ALEXANDRA DOS ANJOS CASSADO

**Papel da flagelina e de lipopolissacarídeos
bacterianos na ativação de populações
heterogêneas de macrófagos**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de mestre
em Ciências (Imunologia).

São Paulo

2007

ALEXANDRA DOS ANJOS CASSADO

**Papel da flagelina e de lipopolissacarídeos
bacterianos na ativação de populações
heterogêneas de macrófagos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de mestre em Ciências (Imunologia).

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Dr^a. Karina Ramalho Bortoluci Bastos

São Paulo

2007

DEDICATÓRIA

Dedico o presente trabalho aos meus PAIS...

***Que tiveram a difícil tarefa de me educar e me ensinar o que é amor, coragem e
compreensão...***

Que estão sempre prontos para enfrentar comigo cada etapa da minha vida...

***Que me auxiliam na escolha do melhor caminho a ser seguido, nos momentos
em que as dúvidas tomam meu coração...***

***E, por fim, que oferecem um consolo e uma segurança que não podem ser
encontrados em qualquer outro lugar, quando as ocasiões se tornam difíceis.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço às pessoas que ajudaram diretamente na realização deste trabalho e àquelas que, sem o saberem, muito contribuíram para a sua concretude.

***À minha família,** companheiros de todas as horas que, mesmo à distância, foram essenciais para minha formação. Meus agradecimentos por terem se privado da minha companhia, devido aos meus estudos, concedendo-me a oportunidade de me realizar ainda mais.*

***Ao meu querido Lucas,** que estava comigo nos momentos mais felizes e mais difíceis, sempre me incentivando e me apoiando. Muito obrigada por todo seu amor, carinho, atenção e companheirismo...*

***À minha orientadora Karina Bastos,** que transmitiu conhecimentos e experiências essenciais para minha formação e para meu crescimento intelectual. Meus agradecimentos por ter acreditado, confiado, ensinado e ter sido minha amiga ou até mesmo mãe por todo esse tempo...*

***À Carinhinha,** que dividiu comigo todos os momentos durante essa etapa da minha vida, tornando-os engraçados e agradáveis. Meus agradecimentos pelo carinho e atenção, além do grande auxílio durante os experimentos...*

***Ao Momtchilo Russo,** que me recebeu em seu laboratório. Obrigada pelas valiosas discussões imunológicas que muito contribuíram para minha formação...*

***Aos companheiros de trabalho Juciane, Lucas, Karina Carla, Esther, Érica, Juliana, Lili, David e Renato.** Obrigada pela amizade e agradáveis dias que passamos juntos durante esse período...*

—

Ao grupo da Profª Sonia Jancar, que estavam sempre dispostos a ajudar. Muito obrigada pelos reagentes cedidos e pelas conversas de corredores que em muitos momentos me fizeram despertar para as coisas realmente importantes...

Aos colaboradores Profº Luis Carlos Ferreira e Liliana Massis por terem cedido a flagelina purificada... Lili, obrigada pelas inúmeras purificações...

Aos componentes da Banca de Qualificação Maria Regina D'Império Lima, Sonia Jancar e Nancy Starobinas, que muito contribuíram para a finalização dessa dissertação...

Àqueles que por ventura deixei de mencionar e que contribuíram para a realização desse trabalho.

A todos vocês, o meu muito obrigada!!!

—

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Resumo

CASSADO A.A. **Papel da flagelina e de lipopolissacarídeos bacterianos na ativação de populações heterogêneas de macrófagos**. 2007.78f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Os macrófagos (MO) são populações heterogêneas de células residentes em diversos tecidos, onde iniciam a resposta imune através do reconhecimento de padrões moleculares de patógenos. Para avaliar a modulação funcional dessas populações, MO peritoneais (PM) e alveolares (AM), com perfil M1 e M2, foram ativados *in vivo* por flagelina (FliCi) e lipopolissacarídeos bacterianos (LPS). Esse trabalho mostra que o microambiente parece influenciar a resposta diferencial das populações de MO, uma vez que a expressão de MHCII, CD80, CD86 e CD40 e produção de NO por PM são mais intensamente modulados por FliCi, enquanto os AM são mais sensíveis ao LPS. Porém, dentro da população de PM, encontramos duas subpopulações distintas, nomeadas F4/80^{hi} e F4/80^{lo}. A população F4/80^{hi} parece adquirir um perfil M1 após estímulo com FliCi, com alta expressão de iNOS, enquanto a população F4/80^{lo} apresenta um perfil M2, com maior expressão basal de mTGF- β , indicando que a heterogeneidade dos MO também pode estar expressa no mesmo microambiente.

Palavras-chave: Macrófagos, Inflamação, Receptores do tipo *Toll*, Flagelina, Lipopolissacarídeo, Heterogeneidade.

ABSTRACT

CASSADO A.A. **The role of bacterial flagellin and lipopolysaccharide on the activation of heterogeneous macrophage subpopulations.** 2007.78f. Máster Thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Macrophages (MO) are a heterogeneous cell population that resides in distinct tissues, where they trigger the immune response through the recognition of pathogen-associated molecular patterns. To evaluate the functional modulation of these populations, peritoneal (PM) and alveolar (AM) MO, from M1 and M2 profile, were *in vivo* activated by flagellin (FliCi) and bacterial lipopolysaccharide (LPS). In this study we show that microenvironment seems to influence the differential responses of MO populations, since MHCII, CD80, CD86 e CD40 expression and NO production by PM are more intensely modulated by FliCi whereas AM are more sensitive to LPS. However, we found two distinct subpopulations within PM, named F4/80^{hi} e F4/80^{lo}. F4/80^{hi} cells show a M1 profile after FliCi stimulation, with high iNOS expression, and F4/80^{lo} population presents a M2 profile, with higher basal expression of mTGF- β , indicating that the MO heterogeneity can also be finding in the same microenvironment.

Key-words: Macrophages, Inflammation, *Toll* Like Receptors, Flagellin, Lipopolysaccharide, Heterogeneity.

LISTA DE ABREVIATURAS

Apaf: “Apoptotic protease activating factor” (Fator de ativação de protease apoptótica)

BAL: “Bronchoalveolar lavage” (Lavado bronqueoalveolar)

CAA: “Adherents alveolar cells” (Células alveolares aderentes)

CPA: “Adherents peritoneal cells” (Células peritoneais aderentes)

FliCi: “Flagellin” (Flagelina)

GPI: “Phosphatidylinositol” (Glicofosfatidil inositol)

HO-1: “Heme-oxygenase-1” (Heme-oxigenase-1)

IC: “Immune complex” (Imunocomplexo)

ICE: “IL-1 beta Converting enzyme” (Enzima de conversão de IL-1 beta)

IDO: “Indolamina dioxigenase” (Indolamina dioxigenase)

IFN-γ: “Interferon gama” (Interferon gama)

IL: “Interleukin” (Interleucina)

i.n.: “Intranasal” (Intranasal)

Ipaf: “ICE- protease activating factor” (Fator de ativação de protease ICE)

i.p.: “Intraperitoneal” (Intraperitoneal)

LPS: “Lipopolysaccharid” (Lipopolissacarídeo)

LRR: “Leucin rich repeats” (Sequência rica em leucina)

M1: “M1 Macrophages” (Macrófagos M1)

M2: “M2 Macrophages” (Macrófagos M2)

MAL/TIRAP: “MyD88-adaptor like/TIR-associated protein” (Proteína associada ao TIR)

MHCII: “Major histocompatibility complex” (Complexo principal de histocompatibilidade)

MIF: “Mean of fluorescence intensity” (Média de intensidade de fluorescência)

—

MPO: “Mieloperoxidase” (Mieloperoxidase)

MyD88: “Myeloid differentiation factor 88” (Fator de diferenciação mielóide 88)

Naip: “Neuronal apoptosis inhibitor protein” (Proteína inibidora de apoptose neuronal)

NLR: “NOD like receptors” (Receptores do Tipo NOD)

NO: “Nitric Oxide” (Óxido nítrico)

NOD: “Nucleotide-binding oligomerization domain” (Domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo)

PEC: “Peritoneal Cavity” (Cavidade Peritoneal)

SA: “Streptoavidin” (Estreptoavidina)

TGF- β : “Transforming growth factor beta” (Fator beta de transformação do crescimento)

TIR: “*Tol*//IL-1R domain” (Domínio *Tol*//IL-1R)

TLR: “*Tol* like receptors” (Receptores do Tipo *Tol*)

TRAM: “TRIF- related adaptor molecule” (Molécula adaptadora relacionada ao TRIF)

TRIF: “*Tol*//IL-1R domain – Containing adaptor inducing IFN-beta”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da FliCi. Bactérias flageladas apresentam o complexo flagelar, cada flagelo é composto por protofilamento os quais são formados por monômeros de flagelina **(A)**. Cada monômero e flagelina é constituído por domínios **(B)**. Flagelina interage com seu receptor para padrão molecular (TLR5) **(C)**. Página 22.

Figura 2: FliCi total e FliCi purificada após cromatografia. A flagelina é extraída da bactéria *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* SL3261 e a seguir passa por uma coluna de cromatografia para purificação. A figura mostra o gel de proteína antes e após a purificação.

Figura 3: Migração celular em resposta à FliCi e ao LPS. Camundongos C57Bl/6 e BALB/c foram inoculados com FliCi ou LPS (1 µg) pelas vias i.p. ou i.n. e as células presentes nos compartimentos peritoneal **(A)** ou alveolar **(B)**, respectivamente, foram coletadas após 48h. O número total de células foi obtido por contagem em hemocítmetro, utilizando Tripán Blue para exclusão das células mortas. Cada barra representa a média ± DP, de 3 experimentos, com n=3. * p<0,05 e ** p<0,01 em relação ao controle da mesma linhagem, # p<0,05 e ## p<0,01 em relação ao grupo FliCi da mesma linhagem.

Figura 4: Representação absoluta das populações celulares presentes nos lavados peritoneal e bronqueoalveolar de animais C57Bl/6 e BALB/c, estimulados ou não com FliCi e LPS. Camundongos C57Bl/6 e BALB/c foram inoculados com FliCi ou LPS (1 µg) pelas vias i.p. ou i.n. e as células presentes nos compartimentos peritoneal ou alveolar, coletadas após 48h foram analisadas por citometria de fluxo. O número de células de cada população celular presente no lavado peritoneal **(A)** e alveolar **(B)** foi obtido multiplicando-se o número relativo pelo número total de células presentes nos diferentes compartimentos. O número de células de cada população linfocitária presente nos lavados peritoneal **(C)** e alveolar **(D)** foi obtido da mesma maneira. Os experimentos foram repetidos 3 vezes, mostrando o mesmo perfil de resultados. Cada barra representa a média ± DP, com n=3, de um experimento representativo. * p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao grupo controle da mesma linhagem, #p<0,05; ##p<0,01 e ###p<0,001 em relação ao grupo FliCi da mesma linhagem.

Figura 5: Avaliação da expressão de MHC classe II por células F4/80⁺ peritoneais e alveolares. Camundongos C57Bl/6 e BALB/c foram inoculados com 1 µg de FliCi ou LPS i.p. ou i.n. e 48h mais tarde o PEC e o BAL foram removidos. A expressão de MHC classe II na população F4/80⁺ foi avaliada por citometria de fluxo. Os gráficos **A** e **B** mostram respectivamente o número relativo de células peritoneais e alveolares F4/80⁺MHCII⁺. Os gráficos **C** e **D** mostram, respectivamente, o aumento da MIF de MHCII em relação a MIF de MHCII nos macrófagos controles peritoneais e alveolares. Cada barra representa a média ± DP, de 3 experimentos, com n=3 cada. * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 em relação ao controle da mesma linhagem; # p<0,05 em relação ao grupo FliCi da mesma linhagem e & p<0,05 em relação ao grupo controle dos animais C57Bl/6. Os números no interior dos histogramas **(E)** representam a MIF de MHC nessas populações obtidas em um experimento demonstrativo, &&& p<0,001 em relação ao grupo controle dos animais C57BL/6. Os grupos são representados por IC (controle isotópico ■), Controle (animais não inoculados ■), FliCi (▨) e LPS (▩).

Figura 6: Avaliação da expressão de CD80 por células F4/80⁺ peritoneais e alveolares. Camundongos C57Bl/6 e BALB/c foram inoculados com 1 µg de FliCi ou LPS i.p. ou i.n. e 48h mais tarde, o PEC e o BAL foram removidos. A expressão de CD80 na população F4/80⁺ foi avaliada por citometria de fluxo. Os gráficos **A** e **B** mostram, respectivamente, o número relativo de células peritoneais e alveolares F4/80⁺CD80⁺. Os gráficos **C** e **D** mostram, respectivamente, o aumento da MIF de CD80 em relação a MIF de CD80 nos macrófagos controles peritoneais e alveolares. Cada barra representa a média ± DP, de 3 experimentos, com n=3 cada grupo. * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 em relação ao controle da mesma linhagem; ## p<0,01 e ### p<0,001 em relação ao grupo FliCi da mesma linhagem e & p<0,05; &&p<0,001 em relação ao grupo controle dos animais C57Bl/6. Os números no interior dos histogramas (**E**) representam a MIF de CD80 nessas populações, obtidas em um experimento demonstrativo com n=3 para cada grupo, &&p<0,001 em relação ao grupo controle dos animais C57Bl/6. Os grupos são representados por IC (controle isotípico ■), Controle (animais não inoculados ■), FliCi (▨) e LPS (▩).

Figura 7: Avaliação da expressão de CD86 por células F4/80⁺ peritoneais e alveolares. Camundongos C57Bl/6 e BALB/c foram inoculados com 1 µg de FliCi ou LPS i.p. ou i.n. e 48h mais tarde, o PEC e o BAL foram removidos. A expressão de CD86 na população F4/80⁺ foi avaliada por citometria de fluxo. Os gráficos **A** e **B** mostram, respectivamente, o número relativo de células peritoneais e alveolares F4/80⁺CD86⁺. Os gráficos **C** e **D** mostram, respectivamente, o aumento da MIF de CD86 em relação a MIF de CD86 nos macrófagos controles peritoneais e alveolares. Cada barra representa a média ± DP, de 3 experimentos, com n=3 cada grupo. * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 em relação ao controle da mesma linhagem; # p<0,05, ## p<0,01 e ### p<0,001 em relação ao grupo FliCi da mesma linhagem e &&p<0,001 em relação ao grupo controle dos animais C57Bl/6. Os números no interior dos histogramas (**E**) representam a MIF de CD86 nessas populações, obtidas em um experimento demonstrativo com n=3 para cada grupo, & p<0,05 em relação ao grupo controle dos animais C57Bl/6. Os grupos são representados por IC (controle isotípico ■), Controle (animais não inoculados ■), FliCi (▨) e LPS (▩).

Figura 8: Avaliação da expressão de CD40 por células F4/80⁺ peritoneais e alveolares. Camundongos C57Bl/6 e BALB/c foram inoculados com 1 µg de FliCi ou LPS i.p. ou i.n. e 48h mais tarde, o PEC e o BAL foram removidos. A expressão de CD40 na população F4/80⁺ foi avaliada por citometria de fluxo. Os gráficos **A** e **B** mostram, respectivamente, o número relativo de células peritoneais e alveolares F4/80⁺CD40⁺. Os gráficos **C** e **D** mostram, respectivamente, o aumento da MIF de CD40 em relação a MIF de CD40 nos macrófagos controles peritoneais e alveolares. Cada barra representa a média ± DP, de 3 experimentos, com n=3 cada grupo. * p<0,05; ** p<0,01 e *** p<0,001 em relação ao controle da mesma linhagem; # p<0,05 e ## p<0,01 em relação ao grupo FliCi da mesma linhagem e &p<0,01 em relação ao grupo controle dos animais C57Bl/6. Os números no interior dos histogramas (**E**) representam a MIF de CD40 nessas populações, obtidas em um experimento demonstrativo com n=3 para cada grupo, &p<0,01 em relação ao grupo controle dos animais C57Bl/6. Os grupos são representados por IC (controle isotípico ■), Controle (animais não inoculados ■), FliCi (▨) e LPS (▩).

Figura 9: Avaliação da produção de NO. Produção de NO por células aderentes obtidas dos lavados peritoneal (A) e alveolar (B) de camundongos C57Bl/6 e BALB/c. Os animais foram inoculados com 1 µg de FliCi ou LPS i.p. ou i.n. e 48h mais tarde, o BAL e o PEC foram removidos. As células foram colocadas em cultura para aderir por 4h, lavadas para remoção das células não aderentes e estimuladas *in vitro* por 48h com apenas meio de cultura (-), 1 µg/mL de FliCi ou 1 µg/mL de LPS. Após esse período, o sobrenadante das culturas foi removido e o NO mensurado utilizando o Reagente de Griess. Os dados representam a média ± DP de um experimento demonstrativo, com n = 3 cada grupo. * p<0,05 em relação ao grupo C (-), # p<0,05 em relação ao grupo FliCi (-) e & p<0,05 em relação ao grupo LPS (-). Os estímulos *in vivo* são representados no gráfico, enquanto os estímulos *in vitro* são representados por □ (-) ou sem estímulo, ■ estímulo com FliCi e ■ LPS.

Figura 10: Caracterização fenotípica e morfológica das populações de macrófagos peritoneais e alveolares. As células peritoneais (A) e alveolares (B) de animais C57Bl/6 controles foram analisadas por citometria de fluxo quanto à expressão de F4/80. Em seguida, as subpopulações peritoneais, F4/80^{hi} e F4/80^{lo}, foram separadas por *sorting* em um FACS Vantage, de acordo com a intensidade de expressão dessa molécula. As subpopulações peritoneais, assim como os macrófagos alveolares, foram colocadas em lâminas de cultura de 8 poços por 24h. As lâminas foram coradas com o kit de coloração Instant-Prov. Os slides representam um aumento de 40x em microscopia óptica. Os experimentos foram repetidos ao menos 3 vezes, mostrando o mesmo perfil de resultados. Os dados apresentados representam um experimento demonstrativo com n=3 para cada grupo.

Figura 11: Avaliação da expressão de iNOS por células F4/80^{lo} (A) e F4/80^{hi} (B). Os animais foram inoculados com 1 µg de FliCi ou LPS i.p. e 48h mais tarde o PEC foi removido. As células foram colocadas em cultura com meio de cultura (-) ou 1 ng/mL de rIFN-γ, na presença de monensina, por 5h. Após esse período, as células foram manipuladas utilizando o kit cytofix/cytoperm e marcadas com anti-F4/80 (FITC), IgG de coelho anti-iNOS de camundongo, anti-IgG de coelho marcada com biotina e SA (Cy), sendo que os controles das marcações não foram incubados com o anticorpo anti-iNOS. Os números apresentados nos *plots* mostram o número relativo de células iNOS⁺ dentro de cada população celular. Os experimentos foram repetidos ao menos três vezes, mostrando o mesmo perfil de resultados. Os dados apresentados representam um experimento demonstrativo com n=4 para cada grupo.

Figura 12: Avaliação da expressão de mTGF-β1 por macrófagos F4/80^{lo} (A) e F4/80^{hi} (B). Os animais foram inoculados com 1 µg de FliCi ou LPS i.p. e 48h mais tarde o PEC foi removido. As células foram marcadas com anti-F4/80 (FITC), anti-mTGF-β1 (Biotina) e SA (Cy), sendo que os controles das marcações não foram incubados com anti-mTGF-β1. Os números apresentados nos *plots* mostram o número relativo de células mTGF-β⁺ dentro de cada população celular. Os experimentos foram repetidos ao menos três vezes, mostrando o mesmo perfil de resultados. Os dados apresentados representam um experimento demonstrativo com n=4 para cada grupo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 HETEROGENEIDADE DE MACRÓFAGOS	16
1.2 RECEPTORES PARA PADRÕES MOLECULARES	18
1.3 LPS E FLAGELINA	21
2 OJETIVOS	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 ANIMAIS	29
3.2 PURIFICAÇÃO DA FLAGELINA	29
3.3 TRATAMENTO DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DE CÉLULAS	30
3.4 CULTURA DE MACRÓFAGOS	30
3.5 ANÁLISE FENOTÍPICA DAS CÉLULAS	30
3.6 DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	31
3.7 DETECÇÃO DE iNOS POR CITOMETRIA DE FLUXO	31
3.8 SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS F4/80 ^{LO} E F4/80 ^{HI} POR SORTING	32
3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	33
4 RESULTADOS	34
4.1 PAPEL DA FLAGELINA E DO LPS NA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS M1 E M2	35
4.1.1 FLiCi É MAIS POTENTE NO RECRUTAMENTO DE CÉLULAS PARA O PERITÔNIO ENQUANTO O LPS RECRUTA MAIS CÉLULAS PARA O COMPARTIMENTO ALVEOLAR	35
4.1.2 FLiCi É MAIS POTENTE NO RECRUTAMENTO DE MACRÓFAGOS ENQUANTO O LPS INDUZ A MIGRAÇÃO PREFERENCIAL DE NEUTRÓFILOS	37
4.1.3 MACRÓFAGOS PERITONEAIS SÃO MODULADOS MAIS INTENSAMENTE POR FLiCi ENQUANTO QUE OS MACRÓFAGOS ALVEOLARES SÃO MAIS SENSÍVEIS AO LPS	41
4.2 POLARIZAÇÃO M1/M2: UM CONCEITO REVISITADO	52
4.2.1 POLARIZAÇÃO M1/M2 É OBSERVADA APENAS NO AMBIENTE PERITONEAL	52
4.2.2 MACRÓFAGOS PERITONEAIS COMO UMA POPULAÇÃO HETEROGÊNEA: POLARIZAÇÃO M1/M2 NO MESMO MICROAMBIENTE?	55
4.2.3 MACRÓFAGOS F4/80 ^{LO} APRESENTAM MAIOR EXPRESSÃO DE MTGF-B1 E OS MACRÓFAGOS F4/80 ^{HI} EXPRESSAM MAIORES NÍVEIS DE iNOS	56
5 DISCUSSÃO	60
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

—

1 INTRODUÇÃO

1.1 Heterogeneidade de Macrófagos

Os macrófagos são células pertencentes ao sistema fagocítico mononuclear, originados a partir de um progenitor mielóide, compartilhado também por granulócitos. Após deixarem a medula óssea, são liberados no sangue periférico, onde circulam por vários dias como monócitos antes de alcançarem os tecidos e se diferenciarem em macrófagos (1, 2). Os macrófagos são essenciais para o funcionamento do sistema imune (3) e dentre suas funções destacam-se a fagocitose e destruição de microorganismos, apresentação de antígenos para linfócitos T (4), remoção de células apoptóticas (5), resolução de processos inflamatórios (6), angiogênese (7) e reparo e remodelamento tissular (8).

Os macrófagos, células residentes em tecidos distintos, representam uma população celular altamente heterogênea. A heterogeneidade dessas células está refletida tanto em seus aspectos morfológicos e fenotípicos, como metabólicos e funcionais (9-11). De maneira geral, os macrófagos são caracterizados fenotipicamente pela expressão de altos níveis da cadeia CD11b da integrina Mac-1 e da glicoproteína F4/80 (12). Porém, a expressão dessas moléculas não é homogênea entre as diferentes subpopulações de macrófagos. O exemplo típico da expressão diferencial desses marcadores pode ser visto nos macrófagos esplênicos, onde as células encontradas na polpa vermelha apresentam alta expressão de F4/80, enquanto os macrófagos da polpa branca (tanto os macrófagos da zona marginal (MZMΦ) como os macrófagos metalofílicos) possuem baixa expressão de F4/80 (13, 14).

Com relação ao perfil metabólico e funcional, os macrófagos podem ser subdivididos em M1 e M2 (9). De acordo com Mills et al., macrófagos M1,

provenientes de camundongos de linhagens Th1 (C57Bl/6 e B10.A), o metabolismo da arginina é caracterizado por alta expressão da enzima NO-sintase induzida (iNOS), com conseqüente produção de níveis elevados de óxido nítrico (NO) em resposta aos lipopolissacarídeos (LPS) ou interferon- γ (IFN- γ). Em macrófagos provenientes de camundongos de linhagens Th2 (BALB/c e DBA.2), denominados macrófagos M2, a via da arginase, com conseqüente geração de ornitina e poliaminas, é predominante. Assim, os macrófagos M1 são considerados macrófagos inflamatórios, ou macrófagos com grande capacidade microbicida, por seu potencial em produzir NO em resposta a estímulos inflamatórios, enquanto que macrófagos M2 são conhecidos como macrófagos ativados para o reparo tecidual, com secreção espontânea de altos níveis de fator beta de transformação do crescimento (TGF- β) (9-11).

Parece haver um consenso de que a ativação clássica de macrófagos se dá pelo estímulo com IFN- γ , resultando na geração de macrófagos M1, com alto potencial microbicida e secretores de citocinas pró-inflamatórias como Interleucina (IL)-1, IL-6, IL-12 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (15). Nesse caso, a IL-12 parece estar envolvida com o perfil de ativação dos macrófagos, uma vez que na ausência de IL-12, macrófagos M1 apresentam um desvio para o perfil M2 de ativação (16). A ativação alternativa parece induzir a diferenciação de macrófagos M2, que ainda podem ser subdivididos em M2a, M2b e M2c, de acordo com o estímulo recebido (10). Macrófagos M2a, ditos alérgicos, são induzidos pelas citocinas IL-4 e IL-13, enquanto que macrófagos M2c, ditos reguladores, são induzidos por IL-10 e glicocorticóides. Macrófagos expostos a imunocomplexos (IC) ou a alguns agonistas de receptores do tipo *Toll* (TLR) diferenciam-se em M2b e

—
tornam-se produtores de altos níveis de IL-10 e baixos níveis de IL-12, ainda que conservem a secreção de IL-1, IL-6 e TNF- α (10).

Ainda que a polarização M1/M2 se apresente numa clara dicotomia, a heterogeneidade das populações de macrófagos ainda levanta algumas questões, uma vez que pode expressar fases de diferenciação distintas dessas células ou, até mesmo, origens distintas. De acordo com Gordon e Taylor (11), os macrófagos podem ser divididos em duas subpopulações conforme a expressão de CCR2, CD62-L (L-selectina) e CX₃CR1. Macrófagos inflamatórios parecem expressar altos níveis de CCR2, CD62-L e baixos níveis de CX₃CR1, enquanto que macrófagos residentes são caracterizados pela expressão de altos níveis de CX₃CR1 e ausência de CCR2 e CD62-L (11, 17). Peculiar, nesse caso, é o fato de que esses macrófagos parecem originar-se de diferentes monócitos sanguíneos, levantando a possibilidade de que não haja apenas um progenitor mielóide comum (17). Ainda, durante a diferenciação de monócitos para macrófagos, essas células assumem perfis transcricionais bastante diferenciados (18). Em condições fisiológicas, macrófagos diferenciados tendem a apresentar polarização para o perfil M2, com modificações transcricionais mais sutis que aquelas apresentadas pelos macrófagos M1 (18).

1.2 Receptores para padrões moleculares

Os macrófagos iniciam a resposta imune através do reconhecimento de padrões moleculares freqüentemente presentes em microorganismos. Vários tipos de receptores para padrões moleculares estão presentes nessas células, como os receptores do tipo lectina que ligam-se a carboidratos freqüentemente presentes na superfície de microorganismos (p.e. manose e β -glucanos) (19) e receptores tipo

–

scavengers envolvidos no reconhecimento tanto de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) modificadas (envolvidas no processo de aterosclerose), como de eritrócitos e células apoptóticas, além de uma variedade de patógenos (20).

Nesse contexto, a descoberta dos receptores do tipo *Toll* (TLR) revolucionou os mecanismos envolvidos no reconhecimento do sistema imune inato. Os TLR são moléculas transmembranas que contêm um domínio externo à membrana com seqüências ricas em leucina (LRR), particular para cada TLR, e uma cauda intracelular que mostra grande homologia com o domínio intracelular do receptor para a IL-1 (IL-1R), chamada domínio *Toll*/IL-1R (TIR) (21). A ativação do TLR por seus ligantes induz o recrutamento de proteínas adaptadoras específicas. Até o momento, quatro proteínas adaptadoras foram descritas: fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), proteína associada ao TIR (MAL/TIRAP), *Toll*/IL-1R domain – containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) e molécula adaptadora relacionada ao TRIF (TRAM) (22). Essas proteínas adaptadoras transduzem o sinal do TIR, ativando quinases e fatores de transcrição como NF-kB e STAT-1 (23). Dá-se, dessa maneira, a produção de diferentes moléculas efetoras, citocinas pró-inflamatórias, entre outros mediadores, responsáveis pelas diferentes respostas geradas a partir do reconhecimento de estruturas padrões de patógenos.

A família dos receptores do tipo *Toll* compreende, até o momento, onze proteínas identificadas em mamíferos (11 receptores identificados em camundongos e 10 receptores em humanos) (24). Entre seus diversos ligantes, os melhores caracterizados são peptidoglicanas e lipoproteínas bacterianas, âncoras de glicofosfatidil inositol (GPI) presentes em protozoários e zimosan em fungos (ligantes de TLR2), RNA dupla-fita, comuns em vírus (ligante de TLR3), LPS presentes na parede de bactérias gram-negativas (ligante do TLR4), flagelina, componente do

—

flagelo microbiano (ligante de TLR5) e seqüências de DNA não metilados, ricas em CpG, presentes em bactérias e vírus (ligante de TLR9), entre outros (22).

Após a descoberta dos receptores do tipo *Toll*, uma nova família de receptores para padrões moleculares tem sido descrita. Os receptores do tipo *NOD* (NLR) têm como característica peculiar sua localização citosólica e compreendem proteínas NOD1 e NOD2 (*Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1 ou 2*), Naip (*neuronal apoptosis inhibitor protein*), Apaf (*apoptotic protease activating factor*), Ipaf (*ICE- protease activating factor*), entre outras (25). São proteínas formadas essencialmente por 3 domínios, um domínio N-terminal variável, um domínio central do tipo NOD e uma porção C-terminal com LRR. O reconhecimento de padrões se dá pela cauda LRR, o qual induz uma cascata de ativação que culmina na ativação do fator de transcrição NF- κ B ou da protease caspase-1, dependendo do tipo de receptor recrutado. Como dito anteriormente, o fator de transcrição NF- κ B é capaz de induzir a transcrição de inúmeros genes, culminando na produção de diferentes moléculas efetoras. A caspase-1 ou enzima de conversão de *IL-1 β* (ICE) é uma protease intracelular necessária para a secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e IL-18. Além disso, a ativação da caspase-1 induz apoptose em macrófagos infectados, fato que poderia indicar um mecanismo de resistência e controle de patógenos por essas células (26, 27). Ainda, o mecanismo efetor da caspase-1, pode estar correlacionado com a clivagem de outros substratos endógenos ainda não conhecidos.

O conhecimento desses receptores citosólicos é bastante recente e seus ligantes ainda não estão bem caracterizados. Sabe-se, entretanto, que a mutação de alguns desses receptores está associado a síndromes inflamatórias (28-30) e susceptibilidade a infecções bacterianas, como no caso da *Legionella pneumophila*

—

(27). Esses fatos indicam que os receptores do tipo NLR desempenham um importante papel na regulação da resposta imune (28, 31, 32). Análises genéticas e bioquímicas têm revelado que as proteínas NLR participam do reconhecimento da imunidade inata de maneira independente dos TLR, embora esses dois tipos de receptores possam cooperar para otimizar a resposta contra produtos microbianos (30). Ainda, não há conhecimento na literatura se uma determinada população de macrófagos é mais susceptível à ativação por TLR ou NLR ou, ainda, se há uma cooperação ou regulação entre ambos os receptores.

1.3 LPS e Flagelina

A endotoxina, um produto bacteriano com propriedade adjuvante e freqüentemente utilizado como ativador de macrófagos, é constituída principalmente por LPS, presentes na parede celular de todas as bactérias gram-negativas. Até recentemente, o receptor celular para LPS era misterioso. Porém, há muito se sabia que macrófagos de animais da linhagem C3H/HeJ não respondiam aos LPS (33) e que esta deficiência era devido a uma mutação em um único gene, denominado *Lps*, localizado no cromossomo 4 (34). No entanto, foram necessários cinco anos de trabalho, no laboratório de Bruce Beutler, para que Poltorak et al. identificassem o receptor para LPS, como sendo o receptor do tipo *Toll* 4 (TLR4) (35). O TLR4 foi o primeiro TLR identificado em mamíferos e, por isso, é o mais conhecido. Além disso, o TLR4 apresenta outra particularidade, sendo o único dessa família de receptores a recrutar dois tipos distintos de moléculas adaptadoras, MyD88 e TRIF (24). Sendo assim, a ativação celular induzida pelo LPS, inclui produção de moléculas efetoras induzidas pelos fatores de transcrição NF-κB e STAT-1 (23).

—

A flagelina faz parte de uma estrutura de superfície complexa, comum em bactérias móveis, chamadas de flagelo e que possuem mais de 15 µm de comprimento. Tal estrutura atua como sensor captando informações químicas e físicas do ambiente e promove a migração desses microrganismos visando sua sobrevivência (36). A flagelina tem sido alvo de muitos estudos devido sua importância na patogenicidade de bactérias flageladas. Esse fato foi demonstrado por estudos histológicos com linhagens bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* desprovidas de flagelo que revelaram infecções localizadas e mais atenuadas que as linhagens flageladas, as quais causam infecções generalizadas (37).

A estrutura flagelar é constituída por três porções, o corpo basal, um gancho que liga o corpo basal ao filamento e o filamento flagelar propriamente dito (38). O filamento flagelar é semelhante a um cilindro formado por 11 protofilamentos constituídos por polímeros (39). Cada polímero é composto por monômeros, os quais são formados por domínios, chamados D0 a D4. O monômero de flagelina é constituído por duas regiões terminais conservadas, chamadas N e C terminais, que flanqueiam a região central. A região central é também conhecida como região hipervariável por não conservar seu tamanho nem composição. As regiões conservadas N e C terminais formam uma estrutura em α -hélice que constitui os domínios D0 e D1, enquanto as regiões variáveis D2 e D3 são expostas e estão relacionadas com a adesão bacteriana à superfície celular (38).

Figura 1: Estrutura da FliCi. Bactérias flageladas apresentam o complexo flagelar, cada flagelo é composto por protofilamento os quais são formados por monômeros de flagelina (A). Cada monômero de flagelina é constituído por domínios (B). Flagelina interage com seu receptor para padrão molecular (TLR5) (C).

Em 2001, Hayashi et al., utilizando frações purificadas de *Listeria monocytogenes*, caracterizaram a flagelina como ligante para o TLR5 em células mononucleares (40). Em adição, demonstraram que a ativação de tal receptor promove a mobilização do fator nuclear NF- κ B para o núcleo celular estimulando a produção de TNF- α e IL-6 de maneira dependente de MyD88 (40). Mais recentemente, Feuillet et al. (41) demonstraram o papel do TLR5 no reconhecimento da flagelina de *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa* utilizando animais deficientes de TLR5. Esses autores demonstraram que durante a infecção por uma dessas bactérias o TLR4 pode compensar a ausência do TLR5, já que ambos microrganismos possuem LPS em sua parede celular. Contudo o reconhecimento da flagelina purificada é dependente da expressão de TLR5 (41).

Durante muito tempo, os detalhes das interações entre a flagelina e o TLR5 permaneceram controversos. McDermott et al. (42) relacionou o domínio

hipervariável (D3) com o TLR5, enquanto o grupo de Eaves-Pyles (43) demonstrou que a interação ocorre via regiões N e C terminais da flagelina. Finalmente, Smith et al. (44), utilizando modelos de mutagênese, mapearam o sítio de reconhecimento da flagelina pelo TLR5 e definiram uma região altamente conservada de 13 resíduos de aminoácidos da porção N-terminal, os quais participam das interações intermoleculares que formam o protofilamento flagelar e são requeridas para a motilidade bacteriana.

Mais recentemente, a flagelina foi descrita por sua habilidade em ativar o receptor citosólico Naip5. A ativação desse receptor por flagelina é fundamental para a resistência de macrófagos a infecções pela bactéria *Legionella pneumophila*, envolvendo um mecanismo dependente de *pro-caspase-1* (27, 45). Porém, ainda não se sabe qual é a porção da flagelina que se associa aos receptores do tipo NLR.

A ativação de macrófagos a partir do reconhecimento de padrões moleculares induz a produção de uma série de moléculas efetoras envolvidas na capacidade microbicida dessas células, na condução e resolução da resposta inflamatória e no desenvolvimento da resposta imune adaptativa (46). Essas moléculas são produtos de genes pró-inflamatórios (como citocinas inflamatórias e quimiocinas), ou provenientes do metabolismo lipídico (leucotrienos e prostaglandinas) e bioquímico dessas células (enzimas como iNOS, NADPH-oxidase, mieloperoxidase (MPO), hemeoxigenase-1 (HO-1) e indoleamina dioxigenase (IDO)).

Porém, muitos aspectos envolvidos no reconhecimento desses padrões moleculares por diferentes subpopulações de macrófagos necessitam de maiores elucidações. Considerando a imensa heterogeneidade existente entre as células da imunidade inata, especialmente nas subpopulações de macrófagos e células

—

dendríticas, e o fato de que a “especialização” funcional dessas populações vem sendo associada com a expressão diferencial de receptores para padrões moleculares (46-48), o objetivo principal deste trabalho foi avaliar de maneira comparativa a ativação de diferentes populações de macrófagos pelos agonistas de TLR4 e TLR5. Para isso, utilizamos macrófagos provenientes de diferentes compartimentos (espaços bronqueoalveolar e peritoneal) e com perfis de ativação distintos, M1 (provenientes de animais C57Bl/6) e M2 (provenientes de animais BALB/c), como previamente descrito por Mills et al. (9).

-

2 OJETIVOS

—

O objetivo desse trabalho foi comparar a ativação de diferentes populações de macrófagos proporcionada pelos agonistas de TLR4 e TLR5. Para isso, utilizamos macrófagos provenientes de diferentes compartimentos (espaços bronqueoalveolar e peritoneal) e com perfis de ativação distintos, M1 (provenientes de animais C57Bl/6) e M2 (provenientes de animais BALB/c).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos C57Bl/6 e BALB/c, com 6-8 semanas de idade, mantidos em condições “germ-free”, foram fornecidos pelo Biotério de camundongos isogênicos do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP).

3.2 Purificação da flagelina

A flagelina (FliCi) purificada utilizada para o tratamento dos camundongos ou para cultura de células é proveniente da bactéria *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* SL3261 (selvagem ou flagelada), foi obtida como descrito por Luna et al. (49), purificada por cromatografia e gentilmente cedida pelo grupo do Prof Dr. Luiz Carlos Ferreira (professor titular do Departamento de Microbiologia – ICB – USP).

Figura 2: FliCi total e FliCi purificada após cromatografia. A flagelina é extraída da bactéria *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* SL3261 como citado acima e a seguir passa por uma coluna de cromatografia para purificação. A figura mostra o gel de proteína antes e após a purificação.

3.3 Tratamento dos animais e obtenção de células

Para a avaliação da ativação de macrófagos peritoneais ou alveolares M1 e M2 por ligantes de TLR, camundongos C57Bl/6 e BALB/c foram inoculados pelas vias intraperitoneal (i.p.) ou intranasal (i.n.) com LPS de *Escherichia coli* (1 µg/animal) (Sigma) ou FliCi (1 µg/animal). Após 24, 48 ou 72h, as células presentes nos compartimentos peritoneal e bronqueoalveolar foram obtidas por lavagens com 5 mL e 1,5 mL de PBS (solução salina tamponada com fosfato), respectivamente.

3.4 Cultura de macrófagos

As células peritoneais e alveolares (5×10^6) obtidas dos camundongos controles ou tratados com FliCi e LPS, foram colocadas em cultura em meio RPMI suplementado (Sigma) por 4h a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂, em placas de 6 poços (Costar), para que os macrófagos fossem enriquecidos por aderência. Após vigorosas lavagens, as células aderentes obtidas foram retiradas com Accutase (MP Biomedicals) (1 mL/poço), contadas e incubadas em placas de 96 poços (Costar) na concentração de 2×10^5 células/poço. As células foram reestimuladas ou não com FliCi ou LPS (1 µg/mL ou 0,2 µg/poço), e 48h mais tarde os sobrenadantes das culturas foram coletados para análise da produção de NO.

3.5 Análise fenotípica das células

—

Para avaliação fenotípica, as células peritoneais e alveolares foram incubadas com anticorpos monoclonais para F4/80 (Serotec), CD80 (B7.1, 1G10), CD86 (B7.2, GL-1), CD40 (3/23), GR1 (RB6), CD4 (H129.19), CD8 (53-6.7) e B220 marcados com FITC, PE ou Cy-Chrome. As células peritoneais foram incubadas também com anticorpo monoclonal para mTGF- β 1 marcado com biotina, por isso foi necessário uma segunda incubação com estreptoavidina (SA) (Cy). As células foram analisadas por citometria de fluxo em um FACS Calibur (Becton Dickinson) e com exceção do anticorpo F4/80, os demais reagentes foram obtidos da PharMingen.

3.6 Detecção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico foi analisada pelo método de Griess, como descrito previamente (50). Resumidamente, 50 μ l dos sobrenadantes de cultura foram incubados com 50 μ l do reagente de Griess (preparados com reagentes da Sigma) por 5 min em temperatura ambiente. A concentração de NO₂ foi determinada por leitura da densidade óptica a 550 nm em referência ao padrão da solução de NaNO₂. As dosagens foram realizadas em duplicata.

3.7 Detecção de iNOS por citometria de fluxo

O ensaio para detecção de iNOS foi realizado conforme protocolo proposto por Jung et al. (51), com algumas modificações. As células (10⁶) peritoneais, obtidas de camundongos controles ou previamente inoculados com FliCi ou LPS foram incubadas com estímulos *in vitro* (apenas meio de cultura (-) ou IFN- γ (2,5 ng/mL)),

—

juntamente com monensina (stop Golgi) (Pharmlingen), por 5h, a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após lavagens com PBS contendo 1% SBF e 0,05% de azida, foi realizada a marcação extracelular com anticorpos monoclonais anti-F4/80 marcado com FITC por 30 min a 4 °C. Em seguida, as células foram fixadas com Citofix (Pharmlingen) (100 µl/10⁶ células) por 10 min. Após lavagens com PBS-soro-azida, as células foram permeabilizadas com 100 µl de PermWash (Pharmlingen). Nessa etapa, as células foram incubadas com um anticorpo monoclonal de coelho anti-iNOS de camundongo (Santa Cruz) seguido por incubação de 30 min. em ambiente protegido de luz. Posteriormente, as células foram lavadas, incubadas com um anticorpo de cabra anti-IgG de coelho marcado com biotina (Southern Biotechnology Associates) por 30 min. e em seguida as células foram novamente lavadas e marcadas com SA (Cy) (Pharmlingen). Por fim, as células foram lavadas, ressuspensas em 0,2 mL de PBS-soro-azida e analisadas em citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson), de acordo com a intensidade de fluorescência (FL1, FL3) e a dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) do feixe luminoso.

3.8 Separação das células F4/80^{lo} e F4/80^{hi} por sorting

Para avaliação individual das populações de macrófagos peritoneais, as células de animais controles ou inoculados com agonistas de TLR obtidas após lavagem peritoneal com PBS foram passadas por agulha 23G para remoção de grumos celulares. Após lavagens com PBS-soro-azida, foi realizada a marcação extracelular com anticorpos monoclonais anti-F4/80 marcado com PE por 30 min a 4 °C em ambiente protegido de luz. As células foram lavadas com PBS-soro-azida e ressuspensas em meio de cultura em concentração de 2-3 milhões de células/mL.

—

para posterior separação por citometria de fluxo em FacsVantage (Becton Dickinson). Para coleta após a realização do sorting, os tubos de aleta (Spectrum) foram preparados com 1 mL de meio de cultura RPMI 3% SFB contendo gentamicina (1:100). Todas as manipulações foram realizadas em condições estéreis.

3.9 Análises Estatísticas

Análise estatística foi realizada através do Anova (Teste Turkey). As diferenças entre os grupos serão consideradas significantes quando o valor de p for <0.05 (5%).

—

4 RESULTADOS

4.1 PAPEL DA FLAGELINA E DO LPS NA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS M1 e M2

4.1.1 FliCi é mais potente no recrutamento de células para o peritônio enquanto o LPS recruta mais células para o compartimento alveolar

A avaliação dos efeitos de ligantes de TLR na ativação celular tem sido tema de grande parte dos estudos da imunologia atual, englobando desde mecanismos moleculares envolvidos no reconhecimento da resposta inata e desenvolvimento da resposta imune adaptativa até o potencial desses agonistas como adjuvantes em vacinas (46, 52). Porém, muitos aspectos envolvidos no reconhecimento diferencial desses padrões moleculares necessitam de maiores elucidações. Para avaliar, de maneira comparativa, o papel dos agonistas de TLR4 e TLR5 na ativação de diferentes populações de macrófagos, camundongos C57Bl/6 e BALB/c foram inoculados via i.p. ou i.n. com LPS ou FliCi. Os animais C57Bl/6 e BALB/c foram escolhidos como modelo experimental, uma vez que os macrófagos provenientes dessas linhagens apresentam distintos perfis de ativação, e são conseqüentemente nomeados como macrófagos M1 e M2, respectivamente (9).

Inicialmente, foi realizada uma cinética para verificar a melhor dose dos agonistas de TLR a ser utilizada, assim como o tempo ideal para a coleta das células. Para isso, camundongos C57Bl/6 foram imunizados via i.p. com diferentes doses de LPS (0,1 µg, 1 µg ou 10 µg) e o lavado peritoneal (PEC) foi removido 24, 48 ou 72h mais tarde para avaliação da migração celular. O estímulo com LPS na dose de 1 µg/animal foi a menor dose capaz de induzir significativa migração de

—

células, enquanto que no tempo de 48h após as inoculações foi encontrado o pico da população de macrófagos, nosso foco (dados não mostrados).

Assim, animais C57Bl/6 e BALB/c foram inoculados via i.p. ou i.n. com 1 µg de LPS ou FliCi. Após 48h, os lavados peritoneal (PEC) e bronqueoalveolar (BAL) foram coletados. Somente a injeção de FliCi foi capaz de induzir uma significativa migração de células para o compartimento peritoneal em animais C57Bl/6, com um aumento de cerca de 60% no número total de células em relação ao controle e 35% em relação ao grupo inoculado com LPS (Fig 3A). Já em animais BALB/c, ambos os agonistas de TLR induziram uma migração significativa de células, havendo um aumento similar de aproximadamente 50% em relação aos animais controles (Fig 3A). A inoculação de FliCi e LPS por via i.n. em animais C57Bl/6 e BALB/c proporcionou uma significativa migração de células para o compartimento bronqueoalveolar (Fig 3B). Contudo, o LPS se mostrou um estímulo mais potente que a FliCi, induzindo um aumento de 6 vezes no número total de células presentes no BAL de ambas as linhagens em relação aos animais controles das respectivas linhagens (Fig 3B).

Os resultados indicam que a FliCi é mais potente no recrutamento celular para o compartimento peritoneal de animais C57Bl/6, enquanto o LPS induz a melhor migração celular para o compartimento alveolar de ambas as linhagens estudadas.

Figura 3: Migração celular em resposta à FliCi e ao LPS. Camundongos C57Bl/6 e BALB/c foram inoculados com FliCi ou LPS (1 µg) pelas vias i.p. ou i.n. e as células presentes nos compartimentos peritoneal (A) ou alveolar (B), respectivamente, foram coletadas após 48h. O número total de células foi obtido por contagem em hemocítmetro, utilizando Tripán Blue para exclusão das células mortas. Cada barra representa a média ± DP, de 3 experimentos, com n=3. * p<0,05 e ** p<0,01 em relação ao controle da mesma linhagem, # p<0,05 e ## p<0,01 em relação ao grupo FliCi da mesma linhagem.

4.1.2 FliCi é mais potente no recrutamento de macrófagos enquanto o LPS induz a migração preferencial de neutrófilos

Para caracterizar as populações celulares presentes no PEC e BAL de animais controles e previamente inoculados com FliCi ou LPS, as células foram submetidas à análise por citometria de fluxo. As células peritoneais de camundongos C57Bl/6 controles são constituídas por populações dominantes e equivalentes de macrófagos (F4/80⁺) (Fig 4A) e linfócitos B (B220⁺) (Fig 4C), além de um número mínimo de neutrófilos (GR1⁺) (Fig 4A) e linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) (Fig 4C). Nos animais BALB/c controles, os linfócitos B parecem predominar no compartimento peritoneal (Fig 4A).

A inoculação i.p. de FliCi em camundongos C57Bl/6 induziu uma significativa migração de macrófagos (F4/80⁺) e de neutrófilos (F4/80⁻GR1⁺) para a cavidade

peritoneal (Fig 4A). Em contrapartida, a inoculação i.p. de LPS não induziu uma regulação no número de macrófagos, porém aumentou cerca de 10 vezes o número total de neutrófilos neste compartimento. Nos animais BALB/c, somente a inoculação i.p. de FliCi induziu um aumento significativo no número de macrófagos (Fig 4A). Ainda, ambos os agonistas de TLR induziram uma migração bastante acentuada de neutrófilos, sendo o LPS o estímulo mais potente.

No compartimento bronqueoalveolar, a população de macrófagos é claramente predominante em camundongos C57Bl/6 e BALB/c controles, ainda que uma população de neutrófilos seja encontrada em animais BALB/c (Fig 4B). Houve um expressivo aumento na população de macrófagos no compartimento alveolar de ambas as linhagens estudadas após a inoculação i.n. de FliCi e LPS, sendo que o efeito mais potente foi observado com a inoculação de FliCi em animais C57Bl/6 e LPS em animais BALB/c (Fig 4B). Porém, o efeito mais potente da inoculação i.n. dos agonistas de TLR foi a entrada de neutrófilos no compartimento bronqueoalveolar de ambos os animais, especialmente nos animais BALB/c inoculados com LPS, onde o aumento dessa população foi de aproximadamente 15 vezes.

Entre as populações linfóides presentes no peritônio de camundongos C57Bl/6 e BALB/c controles, os linfócitos B (F4/80⁻B220⁺) claramente predominam, constituindo uma população bastante representativa (Fig 4C). O estímulo com FliCi ou LPS induziu uma migração significativa de linfócitos B e T, especialmente linfócitos TCD8⁺, para o peritônio de ambos os animais, sendo o LPS o estímulo mais potente.

Como dito anteriormente, o espaço bronqueoalveolar dos animais C57Bl/6 e BALB/c controles não possuem uma população linfocitária predominante, ainda que

—

haja mais linfócitos B e TCD4⁺ nos animais BALB/c (Figura 4D). A inoculação i.n. de LPS induziu uma migração acentuada de linfócitos T, em especial de linfócitos TCD8⁺, para o BAL de camundongos C57Bl/6, um efeito também observado em animais BALB/c, porém em menor escala. Além disso, a inoculação de LPS em animais BALB/c induziu um aumento de cerca de 8 vezes no número de linfócitos B encontrados nesse espaço (Fig 4D).

Os dados, em conjunto, mostram o potencial da FliCi e LPS na indução da migração celular para os compartimentos peritoneal e alveolar de camundongos C57Bl/6 e BALB/c. A FliCi parece induzir a migração preferencial de macrófagos para o compartimento peritoneal, enquanto que o LPS claramente é um potente estímulo para a entrada de neutrófilos nos dois compartimentos, especialmente no compartimento bronqueoalveolar de camundongos BALB/c.

Figura 4: Representação absoluta das populações celulares presentes nos lavados peritoneal e bronquealveolar de animais C57Bl/6 e BALB/c, estimulados ou não com FliCi e LPS. Camundongos C57Bl/6 e BALB/c foram inoculados com FliCi ou LPS (1 µg) pelas vias i.p. ou i.n. e as células presentes nos compartimentos peritoneal ou alveolar, coletadas após 48h foram analisadas por citometria de fluxo. O número de células de cada população celular presente no lavado peritoneal (**A**) e alveolar (**B**) foi obtido multiplicando-se o número relativo pelo número total de células presentes nos diferentes compartimentos. O número de células de cada população linfocitária presente nos lavados peritoneal (**C**) e alveolar (**D**) foi obtido da mesma maneira. Os experimentos foram repetidos 3 vezes, mostrando o mesmo perfil de resultados. Cada barra representa a média ± DP, com n=3, de um experimento representativo. * p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao grupo controle da mesma linhagem, #p<0,05; ##p<0,01 e ###p<0,001 em relação ao grupo FliCi da mesma linhagem.

4.1.3 Macrófagos peritoneais são modulados mais intensamente por FliCi enquanto que os macrófagos alveolares são mais sensíveis ao LPS

Para verificar o efeito da FliCi e do LPS na modulação das diferentes populações de macrófagos, o primeiro parâmetro que utilizamos foi a avaliação da expressão de moléculas MHC classe II (MHCII) e das moléculas coestimulatórias CD80, CD86 e CD40. Essas moléculas estão envolvidas com a função de células apresentadoras de antígeno dos macrófagos e caracterizam seu estado de ativação (53, 54). As células F4/80⁺ viáveis foram selecionadas em uma janela e consideradas positivas para MHCII, CD80, CD86 ou CD40 em relação aos respectivos controles isotípicos.

Quase 50% das células peritoneais F4/80⁺ de animais C57Bl/6 controles expressam MHCII, enquanto uma proporção superior de células peritoneais F4/80⁺MHCII⁺ é encontrada em animais BALB/c, aproximadamente 62% (Fig. 5A). A inoculação dos agonistas de TLR não foi capaz de modular de maneira positiva a porcentagem de células MHCII⁺ nos macrófagos peritoneais de ambas linhagens, sendo que a FliCi induziu até mesmo uma significativa diminuição na porcentagem de células F4/80⁺MHCII⁺ provenientes de animais BALB/c (Fig. 5A).

No compartimento bronqueoalveolar é encontrado uma porcentagem menor de células F4/80⁺MHCII⁺ quando comparado com a cavidade peritoneal. Apenas cerca de 20% de macrófagos M1 e menos de 10% de macrófagos M2 apresentam expressão basal de MHCII (Fig. 5B). Porém, a porcentagem de células F4/80⁺MHCII⁺ em ambas linhagens estudadas foi modulada positivamente pela FliCi, e, principalmente pelo LPS, o qual induziu um aumento de até 5 vezes na porcentagem de macrófagos M2 MHCII⁺, nesse microambiente (Fig. 5B).

—

Os macrófagos peritoneais de animais BALB/c apresentam uma maior média de intensidade de fluorescência (MIF) de MHCII do que os macrófagos provenientes do peritônio de animais C57Bl/6 (Fig 5E). Contudo, a expressão desse marcador nos macrófagos peritoneais de ambas as linhagens não foi modulada de maneira significativa após os estímulos com FliCi ou LPS (Fig. 5C/E). Já no compartimento alveolar, somente o estímulo com LPS foi capaz de modular de maneira significativa a intensidade de fluorescência de MHCII em ambos os animais, com um aumento de quase 2 vezes na MIF dessa molécula (Fig. 5D/E).

Esses dados nos sugerem que os macrófagos peritoneais M2 apresentam maior expressão basal de MHCII do que macrófagos M1, contudo, somente os macrófagos alveolares mostram uma modulação positiva na expressão de MHCII, principalmente após estímulo com LPS.

Figura 5: Avaliação da expressão de MHC classe II por células F4/80⁺ peritoneais e alveolares. Camundongos C57Bl/6 e BALB/c foram inoculados com 1 µg de FliCi ou LPS i.p. ou i.n. e 48h mais tarde o PEC e o BAL foram removidos. A expressão de MHCII na população F4/80⁺ foi avaliada por citometria de fluxo. Os gráficos **A** e **B** mostram respectivamente o número relativo de células peritoneais e alveolares F4/80⁺MHCII⁺. Os gráficos **C** e **D** mostram, respectivamente, o aumento na média de intensidade de fluorescência (MIF) em relação a MIF de MHCII nos macrófagos controles peritoneais e alveolares. Cada barra representa a média ± DP, de 3 experimentos, com n=3 cada grupo. * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 em relação ao controle da mesma linhagem; # p<0,05 em relação ao grupo FliCi da mesma linhagem e & p<0,05 em relação ao grupo controle dos animais C57Bl/6. Os números no interior dos histogramas (**E**) representam a MIF de MHCII nessas populações obtidas em um experimento demonstrativo com n=3 para cada grupo, &&& p<0,001 em relação ao grupo controle dos animais C57Bl/6. Os grupos são representados por IC (controle isotípico ■), Controle (animais não inoculados ■), FliCi (▨) e LPS (▤).

—

Animais C57Bl/6 possuem cerca de 35% de células F4/80⁺CD80⁺ no peritônio, antes da inoculação com os agonistas de TLR, enquanto cerca de 75% dos macrófagos peritoneais provenientes de animais BALB/c expressam CD80 (Fig 6A). A inoculação de FliCi e LPS por via i.p. em animais C57Bl/6 foi capaz de modular significativamente a expressão desse marcador, induzindo um aumento de cerca de 2 vezes na porcentagem de células F4/80⁺CD80⁺. Contudo, em animais BALB/c, a modulação dessa molécula foi exercida de maneira significativa somente após estímulo com FliCi, ainda que menos intensamente do que observado em animais C57Bl/6 (Fig 6A).

Assim como a cavidade peritoneal, o compartimento bronqueoalveolar de camundongos BALB/c apresenta mais células F4/80⁺CD80⁺ que animais C57Bl/6 (Fig 6B). Apesar da inoculação i.n. de LPS induzir um aumento de aproximadamente 40% no número de macrófagos CD80⁺ em ambas linhagens, esses valores foram considerados estatisticamente diferentes apenas nos macrófagos de animais BALB/c. (Fig 6B).

A intensidade de fluorescência basal de CD80 observada nos macrófagos peritoneais foi correspondente ao perfil observado no número relativo de células CD80⁺. Macrófagos peritoneais M2 apresentam uma maior intensidade de fluorescência basal de CD80 do que macrófagos peritoneais M1 (Fig 6E). A inoculação dos agonistas, e em especial o LPS, modulou de maneira positiva a expressão de CD80 nos macrófagos peritoneais M1 e M2, sendo claramente mais expressiva nos macrófagos M1 (Fig. 6C/E). Diferentemente dos macrófagos peritoneais, os macrófagos alveolares provenientes de animais C57Bl/6 mostram uma maior intensidade de fluorescência de CD80 do que macrófagos de animais BALB/c (6E). Contudo, a intensidade de fluorescência de CD80 nos macrófagos

—

alveolares M1 não foi modulada significativamente pelos agonistas de TLR, enquanto a expressão de CD80 nos macrófagos alveolares M2 foi significativamente modulada após estímulo com LPS (Fig. 6D/E).

Figura 6: Avaliação da expressão de CD80 por células F4/80⁺ peritoneais e alveolares. Camundongos C57Bl/6 e BALB/c foram inoculados com 1 µg de FliCi ou LPS i.p. ou i.n. e 48h mais tarde, o PEC e o BAL foram removidos. A expressão de CD80 na população F4/80⁺ foi avaliada por citometria de fluxo. Os gráficos **A** e **B** mostram, respectivamente, o número relativo de células peritoneais e alveolares F4/80⁺CD80⁺. Os gráficos **C** e **D** mostram, respectivamente, o aumento da MIF de CD80 em relação a MIF de CD80 nos macrófagos controles peritoneais e alveolares. Cada barra representa a média ± DP, de 3 experimentos, com n=3 cada grupo. * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 em relação ao controle da mesma linhagem; ## p<0,01 e ### p<0,001 em relação ao grupo FliCi da mesma linhagem e & p<0,05; && p<0,001 em relação ao grupo controle dos animais C57Bl/6. Os números no interior dos histogramas (**E**) representam a MIF de CD80 nessas populações, obtidas em um experimento demonstrativo com n=3 para cada grupo, &&& p<0,001 em relação ao grupo controle dos animais C57Bl/6. Os grupos são representados por IC (controle isotópico ■), Controle (animais não inoculados ■), FliCi (▤) e LPS (▨).

—

A porcentagem de macrófagos peritoneais, M1 e M2, provenientes de animais controles, que expressam CD86 foi muito semelhante ao perfil encontrado para CD80, com cerca de 45% e 65%, respectivamente, de macrófagos M1 e M2 positivos para essa molécula (Fig. 7A). A inoculação de FliCi foi capaz de modular significativamente somente a proporção de macrófagos peritoneais M1 CD86⁺, enquanto o LPS não induziu uma modulação significativa na porcentagem de macrófagos peritoneais M1 ou M2 CD86⁺ (Fig 7A).

O compartimento alveolar de ambas as linhagens apresenta menos de 10% de células F4/80⁺CD86⁺ (Fig. 7B). Contudo, a porcentagem de macrófagos alveolares CD86⁺ de ambas as linhagens aumentou de maneira significativa após a inoculação de LPS, ainda que permanecendo em valores baixos (Fig 7B).

A intensidade de fluorescência basal de CD86 apresentada pelos macrófagos peritoneais de ambas linhagens foi semelhante ao observado na expressão de CD80, sendo que os macrófagos peritoneais M2 apresentam maior intensidade de fluorescência basal de CD86 do que os macrófagos peritoneais M1 (Fig 7E). A inoculação de FliCi induziu um aumento significativo na MIF de CD86 nos macrófagos peritoneais M1 e M2. Porém, o LPS não foi capaz de proporcionar o mesmo efeito, induzindo até uma modulação negativa na expressão desse marcador nos macrófagos M2 (Fig. 7C/E). Nos macrófagos alveolares M1 e M2, a expressão basal de CD86 foi similar (Fig. 7E). A injeção de FliCi induziu um aumento mais sutil na expressão de CD86 nos macrófagos alveolares de animais C57Bl/6 e BALB/c, enquanto a inoculação de LPS mostrou uma modulação significativa, com um aumento de aproximadamente 2 vezes na MIF de CD86 nos macrófagos de ambas linhagens (Fig 7D/E).

Figura 7: Avaliação da expressão de CD86 por células F4/80⁺ peritoneais e alveolares. Camundongos C57Bl/6 e BALB/c foram inoculados com 1 µg de FliCi ou LPS i.p. ou i.n. e 48h mais tarde, o PEC e o BAL foram removidos. A expressão de CD86 na população F4/80⁺ foi avaliada por citometria de fluxo. Os gráficos **A** e **B** mostram, respectivamente, o número relativo de células peritoneais e alveolares F4/80⁺CD86⁺. Os gráficos **C** e **D** mostram, respectivamente, o aumento da MIF de CD86 em relação a MIF de CD86 nos macrófagos controles peritoneais e alveolares. Cada barra representa a média ± DP, de 3 experimentos, com n=3 cada grupo. * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 em relação ao controle da mesma linhagem; # p<0,05, ## p<0,01 e ### p<0,001 em relação ao grupo FliCi da mesma linhagem e &&& p<0,001 em relação ao grupo controle dos animais C57Bl/6. Os números no interior dos histogramas (**E**) representam a MIF de CD86 nessas populações, obtidas em um experimento demonstrativo com n=3 para cada grupo, & p<0,05 em relação ao grupo controle dos animais C57Bl/6. Os grupos são representados por IC (controle isotópico ■), Controle (animais não inoculados ■), FliCi (▨) e LPS (▩).

—

O número relativo de macrófagos M1 e M2 que expressam CD40 no peritônio de animais controles foi similar ao perfil observado para a expressão de CD80 e CD86, com os macrófagos M2 mostrando a maior porcentagem basal de células F4/80⁺CD40⁺ (Fig 8A). Em camundongos C57Bl/6, a inoculação de FliCi induziu um aumento de 50% na porcentagem de macrófagos CD40⁺, sendo superior ao efeito do LPS. Já os animais BALB/c revelaram um aumento de 17% na porcentagem de macrófagos CD40⁺ após a inoculação de ambos os agonistas (Fig 8A). Semelhante ao observado na porcentagem de macrófagos alveolares CD86⁺, apenas cerca de 2% das células alveolares F4/80⁺ de ambos os animais apresentam expressão basal de CD40 (Fig 8B). Enquanto a FliCi não modulou significativamente a porcentagem de células alveolares F4/80⁺CD40⁺, a inoculação de LPS induziu um aumento bastante significativo na porcentagem dessas células em ambas as linhagens (Fig 8B).

A intensidade de fluorescência basal de CD40 nos macrófagos peritoneais M2, assim como para expressão de CD80 e CD86, é superior aos macrófagos peritoneais M1 (Fig. 8E). A inoculação de FliCi, em ambos os animais, induziu uma modulação significativa na expressão de CD40 dos macrófagos peritoneais, sendo mais expressiva nos macrófagos M1. Além disso, somente os macrófagos peritoneais M1 foram responsivos ao LPS, ainda que de maneira mais sutil quando comparado com a FliCi (Fig. 8C/E).

Nos macrófagos alveolares, a MIF de CD40 é semelhante nos macrófagos M1 e M2 (Fig.8E). A inoculação dos agonistas de TLR induziu uma modulação significativa na intensidade de fluorescência de CD40 nos macrófagos alveolares de ambas as linhagens, contudo o LPS foi um estímulo mais potente (Fig. 8D/E).

—

Esses dados nos sugerem que os macrófagos peritoneais M2 apresentam a maior intensidade de fluorescência basal de MHCII, CD80, CD86 e CD40 que os macrófagos M1. Ainda, a FliCi é o estímulo mais potente na modulação da expressão desses marcadores nos macrófagos peritoneais, ainda que macrófagos M2 se mostrem sensíveis também ao estímulo com LPS. De maneira interessante, o compartimento bronqueoalveolar apresenta um número reduzido de macrófagos CD86⁺ e CD40⁺ e essas células são mais responsivas ao LPS do que a FliCi. Assim, podemos dizer que os macrófagos residentes em diferentes tecidos mostram diferenças basais na expressão de MHCII e moléculas coestimulatórias e são sensíveis a agonistas de TLR particulares.

Figura 8: Avaliação da expressão de CD40 por células F4/80⁺ peritoneais e alveolares. Camundongos C57Bl/6 e BALB/c foram inoculados com 1 µg de FliCi ou LPS i.p. ou i.n. e 48h mais tarde, o PEC e o BAL foram removidos. A expressão de CD40 na população F4/80⁺ foi avaliada por citometria de fluxo. Os gráficos **A** e **B** mostram, respectivamente, o número relativo de células peritoneais e alveolares F4/80⁺CD40⁺. Os gráficos **C** e **D** mostram, respectivamente, o aumento da MIF de CD40 em relação a MIF de CD40 nos macrófagos controles peritoneais e alveolares. Cada barra representa a média ± DP, de 3 experimentos, com n=3 cada grupo. * p<0,05; ** p<0,01 e *** p<0,001 em relação ao controle da mesma linhagem; # p<0,05 e ## p<0,01 em relação ao grupo FliCi da mesma linhagem e &&p<0,01 em relação ao grupo controle dos animais C57Bl/6. Os números no interior dos histogramas (**E**) representam a MIF de CD40 nessas populações, obtidas em um experimento demonstrativo com n=3 para cada grupo, && p<0,01 em relação ao grupo controle dos animais C57Bl/6. Os grupos são representados por IC (controle isotópico ■), Controle (animais não inoculados ■), FliCi (▨) e LPS (▨).

4.2 POLARIZAÇÃO M1/M2: UM CONCEITO REVISITADO

4.2.1 Polarização M1/M2 é observada apenas no ambiente peritoneal

Mills et al. (9), tomaram por base a produção de NO e TGF- β por macrófagos peritoneais para descreverem o conceito de polarização dessas células. Assim, macrófagos peritoneais provenientes de linhagens Th1 como C57Bl/6 e B10.A foram descritos como macrófagos M1 por sua habilidade em produzir altos níveis de NO em resposta a estímulos clássicos como LPS e IFN- γ . Em contrapartida, macrófagos de BALB/c e DBA/2 são incapazes de produzir NO em resposta a esses estímulos, fato que poderia ser explicado pelos altos níveis de TGF- β secretados por essas células. Para verificar o perfil de produção de NO das diferentes populações de macrófagos, as células aderentes obtidas do PEC ou BAL de camundongos C57Bl/6 ou BALB/c, controles e previamente inoculados com FliCi ou LPS, foram colocadas em cultura por 48h, com meio ou com FliCi ou LPS (1 μ g/mL).

A Fig. 9A mostra que as células peritoneais aderentes (CPA) de animais controles apresentam produção de baixos níveis de NO em resposta aos estímulos *in vitro* com FliCi ou LPS. Porém, CPA obtidas de animais C57Bl/6 previamente inoculados com FliCi, apresentam produção espontânea de níveis consideráveis de NO, fato não observado com CPA de animais inoculados com LPS. O reestímulo *in vitro* com os agonistas induziu a secreção de altos níveis de NO por CPA de animais previamente inoculados com FliCi e LPS, sendo encontrado, na cultura desses últimos, metade da concentração de nitrito. Em nenhuma das situações descritas acima foi possível encontrar níveis significantes de nitrito nas culturas de CPA de

animais BALB/c, confirmando a polarização M1/M2 no ambiente peritoneal e a deficiência dos macrófagos M2 para a produção de NO.

A produção de NO por células alveolares aderentes (CAA) foi até 7 vezes menor do que encontrado em CPA (Fig. 9B). Interessantemente, o perfil de resposta dos macrófagos M1 e M2 alveolares foi muito semelhante, sendo o LPS o único estímulo capaz de induzir a secreção de níveis consideráveis de NO por CAA de animais previamente inoculados com os agonistas de TLR *in vivo*.

Assim, esses resultados indicam que a FliCi é um estímulo *in vivo* mais potente que o LPS para a produção de NO por macrófagos M1 peritoneais, enquanto os macrófagos alveolares se mostram mais sensíveis ao estímulo com LPS. Ainda, o conceito da polarização M1/M2 pode ser aplicado no compartimento peritoneal, mas não no compartimento bronqueoalveolar.

Figura 9: Avaliação da produção de NO. Produção de NO por células aderentes obtidas dos lavados peritoneal **(A)** e alveolar **(B)** de camundongos C57Bl/6 e BALB/c. Os animais foram inoculados com 1 µg de FliCi ou LPS i.p. ou i.n. e 48h mais tarde, o BAL e o PEC foram removidos. As células foram colocadas em cultura para aderir por 4h, lavadas para remoção das células não aderentes e estimuladas *in vitro* por 48h com apenas meio de cultura (-), 1 µg/mL de FliCi ou 1 µg/mL de LPS. Após esse período, o sobrenadante das culturas foi removido e o NO mensurado utilizando o Reagente de Griess. Os dados representam a média ± DP de um experimento demonstrativo, com n = 3 cada grupo. * p<0,05 em relação ao grupo C (-), # p<0,05 em relação ao grupo FliCi (-) e & p<0,05 em relação ao grupo LPS (-). Os estímulos *in vivo* são representados no gráfico, enquanto os estímulos *in vitro* são representados por □ (-) ou sem estímulo, ■ estímulo com FliCi e ■ LPS.

4.2.2 Macrófagos peritoneais como uma população heterogênea: polarização M1/M2 no mesmo microambiente?

F4/80 é uma glicoproteína presente na superfície celular e considerada um dos marcadores mais específicos de macrófagos murinos (55). Porém, como revisto por Gordon et al. (11), a expressão desse marcador não é homogênea entre as diferentes populações de macrófagos. Surpreendentemente, durante a análise do papel da FliCi e do LPS na ativação de macrófagos M1 e M2 foi observado que os macrófagos peritoneais se apresentam como duas populações distintas, com expressão heterogênea de F4/80, sendo uma delas F4/80^{high} e a outra F4/80^{low} (Fig. 10A). Diferente do compartimento peritoneal, o compartimento alveolar apresenta uma população homogênea de macrófagos com expressão intermediária de F4/80, denominada F4/80^{int} (Fig. 10B).

Para verificar a morfologia dessas células, as populações peritoneais F4/80^{hi} e F4/80^{lo} de camundongos controles foram separadas por *sorting*, utilizando o FACS Vantage. As subpopulações peritoneais, obtidas com uma pureza de cerca de 95% (dados não mostrados), foram colocadas em cultura por 24h em lâminas de 8 poços e coradas com o kit de coloração Instant-Prov. A análise microscópica mostrou diferenças exuberantes entre a população F4/80^{lo} e F4/80^{hi} (Fig. 10A). Enquanto a população F4/80^{lo} se mostra mais alongada e polarizada, com prolongamentos semelhantes aos dendritos presentes células dendríticas, a população F4/80^{hi} é mais arredondada, com grande citoplasma, e tem a morfologia classicamente descrita para os macrófagos (Fig. 10A). Nesse sentido, a população de macrófagos alveolares apresenta as mesmas características descritas acima para a população F4/80^{hi}, confirmando a morfologia clássica de macrófagos (Fig. 10B).

Figura 10: Caracterização fenotípica e morfológica das populações de macrófagos peritoneais e alveolares. As células peritoneais (A) e alveolares (B) de animais C57Bl/6 controles foram analisadas por citometria de fluxo quanto à expressão de F4/80. Em seguida, as subpopulações peritoneais, $F4/80^{hi}$ e $F4/80^{lo}$, foram separadas por *sorting* em um FACS Vantage, de acordo com a intensidade de expressão dessa molécula. As subpopulações peritoneais, assim como os macrófagos alveolares, foram colocadas em lâminas de cultura de 8 poços por 24h. As lâminas foram coradas com o kit de coloração Instant-Prov. Os slides representam um aumento de 40x em microscopia óptica. Os experimentos foram repetidos ao menos 3 vezes, mostrando o mesmo perfil de resultados. Os dados apresentados representam um experimento demonstrativo com $n=3$ para cada grupo.

4.2.3 Macrófagos $F4/80^{lo}$ apresentam maior expressão de mTGF- $\beta 1$ e os macrófagos $F4/80^{hi}$ expressam maiores níveis de iNOS

Como já mencionado, os macrófagos podem ser classificados em M1 e M2, com relação ao perfil metabólico e funcional apresentado. Em resposta ao LPS ou IFN- γ , macrófagos M1 secretam altos níveis de NO (9), uma das principais moléculas envolvidas na capacidade microbicida dessas células (56, 57). Os

macrófagos M2 são conhecidos por secretarem espontaneamente altos níveis de TGF- β e parecem ativados para o reparo tecidual (9-11). Assim, tomamos por base a expressão intracelular da enzima iNOS e de TGF- β 1 da membrana dessas células para avaliar o perfil funcional das populações F4/80^{lo} e F4/80^{hi}.

Para verificar o perfil basal e induzido da expressão da iNOS nas subpopulações de macrófagos peritoneais, as células obtidas do lavado peritoneal de camundongos controles e inoculados com os agonistas de TLR foram colocadas em cultura com meio apenas ou reestimuladas *in vitro* com baixas doses de rIFN- γ (1 ng/ml) por 5h, na presença de monensina (stop golgi). As células foram manipuladas como descrito em *Material e Métodos* e analisadas por citometria de fluxo. Como controle foi realizada a marcação intracelular apenas com o anticorpo secundário marcado com biotina seguido da marcação com SA fluorescente. As populações F4/80^{hi} e F4/80^{lo} foram selecionadas em janelas separadas, e foram consideradas células positivas para iNOS, aquelas com marcação acima de seu respectivo controle.

A população de macrófagos F4/80^{hi} (Fig.11B) apresenta um número basal 30% maior de células que expressam iNOS que o encontrado na população F4/80^{lo} (Fig. 11A). Porém, o comportamento das duas populações em resposta aos agonistas de TLR foi muito semelhante, sendo que o estímulo com FliCi aumentou de 2 a 3 vezes a frequência de células iNOS⁺ dentro das duas subpopulações, enquanto o LPS não proporcionou o mesmo efeito.

Claramente, a expressão de iNOS se torna mais estável na presença de baixas doses de rIFN- γ , como previamente descrito (58, 59). Na presença de rIFN- γ , a frequência de células que expressam iNOS aumentou até 10 vezes em relação às células obtidas dos animais controles e cerca de 3 vezes em relação às células

obtidas dos animais previamente inoculados, inclusive com LPS (Fig 11). Curiosamente, esse efeito foi observado nas duas subpopulações, ainda que frequências mais altas são sempre encontradas na população F4/80^{hi}.

Figura 11: Avaliação da expressão de iNOS por células F4/80^{lo} (A) e F4/80^{hi} (B). Os animais foram inoculados com 1 µg de FliCi ou LPS i.p. e 48h mais tarde o PEC foi removido. As células foram colocadas em cultura com meio de cultura (-) ou 1 ng/mL de rIFN-γ, na presença de monensina, por 5h. Após esse período, as células foram manipuladas utilizando o kit cytofix/cytoperm e marcadas com anti-F4/80 (FITC), IgG de coelho anti-iNOS de camundondongo, anti-IgG de coelho marcada com biotina e SA (Cy), sendo que os controles das marcações não foram incubados com o anticorpo anti-iNOS. Os números apresentados nos *plots* mostram o número relativo de células iNOS⁺ dentro de cada população celular. Os experimentos foram repetidos ao menos três vezes, mostrando o mesmo perfil de resultados. Os dados apresentados representam um experimento demonstrativo com n=4 para cada grupo.

A expressão de mTGF-β1 foi avaliada em células F4/80^{lo} e F4/80^{hi} obtidas de animais controles ou inoculados previamente com os agonistas de TLR, como previamente descrito. As células foram consideradas positivas para mTGF-β1 de

acordo com o controle de marcação de cada população, o qual foi obtido apenas com a marcação de F4/80 e SA.

De maneira oposta à expressão de iNOS, a população F4/80^{lo} é a única que apresenta expressão basal de mTGF- β 1, ainda que em apenas 3% das células (Fig. 12A). Curiosamente, porém, a inoculação dos agonistas de TLR induziu uma modulação positiva no número relativo de células F4/80^{hi} (Fig. 12B) e F4/80^{lo} positivas para mTGF- β 1, sendo as maiores frequências reservadas à população F4/80^{lo} (Fig. 12A).

Esses resultados demonstram que há uma expressão preferencial de iNOS na população F4/80^{hi} e de mTGF- β 1 na população F4/80^{lo}, o que poderia indicar que, em um mesmo ambiente, há macrófagos com perfis basais de ativação distintos.

Figura 12: Avaliação da expressão de mTGF- β 1 por macrófagos F4/80^{lo} (A) e F4/80^{hi} (B). Os animais foram inoculados com 1 μ g de FliCi ou LPS i.p. e 48h mais tarde o PEC foi removido. As células foram marcadas com anti-F4/80 (FITC), anti-mTGF- β 1 (Biotina) e SA (Cy), sendo que os controles das marcações não foram incubados com anti-mTGF- β 1. Os números apresentados nos *plots* mostram o número relativo de células mTGF- β 1⁺ dentro de cada população celular. Os experimentos foram repetidos ao menos três vezes, mostrando o mesmo perfil de resultados. Os dados apresentados representam um experimento demonstrativo com n=4 para cada grupo.

—

5 DISCUSSÃO

—

A descoberta dos receptores do tipo *Toll* em mamíferos revolucionou os conhecimentos científicos a respeito do reconhecimento da imunidade inata e fez com que esse assunto fosse amplamente explorado na literatura (46, 52). Desde então, o que era tido como inespecífico ganhou certa especificidade, uma vez que diferentes padrões moleculares, pertencentes a grupos distintos de patógenos, ligam-se a receptores específicos, gerando respostas particulares. Isso quer dizer que cada TLR liga o(s) seu(s) padrão(ões) molecular(es) e essa ligação induz uma resposta celular peculiar que depende das moléculas adaptadoras e fatores de transcrição envolvidos (60, 61). Nos últimos 10 anos, foram muitas as contribuições nesse assunto, porém muitos aspectos envolvidos no reconhecimento diferencial desses padrões moleculares necessitam de maiores elucidações.

Esses aspectos ganham ainda mais importância quando consideramos a imensa heterogeneidade existente entre as células da imunidade inata, especialmente nas subpopulações de macrófagos e células dendríticas. Essas células, presentes em diferentes tecidos do organismo, são consideradas as sentinelas imunológicas, que reconhecem o *non self* e iniciam e conduzem a resposta imunológica. Assim, esse trabalho teve como objetivo principal a avaliação comparativa da ativação de diferentes populações de macrófagos pelos agonistas de TLR4 e TLR5. Utilizamos macrófagos provenientes de diferentes compartimentos (espaços bronqueoalveolar e peritoneal) e com perfis de ativação distintos, M1 (provenientes de animais C57Bl/6) e M2 (provenientes de animais BALB/c), como previamente descrito por Mills et al. (9). Dentro de todas as particularidades encontradas, o padrão fica restrito ao fato de que o microambiente no qual as populações celulares se encontram parece influenciar os tipos celulares recrutados em resposta aos agonistas de TLR e a sensibilidade dos macrófagos aos mesmos,

—
além de determinar a expressão basal e induzida de moléculas envolvidas com a apresentação de antígenos.

No espaço bronqueoalveolar, os dois agonistas de TLR induzem o recrutamento de neutrófilos, como previamente demonstrado por vários grupos (37, 41, 62). Nossos dados ainda indicam que os neutrófilos são recrutados preferencialmente em camundongos BALB/c, pelo estímulo com LPS, quando houve um aumento bastante expressivo, de 15 vezes, no número dessas células. O LPS apresenta o mesmo potencial neutrofílico no compartimento peritoneal, porém, de maneira interessante, há uma clara migração preferencial de macrófagos em resposta à FliCi para esse espaço, dados não encontrados na literatura. Uma possível explicação para os efeitos distintos da FliCi no compartimento bronqueoalveolar e peritoneal poderia ser dada pelo fato de que a FliCi parece ser reconhecida de maneira distinta nesses dois compartimentos (41). Utilizando quimeras nas quais células de medula óssea de animais TLR5^{+/+} foram transferidas para animais TLR5^{-/-} irradiados, Feuillet et al. (41) demonstraram que a inoculação i.p. de FliCi (1 µg/animal) foi capaz de induzir uma reação inflamatória caracterizada por níveis séricos elevados de IL-6 e IL-12, mostrando a dependência da expressão de TLR5 em células imunes para essa resposta. Porém, a intensa inflamação neutrofílica com a presença de IL-6 e IL-12 no lavado bronqueoalveolar só foi alcançada nos animais TLR5^{+/+}, mesmo quando esses animais foram irradiados e posteriormente reconstituídos com células da medula óssea de animais TLR5^{-/-}, sugerindo, nesse caso, o reconhecimento da FliCi por células não imunes.

O reconhecimento particular da FliCi nos dois microambientes também poderia explicar o potencial desse agonista em aumentar a expressão de moléculas coestimulatórias preferencialmente em macrófagos peritoneais, enquanto o LPS

modula a expressão dessas moléculas mais intensamente em macrófagos alveolares. Experimentos conduzidos com células dendríticas humanas também mostram efeitos distintos da FliCi e do LPS na expressão de moléculas coestimulatórias, em que a FliCi é mais eficaz em induzir a expressão de CD80, enquanto o LPS modula mais visivelmente a expressão de CD86, estimulando, assim, a capacidade de apresentação de aloantígenos por essas células (63). Porém, em células dendríticas esplênicas de camundongos, a inoculação i.p. com FliB ou LPS aumenta igualmente a expressão de CD80, CD86 e CD40 (41). Nesse sentido, a resposta diferencial das populações de macrófagos a agonistas particulares mostrou-se independente do perfil de ativação dos macrófagos avaliados, uma vez que o comportamento foi semelhante nos macrófagos obtidos de camundongos C57Bl/6 (M1) e BALB/c (M2). Porém, mostrou ser claramente determinada pelo microambiente no qual essas células se encontram.

Muitas das diferenças entre as heterogêneas populações de macrófagos são geralmente justificadas pela localização dessas células nos distintos tecidos, onde adquirem funções especializadas (11). No entanto, as diferenças basais entre os macrófagos residentes em tecidos distintos não são bem esclarecidas pela literatura. Nesse sentido, nossos dados demonstram que os macrófagos peritoneais apresentam uma expressão basal e induzida mais elevada de moléculas envolvidas com a apresentação de antígenos do que os macrófagos alveolares. Além disso, mostram uma modulação sutil na expressão de MHCII e CD86 quando comparada com a expressão de CD80 e CD40. No compartimento bronqueoalveolar é encontrado um número basal bastante reduzido de macrófagos MHCII⁺, CD86⁺ e CD40⁺, porém, a porcentagem basal de macrófagos alveolares que expressam CD80 pode ser considerada relevante.

—

Ao contrário das características fenotípicas induzidas pelos agonistas, o fenótipo basal dos macrófagos parece ser determinado também por seu perfil de ativação. Assim, nossos experimentos demonstraram que macrófagos peritoneais e alveolares, M1 e M2, apresentam níveis distintos de moléculas relacionadas com a apresentação de antígenos. Surpreendentemente, a maior MIF e porcentagem basal de células expressando MHCII, CD80, CD86 e CD40 ficam sempre reservadas aos macrófagos peritoneais M2. Esses dados sugerem que essas células poderiam desempenhar outras funções de maneira mais eficaz que os macrófagos M1, como a apresentação de antígenos, apesar do menor potencial microbicida (9) e da baixa produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF- α e IL-23, e elevada produção de IL-10 e TGF- β (64). Porém, nos macrófagos alveolares esse perfil não é tão aparente, sendo ainda que os macrófagos M1 apresentam uma expressão mais elevada de CD80 do que macrófagos M2.

Além do aumento na expressão de moléculas envolvidas com a apresentação de antígeno, a FliCi também se mostrou mais eficaz que o LPS na indução da produção de NO por macrófagos M1 peritoneais. Já os macrófagos M2 do peritônio não produziram NO em nenhuma das situações descritas, como esperado. Sabe-se que o LPS é capaz de induzir a produção de NO em culturas de macrófagos somente quando é administrado em altas doses ($> 10 \mu\text{g}$) (65, 66). Porém, quando as células são pré-ativadas com IFN- γ ou IL-12 e/ou IL-18, baixas doses de LPS são capazes de induzir a produção de níveis bastante altos de NO. Isso se explica pelo fato de que o promotor gênico da iNOS contém dois sítios de ligação, um que se liga ao NF- κB (ativado pela cascata intracelular dos TLR) e outro para IRF-1 (induzido por IFN- γ) (58, 59). Assim, a produção de altos níveis de NO requer os dois sinais, ainda que alta concentração de LPS poderia dispensar o sinal dado via IRF-1. A

—

mesma explicação parece se aplicar para a FliCi, uma vez que nenhum dos dois agonistas (na dose de 1 µg/mL) foi capaz de estimular *in vitro* a produção de NO por macrófagos peritoneais de animais controles. Porém, a inoculação de FliCi foi o único estímulo capaz de induzir a produção de níveis consideráveis de nitrito (27 µM) pelos macrófagos, sugerindo que esse efeito advenha de fatores programadores induzidos por esse agonista *in vivo*, como a produção de IL-12, IL-18 e IFN-γ, que estariam induzindo a ativação da iNOS via IRF-1.

De maneira interessante, o reestímulo *in vitro* com FliCi ou LPS dos macrófagos provenientes de animais previamente inoculados com os agonistas induziu uma secreção ainda mais elevada de NO, chegando a níveis de 70 µM. No corrente ano, Bagchi et al. (66) demonstraram que o sinergismo, a programação e a tolerância exercida por agonistas de TLR dependem da via de sinalização utilizada. Quando macrófagos são estimulados com um agonista D (MyD88-dependente) e um agonista I (MyD88-independente) concomitantemente, pode-se notar uma resposta mais acentuada na produção de TNF-α, IL-6 e MIP-1α, indicando sinergismo. Quando os macrófagos são estimulados com esses agonistas, porém com intervalo de 20h entre os estímulos, nota-se a programação proporcionada pelo primeiro estímulo. De maneira interessante, o estímulo seqüencial com dois agonistas D ou I confere um estado de tolerância ou tolerância cruzada (66). Nossos resultados sugerem que o estímulo realizado *in vivo* com FliCi ou LPS foi capaz de programar os macrófagos fazendo com que, diante de um segundo estímulo com os mesmos agonistas, a resposta fosse potencializada. Esse perfil é encontrado até mesmo quando é utilizado o mesmo agonista para o estímulo *in vivo* e *in vitro*, contradizendo os dados de Bagchi et al. (66).

—

Ao contrário do peritônio, o LPS foi o único estímulo capaz de induzir a secreção de níveis consideráveis de NO nos macrófagos alveolares, ainda que até 7 vezes menores do que encontrados em macrófagos peritoneais. Ainda, o perfil de resposta dos macrófagos M1 e M2 alveolares para a produção de NO, parâmetro fundamental para essa caracterização (9), foi muito semelhante. Esse fato parece importante, uma vez que a polarização M1 e M2 de macrófagos, amplamente empregada na literatura (9, 10, 16, 67), parece restringir-se ao microambiente no qual se encontram essas células.

Porém, além das diferenças existentes entre os macrófagos residentes em distintos microambientes, a mesma localização anatômica pode também apresentar populações heterogêneas de macrófagos. Nesse sentido, nossos dados revelaram que a cavidade peritoneal é constituída por duas subpopulações de macrófagos com expressão heterogênea de F4/80, sendo uma delas F4/80^{high} e a outra F4/80^{low}. Já o compartimento alveolar apresenta uma população homogênea de macrófagos com expressão intermediária de F4/80, denominada F4/80^{int}. Taylor et al. demonstraram que a inoculação i.p. de zimosam induz um recrutamento bastante expressivo de neutrófilos associado a um aumento no número de macrófagos F4/80^{lo}, nomeados como macrófagos inflamatórios. Ainda, a inoculação de zimosam induz uma depleção nos macrófagos F4/80^{hi}, nomeados por esses autores como macrófagos residentes, podendo refletir a migração dessas células para o linfonodo drenante (12). Apesar desses resultados, os autores não explicam de maneira detalhada a existência de duas populações heterogêneas na cavidade peritoneal, sendo a heterogeneidade dos macrófagos peritoneais um assunto ainda não abordado na literatura.

—

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura aborda as diferenças morfológicas e funcionais existentes entre populações de macrófagos residentes em tecidos distintos, justificando essas diferenças pela especialização e a função adotada pelos macrófagos nos diferentes microambientes (11). Nesse sentido, podemos citar a capacidade de remodelamento ósseo dos osteoclastos, a alta expressão de receptores *scavenger* e receptores para padrões moleculares em macrófagos alveolares e a alta capacidade fagocítica e bactericida, porém baixa produção de citocinas pró-inflamatórias apresentada pelos macrófagos da lâmina própria (11). Contudo, a presença de populações heretogêneas num mesmo microambiente é compartilhada por órgãos como o baço, onde parece haver ao menos três diferentes subpopulações de macrófagos (11, 14). Macrófagos encontrados na polpa vermelha são células com alta expressão de F4/80 e estão envolvidos com a remoção de eritrócitos. Já na polpa branca deste órgão, foi demonstrada a existência de duas populações distintas de macrófagos, macrófagos metalofílicos e macrófagos da zona marginal, os quais possuem baixa expressão de F4/80. Os macrófagos da zona marginal são caracterizados pela expressão de altos níveis de receptores para padrões moleculares e receptores *scavenger*, sendo então associados com o *clearance* de patógenos. Já os macrófagos metalofílicos são encontrados adjacentes à polpa branca e, embora sua função ainda não seja totalmente clara, essas células parecem estar envolvidas na resposta a infecções virais (13).

A regulação negativa na expressão de F4/80 nos macrófagos residentes poderia explicar a existência da população F4/80^{lo}. Esse fenômeno foi observado após a infecção intraperitoneal de camundongos com o bacilo *Calmette-Guérin*, a qual foi acompanhada por uma diminuição da expressão do receptor FcγR, sendo

—

essas modificações associadas à ativação celular (68). Fenômeno semelhante foi observado após tratamento dos macrófagos com IFN- γ exógeno (69). Porém, a presença das subpopulações F4/80^{hi} e F4/80^{lo}, em proporções bastante semelhantes, em animais controles, levanta a hipótese da co-existência de duas populações distintas. Ainda, as diferenças exuberantes encontradas na análise morfológica dessas subpopulações poderia ser mais um argumento a favor dessa hipótese. Enquanto a população F4/80^{hi} apresenta morfologia clássica de macrófagos, arredondadas, com grande citoplasma e núcleo irregular, a população F4/80^{lo} se mostra alongada e adere-se ao plástico de maneira polarizada, com prolongamentos semelhantes aos encontrados em células dendríticas.

Esse fato nos levou a questionar a importância da co-existência dessas duas populações no mesmo microambiente. Uma possibilidade para explicar a convivência das duas populações no peritônio seria dessas células assumirem papéis distintos durante a resposta imune, como controle de patógenos, desempenhado por macrófagos M1, e reparo tecidual, descrito para macrófagos M2 (9, 10, 67). Com relação aos parâmetros utilizados por Mills et al. (9, 10, 67) para diferenciar macrófagos M1 e M2, nossos dados sugerem que a população F4/80^{hi} apresenta uma tendência ao perfil de polarização M1, uma vez que mostra um número basal e induzido de células iNOS⁺ maior que a população F4/80^{lo}. Por sua vez, a população F4/80^{lo} apresenta uma porcentagem maior de células mTGF- β 1⁺ do que a população F4/80^{hi}, demonstrando uma tendência ao perfil M2. As duas proteínas foram reguladas positivamente a partir dos estímulos com FliCi e LPS em ambas as populações, mas sempre os maiores valores de células iNOS⁺ ficaram reservados aos macrófagos F4/80^{hi} e a maior porcentagem de células mTGF- β 1⁺ foram encontradas na população F4/80^{lo}. Mais uma vez, a FliCi foi o estímulo mais

—
eficaz na indução da expressão de iNOS, fato que poderia estar relacionado ao seu potencial para a ativação de IL-12, uma vez que essa citocina está estritamente ligada ao direcionamento para o perfil M1 (16).

Assim, ainda que muitas questões permaneçam abertas, tornando a heterogeneidade desse sistema ainda mais fascinante, nossos dados nos permitem especular que, em um mesmo microambiente, podem ser encontradas populações de macrófagos com perfis de ativação distintos, que poderiam assumir papéis específicos durante a resposta imune, justificando a co-existência das mesmas em um mesmo ambiente.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Volkman A, Gowans JL. The Origin of Macrophages from Bone Marrow in the Rat. *Br J Exp Pathol*. 1965;46:62-70.
2. van Furth R. Monocyte production during inflammation. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1985;8(2):205-11.
3. Unanue ER. Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response. *Immunol Rev*. 1997;158:11-25.
4. Villacres-Eriksson M. Antigen presentation by naive macrophages, dendritic cells and B cells to primed T lymphocytes and their cytokine production following exposure to immunostimulating complexes. *Clin Exp Immunol*. 1995;102(1):46-52.
5. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:593-623.
6. Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol*. 1975;78(1):71-100.
7. Polverini PJ, Cotran PS, Gimbrone MA, Jr., Unanue ER. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature*. 1977;269(5631):804-6.
8. Werb Z, Gordon S. Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. *J Exp Med*. 1975;142(2):346-60.
9. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000;164(12):6166-73.
10. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677-86.
11. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(12):953-64.
12. Taylor PR, Brown GD, Geldhof AB, Martinez-Pomares L, Gordon S. Pattern recognition receptors and differentiation antigens define murine myeloid cell heterogeneity ex vivo. *Eur J Immunol*. 2003;33(8):2090-7.
13. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity; 2005.
14. Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:901-44.
15. Nathan C. Mechanisms and modulation of macrophage activation. *Behring Inst Mitt*. 1991(88):200-7.

16. Bastos KR, Alvarez JM, Marinho CR, Rizzo LV, Lima MR. Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile. *J Leukoc Biol.* 2002;71(2):271-8.
17. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003;19(1):71-82.
18. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol.* 2006;177(10):7303-11.
19. McGreal EP, Miller JL, Gordon S. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr Opin Immunol.* 2005;17(1):18-24.
20. Greaves DR, Gordon S. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res.* 2005;46(1):11-20.
21. Gay NJ, Keith FJ. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature.* 1991;351(6325):355-6.
22. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature.* 2004;430(6996):257-63.
23. Takeda AA, dos Santos JI, Marcussi S, Silveira LB, Soares AM, Fontes MR. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an acidic phospholipase A(2) complexed with p-bromophenacyl bromide and alpha-tocopherol inhibitors at 1.9- and 1.45-A resolution. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1699(1-2):281-4.
24. Netea MG, van der Graaf C, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J Leukoc Biol.* 2004;75(5):749-55.
25. Inohara, Chamaillard, McDonald C, Nunez G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:355-83.
26. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature.* 2004;430(6996):213-8.
27. Zamboni DS, Kobayashi KS, Kohlsdorf T, Ogura Y, Long EM, Vance RE, et al. The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. *Nat Immunol.* 2006;7(3):318-25.
28. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem.* 2003;278(8):5509-12.

29. Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(5):371-82.
30. Tanabe T, Chamaillard M, Ogura Y, Zhu L, Qiu S, Masumoto J, et al. Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *Embo J.* 2004;23(7):1587-97.
31. Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol.* 2003;4(7):702-7.
32. McDonald C, Inohara N, Nunez G. Peptidoglycan signaling in innate immunity and inflammatory disease. *J Biol Chem.* 2005;280(21):20177-80.
33. Russo M, Lutton JD. Decreased in vivo and in vitro colony stimulating activity responses to bacterial lipopolysaccharide in C3H/HeJ mice. *J Cell Physiol.* 1977;92(2):303-7.
34. Sultzzer BM. Genetic control of leucocyte responses to endotoxin. *Nature.* 1968;219(5160):1253-4.
35. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 1998;282(5396):2085-8.
36. Macnab RM. How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol.* 2003;57:77-100.
37. Feldman M, Bryan R, Rajan S, Scheffler L, Brunnert S, Tang H, et al. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun.* 1998;66(1):43-51.
38. Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature.* 2003;424(6949):643-50.
39. Reichhart JM. TLR5 takes aim at bacterial propeller. *Nat Immunol.* 2003;4(12):1159-60.
40. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* 2001;410(6832):1099-103.
41. Feuillet V, Medjane S, Mondor I, Demaria O, Pagni PP, Galan JE, et al. Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(33):12487-12492.
42. McDermott PF, Ciacci-Woolwine F, Snipes JA, Mizel SB. High-affinity interaction between gram-negative flagellin and a cell surface polypeptide results in human monocyte activation. *Infect Immun.* 2000;68(10):5525-9.

43. Eaves-Pyles TD, Wong HR, Odoms K, Pyles RB. Salmonella flagellin-dependent proinflammatory responses are localized to the conserved amino and carboxyl regions of the protein. *J Immunol.* 2001;167(12):7009-16.
44. Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Barrett SL, et al. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol.* 2003;4(12):1247-53.
45. Molofsky AB, Byrne BG, Whitfield NN, Madigan CA, Fuse ET, Tateda K, et al. Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts Legionella pneumophila infection. *J Exp Med.* 2006;203(4):1093-104.
46. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2004;5(10):987-95.
47. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med.* 2001;194(6):863-9.
48. Huang Q, Liu D, Majewski P, Schulte LC, Korn JM, Young RA, et al. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science.* 2001;294(5543):870-5.
49. Luna MG, Martins MM, Newton SM, Costa SO, Almeida DF, Ferreira LC. Cloning and expression of colonization factor antigen I (CFA/I) epitopes of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) in Salmonella flagellin. *Res Microbiol.* 1997;148(3):217-28.
50. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol.* 1988;141(7):2407-12.
51. Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1993;159(1-2):197-207.
52. Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol.* 2005;560:11-8.
53. Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:29-53.
54. Collins M, Ling V, Carreno BM. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol.* 2005;6(6):223.
55. Austyn JM, Gordon S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol.* 1981;11(10):805-15.
56. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* 2001;2(10):907-16.

57. Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(16):8841-8.
58. Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, et al. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(20):9730-4.
59. Kamijo R, Harada H, Matsuyama T, Bosland M, Gerecitano J, Shapiro D, et al. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science*. 1994;263(5153):1612-5.
60. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216.
61. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):499-511.
62. Honko AN, Mizel SB. Mucosal administration of flagellin induces innate immunity in the mouse lung. *Infect Immun*. 2004;72(11):6676-9.
63. Means TK, Hayashi F, Smith KD, Aderem A, Luster AD. The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J Immunol*. 2003;170(10):5165-75.
64. Mantovani A, Sica A, Locati M. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol*. 2007;37(1):14-6.
65. Bastos RG, Johnson WC, Brown WC, Goff WL. Differential response of splenic monocytes and DC from cattle to microbial stimulation with *Mycobacterium bovis* BCG and *Babesia bovis* merozoites. *Vet Immunol Immunopathol*. 2007;115(3-4):334-45.
66. Bagchi A, Herrup EA, Warren HS, Trigilio J, Shin HS, Valentine C, et al. MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists. *J Immunol*. 2007;178(2):1164-71.
67. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(1):23-35.
68. Ezekowitz RA, Austyn J, Stahl PD, Gordon S. Surface properties of bacillus Calmette-Guerin-activated mouse macrophages. Reduced expression of mannose-specific endocytosis, Fc receptors, and antigen F4/80 accompanies induction of Ia. *J Exp Med*. 1981;154(1):60-76.
69. Ezekowitz RA, Gordon S. Down-regulation of mannosyl receptor-mediated endocytosis and antigen F4/80 in bacillus Calmette-Guerin-activated mouse

—
macrophages. Role of T lymphocytes and lymphokines. J Exp Med.
1982;155(6):1623-37.