10 produzidos pelos macrófagos não foram alterados significativamente por nenhuma das drogas testadas (Tabela 4).

Tabela 4 - Efeitos das drogas imunomoduladoras na produção de TNF-α, IL-12 e IL-10 por macrófagos peritoniais[a].

	Concentração	**TNF-α (pg/ml)[b]**	**IL-12 (pg/ml)[b]**	**IL-10 (pg/ml)[b]**
Controle (36 h)	-	339.3 ± 82.3	255.1 ± 27.5	195.0 ± 12.8
Prednisona	10^{-6} M	129.6 ± 33.0*	184.6 ± 48.1	209.8 ± 17.3
	10^{-8} M	138.2 ± 6.0*	149.4 ± 7.5**	193.5 ± 29.8
Talidomida	10^{-6} M	100.9 ± 9.0**	149.0 ± 14.9*	221.2 ± 22.7
	10^{-8} M	228.6 ± 78.9	192.9 ± 63.1	160.1 ± 29.8
Ciclosporina A	10^{-6} M	117.4 ± 59.7*	190.6 ± 10.8	212.4 ± 4.8
	10^{-8} M	215.4 ± 32.3	150.1 ± 11.9**	184.2 ± 21.9
Amitriptilina	10^{-6} M	139.7 ± 49.2*	157.0 ± 27.6*	200.2 ± 10.2
	10^{-8} M	198.8 ± 47.2	147.1 ± 47.4*	207.5 ± 8.1

[a]Os macrófagos peritoniais foram cultivados por 36 h na presença ou ausência de prednisona, talidomida, ciclosporina A ou amitriptilina, a 10^{-6} M ou 10^{-8} M. Os níveis de TNF-α, IL-12 e IL-10 nos sobrenadantes foram quantificados por ELISA. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

[b]média ± desvio padrão.

*$p<0.05$ vs. controle.

**$p<0.01$ vs. controle.

5. DISCUSSÃO

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

Nossos resultados mostram que a prednisona também inibe a produção de TNF-α em macrófagos, corroborando com um estudo prévio que descreveu a supressão da produção de TNF-α em monócitos do sangue periférico pré-incubados por 24 e 48 h com LPS, e posteriormente estimulados com dexametasona. No entanto, o mesmo trabalho também mostrou que dependendo da amplitude do estímulo, dexametasona em altas concentrações pode inibir, e quando em baixas concentrações pode aumentar a produção de IL-10 (FRANCHIMONT *et al.*, 1999). Outro estudo mostrou que em macrófagos alveolares pré-incubados com metilprednisolona por 20h, e posteriormente ativados por LPS, também ocorre supressão da produção de TNF-α e aumento da produção de IL-10 (FRANKENBERGER *et al.*, 2005), o que não foi detectado em nosso estudo provavelmente devido a diferenças no sistema experimental, incluindo o fato de estudos prévios adicionarem GC antes ou juntamente com LPS e utilizarem células humanas. Portanto, o tipo de estímulo e a fonte de obtenção de células podem influenciar nos efeitos dos GC na produção de IL-10.

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

Na análise da ação imunomoduladora da talidomida, observamos que ocorreu redução nos níveis de TNF-α produzidos pelas CLs em 36 h de tratamento, corroborando um estudo prévio, onde se observou que a talidomida tem profundos efeitos inibitórios sobre a habilidade de apresentação de antígenos de CLs purificadas da epiderme, inibindo a produção de TNF-α por estas células (DENG *et al.*, 2003). A talidomida também apresentou efeitos inibitórios na secreção de TNF-α por macrófagos em 36h de tratamento, como também demonstrado em estudo prévio, onde ocorreu uma redução significativa de 30% na produção de TNF-α em células do sangue periférico tratadas com talidomida por 48h (ROWLAND *et al.*, 1998). Além disso, os níveis de IL-12 secretados pelas CLs foram fortemente suprimidos pela talidomida em ambas as concentrações, e os níveis de IL-12 produzidos por macrófagos também foram reduzidos pela talidomida na concentração de 10^{-6} M, corroborando estudos prévios que demonstraram a inibição da produção de IL-12 por talidomida em monócitos estimulados com LPS (MOLLER *et al.*, 1997) e a diminuição do RNAm de IL-12 por talidomida e análogos, em monócitos cultivados com *M. leprae* (SAMPAIO *et al.*, 2002).

Os experimentos com ciclosporina A revelaram uma inibição dos níveis de TNF-α produzidos por CLs, em ambas as concentrações utilizadas, mostrando que esta droga apresenta o mesmo efeito inibitório observado nos testes com prednisona e talidomida. Porém, não observamos alterações significativas na secreção de IL-12 por estas células, discordando do observado em um estudo anterior, onde foi relatado que dexametasona possui maiores efeitos inibitórios sobre a função de CDs derivadas de monócitos do que a ciclosporina A, pois diminuiu parcialmente a produção de TNF-α e bloqueou a produção de IL-12 (WOLTMAN *et al.*, 2000). Isto

sugere que os efeitos da ciclosporina A sobre a produção de TNF-α ocorrem em diferentes níveis de inibição entre estes dois tipos de CDs, sendo maior nas CLs, da mesma forma com relação à secreção de IL-12, que foi inibida nas CDs, mas não foi alterada nas CLs, resultados possivelmente relacionados com a natureza da diferenciação destas células, já que possuem estados de maturação e níveis de produção de IL-12 distintos (PEISER *et al.*, 2004). Dessa forma, os mecanismos envolvidos nos efeitos da ciclosporina A permanecem ainda não esclarecidos, e nossos resultados sustentam a hipótese de que esta droga inibe a produção de TNF-α pelas CLs.

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

Em relação à amitriptilina, apesar de existirem alguns trabalhos recentes demonstrando que a droga possui capacidade de imunomodulação, pouco se sabe

sobre o seu mecanismo de ação e quais células do sistema imunológico são reguladas por ela. Um estudo prévio relatou que os antidepressivos tricíclicos clomipramina, imipramina e citalopram causam redução na liberação de TNF-α por monócitos do sangue periférico estimulados com LPS (XIA *et al.*, 1996). Recentemente, um trabalho utilizando amitriptilina e seu metabólito, nortriptilina, demonstrou a diminuição da secreção de TNF-α em culturas de células gliais (OBUCHOWICZ *et al.*, 2006), que atuam na defesa imunológica do sistema nervoso central (SNC). Por outro lado, estudo recente utilizando sangue total examinou os efeitos de diferentes tipos de antidepressivos, como desipramina, clomipramina e trimipramina relatando não afetarem a produção de TNF-α e IL-12 (DIAMOND *et al.*, 2006). Nossos dados revelaram que a amitriptilina inibiu a secreção de TNF-α e IL-12 nos dois tipos celulares estudados, o que corrobora estudos anteriores realizados com células isoladas. No entanto, os mecanismos imunomodulatórios desta droga não são ainda completamente conhecidos, mas acredita-se que estão relacionados com o aumento intracelular de cAMP (XIA *et al.*, 1996)

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

A citocina pró-inflamatória TNF-α é importante na resposta antimicobacteriana e na formação de granuloma durante a infecção (ANDERSSON *et al.*, 2005). No entanto, a produção excessiva de TNF-α pode causar dano tecidual, o qual está presente em lesões de pele e no plasma em grandes quantidades durante reações do tipo I (KHANOLKAR-YOUNG *et al.*, 1995). Assim, a regulação da produção desta citocina por APCs apresenta um importante papel para

a redução da inflamação em reações hansênicas (ANDERSSON *et al.*, 2005), mecanismo pelo qual as drogas imunomoduladoras utilizadas neste trabalho podem atuar. Com relação à inibição observada na produção de IL-12 por CLs ou macrófagos, este pode ser outro possível modo de ação, pois já foi descrito que esta citocina é responsável pelo aumento da atividade bactericida de macrófagos peritoniais contra *M. leprae*, tanto diretamente, estimulando a produção de NO, como indiretamente, pela produção de IFN-γ por células T e NK (NOMAGUCHI *et al.*, 2001).

A IL-10 é produzida principalmente por células Th2, porém também pode ser produzida por macrófagos em resposta a diversos estímulos, incluindo antígenos derivados de *Micobacteria* (MURRAY & YOUNG, 1999). Os resultados deste trabalho demonstram que a produção de IL-10 induzida por LPS não é afetada por nenhuma das drogas imunomoduladoras, o que poderia contribuir com os efeitos supressores desta citocina sobre as funções dos macrófagos, através da redução de suas atividades antimicobacterianas (MURRAY & YOUNG, 1999), favorecendo a sobrevivência do *M. leprae* dentro de macrófagos cultivados com esta citocina (FUKUTOMI *et al.*, 2004). A presença de IL-10 em pacientes com hanseníase virchowiana sugere um possível papel na resposta imunológica ineficiente aos antígenos de *M. leprae* (MISRA *et al.*, 1995), o que poderia levar à diferenciação de células Treg, que são essenciais na indução de tolerância periférica e a supressão da resposta imune antígeno-específica (TAYLOR *et al.*, 2006).

A ação imunomoduladora da prednisona é bastante conhecida, mas apesar de ser o fármaco de escolha para o controle da dor na hanseníase, esta droga apresenta diversos efeitos indesejáveis. O uso de outros fármacos com propriedades analgésicas se faz necessário principalmente para controlar a dor em pacientes que dificilmente conseguem reduzir as doses de prednisona. A talidomida é outro fármaco bastante eficiente, no entanto, seu alto risco de teratogenicidade implica em controle e limitações do seu emprego. Quanto à ciclosporina A, alguns estudos mostram que esta droga também é útil no tratamento das reações, sendo ainda necessários outros estudos para evidenciar sua eficácia. A amitriptilina

também possibilita uma alternativa para o tratamento, e o estudo de seus efeitos imunomoduladores possibilita melhor entendimento dos seus mecanismos de ação, proporcionando maiores evidências para o uso desta droga no tratamento dos estados reacionais.

6. CONCLUSÕES

1. Todas as drogas estudadas diminuíram significativamente a produção de TNF-α e IL-12 pelas CLs, independente da concentração utilizada;

2. Prednisona e talidomida, nas duas concentrações estudadas, e amitriptilina na concentração de 10^{-6} M, reduziram a secreção de IL-12 por CLs;

3. Prednisona, nas duas concentrações estudadas, talidomida, ciclosporina A e amitriptilina, todas na concentração de 10^{-6} M, diminuíram a produção de TNF-α por macrófagos;

4. Prednisona e ciclosporina A na concentração de 10^{-8} M, talidomida na concentração de 10^{-6} M, e amitriptilina nas duas concentrações, diminuíram a produção de IL-12 por estas células;

5. Prednisona, talidomida, ciclosporina A e amitriptilina não apresentaram efeitos significativos sobre a produção de IL-10 por macrófagos;

6. O modelo experimental *in vitro* descrito neste trabalho constitui uma importante ferramenta para o entendimento de como as drogas imunomoduladoras podem atuar sobre células envolvidas na resposta imune, especialmente na hanseníase.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. & JANEWAY, C. A., JR. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell* v.100, p.129-138, 2000.

AGRAWAL, A., PANDIT, L., DALAL, M. *et al*. Neurological manifestations of Hansen's disease and their management. *Clin.Neurol.Neurosurg.* v.107, p.445-454, 2005.

ANDERSSON, A. K., CHADUVULA, M., ATKINSON, S. E. *et al*. Effects of prednisolone treatment on cytokine expression in patients with leprosy type 1 reactions. *Infect.Immun.* v.73, p.3725-3733, 2005.

ANJUERE, F., MARTIN, P., FERRERO, I. *et al*. Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. *Blood* v.93, p.590-598, 1999.

ARDAVIN, C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat.Rev.Immunol.* v.3, p.582-590, 2003.

ASAHINA, A. & TAMAKI, K. Role of Langerhans cells in cutaneous protective immunity: is the reappraisal necessary? *J.Dermatol.Sci.* v.44, p.1-9, 2006.

BANCHEREAU, J., BRIERE, F., CAUX, C. *et al*. Immunobiology of dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* v.18, p.767-811, 2000.

BANCHEREAU, J. & STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* v.392, p.245-252, 1998.

BARKER, L. P. *Mycobacterium leprae* interactions with the host cell: recent advances. *Indian J.Med.Res.* v.123, p.748-759, 2006.

BORGHI-CIRRI, M. B., RICCARDI-ARBI, R., BACCI, S. *et al*. Inhibited differentiation of Langerhans cells in the rat epidermis upon systemic treatment with cyclosporin A. *Histol.Histopathol.* v.16, p.107-112, 2001.

BRITTON, W. J. & LOCKWOOD, D. N. Leprosy. *Lancet* v.363, p.1209-1219, 2004.

BRYSON, H. M. & WILDE, M. I. Amitriptyline. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in chronic pain states. *Drugs Aging* v.8, p.459-476, 1996.

CARRENO, B. M. & COLLINS, M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* v.20, p.29-53, 2002.

CASIS, O. & SANCHEZ-CHAPULA, J. A. Mechanism of block of cardiac transient outward K+ current (I(to)) by antidepressant drugs. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* v.32, p.527-534, 1998.

CORRAL, L. G. & KAPLAN, G. Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. *Ann.Rheum.Dis.* v.58 Suppl 1, p.I107-I113, 1999.

DEKRUYFF, R. H., FANG, Y., UMETSU, D. T. Corticosteroids enhance the capacity of macrophages to induce Th2 cytokine synthesis in CD4+ lymphocytes by inhibiting IL-12 production. *J.Immunol.* v.160, p.2231-2237, 1998.

DENG, L., DING, W., GRANSTEIN, R. D. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor-alpha production and antigen presentation by Langerhans cells. *J.Invest Dermatol.* v.121, p.1060-1065, 2003.

DIAMOND, M., KELLY, J. P., CONNOR, T. J. Antidepressants suppress production of the Th1 cytokine interferon-gamma, independent of monoamine transporter blockade. *Eur.Neuropsychopharmacol.* v.16, p.481-490, 2006.

DUSTIN, M. L., TSENG, S. Y., VARMA, R. *et al*. T cell-dendritic cell immunological synapses. *Curr.Opin.Immunol.* v.18, p.512-516, 2006.

EBNER, S., EHAMMER, Z., HOLZMANN, S. *et al*. Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin. *Int.Immunol.* v.16, p.877-887, 2004.

FEILI-HARIRI, M., FALKNER, D. H., MOREL, P. A. Polarization of naive T cells into Th1 or Th2 by distinct cytokine-driven murine dendritic cell populations: implications for immunotherapy. *J.Leukoc.Biol.* v.78, p.656-664, 2005.

FRANCHIMONT, D., MARTENS, H., HAGELSTEIN, M. T. *et al*. Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. *J.Clin.Endocrinol.Metab* v.84, p.2834-2839, 1999.

FRANKENBERGER, M., HAUSSINGER, K., ZIEGLER-HEITBROCK, L. Liposomal methylprednisolone differentially regulates the expression of TNF and IL-10 in human alveolar macrophages. *Int.Immunopharmacol.* v.5, p.289-299, 2005.

FUJII, S., LIU, K., SMITH, C. *et al*. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J.Exp.Med.* v.199, p.1607-1618, 2004.

FUKUTOMI, Y., MATSUOKA, M., MINAGAWA, F. *et al*. IL-10 treatment of macrophages bolsters intracellular survival of *Mycobacterium leprae*. *Int.J.Lepr.Other Mycobact.Dis.* v.72, p.16-26, 2004.

FUNASA. Guia de Vigilancia Epidemiológica, 2002.

GAD, M., CLAESSON, M. H., PEDERSEN, A. E. Dendritic cells in peripheral tolerance and immunity. *APMIS* v.111, p.766-775, 2003.

GARCIA, J. E., DE CABO, M. R., RODRIGUEZ, F. M. *et al*. Effect of cyclosporin A on inflammatory cytokine production by U937 monocyte-like cells. *Mediators.Inflamm.* v.9, p.169-174, 2000.

GIRDHAR, B. K. Skin to skin transmission of leprosy. *Indian J.Dermatol.Venereol.Leprol.* v.71, p.223-225, 2005.

GIRDHAR, B. K., GIRDHAR, A., CHAKMA, J. K. Advances in the treatment of reactions in leprosy. *Indian J.Lepr.* v.79, p.121-134, 2007.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. *Nat.Rev.Immunol.* v.3, p.23-35, 2003.

_____. The macrophage: past, present and future. *Eur.J.Immunol.* v.37 Suppl 1, p.S9-17, 2007.

GOULART, I. M., PENNA, G. O., CUNHA, G. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* v.35, p.365-375, 2002.

GREENWALD, R. J., FREEMAN, G. J., SHARPE, A. H. The B7 family revisited. *Annu.Rev.Immunol.* v.23, p.515-548, 2005.

GREWAL, I. S. & FLAVELL, R. A. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu.Rev.Immunol.* v.16, p.111-135, 1998.

GUERMONPREZ, P., VALLADEAU, J., ZITVOGEL, L. *et al*. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* v.20, p.621-667, 2002.

HOETZENECKER, W., MEINGASSNER, J. G., ECKER, R. *et al*. Corticosteroids but not pimecrolimus affect viability, maturation and immune function of murine epidermal Langerhans cells. *J.Invest Dermatol.* v.122, p.673-684, 2004.

HOWARD, C. J., CHARLESTON, B., STEPHENS, S. A. *et al*. The role of dendritic cells in shaping the immune response. *Anim Health Res.Rev.* v.5, p.191-195, 2004.

HUGUES, S., BOISSONNAS, A., AMIGORENA, S. *et al*. The dynamics of dendritic cell-T cell interactions in priming and tolerance. *Curr.Opin.Immunol.* v.18, p.491-495, 2006.

HUME, D. A., ROSS, I. L., HIMES, S. R. *et al*. The mononuclear phagocyte system revisited. *J.Leukoc.Biol.* v.72, p.621-627, 2002.

JACOBSON, R. R. & KRAHENBUHL, J. L. Leprosy. *Lancet* v.353, p.655-660, 1999.

KANAZAWA, N. Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. *J.Dermatol.Sci.* v.45, p.77-86, 2007.

KARLSSON, H., GU, Y., DEPIERRE, J. *et al*. Induction of apoptosis in proliferating lymphocytes by tricyclic antidepressants. *Apoptosis.* v.3, p.255-260, 1998.

KHANOLKAR-YOUNG, S., RAYMENT, N., BRICKELL, P. M. *et al*. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) synthesis is associated with the skin and peripheral nerve pathology of leprosy reversal reactions. *Clin.Exp.Immunol.* v.99, p.196-202, 1995.

KIMURA, H., MAEDA, Y., TAKESHITA, F. *et al*. Upregulation of T-cell-stimulating activity of mycobacteria-infected macrophages. *Scand.J.Immunol.* v.60, p.278-286, 2004.

KISSENPFENNIG, A., AIT-YAHIA, S., CLAIR-MONINOT, V. *et al*. Disruption of the langerin/CD207 gene abolishes Birbeck granules without a marked loss of Langerhans cell function. *Mol.Cell Biol.* v.25, p.88-99, 2005.

KITAGAWA, N., ODA, M., NOBUTAKA, I. *et al*. A proposed mechanism for amitriptyline neurotoxicity based on its detergent nature. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* v.217, p.100-106, 2006.

KROCZEK, R. A., MAGES, H. W., HUTLOFF, A. Emerging paradigms of T-cell co-stimulation. *Curr.Opin.Immunol.* v.16, p.321-327, 2004.

LEWIS, C. & MURDOCH, C. Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies. *Am.J.Pathol.* v.167, p.627-635, 2005.

LIRK, P., HALLER, I., HAUSOTT, B. et al. The neurotoxic effects of amitriptyline are mediated by apoptosis and are effectively blocked by inhibition of caspase activity. *Anesth.Analg.* v.102, p.1728-1733, 2006.

LOSA GARCIA, J. E., MATEOS, R. F., JIMENEZ, L. A. *et al*. Effect of cyclosporin A on inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Respir.Med.* v.92, p.722-728, 1998.

MA, J., CHEN, T., MANDELIN, J. *et al*. Regulation of macrophage activation. *Cell Mol.Life Sci.* v.60, p.2334-2346, 2003.

MA, W., MISHRA, S., GEE, K. *et al*. Cyclosporin A and FK506 inhibit IL-12p40 production through the calmodulin/calmodulin-dependent protein kinase-activated phosphoinositide 3-kinase in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells. *J.Biol.Chem.* v.282, p.13351-13362, 2007.

MAES, M., SONG, C., LIN, A. H. *et al*. Negative immunoregulatory effects of antidepressants: inhibition of interferon-gamma and stimulation of interleukin-10 secretion. *Neuropsychopharmacology* v.20, p.370-379, 1999.

MAHNKE, K., BEDKE, T., ENK, A. H. Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression. *Cell Immunol.*, 2008.

MARELLI-BERG, F. M., OKKENHAUG, K., MIRENDA, V. A two-signal model for T cell trafficking. *Trends Immunol.* v.28, p.267-273, 2007.

MATSUDA, S. & KOYASU, S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology.* v.47, p.119-125, 2000.

MELLMAN, I. & STEINMAN, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* v.106, p.255-258, 2001.

MIRANDA, A., AMADEU, T. P., SCHUELER, G. *et al*. Increased Langerhans cell accumulation after mycobacterial stimuli. *Histopathology* v.51, p.649-656, 2007.

MISRA, N., SELVAKUMAR, M., SINGH, S. *et al*. Monocyte derived IL-10 and PGE2 are associated with the absence of Th1 cells and in vitro T cell suppression in lepromatous leprosy. *Immunol.Lett.* v.48, p.123-128, 1995.

MOLLER, D. R., WYSOCKA, M., GREENLEE, B. M. *et al*. Inhibition of IL-12 production by thalidomide. *J.Immunol.* v.159, p.5157-5161, 1997.

MOSCHELLA, S. L. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. *J.Am.Acad.Dermatol.* v.51, p.417-426, 2004.

MOSER, M. & MURPHY, K. M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat.Immunol.* v.1, p.199-205, 2000.

MOZO, L., SUAREZ, A., GUTIERREZ, C. Glucocorticoids up-regulate constitutive interleukin-10 production by human monocytes. *Clin.Exp.Allergy* v.34, p.406-412, 2004.

MURRAY, P. J. & YOUNG, R. A. Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice. *Infect.Immun.* v.67, p.3087-3095, 1999.

NAKAMURA, K., SAITOH, A., YASAKA, N. *et al*. Molecular mechanisms involved in the migration of epidermal dendritic cells in the skin. *J.Investig.Dermatol Symp.Proc.* v.4, p.169-172, 1999.

NELMS, K., KEEGAN, A. D., ZAMORANO, J. *et al*. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu.Rev.Immunol.* v.17, p.701-738, 1999.

NIMMERJAHN, F. & RAVETCH, J. V. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv.Immunol.* v.96, p.179-204, 2007.

NOMAGUCHI, H., JAHAN, N., MANDAL, B. C. *et al*. IL-12 and IL-18 synergistically induce the bactericidal activity of murine peritoneal cells against *M. leprae*. *Nihon Hansenbyo.Gakkai Zasshi* v.70, p.113-119, 2001.

NOVAK, N. & BIEBER, T. 2. Dendritic cells as regulators of immunity and tolerance. *J.Allergy Clin.Immunol.* v.121, p.S370-S374, 2008.

O'GARRA, A. & ARAI, N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol.* v.10, p.542-550, 2000.

OBUCHOWICZ, E., KOWALSKI, J., LABUZEK, K. *et al*. Amitriptyline and nortriptyline inhibit interleukin-1 release by rat mixed glial and microglial cell cultures. *Int.J.Neuropsychopharmacol.* v.9, p.27-35, 2006.

PAN, P. Y., OZAO, J., ZHOU, Z. *et al*. Advancements in immune tolerance. *Adv.Drug Deliv.Rev.* v.60, p.91-105, 2008.

PANCRAZIO, J. J., KAMATCHI, G. L., ROSCOE, A. K. *et al*. Inhibition of neuronal Na^+ channels by antidepressant drugs. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* v.284, p.208-214, 1998.

PEISER, M., WANNER, R., KOLDE, G. Human epidermal Langerhans cells differ from monocyte-derived Langerhans cells in CD80 expression and in secretion of IL-12 after CD40 cross-linking. *J.Leukoc.Biol.*, 2004.

PENG, Y., MARTIN, D. A., KENKEL, J. *et al*. Innate and adaptive immune response to apoptotic cells. *J.Autoimmun.* v.29, p.303-309, 2007.

RAMBUKKANA, A. How does *Mycobacterium leprae* target the peripheral nervous system? *Trends Microbiol.* v.8, p.23-28, 2000.

_____. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Curr.Opin.Microbiol.* v.4, p.21-27, 2001.

RANDOLPH, G. J. Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Semin.Immunol.* v.13, p.267-274, 2001.

RANDOLPH, G. J., OCHANDO, J., PARTIDA-S NCHEZ. Migration of Dendritic Cell Subsets and their Precursors. *Annu.Rev.Immunol.*, 2007.

RAVETCH, J. & ADEREM, A. Phagocytic cells. *Immunol.Rev.* v.219, p.5-7, 2007.

ROMANI, N., HOLZMANN, S., TRIPP, C. H. *et al*. Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *APMIS* v.111, p.725-740, 2003.

ROWLAND, T. L., MCHUGH, S. M., DEIGHTON, J. *et al*. Differential regulation by thalidomide and dexamethasone of cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunopharmacology* v.40, p.11-20, 1998.

SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* v.101, p.455-458, 2000.

SALGADO, C. G. & CRUZ, C. A. V. Hanseníase: Análise dos dados epidemiológicos brasileiros em relação ao resto do mundo, com especial ênfase à Região norte do Brasil. *Coleção de Estudos Regionais sobre os Objeticos de Desenvolvimento do Milênio* v.Região Norte, p.184-190, 2007.

SALGADO, C. G., NAKAMURA, K., SUGAYA, M. *et al*. Differential effects of cytokines and immunosuppressive drugs on CD40, B7-1, and B7-2 expression on purified epidermal Langerhans cells. *J.Invest Dermatol* v.113, p.1021-1027, 1999a.

SALGADO, C. G., NAKAMURA, K., SUGAYA, M. *et al*. Functional CD40 ligand is expressed on epidermal Langerhans cells. *J.Leukoc.Biol.* v.66, p.281-285, 1999b.

SALLUSTO, F. & LANZAVECCHIA, A. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res.* v.4 Suppl 3, p.S127-S132, 2002.

SAMPAIO, E. P., HERNANDEZ, M. O., CARVALHO, D. S. *et al*. Management of erythema nodosum leprosum by thalidomide: thalidomide analogues inhibit *M. leprae*-induced TNF-alpha production *in vitro*. *Biomed.Pharmacother.* v.56, p.13-19, 2002.

SANCHEZ, C. & HYTTEL, J. Comparison of the effects of antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding. *Cell Mol.Neurobiol.* v.19, p.467-489, 1999.

SBH & SBD. Hanseníase: Estados Reacionais. *Projeto Diretrizes* p.1-19, 2003.

SCOLLARD, D. M., ADAMS, L. B., GILLIS, T. P. *et al*. The continuing challenges of leprosy. *Clin.Microbiol.Rev.* v.19, p.338-381, 2006.

SENA, C. B., SALGADO, C. G., TAVARES, C. M. *et al*. Cyclosporine A treatment of leprosy patients with chronic neuritis is associated with pain control and reduction in antibodies against nerve growth factor. *Lepr.Rev.* v.77, p.121-129, 2006.

SERBINA, N. V., JIA, T., HOHL, T. M. *et al*. Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annu.Rev.Immunol.*, 2007.

SERRES, M., VIAC, J., SCHMITT, D. Glucocorticoid receptor localization in human epidermal cells. *Arch.Dermatol Res.* v.288, p.140-146, 1996.

STEINMAN, R. M. Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS* v.111, p.675-697, 2003.

_____. Dendritic cells: understanding immunogenicity. *Eur.J.Immunol.* v.37 Suppl 1, p.S53-S60, 2007a.

_____. Lasker Basic Medical Research Award. Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. *Nat.Med.* v.13, p.1155-1159, 2007b.

STEINMAN, R. M., TURLEY, S., MELLMAN, I. *et al*. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J.Exp.Med.* v.191, p.411-416, 2000.

STERNBERG, E. M. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat.Rev.Immunol.* v.6, p.318-328, 2006.

STUMP, P. R. N. A. G., VIRMOND, M., BACCARELLI, R. *et al*. Dor Crônica em Hanseníase - Um Problema de Saúde Pública. *Boletim Epidemiológico Paulista* v.3, 2006.

SUDOH, Y., CAHOON, E. E., GERNER, P. *et al*. Tricyclic antidepressants as long-acting local anesthetics. *Pain* v.103, p.49-55, 2003.

TAJIMA, K., AMAKAWA, R., ITO, T. *et al*. Immunomodulatory effects of cyclosporin A on human peripheral blood dendritic cell subsets. *Immunology* v.108, p.321-328, 2003.

TAKEDA, K. & AKIRA, S. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells* v.6, p.733-742, 2001.

TAYLOR, A., VERHAGEN, J., BLASER, K. *et al*. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology* v.117, p.433-442, 2006.

TAYLOR, P. R., BROWN, G. D., REID, D. M. *et al*. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J.Immunol.* v.169, p.3876-3882, 2002.

TEO, S. K., RESZTAK, K. E., SCHEFFLER, M. A. *et al*. Thalidomide in the treatment of leprosy. *Microbes.Infect.* v.4, p.1193-1202, 2002.

TRIPATHI, S., BRUCH, D., KITTUR, D. S. Ginger extract inhibits LPS induced macrophage activation and function. *BMC.Complement Altern.Med.* v.8, p.1, 2008.

VALLADEAU, J., CLAIR-MONINOT, V., DEZUTTER-DAMBUYANT, C. *et al*. Identification of mouse langerin/CD207 in Langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues. *J.Immunol.* v.168, p.782-792, 2002.

VALLADEAU, J., RAVEL, O., DEZUTTER-DAMBUYANT, C. *et al*. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity.* v.12, p.71-81, 2000.

VAN BEERS, S. M., DE WIT, M. Y., KLATSER, P. R. The epidemiology of *Mycobacterium leprae*: recent insight. *FEMS Microbiol.Lett.* v.136, p.221-230, 1996.

VIEIRA, P. L., KALINSKI, P., WIERENGA, E. A. *et al*. Glucocorticoids inhibit bioactive IL-12p70 production by in vitro-generated human dendritic cells without affecting their T cell stimulatory potential. *J.Immunol.* v.161, p.5245-5251, 1998.

WANG, G. K., RUSSELL, C., WANG, S. Y. State-dependent block of voltage-gated Na+ channels by amitriptyline via the local anesthetic receptor and its implication for neuropathic pain. *Pain* v.110, p.166-174, 2004.

WATFORD, W. T., MORIGUCHI, M., MORINOBU, A. *et al*. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* v.14, p.361-368, 2003.

WOLTMAN, A. M., DE FIJTER, J. W., KAMERLING, S. W. *et al*. The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* v.30, p.1807-1812, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leprosy, 2005.

WU, J. J., HUANG, D. B., PANG, K. R. *et al*. Thalidomide: dermatological indications, mechanisms of action and side-effects. *Br.J.Dermatol.* v.153, p.254-273, 2005.

XIA, Z., DEPIERRE, J. W., NASSBERGER, L. Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1 beta and TNF-alpha release in human blood monocytes and IL-2 and interferon-gamma in T cells. *Immunopharmacology* v.34, p.27-37, 1996.

XIAO, L. & ENEROTH, P. Tricyclic antidepressants inhibit human natural killer cells. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* v.137, p.157-162, 1996.

ZHANG, X. & MOSSER, D. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J.Pathol.* v.214, p.161-178, 2008.

ZHU, X. Y., LIU, Y. J., DIAO, F. *et al*. Role of glucocorticoids and glucocorticoid receptor in priming of macrophages caused by glucocorticoid receptor blockade. *Endocrine.* v.31, p.130-137, 2007.

BMC Research Notes

SHORT REPORT Open Access

Effects of immunomodulatory drugs on TNF-α and IL-12 production by purified epidermal langerhans cells and peritoneal macrophages

Simone R Campelo[1], Moises B da Silva[1,2], José LF Vieira[3,4], Jorge P da Silva[1,4], Claudio G Salgado[1,2*]

Abstract

Background: Langerhans cells constitute a special subset of immature dendritic cells localized in the epidermis that play a key role in the skin's immune response. The production of cytokines is a key event in both the initiation and the regulation of immune responses, and different drugs can be used to remove or modify their production by DC and, therefore, alter immune responses in a broad spectrum of diseases, mainly in human inflammatory and autoimmune diseases. In the present study, we examined the effects of prednisone, thalidomide, cyclosporine A, and amitriptyline, drugs used in a variety of clinical conditions, on the production of TNF-α, IL-10, and IL-12 by purified epidermal Langerhans cells and peritoneal macrophages in BALB/c mice.

Findings: All drugs inhibited TNF-α production by Langerhans cells after 36 hours of treatment at two different concentrations, while prednisone and thalidomide decreased IL-12 secretion significantly, amitriptyline caused a less pronounced reduction and cyclosporine A had no effect. Additionally, TNF-α and IL-12 production by macrophages decreased, but IL-10 levels were unchanged after all treatments.

Conclusions: Our results demonstrate that these drugs modulate the immune response by regulating pro-inflammatory cytokine production by purified epidermal Langerhans cells and peritoneal macrophages, indicating that these cells are important targets for immunosuppression in various clinical settings.

Background

Dendritic cells (DC) are professional antigen-presenting cells (APC) that possess the unique ability to stimulate naïve T cells and initiate a primary immune response [1]. In the skin, the main DC populations present include epidermal DC (Langerhans cells) and dermal DC (myeloid DC and plasmacytoid DC). Langerhans cells (LC) are immature cells that reside in the epidermal layer and are distinct from other DC subsets [2].

In medicine, LC are often studied due to their role in numerous skin diseases, including psoriasis and contact and allergic dermatitis [3], and their ability to uptake antigen is crucial to inducing dermal immune response and tolerance [4]. Upon activation, LC gain the ability to produce chemokines [5] and pro-inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor-α (TNF-α) and IL-12 [6], which coordinate local and systemic inflammatory responses. TNF- α is a pleiotropic cytokine, produced primarily by monocytes and macrophages, which plays an important role in host immune responses. Antigen-presenting cells and phagocytic cells, including monocytes and macrophages, dendritic cells, and neutrophils, also are the primary producers of IL-12, an important regulatory cytokine that has a function central to the initiation and regulation of the adaptive immune response [7]. IL-10 is also an important immunoregulatory cytokine produced by many cell populations. Its main biological function seems to be the limitation and termination of inflammatory responses and the regulation of differentiation and proliferation of several immune cells, and the major source of IL-10 in vivo seems to be macrophages [8].

Different drugs may be used to modify cytokine production by DC and thus alter the initiation and regulation of immune responses to a broad spectrum of

* Correspondence: csalgado@ufpa.br
[1]Dermato-Immunology Laboratory, Federal University of Pará, Dr Marcello Candia Reference Unit in Sanitary Dermatology of the State of Pará, Marituba, PA, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2011 Salgado et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

diseases, such as human inflammatory and autoimmune diseases [9]. Immunosuppressive drugs used to treat dermatological conditions, control allograft rejection, and promote transplant tolerance are well recognized for their ability to inhibit lymphocyte activation and proliferation. These drugs may also affect the differentiation, viability, and functions of DC [10], resulting in suppressed T-cell responses. Such drugs promote T-cell unresponsiveness as a means for treating a variety of clinical conditions, including transplantation and autoimmune disorders and allergic hypersensitivity.

LC and macrophages (MΦ) are effective APC whose secretion of immunoregulatory and pro-inflammatory cytokines plays a critical role during T-cell priming [6]. To gain a better understanding of immunosuppressive drugs' influences on these APC and their potential to induce tolerance, the present study sought to examine the effects of prednisone, thalidomide, cyclosporine A, and amitriptyline on TNF-α, IL-10, and IL-12 production by epidermal LC and peritoneal MΦ *in vitro*.

Methods

Reagents

Prednisone, thalidomide, cyclosporine A, amitriptyline and LPS were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) and were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) or methanol to make 10^{-2} M stock solutions. ELISA kits for TNF-α, IL-12 (p40/p70), and IL-10 were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA).

Mice

Female BALB/c mice were provided by the Evandro Chagas Institute, where they were maintained under specific pathogen-free conditions until use at the age of 8-12 weeks. All procedures were carried out under the Brazilian Law 1153-A, which regulates animal research in Brazil, and were approved by animal ethics committee of Pará Federal University.

LC enrichment and culture

LC were prepared using the previously described panning method, resulting in a purity of over 95% [11]. Briefly, the murine epidermis was separated from the dermis after 3 h of treatment with dispase II (3000 U per ml, Sigma), a neutral protease, at 37°C and 5% CO_2. The epidermis was then incubated with DNAse enzyme (0.025%, Sigma) for 20 min at room temperature, after which an epidermal cell suspension was obtained by vigorous pipetting of the epidermal sheets. Next, the cell suspension was treated with mouse anti-mouse Ia^d (murine MHC allele) monoclonal antibody (1:600, BD PharMingen, San Diego, CA) for 45 min on ice. The cells were then incubated in plates coated with goat anti-mouse IgG (Jackson Immuno Research, West Grove, PA) (1:100) for an additional 45 min at 4°C. After washing away floating cells, adherent LC were collected and resuspended in complete medium, consisting of RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco, Grand Island, NY), 10000 U/ml penicillin/streptomycin solution (Sigma), and 50 μM β-mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, Germany), dispensed into 96-well flat bottom plates and incubated in humidified 5% CO_2 at 37°C. These cells are cultured in suspension and can be maintained in culture flasks that are not tissue-culture treated.

Cell viability assessment

After exposure to prednisone, thalidomide, cyclosporine A, or amitriptyline for 36 h, LC or MΦ were rinsed three times in phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with propidium iodide (10 μg/ml) immediately prior to flow cytometric analysis (Epics XL, Beckman Coulter, Miami, FL) or before mounting in dilute medium on a glass slide with coverslip to assess cell viability.

Preparation of peritoneal MΦ

MΦ were isolated from the peritoneal cavities of female BALB/c mice. Briefly, 10 ml of cold PBS was injected into the peritoneal cavity of each mouse and the resultant exudate was immediately collected, washed, and resuspended in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin/streptomycin solution and 50 μM β-mercaptoethanol. The cell suspension was then dispensed into 24-well flat bottom plates and incubated in humidified 5% CO_2 at 37°C for 1 h to allow MΦ adherence. The non-adherent cells were removed by three washes with RPMI-1640 medium. The purified MΦ were incubated for an additional 24 h with 1 ml RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin/streptomycin solution and 50 μM β-mercaptoethanol and 10 ng/ml lipopolysaccharide (LPS; Sigma) [12].

Drug treatment

In the culture experiments, purified LC (2×10^5 cells/well) or peritoneal MΦ (5×10^4 cells/well) were incubated with or without prednisone, thalidomide, cyclosporine A, or amitriptyline at varying concentrations (10^{-6} M, 10^{-8} M, or diluent alone) in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 10000 U/ml penicillin/streptomycin solution and 50 μM β-mercaptoethanol. Drug concentrations were chosen based on the results of preliminary studies which showed that these concentrations had no effects on the functions of other cell types [13,14].

Measurement on cytokine production

Culture supernatants were collected after 36 h, centrifuged, stored at -20°C and subjected to protein

quantification at the indicated time-points by ELISA, using mouse TNF-α, IL-12, and IL-10 immunoassay kits according to the manufacturer's instructions (BD Pharmingen). Protein levels were assessed using a microplate reader at 450 nm (MRX Revelation-DINEX, Chantilly, VA), and each sample was tested in triplicate. Data are expressed in pg/ml × 10^5 cells (LC) or pg/ml × 10^4 cells (peritoneal MΦ).

Statistical analysis

Data obtained from three independent experiments are presented as mean ± SD and were compared using the Student's t test for single comparisons or analysis of variance (ANOVA) for multiple comparisons. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

LC viability by propidium iodide staining

The viability of cultured LC was carefully checked in each experiment. By panning, we obtained about 95% of LC, with more than 90% viability (Table 1). After 36 hours in culture, cell viability decreased to approximately 70%, and was not affected by treatment with prednisone, thalidomide, cyclosporine A, or amitriptyline at 10^{-6} M or 10^{-8} M (Table 1).

Differential effect of immunomodulatory drugs on cytokine secretion by LC

The purified LC acquires mature phenotypes during culture even without exogenous stimulation [15]. We utilized those cells for *in vitro* culture system in which the interference of keratinocytes or keratinocytes-derived cytokines was negligible. To determine whether TNF-α and IL-12 were secreted into the culture medium by unstimulated LC after 36 hours, cytokine levels in the medium were quantified via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). TNF-α production (21.8 ± 1.4 pg/ml × 10^5 cells) decreased to 10.8 pg/ml × 10^5 cells ($p < 0.05$) after treatment with 10^{-6} M prednisone and to 9.5 pg/ml × 10^5 cells ($p < 0.05$) after treatment with 10^{-8} M prednisone, corresponding to an almost 50% reduction (Table 2). LC treatment with thalidomide resulted in significant inhibition of TNF-α secretion, decreasing from 21.8 ± 1.4 pg/ml × 10^5 cells to 7.8 ± 1.7 pg/ml × 10^5 cells at 10^{-6} M (64% reduction, $p < 0.05$) and to 4.4 ± 3.8 pg/ml × 10^5 cells at 10^{-8} M (80% reduction, $p < 0.01$) (Table 2). Following cyclosporine A treatment, TNF-α production was lowered to 5.8 ± 0.4 pg/ml × 10^5 cells at 10^{-6} M (73% reduction, $p < 0.01$) and to 7.6 ± 0.5 pg/ml × 10^5 cells at 10^{-8} M (65% reduction, $p < 0.01$) (Table 2). Similarly, TNF-α release by LC was reduced by amitriptyline, but this reduction was less pronounced than that induced by each of the three other compounds over the same time period. Specifically, amitriptyline decreased TNF-α secretion by 55% at 10^{-6} M (9.7 ± 2.2 pg/ml × 10^5 cells, $p < 0.05$) and by 44% at 10^{-8} M (12.2 ± 0.6 pg/ml × 10^5 cells, $p < 0.05$). IL-12 production (9.4 ± 0.5 pg/ml × 10^5 cells) decreased to 2.9 ± 0.7 pg/ml × 10^5 cells ($p < 0.01$) after treatment with 10^{-6} M prednisone and to 4.0 ± 1.1 pg/ml × 10^5 cells ($p < 0.01$) after treatment with 10^{-8} M prednisone, corresponding to a 69% and 57% reduction, respectively (Table 2). LC treatment with thalidomide resulted in significant inhibition of IL-12 production, decreasing from 9.4 ± 0.5 pg/ml × 10^5 cells to 4.8 ± 0.5 pg/ml × 10^5 cells at 10^{-6} M (49% reduction, $p < 0.01$) and to 3.5 ± 1.8 pg/ml × 10^5 cells at 10^{-8} M (62% reduction, $p < 0.01$) (Table 2). Following cyclosporine A treatment, no significant reduction in IL-12 secretion was noted for any of the two concentrations tested (Table 2). Similarly,

Table 1 LC viability after treatment with immunomodulatory drugs[a]

	Concentration	Viability (%)
Freshly isolated LC	-	94.4 ± 2.1
36 h cultured LC	-	73.3 ± 2.8
Prednisone	10^{-6} M	69.9 ± 3.7
	10^{-8} M	66.7 ± 5.5
Thalidomide	10^{-6} M	63.5 ± 3.2
	10^{-8} M	61.4 ± 2.1
Cyclosporine A	10^{-6} M	62.2 ± 6.4
	10^{-8} M	61.2 ± 10.7
Amitriptyline	10^{-6} M	66.2 ± 2.2
	10^{-8} M	64.6 ± 1.7

[a]Purified LC were cultured for 36 h in the presence or absence of 10^{-6} M or 10^{-8} M prednisone, thalidomide, cyclosporine A, or amitriptyline. Cell viability was then assessed using propidium iodide. All results are shown as mean ± SD for three independent experiments, which did not vary significantly from the control.

Table 2 *In vitro* effects of two different concentrations of immunomodulatory drugs on TNF-α and IL-12 production by LC[a]

	Concentration	TNF-α (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)
36 h cultured LC	-	21.8 ± 1.4	9.4 ± 0.5
Prednisone	10^{-6} M	10.8 ± 2.0*	2.9 ± 0.7**
	10^{-8} M	9.5 ± 0.9*	4.0 ± 1.1**
Thalidomide	10^{-6} M	7.8 ± 1.7*	4.8 ± 0.5**
	10^{-8} M	4.4 ± 3.8**	3.5 ± 1.8**
Cyclosporine A	10^{-6} M	5.8 ± 0.4**	8.7 ± 0.4
	10^{-8} M	7.6 ± 0.5**	8.5 ± 0.6
Amitriptyline	10^{-6} M	9.7 ± 2.2*	6.4 ± 0.3*
	10^{-8} M	12.2 ± 0.6*	7.4 ± 2.7

[a]Purified LC were cultured for 36 h in the presence or absence of 10^{-6} M or 10^{-8} M prednisone, thalidomide, cyclosporine A, or amitriptyline. TNF-α and IL-12 levels in the culture supernatant were quantified by ELISA. All results are shown as mean ± SD for three independent experiments. *$p < 0.05$ vs. control. **$p < 0.01$ vs. control.

amitriptyline inhibited IL-12 secretion by 32% at 10^{-6} M (6.4 ± 0.3 pg/ml × 10^5 cells, $p < 0.05$), while the lowest dose of the same drug did not have a statistically significant effect. Additionally, no IL-10 release was detected in the culture supernatants over the 36-hour incubation period (data not shown).

MΦ viability by propidium iodide staining

After exposure to prednisone, thalidomide, cyclosporine A, or amitriptyline for 36 h, we assessed the cell viability of cultured MΦ by PI staining. None of the immunomodulatory drugs used affected the cell viability of cultured MΦ (Table 3).

Differential effect of immunomodulatory drugs on cytokine secretion by MΦ

MΦ incubated with LPS for 36 hours secreted TNF-α, IL-12 and IL-10 at the following respective levels: 294 ± 33.9 pg/ml × 10^4 cells, 258 ± 27.7 pg/ml × 10^4 cells, and 195 ± 12.8 pg/ml × 10^4 cells (Table 4). A significant decrease in TNF-α production by LPS-stimulated MΦ was observed after prednisone treatment at 10^{-6} M or 10^{-8} M ($p < 0.05$), corresponding with a 56% or 53% (129.6 ± 33.0 pg/ml × 10^4 cells or 138.2 ± 6.0 pg/ml × 10^4 cells) reduction. Thalidomide at 10^{-6} M downregulated TNF-α secretion by 65.6%, to 100.9 ± 9.0 pg/ml × 10^4 cells ($p < 0.01$), while LPS-stimulated MΦ incubated with 10^{-8} M thalidomide exhibited a slight, but statistically insignificant, reduction in TNF-α release. Similarly, cyclosporine A reduced TNF-α secretion significantly (117.4 ± 59.7 pg/ml × 10^4 cells) but only at the highest dose, while the lowest dose of the same drug did not have a statistically significant effect. When LPS-stimulated MΦ were incubated with 10^{-6} M amitriptyline, TNF-α release was reduced from 339.3 ± 82.3 pg/ml × 10^4 cells to 120.6 ± 16.9 pg/ml × 10^4 cells (60% reduction, $p < 0.05$), while 10^{-8} M amitriptyline caused no significant reduction (Table 4).

IL-12 secretion was also significantly downregulated ($p < 0.05$) by prednisone at 10^{-8} M (149.4 ± 7.5 pg/ml × 10^4 cells), thalidomide at 10^{-6} M (139.0 ± 9.8 pg/ml × 10^4 cells), cyclosporine A at 10^{-8} M (149.7 ± 9.1 pg/ml × 10^4 cells), and amitriptyline at both 10^{-6} M and 10^{-8} M (150.0 ± 5.4 pg/ml × 10^4 cells and 148.6 ± 8.6 pg/ml × 10^4 cells), all corresponding to about a 40% reduction. Meanwhile, IL-10 levels by LPS-stimulated MΦ were not altered by any of the drugs tested (Table 4).

Table 3 Peritoneal MΦ viability after treatment with immunomodulatory drugs[a]

	Concentration	Viability (%)
36 h cultured Mφ	-	95.8 ± 1.5
Prednisone	10^{-6} M	84.2 ± 2.5
	10^{-8} M	86.1 ± 1.7
Thalidomide	10^{-6} M	85.4 ± 3.2
	10^{-8} M	86.9 ± 2.2
Cyclosporine A	10^{-6} M	85.5 ± 2.3
	10^{-8} M	88.2 ± 3.7
Amitriptyline	10^{-6} M	83.8 ± 2.9
	10^{-8} M	87.7 ± 0.8

[a]Purified MΦ were first pre-incubated for 24 h with 10 ng/ml LPS, and then cultured for 36 h in the presence or absence of 10^{-6} M or 10^{-8} M prednisone, thalidomide, cyclosporine A, or amitriptyline. Cell viability was then assessed using propidium iodide. All results are shown as mean ± SD for three independent experiments, which did not vary significantly from the control.

Discussion

Epidermal DC are believed to be involved in allergic and irritant contact dermatitis [16], as well as in autoimmune disease [17]. One approach to improving DC tolerogenicity is suppression of their maturation using anti-inflammatory cytokines or pharmacological agents [18]. In the present study, we demonstrate that several immunomodulatory drugs markedly downregulated TNF-α and IL-12 secretion by unstimulated cultured purified LC and by LPS-stimulated MΦ without diminishing cell viability.

We found that *in vitro* TNF-α and IL-12 production by unstimulated cultured LC was reduced by prednisone. Previous data demonstrated that DC derived from human monocytes were similarly suppressed by dexamethasone [19]. Our results show that prednisone also inhibits LPS-stimulated MΦ production of TNF-α, corroborating a previous study that demonstrated suppressed TNF-α secretion by peripheral blood monocytes pre-incubated with LPS for 24 or 48 hours, and then treated with dexamethasone. The same study also showed that, depending on the amplitude of LPS stimulation, glucocorticoids increased IL-10 secretion at low doses and decreased IL-10 release at high doses [20]. Other research showed that methylprednisolone consistently induces IL-10 production by human alveolar MΦ when cells are exposed to the drug for up to 20 hours, followed by LPS stimulation [21]. All of the *in vitro* data summarized above appear to disagree with our findings, since we did not see a consistent change in IL-10 production due to prednisone treatment. This discrepancy may be due to differences in the experimental setup, including the fact that previous studies added glucocorticoids before or together with LPS and used human cells. Thus, the type of stimulus and cell source may influence the effects of glucocorticoids on IL-10 secretion.

Prednisone also inhibited the IL-12 secretion by LPS-stimulated MΦ after 36 hours of treatment. This finding corroborates published data showing that MΦ treated with dexamethasone for 18 hours, followed by stimulation with Listeria antigen for two days, exhibited significantly reduced IL-12 production [22].

Table 4 *In vitro* effects of two different concentrations of immunomodulatory drugs on TNF-α, IL-12, and IL-10 production by MΦ[a]

	Concentration	TNF-α (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
36 h cultured Mφ	-	339.3 ± 82.3	255.1 ± 27.5	195.0 ± 12.8
Prednisone	10^{-6} M	129.6 ± 33.0*	184.6 ± 48.1	209.8 ± 17.3
	10^{-8} M	138.2 ± 6.0*	149.4 ± 7.5**	193.5 ± 29.8
Thalidomide	10^{-6} M	100.9 ± 9.0**	149.0 ± 14.9*	221.2 ± 22.7
	10^{-8} M	228.6 ± 78.9	192.9 ± 63.1	160.1 ± 29.8
Cyclosporine A	10^{-6} M	117.4 ± 59.7*	190.6 ± 10.8	212.4 ± 4.8
	10^{-8} M	215.4 ± 32.3	150.1 ± 11.9**	184.2 ± 21.9
Amitriptyline	10^{-6} M	139.7 ± 49.2*	157.0 ± 27.6*	200.2 ± 10.2
	10^{-8} M	198.8 ± 47.2	147.1 ± 47.4*	207.5 ± 8.1

[a]Purified MΦ were pre-incubated for 24 h with 10 ng/ml LPS and cultured for 36 h in the presence or absence of 10^{-6} M or 10^{-8} M prednisone, thalidomide, cyclosporine A, or amitriptyline. TNF-α, IL-12, and IL-10 levels in the culture supernatant were quantified by ELISA. All results are shown as mean ± SD for three independent experiments. *$p < 0.05$ vs. control. **$p < 0.01$ vs. control.

Thalidomide has been shown to profoundly inhibit the ability of LC to present skin-purified antigens and to produce TNF-α [23]. Our data were consistent with these earlier findings, demonstrating that thalidomide markedly reduced TNF-α generation by unstimulated cultured LC after 36 hours of treatment. Previous studies also demonstrated that thalidomide has inhibitory effects on TNF-α secretion by unstimulated peripheral blood cells treated for two days [13]. Thalidomide may curtail TNF-α production by inhibiting degradation of the inhibitor of kappa B (IκB) and thus, NF-κB-mediated expression of TNF-α mRNA [24]. Here, we also detected downregulation of TNF-α production by LPS-stimulated MΦ after thalidomide treatment. Furthermore, we found also that IL-12 production by unstimulated cultured LC was strongly suppressed by both concentrations of thalidomide, and that IL-12 secretion by LPS-stimulated MΦ was reduced by high concentrations of thalidomide (10^{-6} M), supporting previous studies showing that thalidomide inhibits IL-12 production by LPS-stimulated monocytes [25]. Another study suggested suppression of TNF-α and IL-12 as a possible mechanism of thalidomide's clinical effects in Crohn's disease, which improves clinical symptoms in patients [26], what may explain its clinical efficacy.

We next examined the effects of cyclosporine A on unstimulated cultured LC. TNF-α production by LC was inhibited at both concentrations of cyclosporine A, suggesting that the effects of this drug are similar to those of prednisone and thalidomide. However, we observed no significant changes in the IL-12 secretion by cyclosporine A-treated LC, despite previous observations that the drug blocked IL-12 production by CD40-stimulated monocyte-derived DC [19]. It is possible that cyclosporine A exerts inhibitory effects at different sites in these two types of APC, resulting in inhibited IL-12 secretion in DC but not in LC. This divergent outcome may be due to the cells' different maturation states or levels of IL-12 production [27].

Although the mechanism underlying cyclosporine A effects on LC remains to be elucidated, our results support the hypothesis that cyclosporine A inhibits unstimulated cultured LC TNF-α secretion.

Other investigators have also observed decreased basal TNF-α secretion by the monocyte cell line U936 [28] cultured with cyclosporine A for 18 hours at various concentrations, in either the presence or the absence of LPS. Another study has demonstrated that cyclosporine A inhibits IL-12 production and stimulates IL-10 secretion by subtypes of peripheral blood DC (CD11c+ and CD11c-) [29]. In our study, we observed that cyclosporine A inhibition of TNF-α and IL-12 production by LPS-stimulated MΦ only occurred at the highest drug concentration. Recently, it was reported that the immunomodulatory effects of cyclosporine A may be dose-dependent and may be due to inhibition of such transcription factors such as NF-κB and activator protein-1 (AP-1) by regulating the Ca+ signaling pathway (calmodulin and calmodulin-dependent protein kinase-II, or CaMK-II) [30]. Although the effects of cyclosporine A on LC cytokine production are not well understood, the drug may act by suppressing the number, DNA synthesis, and function of these cells [31].

We also examined the effects of amitriptyline on LC and MΦ cytokine secretion. Despite recent work showing that amitriptyline plays an immunomodulatory role, little is known about its mechanism of action and target immune cells. It was previously reported that similar tricyclic antidepressants, such as clomipramine, imipramine, and citalopram, cause reduction in TNF-α release by LPS-stimulated peripheral blood monocytes [32]. Recently, one study demonstrated that amitriptyline and its metabolite, nortriptyline, decreases TNF-α secretion by glial cells [33], which take part in the immune response of central nervous system. However, other

recent research using whole blood stimulated by LPS or concanavalin A did not detect any effect of such antidepressants as desipramine, clomipramine, and trimipramine on TNF-α and IL-12 production [34]. Meanwhile, our data revealed that amitriptyline inhibits TNF-α and IL-12 secretion by both cell types studied, confirming previous studies using cultured cells. While the immunomodulatory activity of antidepressants on cytokine production is not yet fully characterized, it is believed that one underlying mechanism is an increase in intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) [32]. These drugs may also influence immunocompetent cells cytokine secretion by binding to surface serotonin receptors [35]. Some researchers may not have observed similar antidepressant effects on immunocompetent cells TNF-α secretion because they did not specifically use non-tricyclic antidepressants. Moreover, many of these studies analyzed whole blood, which may contain other cells that affect TNF-α production by releasing cytokines or even by direct cell-cell contact.

In summary, the study indicates that there are differential regulation by immunosuppressive drugs on TNF-α and IL-12 production by LC and MΦ, which constitute important targets for immunomodulatory drugs. Further *in vitro* and *in vivo* studies are necessary to substantiate these findings and to provide further information on the mode of action of prednisone, thalidomide, cyclosporine A and amitriptyline on a cellular and molecular level.

List of abbreviations

APC: antigen-presenting cells; DC: dendritic cells; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; IL-10: interleukin-10; IL-12: interleukin-12; LC: Langerhans cells; LPS: lipopolysaccharide; MΦ: macrophages; NF-κB: nuclear factor-kappa B; TNF-α: tumor necrosis factor-α.

Acknowledgements

This work was supported by Secretaria Executiva de Saúde Pública do Estado do Pará (SESPA), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde do Brasil (SCTIE, MS), and Financiadora de Estudos e Projetos do Governo Federal, Ministério da Ciência e Tecnologia (FINEP).

Author details

[1]Dermato-Immunology Laboratory, Federal University of Pará, Dr Marcello Candia Reference Unit in Sanitary Dermatology of the State of Pará, Marituba, PA, Brazil. [2]Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil. [3]Toxicology Laboratory, Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil. [4]Faculty of Pharmacy, Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil.

Authors' contributions

SRC participated in the design of the study, carried out some of the literature searches, conducted the experiments and drafted the manuscript. MBS participated in the design of the study, conducted the experiments and synthesized the findings. JLFV provided some drugs for the study. JPS participated in the design of the study and carried out some of the literature searches. CGS participated in the design of the study, synthesized the findings and edited the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 18 May 2010 Accepted: 28 January 2011
Published: 28 January 2011

References

1. Steinman RM, Banchereau J: **Taking dendritic cells into medicine.** *Nature* 2007, **449**:419-426.
2. Merad M, Romani N, Randolph G: **Langerhans cells at the interface of medicine, science, and industry.** *J Invest Dermatol* 2008, **128**:251-255.
3. Callard RE, Harper JI: **The skin barrier, atopic dermatitis and allergy: a role for Langerhans cells?** *Trends Immunol* 2007, **28**:294-298.
4. Berger CL, Vasquez JG, Shofner J, Mariwalla K, Edelson RL: **Langerhans cells: mediators of immunity and tolerance.** *Int J Biochem Cell Biol* 2006, **38**:1632-1636.
5. Fujita H, Asahina A, Sugaya M, Nakamura K, Gao P, Fujiwara H, Tamaki K: **Differential production of Th1- and Th2-type chemokines by mouse Langerhans cells and splenic dendritic cells.** *J Invest Dermatol* 2005, **124**:343-350.
6. Tada Y, Asahina A, Fujita H, Mitsui H, TORII H, Watanabe T, Tamaki K: **Differential effects of LPS and TGF-beta on the production of IL-6 and IL-12 by Langerhans cells, splenic dendritic cells, and macrophages.** *Cytokine* 2004, **25**:155-161.
7. Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ: **The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2003, **14**:361-368.
8. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB: **Interleukin-10 and related cytokines and receptors.** *Annu Rev Immunol* 2004, **22**:929-979.
9. Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J: **Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2008, **19**:41-52.
10. Hackstein H, Thomson AW: **Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs.** *Nat Rev Immunol* 2004, **4**:24-34.
11. Salgado CG, Nakamura K, Sugaya M, Tada Y, Asahina A, Koyama Y, Irie S, Tamaki K: **Functional CD40 ligand is expressed on epidermal Langerhans cells.** *J Leukoc Biol* 1999, **66**:281-285.
12. Kim HY, Kim JR, Kim HS: **Upregulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-10 by prostaglandin A1 in mouse peritoneal macrophages.** *J Microbiol Biotechnol* 2008, **18**:1170-1178.
13. Rowland TL, McHugh SM, Deighton J, Dearman RJ, Ewan PW, Kimber I: **Differential regulation by thalidomide and dexamethasone of cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells.** *Immunopharmacology* 1998, **40**:11-20.
14. Salgado CG, Nakamura K, Sugaya M, Tada Y, Asahina A, Fukuda S, Koyama Y, Irie S, Tamaki K: **Differential effects of cytokines and immunosuppressive drugs on CD40, B7-1, and B7-2 expression on purified epidermal Langerhans cells.** *J Invest Dermatol* 1999, **113**:1021-1027.
15. Tada Y, Asahina A, Nakamura K, Tomura M, Fujiwara H, Tamaki K: **Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor inhibits IL-12 production of mouse Langerhans cells.** *J Immunol* 2000, **164**:5113-5119.
16. Toebak MJ, Gibbs S, Bruynzeel DP, Scheper RJ, Rustemeyer T: **Dendritic cells: biology of the skin.** *Contact Dermatitis* 2009, **60**:2-20.
17. El Marsafy S, Bagot M, Bensussan A, Mauviel A: **Dendritic cells in the skin - potential use for melanoma treatment.** *Pigment Cell Melanoma Res* 2009, **22**:30-41.
18. Van Kooten C, Woltman AM: **Dendritic cells as a target of immunosuppressive drugs.** *Transplantation Review* 2004, **18**:70-79.
19. Woltman AM, de Fijter JW, Kamerling SW, Paul LC, Daha MR, Van Kooten C: **The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells.** *Eur J Immunol* 2000, **30**:1807-1812.
20. Franchimont D, Martens H, Hagelstein MT, Louis E, Dewe W, Chrousos GP, Belaiche J, Geenen V: **Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor.** *J Clin Endocrinol Me tab* 1999, **84**:2834-2839.

21. Frankenberger M, Haussinger K, Ziegler-Heitbrock L: **Liposomal methylprednisolone differentially regulates the expression of TNF and IL-10 in human alveolar macrophages.** *Int Immunopharmacol* 2005, **5**:289-299.
22. DeKruyff RH, Fang Y, Umetsu DT: **Corticosteroids enhance the capacity of macrophages to induce Th2 cytokine synthesis in CD4+ lymphocytes by inhibiting IL-12 production.** *J Immunol* 1998, **160**:2231-2237.
23. Deng L, Ding W, Granstein RD: **Thalidomide inhibits tumor necrosis factor-alpha production and antigen presentation by Langerhans cells.** *J Invest Dermatol* 2003, **121**:1060-1065.
24. Paul SC, Lv P, Xiao YJ, An P, Liu SQ, Luo HS: **Thalidomide in rat liver cirrhosis: blockade of tumor necrosis factor-alpha via inhibition of degradation of an inhibitor of nuclear factor-kappaB.** *Pathobiology* 2006, **73**:82-92.
25. Moller DR, Wysocka M, Greenlee BM, Ma X, Wahl L, Flockhart DA, Trinchieri G, Karp CL: **Inhibition of IL-12 production by thalidomide.** *J Immunol* 1997, **159**:5157-5161.
26. Bauditz J, Wedel S, Lochs H: **Thalidomide reduces tumour necrosis factor alpha and interleukin 12 production in patients with chronic active Crohn's disease.** *Gut* 2002, **50**:196-200.
27. Peiser M, Wanner R, Kolde G: **Human epidermal Langerhans cells differ from monocyte-derived Langerhans cells in CD80 expression and in secretion of IL-12 after CD40 cross-linking.** *J Leukoc Biol* 2004.
28. Garcia JE, de Cabo MR, Rodriguez FM, Losada JP, Lopez AJ, Arellano JL: **Effect of cyclosporin A on inflammatory cytokine production by U937 monocyte-like cells.** *Mediators Inflamm* 2000, **9**:169-174.
29. Tajima K, Amakawa R, Ito T, Miyaji M, Takebayashi M, Fukuhara S: **Immunomodulatory effects of cyclosporin A on human peripheral blood dendritic cell subsets.** *Immunology* 2003, **108**:321-328.
30. Ma W, Mishra S, Gee K, Mishra JP, Nandan D, Reiner NE, Angel JB, Kumar A: **Cyclosporin A and FK506 inhibit IL-12p40 production through the calmodulin/calmodulin-dependent protein kinase-activated phosphoinositide 3-kinase in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells.** *J Biol Chem* 2007, **282**:13351-13362.
31. Borghi-Cirri MB, Riccardi-Arbi R, Bacci S, Mori M, Pimpinelli N, Romagnoli P, Filipponi F: **Inhibited differentiation of Langerhans cells in the rat epidermis upon systemic treatment with cyclosporin A.** *Histol Histopathol* 2001, **16**:107-112.
32. Xia Z, DePierre JW, Nassberger L: **Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1 beta and TNF-alpha release in human blood monocytes and IL-2 and interferon-gamma in T cells.** *Immunopharmacology* 1996, **34**:27-37.
33. Obuchowicz E, Kowalski J, Labuzek K, Krysiak R, Pendzich J, Herman ZS: **Amitriptyline and nortriptyline inhibit interleukin-1 release by rat mixed glial and microglial cell cultures.** *Int J Neuropsychopharmacol* 2006, **9**:27-35.
34. Diamond M, Kelly JP, Connor TJ: **Antidepressants suppress production of the Th1 cytokine interferon-gamma, independent of monoamine transporter blockade.** *Eur Neuropsychopharmacol* 2006, **16**:481-490.
35. Maes M, Song C, Lin AH, Bonaccorso S, Kenis G, De Jongh R, Bosmans E, Scharpe S: **Negative immunoregulatory effects of antidepressants: inhibition of interferon-gamma and stimulation of interleukin-10 secretion.** *Neuropsychopharmacology* 1999, **20**:370-379.

doi:10.1186/1756-0500-4-24
Cite this article as: Campelo *et al.*: Effects of immunomodulatory drugs on TNF-α and IL-12 production by purified epidermal langerhans cells and peritoneal macrophages. *BMC Research Notes* 2011 **4**:24.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central