Andrea Gil F. de Arruda

**ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVAÇÃO DE
MACRÓFAGOS DE LINHAGENS DE
CAMUNDONGOS GENETICAMENTE
SELECIONADOS PARA A REATIVIDADE
INFLAMATÓRIA AGUDA**

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

Orientadora: Dra. Nancy Starobinas

Área de concentração: Imunologia

**São Paulo
2008**

RESUMO

ARRUDA, A. G. F. **Estudo comparativo da ativação de macrófagos das linhagens de camundongos selecionadas para reatividade inflamatória aguda.** 85 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

As linhagens de camundongos selecionadas para a máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin) reatividade inflamatória aguda, demonstram diferenças significativas quanto a capacidade de produzir infiltrado diferencial de células neutrofílicas. Esses animais apresentam diferenças na susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores, sendo os animais AIRmax mais resistentes do que camundongos AIRmin, como também na resposta contra infecções por patógenos intracelulares, choque endotóxico por LPS, artrite experimental e cicatrização, fenótipos nos quais os macrófagos são as principais células efectoras. Este projeto tem como principal objetivo caracterizar a atividade de macrófagos residentes ou induzidos com tioglicolato no exsudato peritoneal nas linhagens AIRmax e AIRmin. Nas primeiras 6 horas do estímulo, o tioglicolato induz a migração preferencial de neutrófilos, após este período, induz a migração de células mononucleares sendo o máximo de migração de macrófagos atingida após 96 horas. Em ambas as linhagens, macrófagos induzidos por tioglicolato possuíam uma capacidade de fagocitar partículas de zimosan aumentada em relação aos macrófagos residentes. Em nossos resultados pudemos observar algumas diferenças interlinhagens onde macrófagos da linhagem AIRmax respondem mais em resposta ao estímulo de LPS em relação à expressão de citocinas pro-inflamatórias TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-1 β , expressão do receptor pro-inflamatório TREM1 e sua proteína adaptadora DAP12, como também quanto a liberação de H₂O₂ e síntese de NO, o que é condizente com o fenótipo de alta inflamação aguda selecionada nos animais AIRmax. Por outro lado, pudemos observar que as células residentes da linhagem AIRmin eram capazes de sintetizar maiores quantidades das citocinas IL-10 e TGF- β em relação à linhagem AIRmax, enquanto que, após o estímulo de tioglicolato, os macrófagos peritoneais obtidos da linhagem AIRmax é que produziam e expressavam maiores quantidades destas citocinas anti-inflamatórias.

Palavras-chave: Macrófagos; Inflamação; Citocinas.

ABSTRACT

ARRUDA, A. G. F. **Comparative study of macrophage activation from lines of mice selected for acute inflammatory reactions**. 85 f. Dissertation (Master in Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Lines of mice genetically selected for maximal (AIRmax) or minimal (AIRmin) acute inflammatory reaction (AIR) demonstrated significant differences in the capacity to produce differential infiltrate of neutrophil cells. These mice present distinct susceptibility to tumors development, being the AIRmax animals more resistant than AIRmin mice. Moreover these lines show different responses against intracellular pathogens, endotoxic shock induced by LPS, experimental arthritis and wound healing phenotypes in which macrophages are the major effectors cells. The aim of this work is the characterization of the activity of resident or thioglicollate-induced macrophages in the peritoneal exudates from AIRmax and AIRmin mice. After 6 hours, thioglicollate induces the migration of neutrophils preferentially and, after this period, it induces mononuclear cells migration, being the maximal macrophage migration achieved at 96 hours. On both lines, thioglicollate-induced macrophages showed a higher phagocytic activity of zymosan particles than resident macrophages. Some differences between the lines were observed: the macrophages from AIRmax mice produced higher response when stimulated with LPS, than the AIRmin cells, regarding the expression of pro-inflammatory cytokines, such as, TNF- α , IL-6, IL-12 and IL-1 β ; expression of pro-inflammatory receptor TREM1 and its adapter protein DAP12. Furthermore, we also found a higher release of H₂O₂ and NO synthesis; all these observations are consistent with the high acute inflammation selected phenotype observed in AIRmax mice. On the other hand we observed that resident cells from AIRmin mice secret higher amounts of IL-10 and TGF- β when compared with the AIRmax cells, however after thioglicollate stimulus, the peritoneal macrophages from AIRmax mice secreted and expressed higher levels of those anti-inflammatory cytokines.

Key words: Macrophages; Inflammation; Citokines.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Linhagens geneticamente selecionadas para reatividade inflamatória aguda

Alguns estudos mostraram que a intensidade da inflamação, quando induzida por partículas inertes (látex, Kaolin), microorganismos vivos ou mortos (*Listeria monocytogenes* e BCG) e substâncias biológicas (caseína, peptona e tioglicolato) é variável entre linhagens isogênicas de camundongos, indicando que a reação inflamatória aguda é uma característica que possui um controle poligênico (STERNICK *et al.*, 1983; CZUPRYNSKI *et al.*, 1985).

Um bom modelo experimental para estudar a influência do controle genético na resposta inflamatória são as linhagens de camundongos geneticamente selecionados para máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin) reatividade inflamatória aguda (AIR-acute inflammatory reaction), produzidas no Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, seguindo protocolos de seleção genética bidirecional e considerando as características de alta ou baixa reatividade inflamatória aguda (IBÁÑEZ *et al.*, 1992).

Para a seleção das linhagens, foi utilizado como agente inflamatório o BIOGEL P-100 (microesferas de poliacrilamida), injetado no tecido subcutâneo. A intensidade da resposta inflamatória aguda foi avaliada após 24 horas através da análise do exsudato inflamatório, utilizando como parâmetros a celularidade e o extravasamento de proteínas (FONTAN e FAUVE, 1983). O processo de seleção genética bidirecional iniciou-se a partir de uma população geneticamente polimórfica (F₀), produzida pelo inter cruzamento equilibrado de oito linhagens isogênicas de camundongos de origens independentes (A, DBA2, P, SWR, CBA, SJL, BALB/c e C57BL/6). Após várias gerações de acasalamentos não-consangüíneos, foram obtidas duas linhagens significativamente diferentes quanto à reatividade inflamatória aguda - AIRmax e AIRmin, sendo esta diferença caracterizada principalmente pela migração desigual de leucócitos para o sítio da injeção do agente selecionador. Após 20 gerações de seleção estimou-se a provável participação de 7-11 loci gênicos na determinação do caráter selecionador (IBÁÑEZ *et al.*, 1992; BIOZZI, *et al.*, 1998), e admitiu-se ter sido atingido o limite de seleção (diminuição da variação fenotípica), quando os alelos envolvidos na determinação do fenótipo inflamatório estariam segregados em homozigose em cada linhagem, porém mantendo-se um *background* heterogêneo.

A resposta inflamatória aguda foi avaliada em outros compartimentos e observou-se que a mesma não é limitada à resposta no tecido subcutâneo, mas é um fenômeno geral que se aplica a todos os tecidos vascularizados e que também ocorre em resposta a outros agentes flogísticos tais como carragenina, zimozan e bactérias vivas ou inativadas, permanecendo visível em todos os casos, a diferença entre as linhagens (IBAÑEZ *et al.*, 1992; ARAÚJO *et al.*, 1998).

Vários experimentos foram realizados demonstrando que a resposta imune específica mediada por anticorpos não foi afetada pelo processo seletivo, uma vez que as linhagens AIRmax e AIRmin produzem títulos semelhantes de anticorpo após a imunização com doses ótimas de antígenos complexos como eritrócitos de carneiro, ovalbumina e *Salmonella typhimurium* inativada. A resposta imune específica mediada por células também foi investigada através de experimentos de reações de hipersensibilidade do tipo tardio (HT) a eritrócitos de carneiro e *Salmonella typhimurium*, também não sendo observadas diferenças significativas entre as linhagens (ARAÚJO *et al.*, 1998).

Por outro lado, com relação à resistência natural à infecção experimental por *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes*, foi demonstrado que os camundongos AIRmax são mais resistentes, havendo diferenças acima de 1000 vezes e de cerca de 100 vezes nas doses letais que matam 50% dos animais (DL₅₀) para as duas bactérias respectivamente, sendo esta resistência devida à maior capacidade dos camundongos AIRmax em controlar o crescimento bacteriano no baço e em produzir uma alta resposta inflamatória local com liberação de citocinas. Além disso, esta linhagem foi demonstrada ser mais susceptível ao choque endotóxico do que animais da linhagem AIRmin (ARAÚJO *et al.*, 1998).

Visto também que tanto a infecção por *S. typhimurium*, quanto a sensibilidade aos efeitos tóxicos do LPS são influenciadas pelo gene *natural resistance associated macrophage protein 1* (Nramp1), também conhecido como *Slc11a1*, a frequência dos dois alelos que determinam fenótipos de susceptibilidade (s) e de resistência (r) foram determinadas em nosso laboratório e observou-se que a presença de *Slc11a1*^{SS} foi de 25% na população inicial (Fo) da seleção experimental, e mudou para 60% em animais AIRmin e para 9% em AIRmax, após 30 gerações do processo seletivo. Este desvio de frequências sugere que o processo de seleção afetou esta região cromossômica (ARAÚJO *et al.*, 1998).

O gene *Nramp1* codifica uma proteína transportadora que é expressa em membranas de fagossomos de macrófagos (VIDAL *et al.*, 1993) e sua falta funcional causa acumulação de íons dentro do fagossomo, favorecendo a replicação de patógenos (HACKAM *et al.*, 1998). Este gene é considerado pleotrópico, interferindo com a ativação de macrófagos (BARTON *et al.*, 1995), burst oxidativo, produção de IFN- γ , TNF- α . e IL-1 β (KITA *et al.*, 1992), como também com a expressão de moléculas de MHC classe II em resposta à patógenos intracelulares (WOJCIECHOWSKI *et al.*, 1999).

Com intuito de avaliar a interação do gene *Slc11a1* com QTL fixados na seleção de camundongos AIRmax e AIRmin, foram produzidas sublinhagens nas quais os alelos *R* e *S* de *Slc11a1* foram fixados em homozigose no fundo genético de AIRmax e AIRmin, demonstrando inflamação aguda mais severa frente ao estímulo local com Biogel em animais *Slc11a1^{RR}* em comparação à *Slc11a1^{SS}*, e implicando na regulação da AIR (BORREGO *et al.*, 2006).

Em outros estudos, os animais AIRmax demonstraram uma eficiente atividade de reparo tecidual da orelha, enquanto o mesmo não foi observado em animais AIRmin. Em relação às sublinhagens *Slc11a1*, os animais AIRmax *Slc11a1^{SS}*, demonstraram capacidade de regeneração mais alta do que animais AIRmax *Slc11a1^{RR}*, sugerindo que a presença do alelo *S* de *Slc11a1* e um menor infiltrado neutrofílico favoreçam o reparo tecidual da orelha. Por meio de análise de QTL foram detectados 2 loci inflamatórios modulando o reparo de orelha, nos cromossomos 1 e 14. Estes resultados sugerem o envolvimento de QTL modificadores da resposta inflamatória no fenótipo de reparo tecidual (DE FRANCO *et al.*, 2007).

Os camundongos AIRmax sintetizam maior quantidade de fatores quimiotáticos no foco inflamatório; produzem maior número de neutrófilos, devido a uma intensa atividade da medula óssea, e estas células são mais resistentes à apoptose espontânea, em relação aos camundongos AIRmin. Estes achados podem justificar a grande diferença quantitativa observada entre as linhagens, em relação ao infiltrado celular encontrado no exsudato inflamatório após estímulo flogístico com o Biogel (RIBEIRO *et al.*, 2003).

As linhagens AIRmax e AIRmin também demonstraram diferenças quanto a resistência e susceptibilidade à artrite induzida por pristane (PIA). Foi observado que, após 200 dias da injeção de PIA, 65% dos camundongos AIRmax apresentaram sinais

clínicos de artrite enquanto que somente 7% dos animais AIRmin apresentaram estes mesmos sinais (VIGAR *et al.*, 2000).

A interferência da constituição genética destas linhagens na resistência ou susceptibilidade à tumorigênese também vem sendo investigada. Os camundongos AIRmax mostraram-se mais resistentes à carcinogênese química de pele induzida por DMBA + TPA, enquanto o oposto foi observado em camundongos AIRmin (BIOZZI *et al.*, 1998). Quando foram utilizados protocolos de indução de tumores de pulmão por uretana ou de indução de metástases pulmonares a partir da implantação de melanoma, os animais AIRmax também se mostraram significativamente mais resistentes do que os AIRmin (MARIA *et al.*, 2001). No caso da tumorigênese pulmonar induzida pela uretana, foi demonstrado ainda a fixação diferencial, respectivamente em AIRmax e AIRmin, dos alelos de resistência e suscetibilidade do locus *Pas1*, situado na região distal do cromossomo 6. Estes resultados demonstraram que o locus *Pas1*, que é o principal fator genético que atua na tumorigênese pulmonar em camundongos, está também envolvido na regulação da AIR (GARIBOLDI *et al.*, 1993; MARIA *et al.*, 2003).

Além disso, em estudo de co-segregação ou linkage, em população F2 resultante do inter cruzamento de AIRmax e AIRmin pode-se observar uma correlação individual entre o aumento da AIR com a resistência ao tumor, e a diminuição da AIR com susceptibilidade, indicando que uma parte dos genes que determinam o grau da resposta inflamatória estão relacionados com os genes envolvidos na resistência e susceptibilidade à carcinogênese (MARIA *et al.*, 2003).

Considerando a diferença na intensidade da resposta inflamatória aguda, representada essencialmente por infiltrado diferencial de células, além da diferente susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores, à resistência natural contra infecções, ao choque endotóxico por LPS, à artrite experimental, e à cicatrização, fenótipos aos quais os macrófagos participam como células efectoras, caracterizamos a atividade de macrófagos nas linhagens AIRmax e AIRmin.

1.2 Inflamação e macrófagos

A resposta para uma injúria pode ser classificada em três estágios: inflamação, proliferação e regeneração. Esta resposta envolve uma série de eventos com o objetivo final de restaurar a integridade perdida. Após o reconhecimento de um sinal endógeno/exógeno de perigo, tem início uma série de alterações bioquímicas e vasculares, com infiltração de diversos tipos de células imunes efectoras, com a subsequente remoção do tecido inflamado e, por fim, a geração de um novo tecido.

Os macrófagos possuem um papel crucial nas diversas fases da resposta inflamatória. Dentre suas funções está a ligação da imunidade inata com a imunidade adaptativa, por terem a capacidade de fagocitar, processar e apresentar os antígenos aos linfócitos T (VILLACRES-ERIKSON, 1995); também a remoção de células apoptóticas (ADEREM e UNDERHILL, 1999); resolução de processos inflamatórios (LEIBOVICH e ROSS, 1975); angiogênese (POLVERINI *et al.*, 1977); reparo e remodelamento tissular (WERB e GORDON, 1975).

Estas células são capazes de secretar uma variedade de citocinas (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , IL-10, TGF- β , IL-15, IL-18, IFN- α e - β , GM-CSF, M-CSF), fatores angiogênicos (VEGF), quimiocinas (IL-8, GRO, IP-10, ENA-78), fatores coagulantes, PGE2, leucotrienos, reativos do oxigênio e intermediários do nitrogênio, componentes do complemento e várias enzimas, como as proteases, em resposta a patógenos e sinais de perigo. A secreção destes fatores depende do tipo de estímulo e da localização que o macrófago se encontra (PLOWDEN *et al.*, 2004).

Um dos mecanismos microbicidas utilizados pelos macrófagos envolve a produção de metabólitos tóxicos do oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o hipoclorito (HOCl) e o radical hidroxila, que ajudam na eliminação de microorganismos (FANTONE e WARD, 1982). Outro mecanismo importante é a síntese de óxido nítrico (NO) que possui múltiplas funções, entre elas a regulação do fluxo sanguíneo, neurotransmissão e dor, além da sua função microbicida quando reage com o superóxido gerando o peroxinitrito, que é uma molécula citotóxica (MONCADA *et al.*, 1991).

Os macrófagos iniciam a resposta imune através do reconhecimento de padrões moleculares, frequentemente encontrados na superfície de microorganismos. Vários tipos de receptores para padrões moleculares estão presentes nestas células, como os receptores do tipo lectina que se ligam a carboidratos (por exemplo, manose e β -

glucanos) (MC GREAL *et al.*, 2005); receptores tipo *scavenger* 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; receptores semelhantes a NOD (NLRs), que reconhecem patógenos intracelulares; e receptores semelhantes ao Toll (TLRs). (GREAVES e GORDON, 2005).

Os macrófagos são células heterogêneas e estão presentes em vários tecidos e órgãos. A heterogeneidade dessas células é refletida tanto em seus aspectos morfológicos e fenotípicos, como metabólicos e funcionais (GORDON e TAYLOR, 2005; MANTOVANI *et al.*, 2004; MILLS *et al.*, 2000). 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 (TAYLOR *et al.*, 2003). Porém a expressão destas moléculas não é homogênea entre as diferentes subpopulações de macrófagos. Um bom exemplo da expressão diferencial destes marcadores pode ser observado em macrófagos esplênicos, nas quais, as células encontradas na polpa vermelha apresentam alta expressão de F4/80, enquanto os macrófagos da polpa branca apresentam uma baixa expressão deste marcador (GORDON e TAYLOR, 2005, TAYLOR *et al.*, 2003).

Seus progenitores são originados nos sacos embrionários de embriões em desenvolvimento e diferenciam-se em macrófagos tissulares monocíticos sob a influência de vários fatores de crescimento, incluindo o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF). Em adultos, os progenitores de macrófagos são os promonócitos, que se desenvolvem a partir de células tronco pluripotentes residentes na medula-óssea. Os macrófagos derivados de monócitos possuem vida curta e não proliferam em sítios inflamatórios; contudo, macrófagos tissulares podem sobreviver por no mínimo 6 semanas, mantendo o seu número estável através de proliferação homeostática. Macrófagos estão presentes na medula-óssea, fígado, pele, baço, pulmão, cérebro, timo, linfonodos, placas de Peyer, órgãos reprodutores, cavidade peritoneal, e no interstício de órgãos, tais como, coração, rim e pâncreas. Sua larga distribuição indica sua essencial e importante função como sensores de sinais de perigo exógenos e endógenos (PLOWDEN *et al.*, 2004).

1.3 Receptores transmembrânicos

Os macrófagos possuem funções bem descritas na defesa do organismo contra as infecções. Este fato se deve a uma variedade de receptores presentes na membrana que são capazes de reconhecer padrões moleculares presentes em microorganismos, podendo resultar no processo de fagocitose e capacidade microbicida pela ativação de genes inflamatórios. Estes receptores são responsáveis pelo reconhecimento de estruturas bem conservadas tanto em microorganismos quanto em células apoptóticas, induzindo, respectivamente, o desenvolvimento de respostas pro-inflamatórias ou anti-inflamatórias (GORDON, 2003). Os mecanismos reguladores destas respostas ainda não estão totalmente esclarecidos, entretanto sabe-se que compostos capazes de ativar um grupo de receptores transmembrânicos chamados de *toll-like receptors* (TLR) podem induzir a transcrição de genes necessários para iniciar o processo inflamatório (BARTON e MEDZHITOV, 2003).

Após o reconhecimento de seus ligantes cognatos, os TLRs induzem a expressão de uma variedade de genes de defesa do hospedeiro. Estes incluem citocinas inflamatórias e quimiocinas, peptídeos antimicrobianos, moléculas co-estimulatórias, moléculas de MHC, e outros efetores necessários para proteção do organismo contra patógenos invasores (MEDZHITOV e JANEWAY, 2000).

Até o momento são conhecidos diferentes TLRs, sendo que todos possuem uma estrutura molecular semelhante, com um domínio de reconhecimento extracelular composto por repetições ricas em leucinas (LRRs), um domínio transmembrânico simples e um domínio de sinalização intracelular TIR (Toll/IL-1 receptor homology). Estes receptores diferem entre si de acordo com as especificidades dos ligantes, padrões de expressão e, presumidamente, nos genes alvos que podem induzir. (BRODSKY e MEDZHITOV, 2007). Sua sinalização intracelular requer uma molécula adaptadora, MyD88, e algumas serina/treonina quinases, as IRAKs (quinase associada ao receptor da IL-1). Estes componentes causam a ativação do fator nuclear NF- κ B e de proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK), levando a regulação positiva da expressão de moléculas co-estimulatórias de superfície, e a eventual secreção de citocinas, tais como, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α em células apresentadoras de antígenos (MEDZHITOV *et al.*, 1996). Uma outra via de ativação de NF- κ B, é a via independente de MyD88, a qual requer outras proteínas adaptadoras, como o TRIF (DOYLE *et al.*, 2006).

Dentre os ligantes de receptores do tipo Toll, pode-se citar o LPS, uma endotoxina presente nas membranas de bactérias gram-negativas, que interage com o TLR4 e, com a ajuda de uma proteína acessória, a MD2, causa a ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B, que induz a expressão de uma variedade de genes pro-inflamatórios. As partículas de zimosan, que interagem com o TLR2/6 (ULEVITCH e TOBIAS, 1999); o RNA fita dupla (que mimetiza RNA viral), TLR3; a flagelina, TLR5; o DNA CpG não metilado ou DNA bacteriano, TLR9; o RNA fita simples, TLR7 e TLR8. O ligante de TLR10 ainda não é conhecido, enquanto, o TLR11 parece reconhecer bactéria uropatogênica (HARGREAVES e MEDZHITOV, 2005).

Existem diversos mecanismos importantes na regulação da sinalização via TLRs, que são responsáveis pelas diferenças entre a expressão de genes e proteínas inflamatórias após uma sinalização via TLR. Um destes mecanismos é a diferença encontrada na expressão gênica da proteína adaptadora *Dap12* e dos receptores transmembrânicos *Trem1* e *Trem2*.

Proteínas TREM (“triggering receptors expressed on myeloid cells”), consistem uma família de receptores de superfície celular relacionados, pertencente à superfamília das Imunoglobulinas, encontrados em células mielóides e, dependendo da sua isoforma, podem regular positiva ou negativamente a ativação e diferenciação destas células. Seus ligantes ainda não são conhecidos (COLONNA e FACCHETTI, 2003).

TREM1 humano é uma glicoproteína de 30-KDa, que consiste em um único domínio extracelular semelhante ao da imunoglobulina do tipo V, uma região transmembrânica carregada com resíduos de lisina e uma cauda citoplasmática curta. Este receptor compartilha homologia com o receptor de célula NK, NKp44 (CANTONI *et al.*, 1999), com o receptor leucocitário CMRF-35 (JACKSON *et al.*, 1992) e com o receptor de polimunoglobulina (RAGHAVAN e BJORKMAN, 1996). É expresso nos estágios tardios da diferenciação de células mielóides (GINGRAS *et al.*, 2002) e se associa com DAP12 para sinalização e função (BOUCHON *et al.*, 2000). A ativação da via de sinalização TREM1/DAP12 promove o recrutamento e ativação de proteínas tirosina quinases, levando à fosforilação de resíduos de tirosina em diversos tipos de proteínas, mobilização de Ca^{2+} , rearranjo do citoesqueleto de actina e ativação de vários complexos de transcrição (BOUCHON *et al.*, 2000; GINGRAS *et al.*, 2002).

O receptor TREM1 além de ser encontrado em neutrófilos do sangue e monócitos/macrófagos, é também expresso em altos níveis por infiltrado neutrofílico,

células epiteliais da pele humana e linfonodos infiltrados por bactérias Gram positivas e negativas (COLONNA, 2003).

TREM1 foi caracterizado como um iniciador e amplificador da resposta inflamatória em neutrófilos e monócitos (BOUCHON *et al.*, 2000). A utilização de anticorpos agonistas anti-TREM1 destaca a importância deste receptor em um processo inflamatório, induzindo o aumento da síntese de TNF- α e IL-10 produzidos por monócitos ativados por LPS, e também na estimulação da liberação de mieloperoxidase por granulócitos. O bloqueio de TREM1 também reduz a inflamação e aumenta a sobrevivência de camundongos à infecções bacterianas que causam síndromes hiperinflamatórias sistêmicas. Assim, TREM1 tem função de amplificar respostas proinflamatórias induzidas por TLR. Sabe-se também que o LPS e outros ligantes de TLR podem aumentar a expressão de *Trem1*, sugerindo que estes receptores cooperam para aumentar a resposta inflamatória (COLONNA e FACCHETTI, 2003).

Enquanto TREM1 parece agir principalmente através da ativação de monócitos e granulócitos, TREM2 é amplamente encontrado em fagócitos mononucleares, incluindo macrófagos, células dendríticas, microglia e osteoclastos. Em células macrofágicas, foi demonstrado que os receptores TREM2 potencializam a fagocitose, e inibem a produção de citocinas induzidas por TLR. Este receptor ainda regula o desenvolvimento e função de células dendríticas, como também na microglia e osteoclastos (COLONNA, 2003).

Macrófagos derivados da medula-óssea de camundongos deficientes de *Trem2*, aumentam a produção de citocinas inflamatórias (TNF e IL-6) em resposta a agonistas de TLR (LPS, zimosan e CpG), demonstrando a sua função na inibição da resposta macrofágica a ligantes de TLR (TURNBULL *et al.*, 2006).

As proteínas TREM encontram-se associadas à molécula sinalizadora DAP12, uma proteína pequena, composta por uma cauda extracelular curta, um domínio transmembrânico curto e um motivo de ativação do imunoreceptor baseado em tirosina (ITAM) citoplasmático. Este motivo é o único domínio de sinalização identificado nesta molécula e é responsável pelas suas diversas funções, como ativar células NK e amplificar ou inibir respostas inflamatórias (TURNBULL e COLONNA, 2007).

O balanço de sinais ativadores e inibitórios, gerados pela ligação destes receptores controlam a fagocitose mediada por macrófagos e neutrófilos, liberação de citocinas pro-inflamatórias e a explosão respiratória (COLONNA e FACCHETTI, 2003).

6 CONCLUSÕES

Tomados em conjunto nossos resultados permitem concluir que:

- Os animais previamente injetados com tioglicolato apresentam um maior infiltrado celular na cavidade peritoneal em relação aos animais sem o estímulo.
- Nas primeiras 6 horas do estímulo, o tioglicolato induz a migração preferencial de neutrófilos, e após este período, se torna um potente indutor para a entrada de macrófagos, preferencialmente após 96 horas, em ambas as linhagens.
- Na linhagem AIRmax, macrófagos induzidos por tioglicolato e ativados por LPS, secretam maiores níveis de NO. Enquanto que macrófagos de animais AIRmin são responsivos a sinalização induzida por IFN- γ e LPS.
- Na linhagem AIRmax, leucócitos peritoneais induzidos por tioglicolato sintetizam maiores quantidades de H₂O₂.
- Na linhagem AIRmax, macrófagos peritoneais expressam maiores quantidades de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-1 β .
- Na linhagem AIRmin, macrófagos peritoneais residentes sintetizam maiores quantidades de citocinas TGF- β e IL-10, enquanto que, após o estímulo de tioglicolato, os macrófagos peritoneais obtidos da linhagem AIRmax é que produzem mais e expressam maiores níveis de genes de citocinas anti-inflamatórias.
- Em ambas as linhagens, macrófagos peritoneais residentes apresentam uma expressão gênica muito semelhante do receptor pro-inflamatório TREM1 e sua proteína adaptadora DAP12.
- Macrófagos da linhagem AIRmax demonstram uma regulação positiva da expressão gênica de DAP12 e TREM1 na presença de LPS, enquanto que o oposto foi verificado para os animais AIRmin.
- Ambas as linhagens apresentam uma repressão gênica de TREM2 em macrófagos induzidos por tioglicolato e uma diminuição da expressão do receptor anti-inflamatório em macrófagos residentes da linhagem AIRmin quando ativados por LPS.
- Os macrófagos peritoneais induzidos por tioglicolato são mais eficientes quanto à fagocitose de partículas de zimosan do que os macrófagos residentes, porém não foram observadas diferenças entre as linhagens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 593-623, 1999.

ARAÚJO, L.M.; RIBEIRO, O.G.; SIQUEIRA, M.; STAROBINAS, N.; MASSA, S.; CABRERA, W.H.; MOUTON, D.; SEMAN, M.; IBAÑEZ, O.M. Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal acute inflammatory response. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, p. 2913-20, 1998.

AUSTYN, J. M.; GORDON, S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. **Eur. J. Immunol.**, v. 11, p. 805-815, 1981.

BARTH, W.; HENDRZAK, J. A.; MELNICOFF, M. J.; MORAHAN, P. S. Review of the macrophage disappearance reaction. **J. Leukoc. Biol.**, v. 57, p. 361-367, 1995.

BARTON, C. H.; WHITEHEAD, J. M.; Blackwell, J. M. Nramp transfection transfers Ity/Lsh/Bcg- related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on oxidative burst and nitric oxide pathways. **Mol. Med.**, v.1, p. 267-279, 1995.

BARTON, G. M.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor signaling pathways. **Science**, v. 300, n. 5625, p.1525-1525, 2003.

BASTOS, K. R. B.; BARBOZA, R.; SARDINHA, L.; RUSSO, M.; ALVAREZ, J. M. and D'IMPÉRIO LIMA, M. R. Role of Endogenous IFN- γ in Macrophage Programming Induced by IL-12 and IL-18. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 27, p. 399-410, 2007.

BIOZZI, G.; RIBEIRO, O. G.; SARAN, A.; ARAÚJO, M. L.; MARIA, D. A.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. K.; SANT'ANNA, O. A.; MASSA, S.; COVELLI, V.; MOUTON, D.; NEVEU, T.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O. M. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 337-346, 1998.

BORREGO, A.; PETERS, L. C.; JENSEN, J. R.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H. K.; STAROBINAS, N.; SEMAN, M.; IBAÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M. Genetic determinants of acute inflammation regulate Salmonella infection and modulate Slc11a1 gene (formely Nramp) effects in selected mouse lines. **Microbes Infect.**, v. 8, p. 2766-2771, 2006.

BOUCHON, A.; DIETRICH, J.; COLONNA, M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. **J. Immunol.**, v.164, p. 49991-4995, 2000.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BRODSKY, I.; MEDZHITOV, R. Two modes of ligand recognition by TLRs. **Cell**, v. 130, n. 6, p. 979-981, 2007.
- CAMINSCHI, I.; LUCAS, K. M.; O'KEEFFE, H.; LAÂBI, Y.; KÖNTGEN, F.; LEW, A.M.; SHORTMAN, K. AND WRIGHT, M.D. Molecular cloning of F4/80-like-receptor, a seven-span membrane protein expressed differentially by dendritic cell and monocyte-macrophage subpopulation. **J. Immunol.**, v. 167, p. 3570-3576, 2001.
- CANTONI, C.; BOTTINO, C.; VITALE, M.; PESSINO, A.; AUGUGLIARO, R.; MALASPINA, A.; PAROLINI, S.; MORETTA, L.; MORETTA, A.; BIASSONI, R. NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is member of the immunoglobulin superfamily. **J. Exp. Med.**, v.189, p. 787-96, 1999.
- CARNEIRO, A.; RIBEIRO, O. G.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. H.; VORRARO, F.; SIQUIERA, M.; IBÁÑEZ, O. C. M.; STAROBINAS, N. Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. **Toxicon**, v. 40, p. 1571-1579, 2003.
- COLONNA M. TREMs in the immune system and beyond. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, p. 445-53, 2003.
- COLONNA, M.; FACCHETTI, F. TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells): a new player in acute inflammatory responses. **J. Infect. Dis.**, v. 187, n. 2, p. 397-401, 2003.
- CZUPRYNSKI, C. D.; CANONO, B. P.; HENSON, P. M.; CAMPBELL, P. A. Genetically determined resistance to listeriosis is associated with increased accumulation of inflammatory neutrophils and macrophages which have enhanced listericidal activity. **Immunology**, v. 55, p. 511-518, 1985.
- CZUPRYNSKI, C. J.; BROWN, J. F.; MAROUSHEK, N.; WAGNER, R. D.; STEINBERG, H. Administration of antigranulocyte mAb RB6-8C5 impairs the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. **J. Immunol.**, v. 152, p.1836-1846, 1994.
- DE FRANCO, M.; CARNEIRO, P. S.; PETERS, L. C.; VORRARO, F.; BORREGO, A.; RIBEIRO, O. G.; STAROBINAS, N.; CABRERA, W. K.; IBÁÑEZ, O. M. Slc11a1 (Nramp1) alleles interact with acute inflammation loci to modulate wound-healing traits in mice. **Mamm. Genome**, v. 4, p. 263-269, 2007.
- DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating and evidence for independent production. **J. Immunol.**, v. 141, p. 2407-2412, 1988.
- DOYLE, S. L.; O'NEILL L. A. J. Toll-like receptors: from the discovery of NFκB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 72, p. 1102-1113, 2006.

FADOK, V. A., BRATTON, D. L., FRASCH, S. C., WARNER, M. L., HENSON, P. M. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. **Cell Death Differ.**, v. 5, p. 551-562, 1998.

FANTONE, J. C.; WARD, P. A. Role of oxygen-derived free radical and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. **Am. J. Pathol.**, v. 107, p. 395-418, 1982.

FERRARI, D.; PIZZIRANI, C.; ADINOLFI, E.; LEMOLI, R. M.; CURTI, A.; IDZKO, M.; PANTHER, E.; DI, V.F. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. **J. Immunol.**, v. 176, p. 3877-3883, 2006.

FONTAN, E.; FAUVE, R. M. Inflammation and antibacterial resistance III. Influence of an inflammatory reaction induced by the injection of polyacrylamide gels on the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. **Ann. Immunol. Inst. Pasteur**, v. 134C, n. 2, p. 255-64, 1983.

GARIBOLDI, M.; MANENTI, G. CANZIAN, F.; FALVELLA, F. S.; RADICE, M. T.; PIEROTTI, M. A.; DELLA PORTA, G.; BINELLI, G.; DRAGANI, T. A. A major susceptibility locus to murine lung carcinogenesis maps on chromosome 6. **Nat. Genet.**, v. 3, n. 2, p. 132-136, 1993.

GEISSMANN, F.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, v.19, p. 71-82, 2003.

GINGRAS, M. C.; LAPILLOME, H.; MARGOLIN, J. F. TREM-1, MDL-1, and DAP12 expression is associated with a mature stage of myeloid development. **Mol. Immunol.**, v. 38, p. 817-24, 2002.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 386-401, 2001.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 1, p. 23-25, 2003.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, p. 953-964, 2005.

GREAVES, D. R.; GORDON, S. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors. **J. Lipid Res.**, v. 46, p. 11-20, 2005.

HACKAM, D. J.; ROTSTEIN, O. D.; ZHANG, W.; GRUENHEID, S.; GROS, P.; GRINSTEIN, S. Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nrampl) impairs phagosomal acidification. **J. Exp. Med.**, v. 188, p. 351-364, 1998.

HARGREAVES, D. C.; MEDZHITOV, R. Innate sensors of microbial infection. **J. Clin. Immunol.**, v. 25, n. 6, p. 503-510, 2005.

HAMERMAN, J. A.; TCHAO, N. K.; LOWELL, C.A.; LANIER, L. L. Enhanced Toll-like receptor responses in the absence of signaling adaptor DAP12. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 579-586, 2005.

HUMPHREYS, B. D.; DUBYAK, G. R. Modulation of P2X7 nucleotide receptor expression by pro- and anti-inflammatory stimuli in THP1 monocytes. **J. Leukoc. Biol.**, v. 64, p. 265-273, 1998.

IBAÑEZ, O. M.; STIFFEL, C.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. K.; MASSA, S.; DE FRANCO, M.; SANT'ANNA, O. A.; DECREUSEFOND, C.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Genetics of nonspecific immunity: I. bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, p. 2555-2563, 1992.

JACKSON, D. G.; HART, D. N.; STARLING, G.; BELL, J. I. Molecular cloning of a novel member of immunoglobulin gene superfamily homologous to the polymeric immunoglobulin receptor **Eur. J. Immunol.**, v. 22, p. 1157-1163, 1992.

KANENO, R.; CASTOLDI, L.; GOLIM, M. A.; RIBEIRO, O. G.; ROMAGNOLI, G. G.; IBAÑEZ, O. C. M. Enhanced natural killer activity and production of pro-inflammatory cytokines in mice selected for high acute inflammatory response (AIRmax). **Immunology**, v. 120, p. 472-379, 2006.

KLESNEY-TAIT, J.; TURNBULL, I. R.; COLONNA, M. The TREM receptor family and signal Integration. **Nature**, v. 7, p.1266-1273, 2006.

KITA, E.; EMOTO, M.; OKU, D.; NISHIWAKA, F.; HAMURO, A.; KAMIKAIDOU, N.; KASHIBA, S. Contribution of interferon gamma and membrane-associated interleukin 1 to the resistance to murine typhoid of Ityr mice. **J. Leukoc. Biol.**, v. 51, p. 244-250, 1992.

LAGASSE, E.; WEISSMAN, I. L. Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. **J. Immunol. Methods**, v. 197, p. 139-150, 1996.

LEIBOVICH, S. J.; ROSS, R. The role of macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. **Am. J. Pathol.**, v. 78, p. 71-100, 1975.

LI, M. O.; FLAVELL, R. A. Contextual Regulation of inflammation: a duet by Transforming Growth Factor- β and Interleukin-10. **Immunity**, v. 28, p. 468-476, 2008.

LIVAK, K., L.; SCHMITTGENT, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-DDCT} Method, **Methods**, v. 25, p.402-408, 2001.

LORSBACH, R. B.; RUSSEL, S. W. A specific sequence of stimulation is required to induce synthesis of the antimicrobial molecule nitric oxide by mouse macrophage. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2133-2135, 1992.

MA, J.; CHEN, T.; CEPONIS, A.; MILLER, N. E.; HUKKANEN, M.; MA, G. F.; KONTTINEN, Y. T. Regulation of macrophage activation. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 60, p. 2334-2346, 2003.

MACGARRY, J. M.; STEWART, C. C. Murine eosinophil granulocytes bind the murine macrophage-monocyte specific monoclonal antibody. **J. Leukoc. Biol.**, v. 50, p. 471-478, 1991.

MACMICKING, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, v.15, p. 323-350, 1997.

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.**, v. 25, p. 677-686, 2004.

MARIA, D. A.; RIBEIRO, O. G.; PIZZOCARO, K. F.; DEFRANCO, M.; CABRERA, W. K.; STAROBINAS, N.; GALLOIS, V.; SIQUEIRA, M.; SEMAN, M.; IBÁÑEZ, O. M. Resistance to melanoma metastases in mice selected for high acute inflammatory response. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 337-342, 2001.

MARIA, D. A.; MANENTI, G.; GALBIATI, E.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. K.; BARRERA, R. G.; PETTINICCHIO, A.; DEFRANCO, M.; STAROBINAS, N.; SIQUEIRA, M.; DRAGANI, T. A.; IBÁÑEZ, O. M. Pulmonary adenoma susceptibility 1 (Pas 1) locus affects inflammatory response. **Oncogene**, v. 22, p. 426-432, 2003.

MARIATHASAN, S.; MONACK, D. M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. **Nature**, v. 7, p. 31-40, 2007.

MCGREAL, E. P.; MILLER, J. L.; GORDON, S. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. **Curr. Opin. Immunol.**, v.17, p. 18-24, 2005.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; KOPP, E.; STADDLEN, A.; CHEN, C.; GOSH, S.; JANEWAY JR.; C. A. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. **Mol. Cell**, v. 2, p. 253-258, 1996.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. J. Inate immune recognition: mechanisms and pathways. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 173, p. 89-97, 2000.

MELNICOFF, M. J.; HORAN, P. K.; MORAHAN, P. S. Kinetics of changes in peritoneal cell population following acute inflammation. **Cell Immunol.**, v.118, p. 178-191, 1989.

MILLS, C. D.; KINCAID, K.; ALT, J. M.; HEILMAN, M. J.; AND HILL, A. M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **J. Immunol.**, v. 164, p. 6166-6173, 2000.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p.109-142, 1991.

MORDUE, D. G.; SIBLEY, L. D. A novel population of Gr-1+-activated macrophages induced during acute toxoplasmosis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 74, n. 6, p. 1015-1025, 2003.

NORTH, R. J. The relative importance of blood monocytes and fixed macrophages to the expression of cell-mediated immunity to infection. **J. Exp. Med.**, v. 132, p. 521-534, 1970.

PHILIP, P. T.; GORDON, D. B.; ANJA B. G.; GORDON, S. Pattern recognition receptors and differentiation antigens define murine myeloid cell heterogeneity ex vivo. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, p. 2090-2097, 2003.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Methods**, v. 46, n. 2, p. 211-226, 1981.

PLOWDEN, J.; RENSHAW-HOELSCHER, M.; ENGLEMAN, C.; KATZ, J.; SAMPHARA, S. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. **Aging Cell**, v. 3, n. 4, p.161-167, 2004.

POLVERINE, P. J.; COTRAN, P. S.; GIMBRONE, M. A.; UNANUE, E. R. Activated macrophages induce vascular proliferation. **Nature**, v. 269, p. 804-806, 1977.

RAGHAVAN, M.; BJORKMAN, P. J. Fc receptor and their interactions with immunoglobulins. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 12, p. 181-220, 1996.

RIBEIRO, O. G.; MARIA, D. A.; ADRIOUCH, S.; PECHBERTY, S.; CABRERA, W. H. K.; MORISSET, J.; IBÁÑEZ, O. M.; SEMAN, M. Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. **J. Leukoc. Biol.**, v. 74, p. 497-506, 2003.

ROGERS, H. W.; UNANUE, E. R. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 5090-5096, 1993.

SAMBRANO, G. R. TERPSTRA, V.; STEINBERG, D. Independent mechanisms for macrophage binding and macrophage phagocytosis of damaged erythrocytes. Evidence of receptor cooperativity. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 17, n. 12, p. 3442-3448, 1997.

STERNICK, J. L.; SCHIRIER, D. J.; MOORE, V. L. Genetic control of BCG-induced granulomatous inflammation in mice. **Exp. Lung Res.**, v. 5, p. 217-28, 1983.

SWIRSKI, F. K.; LIBBY, P.; AIKAWA, E.; ALCAIDE, P.; LUSCINSKAS, F. W.; WEISSLEDER, R.; PITTET, M. J. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. **J. Clin. Invest.**, v. 117, n. 1, p.195-205, 2007.

SAVILL, J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. **Br. Med. Bull.**, v. 53, n. 3, p. 491-508. 1997.

SUNDERKÖTTER, C.; NIKOLIC, T.; DILLON, M. J.; VAN, R. N.; STEHLING, M.; DREVETS, D. A.; LEENEN, P. J. M. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in mature stage and inflammatory response. **J. Immunol.**, v.172, p. 4410-4417, 2004.

TAYLOR R. P.; BROWN, G. D.; GELFORD, A. B.; MARTINEZ-POMARES, L.; GORDON, S. Pattern recognition receptors and differentiation antigens define murine myeloid cell heterogeneity ex vivo. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, p. 2090-2097, 2003.

TAYLOR, R. P.; GORDON, S. Monocyte heterogeneity and innate immunity. **Immunity**, v.19, p. 2-4, 2003.

TAVARES DE LIMA, W.; STEIL, A. A.; RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; TEXEIRA, C. F. P.; JANCAR, S. Lipid mediators, tumor necrosis factor and nitric oxide and their interactions in immune-complex-induced lung injury. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 358, p. 69-75, 1998.

TURCHYN, L. R.; BAGINSKI, T. J.; RENKIEWICZ, R. R.; LESCH, C. A.; MOBLEY, J. L. Phenotypic and functional analysis of murine resident and induced peritoneal macrophages. **Comp. Med.**, v. 57, p. 574-580, 2007.

TURNBULL, I. R.; GILFILLAN, S.; CELLA, M.; AOSHI, T.; MILLER, M.; PICCIO, L.; HERNANDEZ, M.; COLONNA, M. Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation. **J. Immunol.**, v.117, p. 3520-3524, 2006.

TURNBULL, I. R.; COLONNA, M. Activating and inhibitory functions of DAP12. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 2, p.155-161, 2007.

ULEVITCH, R. J.; TOBIAS, P. S. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 11, p.19-22, 1999.

VREMEC, D.; POOLEY, J.; HOCHREIN, H.; WU, L.; SHORTMAN, K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. **J. Immunol.**, v.164, p. 2978-2986, 2000.

VIDAL, S.; MALO, D.; VOGAN, K.; SKAMENE, E.; GROS, P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for BCG. **Cell**, v. 73, p. 469-485, 1993.

VIGAR, N. D.; CABRERA, W. H.; RIBEIRO, O. G.; OGATA, T. R. P.; SIQUIERA, M.; IBÁÑEZ, O. C. M.; DE FRANCO, M. pristaine-induced arthritis in mice selected for maximal and minimal acute inflammatory reaction. **Eur. J. Immunol.**, v. 30, p. 431-437, 2000.

VILLACRES-ERIKSSON, M. Antigen presentation by naïve macrophages, dendritic cells and B cells to primed T lymphocytes and their cytokine production following exposure to immunostimulating complexes. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 102, p. 46-52, 1995.

WATANABE, S.; KOBAYASHI, T.; OKUYAMA, H. Absence of relation between the expression of cyclooxygenase isoforms and the synthesis of prostaglandin E2 in

resident and thioglycollate-elicited macrophages in rats. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 56, p. 7-18, 1998.

WELLS, A., C.; RAVASI, T.; FAULKNER, G., J.; CARNINCI, P.; OKAZAKI, Y.; HAYASHIZAKI, Y.; SWEET, M; WAINWRIGHT, B. J.; HUME, D. A. Genetic control of the immune response. **BCM Immunol.**, v. 26, p. 4-5, 2003.

WERB, Z.; GORDON, S. Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. **J. Exp. Med.**, v. 142, p. 346-360, 1975.

WOJCIECHOWSKI, W.; DESANCTIS, J.; SKAMENE, E.; RADZIOCH, D. Attenuation of MHC class II expression in macrophages infected with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin involves class II transactivator and depends on the Nramp1 gene. **J. Immunol.**, v. 163, p. 2688-2696, 1999.