ALEXANDRA DOS ANJOS CASSADO

HETEROGENEIDADE DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de doutor em Cências.

São Paulo

2011

ALEXANDRA DOS ANJOS CASSADO

HETEROGENEIDADE DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de doutor em Cências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Dra. Karina Ramalho Bortoluci

Versão original.

São Paulo

2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Cassado, Alexandra dos Anjos.
Heterogeneidade dos macrófagos peritoneais / Alexandra dos Anjos Cassado. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Dra. Karina Ramalho Bortoluci.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunidade inata e macrófagos.

Versão do título para o inglês: Peritoneal macrophage heterogeneity

Descritores: 1. Macrófagos 2. Heterogeneidade 3. Perfil de ativação 4. Zimosan 5. *Tripanosoma cruzi* 6. Cavidade peritoneal I. Bortoluci, Dra. Karina Ramalho II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB0173/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Alexandra dos Anjos Cassado.

Título da Tese: Heterogeneidade dos macrófagos peritoneais.

Orientador(a): Dra. Karina Ramalho Bortoluci.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Nome completo: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Nome completo: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Nome completo: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Nome completo: .....
Instituição: .....

Presidente: Nome completo: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **109** nas fls. **51** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Karina Bastos** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "***Papel dos receptores do tipo Toll e do tipo NOD-LRR na ativação metabóilica e funcional de macrófagos***" do qual participou(aram) o(s) alunos ***Carina Buzzo de Lima, Alexandra dos Anjos Cassado e o pesquisador Momtchilo Russo*** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **06.12.2007.**

São Paulo, 11 de dezembro de 2007.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA – ICB/USP

Validade: 11.12.2007 à 11.12.2010.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091 7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.43.10
NOSC/mcgn

São Paulo, 27 de julho de 2010.

REF.: Protocolo nº109/07.

"Papel dos receptores do tipo Toll e do tipo NOD-LRR na ativação metabóilica e funcional de macrófagos"

Prezado Professor,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 06.12.2013.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. NIELS OLSEN SARAIVA CÂMARA
Vice-Coordenador da Comissão de Ética
no Uso de Animal - ICB /USP

Ilma.Sra.
Profa Dra. KARINA RAMALHO BORTOLUCI
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Dedico o presente trabalho aos meus PAIS, pelo apoio incondicional; ao meu amor LUCAS, que esteve comigo em todas as etapas deste trabalho; e à minha filha LARA.

AGRADECIMENTOS

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

À minha família, companheiros de todas as horas que, mesmo à distância, foram essenciais durante essa etapa da minha vida.

Ao Lucas, que estava comigo nos momentos mais felizes e mais difíceis, sempre me incentivando e me apoiando. Muito obrigada por toda sua dedicação, seu amor, carinho, e, é claro, pela nossa pequena Larinha!!

À minha orientadora Karina Bortoluci, que transmitiu conhecimentos e experiências essenciais para minha formação e para meu crescimento intelectual. Meus agradecimentos por todos esses anos de trabalho juntas!!

À. Carininha e Silvia, com quem dividi inúmeros experimentos e momentos agradáveis.... Saudades desde já meninas!!

Ao Prof. Gustavo, por todo o apoio necessário para o desenvolvimento deste trabalho...A todos os seus alunos pelos agradáveis momentos juntos...

À Prof. Regina, Prof. Pepe, e aos seus alunos, por estarem sempre lá quando era preciso... Ao Rogério pelo auxílio durante os experimentos com Tripo...

À Prof. Ises, por nos receber de portas abertas em seu laboratório, onde parte desse trabalho foi desenvolvido, e à sua ex-aluna Inez pela ótima convivência...

Ao Profº Frederic Geissmann e seu grupo, que me receberam de braços abertos em seu laboratório, mesmo que por um curto período de tempo...

Ao Eliver e a Profª Leonore Herzenberg, pela colaboração e troca de conhecimentos...

Aos Luizão pelos inúmeros Sortings...

Aos amigos Matheus, Esther, Zé, Lucas, Maísa, Júlia, Angela, Paulo, Juciane, Pedro, Ernandes, Thaís....e outros tantos...Obrigada galera pelos momentos de descontração essenciais durante esses anos!!

Aos colaboradores Profº Luis Carlos Ferreira e Liliana Massis por terem cedido a flagelina purificada...

Às secretárias Eni, Jotelma e Amanda pela disponibilidade e atenção !!!

Aos componentes da Banca de Qualificação José Alexandre Barbuto, Carla Lima e Anderson de Sá Nunes que muito contribuíram para a finalização dessa Tese.

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

Muito obrigada a todos vocês!!!

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. **Heterogeneidade dos macrófagos peritoneais** 2011.158f. Doutorado em Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Os macrófagos (MΦs) compõem uma população celular altamente heterogênea originados, em sua maioria, por monócitos sanguíneos que atingem os tecidos e se diferenciam em células que compartilham algumas funções comuns às diversas populações de MΦs, contudo, podem também se tornar células especializadas. A heterogeneidade dos MΦs está refletida tanto em sua localização como em seus aspectos morfológicos, fenotípicos, metabólicos e funcionais. Os MΦs peritoneais residentes ou elicitados são extensivamente adotados como ferramenta experimental em diversos estudos que abordam aspectos morfológicos e funcionais dessas células. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi revisitar o compartimento peritoneal dando ênfase à heterogeneidade dos MΦs e a especialização que diferentes subpopulações podem adquir em um mesmo microambiente. Nossos dados mostram que duas populações distintas compõem os MΦ residentes peritoneais, os quais foram nomeados com base no seu tamanho, LPM (*Large Peritoneal Macrophage*) e SPM (*Small Peritoneal Macrophage*). Os subtipos de MΦs peritoneais podem ser distinguidos pelo seu fenótipo e morfologia adquirida *in vitro,* quando os SPMs se tornam polarizados e os LPMs mantêm características classsicamente observadas nos MΦs. A análise da ativação *in vitro* mostrou que ambos os subtipos de MΦs peritoneais apresentam uma certa plasticidade, podendo se diferenciar tanto para o perfil M1 ou M2 quando estimulados com LPS/IFN-γ (pró-M1) ou rIL-4 (pró-M2), respectivamente. Em contrapartida, *in vivo*, parece haver uma especialização no perfil de ativação dos subtipos de MΦs caracterizado pela LPM os quais assumem um perfil de ativação M2 após inoculação de zimosan, enquanto a SPM parece apresentar uma tendência para o perfil M1 após reestimulo com LPS ou IFN-γ. As diferentes condições proporcionadas *in vivo* resultam em intensas modificações

na composição celular do peritônio caracterizada pelo desaparecimento de LPM, aumento de SPM e influxo de monócitos. Em paralelo, as células aderentes isoladas do peritônio estimulado apresentaram uma diminuída marcação para β-galactosidase, um marcador de senescência celular. A renovação celular que ocorre no peritônio após estimulação, parece ser benéfica ao microambiente, uma vez que ocorre um aumento na produção de NO e na frequência de células $F4/80^{+}IL\text{-}12^{+}$ após a subsequente estimulação com LPS e IFN-γ. Dentre as células mono-mielocíticas peritoneais, a SPM parece ser a principal célula efetora da cavidade peritoneal estimulada, já que foram a maior fonte de IL-12 desse ambiente, aliada à sua elevada atividade fagocítica. Assim, nossos dados mostram que na cavidade peritoneal residem heterogêneas populações de MΦ, contudo, após estimulação ocorre uma substituição de LPM por SPM e monócitos, o que parece promover um efeito benéfico para a resposta celular frente a estímulos infecciosos.

Palavras-chave: Macrófagos. Heterogeneidade. MΦ M1. MΦ M2. Zimosan. *T. cruzi*.

ABSTRACT

CASSADO, A. A. **Peritoneal macrophage heterogeneity**. 2011.158f. [Ph. D. Thesis (Immunology)] – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Macrophages (MΦs) are a heterogeneous population cells originated from blood monocytes that infiltrate all tissues, and differentiate into cells which share some common functions, but also can be specialyzed cells. The MΦs heterogeneity is reflected on their localization and on their morphologic, metabolic, phenotypic and functional characteristics. Resident and elicited-peritoneal MØ are extensively adopted as experimental model to study many morphological and functional aspects of these cells. Thus, the aim of this work was to revisit peritoneal compartment looking for MΦ heterogeneity and specialization in the same environment. Flow cytometry analysis of peritoneal cells showed that peritoneal MΦ comprise two distinct subpopulations, named LPM (*Large Peritoneal Macrophage*) and SPM (*Small Peritoneal Macrophage*). The MΦ subsets can be distinguished by their phenotype and morphology acquired *in vitro,* when SPM became polarized cells and LPM subsets exhibits a classical MΦ morphology. The activation profile shows that LPM and SPM have a plastic potential in their responses to *in vitro* stimulations, being both easily biased to M1 or M2 activation profile after respectively LPS/IFN-γ (pro-M1) or rIL-4 (Pro-M2) stimulation. Conversely, *in vivo* there was a specialization of activation profile marked by a M2 activation profile after zymosan administered *in vivo* assumed by LPM, whereas among SPM higher frequencies of IL-12-expressing cells were found, especially after *T. cruzi* inoculation. The different conditions provided resulted in the marked modification of the peritoneal myelo-monocytic compartment, characterized by the disappearance of LPM and the accumulation of SPM and monocytes. In parallel, adherent cells isolated from stimulated peritoneal cells displayed reduced staining for β-galactosidase, a biomarker for senescence. Further, the cellular renewal in response to

stimulation seems to be benefic to the microenviroment, once adherent cells showed increased nitric oxide (NO) and higher frequency of IL-12-producing cells in response to subsequent LPS and IFN-γ stimulation. Among myelo-monocytic cells, SPM rather than LPM or monocytes, appear to be the central effectors of the activated peritoneal cavity; they display higher phagocytic activity and are the main source of IL-12. Thus, together our data show the presence of heterogeneous MΦ subsets in the peritoneal cavity that can be plastic *in vitro* and provide a demonstration of the consequences of the dynamics between peritoneal MΦ subpopulations by showing that substitution of LPM by a robust SPM and monocytes in response to infectious stimuli greatly improves peritoneal effector activity.

Key-words: Macrophages. Heterogeneity. MΦ M1. MΦ M2. Zymosan. *T. cruzi*.

LISTA DE ABREVIATURAS

LPM - "*Large peritoneal macrophage*" (Macrófago peritoneal grande)

SPM - "*Small peritoneal macrophage*" (Macrófago peritoneal pequeno)

NK - "*Natural Killer*" (células natural killer)

PMN - Polimorfonucleares

SFM - Sistema Mononuclear Fagocítico

DC - "*Dendritic cells*" (Células dendríticas)

cDCs - "*convencional-Dendritic cells*" (Células dendríticas convencionais)

pDCs - "*plasmacitoid-Dendritic cells*" (Células dendríticas plasmacitóides)

MZMΦ - "*Marginal zone Macrophages*" (MΦ da zona marginal)

MHCII - "*Major histocompatibility complex*" (Complexo principal de histocompatibilidade)

β-Gal - β-galactosidase

MDP - "*Macrophage/DC progenitors*" (Progenitor de macrófago e DC)

CDP - "*Common DC precursors*" (Precursos comum de DC)

FliCi - "*Flagellin*" (Flagelina)

IC - "*Immune complex*" (Imunocomplexo)

IL - "*Interleukin*" (Interleucina)

i.p. - Intraperitoneal

LPS - "*Lipopolysaccharid*" (Lipopolissacarídeo)

M1 - "*M1 Macrophages*" (Macrófagos M1)

M2 - "*M2 Macrophages*" (Macrófagos M2)

NO - "*Nitric Oxide*" (Óxido nítrico)

IFN-γ - "*Interferon gama*" (Interferon gama)

GM-CSF - "*Ganulocyte-Macrophages-Colony Stimulant Factor*" (Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos)

FMO - "*Fluorescence Minus One*" (Fluorescência menos um)

DC-SIGN - "*Dendritic Cell Specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin*" (molécula de adesão intercelular não-integrina específica de DC)

CD62-L - L-selectina

SA - "*Streptoavidin*" (Estreptoavidina)

TGF-β - "*Transforming growth factor beta*" (Fator beta de transformação do crescimento)

MFI - "*Mean of fluorescence intensity*" (Média de intensidade de fluorescência)

TLR - "*Toll like receptors*" (Receptores do Tipo Toll)

TIR - "*Toll/IL-1R domain*" (Domínio Toll/IL-1R)

TRAM - "*TRIF- related adaptor molecule*" (Molécula adaptadora relacionada ao TRIF)

GPI - "*Phosphatidylinositol*" (Glicofosfatidil inositol)

NLR - "*NOD like receptors*" (Receptores do Tipo NOD)

ICE - "*IL-1 beta Converting enzyme*" (Enzima de conversão de IL-1 beta)

NOD-LRR - "*Nucleotide-binding oligomerization domain– Leucin rich repeats*" (Domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo- Sequências ricas em leucina)

Apaf - "*Apoptotic protease activating factor*" (Fator de ativação de protease apoptótica)

Ipaf - "*ICE- protease activing factor*" (Fator de ativação de protease ICE)

Naip - "*Neuronal apoptosis inhibitor protein*" (Proteína inibidora de apoptose neuronal)

G-CSF - "*Ganulocyte-Colony Stimulant Factor*" (Fator estimulante de colônias-de granulócitos)

12/15-LOX - 12/15 lipoxigenase

PRR - “*Patter Recognition Receptor*” (Receptor de reconhecimento de padrões)

(SR)-A - Receptor Scavenger A

SES - *Staphylococcus epidermis*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diferenciação de DC e MΦ em camundongos 32

Figura 2 – Plasticidade dos MΦ ativados 41

Figura 3 – Avaliação da composição celular do peritônio 58

Figura 4 – Análise fenotípica de células F4/80^{+} peritoneais 61

Figura 5 – Avaliação morfológica das células F4/80^{+} da cavidade peritoneal 64

Figura 6 – Estratégia de *gates* para distinção de granulócitos e subpopulações de MΦs peritoneais 66

Figura 7 – Avaliação do envolvimento de CCR2 na manutenção de SPM e LPM 67

Figura 8 – Avaliação fenotípica de SPM e LPM 70

Figura 9 – Avaliação do efeito dos agonistas de TLR4 e TLR5 na expressão de IA^{b} e de moléculas co-estimulatórias por LPM e SPM 73

Figura 10 – Avaliação da capacidade fagocítica de SPM e LPM 75

Figura 11 – Avaliação do efeito dos agonistas de TLR na capacidade fagocítica de LPM e SPM 76

Figura 12 – Análise da expressão de marcadores M1 e M2 nos subtipos de MΦs peritoneais 78

Figura 13 – Diferenciação *in vitro* de SPM e LPM 81

Figura 14 – Diferenciação *in vivo* dos subtipos de MΦs peritoneais 83

Figura 15 – Avaliação da composição das células peritoneais após inoculação com amido 86

Figura 16 – Análise das células F4/80 elicitadas 88

Figura 17 – Produção de NO e expressão de iNOS por células aderentes elicitadas com com amido 90

Figura 18 – Avaliação de LPM e SPM após inoculação de zimosan e *T. cruzi* 93

Figura 19 – Análise da marcação para β-Gal em células peritoneais aderentes de animais inoculados com zimosan ou *T. cruzi* 95

Figura 20 – Avaliação funcional de células peritoneais aderentes de animais inoculados com zimosan ou *T. cruzi* 97

Figura 21 – Avaliação funcional de SPM, LPM e monócitos após estímulos infecciosos 99

Figura 22 – Subtipos de MΦs peritoneais em animais pró-M1 e pró-M2 101

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **21**

1.1 A cavidade peritoneal ***22***

1.2 Fagócitos e Sistema Mononuclear Fagocítico ***23***
1.2.1. Origem dos MΦs 30

1.3 Heterogeneidade dos MΦs ***37***

2 OJETIVOS **43**

2.1 Objetivo geral ***44***

2.2 Objetivos específicos ***44***

3 MATERIAIS E MÉTODOS **45**

3.1 Animais ***46***

3.2 Tratamento dos animais e obtenção de células ***46***

3.3 Obtenção das células peritoneais ***47***

3.4 Cultura de MΦs ***47***

3.5 Análise fenotípica das células peritoneais ***48***

3.6 Separação dos subtipos de MΦs peritoneais por Sorting ***49***

3.7 Preparo de lâminas para análise morfológica das células ***50***

3.8 Opsonização de eritrócitos ***50***

3.9 Ensaio de Capacidade Fagocítica ***51***

3.10 Detecção de óxido nítrico ***52***

3.11 Detecção de iNOS ***52***

3.12 Detecção de IL-12 e IL-10 por Facs Intracelular ***53***

3.13 β-Galactosidase (β –Gal) ***54***

3.14 Análises estatísticas ***55***

4 RESULTADOS **56**

4.1 Os MΦs peritoneais são constituídos por duas subpopulações ***57***
4.1.1 A cavidade peritoneal é constituída majoritariamente por linfócitos e MΦs 57
4.1.2 Células F4/80^{+} são compostas por subpopulações com expressão heterogênea de F4/80 e MHCII 59
4.1.3 Dois subtipos de MΦs e granulócitos compõem as células F4/80^{+} do peritônio 62
4.1.4 Peritônio de animais deficientes em CCR2 apresenta reduzido número de SPM 66

4.2 LPM e SPM são fenotipicamente e funcionalmente distintas ***68***
4.2.1 Subtipos de MΦs peritoneais apresentam expressão peculiar de moléculas envolvidas com ativação celular 68
4.2.2 LPM e SPM são responsivos aos agonistas de TLR4 e TLR5 71
4.2.3 SPM apresenta maior capacidade fagocítica em relação à LPM 74
4.2.4 A capacidade fagocítica dos subtipos de MΦs peritoneais é modulada por FliCi e LPS 75
4.2.5 LPM e SPM apresentam expressão basal de ambos marcadores M1 e M2 77
4.2.6 Ambos os subtipos de MΦs peritoneais se diferenciam *in vitro* para M1 e M2 79
4.2.7 LPM se diferencia para o perfil M2 *in vivo* 82

4.3 Dinâmica de LPM e SPM em peritônio elicitado ***84***
4.3.1 Amido induz um aumento de neutrófilos e MΦs no peritônio 84
4.3.2 A composição de MΦs peritoneais é alterada após inoculação de amido. 86
4.3.3 MΦs elicitados são potentes produtores de NO 88

4.4 Dinâmica dos subtipos de MΦ peritoneais frente a estímulos infamatórios ***91***
4.4.1 Estimulação com zimosan e *T. cruzi* modifica o balanço entre SPM e LPM 91
4.4.2 As modificações no compartimento peritoneal após estimulação resultam em uma renovação celular 94
4.4.3 Renovação peritoneal após estimulação é acompanhada pela presença de NO e IL-12 em resposta a estimulação subsequente com LPS 95
4.4.4 SPM são as principais células peritoneais produtoras de IL-12 após estimulação 97
4.4.5 Ambiente pró-M2, como em animais IL-12$^{-/-}$, favorece o acúmulo de SPM 100

5 DISCUSSÃO **102**

6 CONCLUSÕES **118**

7 REFERÊNCIAS **121**

8 ANEXO I - "TWO PHYSICALLY, FUNCTIONALLY, AND DEVELOPMENTALLY DISTINCT PERITONEAL MACROPHAGE SUBSETS" **132**

9 ANEXO II – "CELLULAR RENEWAL AND IMPROVEMENT OF LOCAL CELL EFFECTOR ACTIVITY IN PERITONEAL CAVITY IN RESPONSE TO INFECTIOUS STIMULI" **133**

10 ANEXO III – "A NOVEL PATHWAY FOR INDUCIBLE NITRIC-OXIDE SYNTHASE ACTIVATION THROUGH INFLAMMASOMES" **134**

INTRODUÇÃO

1.1 A cavidade peritoneal

Durante a ontogenia embrionária, a ectoderme origina a epiderme e seus anexos, o encéfalo e a medula espinhal, enquanto a endoderme é responsável pela formação do aparelho respiratório, o tubo digestivo e glândulas anexas. Por sua vez, a mesoderme é dividida em epímero, mesômero e hipômero. O epímero origina a derme (tecido conjuntivo), a musculatura estriada e o esqueleto axial; o mesômero é responsável pela formação do aparelho urogenital (rins, gônadas e ureteres) e o hipômero é responsável pela formação do sistema circulatório, esqueleto apendicular, mesentérios, musculatura lisa, além de três serosas: pericárdio (revestimento cardíaco), pleura (reveste externamente o pulmão) e o peritônio. No mesoderma lateral e no mesoderma cardiogênico surgem espaços isolados que formarão o celoma intra-embrionário, em seguida este celoma originará as cavidades corporais, como a cavidade peritoneal, a pericárdica e pleural (Moore, 2004).

A cavidade peritoneal abriga grande parte dos órgãos e nela está presente uma variedade de células do sistema imune, entre elas linfócitos T, linfócitos B, Células Matadoras Naturais (do inglês - *Natural Killer* (NK)), granulócitos e fagócitos do sistema mononuclear. Uma vez que os fagócitos podem ser facilmente enriquecidos e isolados do compartimento peritoneal, essas células vêm sendo extensivamente utilizadas como ferramenta experimental desde o início dos estudos da biologia dos fagócitos (Cohn, 1962a; Cohn, 1962b; Cohn, 1962c).

1.2 Fagócitos e Sistema Mononuclear Fagocítico

No século XX, muitos estudos foram necessários para a definição dos fagócitos e a compreensão do processo a que se deu o nome de fagocitose. Em 1882, Élie Metchnikoff (1845-1916), um notável biólogo russo, introduziu o conceito de fagocitose após observar que partículas estranhas eram ingeridas por células móveis. Essas células foram classificadas como fagócitos e divididas em dois subtipos, os macrófagos (MΦs) e os micrófagos (polimorfonucleares - PMN). Essa nomenclatura foi baseada no tamanho das células fagocíticas. Em 1884, Metchnikoff demonstrou que ambos os subtipos de fagócitos desempenhavam papéis importantes na resistência do hospedeiro a infecções, já que essas células ingeriam e digeriam bactérias, e por isso, as considerou como a primeira linha de defesa do organismo. Assim, concluiu que a susceptibilidade as infecções era correlacionada com a resistência à fagocitose ou a capacidade de sobrevivência no citoplasma celular (Auffray et al., 2009b; Hirsch, 1959). Essas observações renderam à Metchnikoff, juntamente com Paul Ehrlich, que propôs a teoria da imunidade humoral, o Prêmio Nobel em Fisiologia/Medicina de 1908 (http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1908/mechnikovlecture, 1908). Atualmente, a teoria celular de Metchnikoff e a teoria de imunidade humoral de Ehrlich são igualmente reconhecidas.

Durante a década de 60, os estudos de Zanvil Cohn foram fundamentais para o conhecimento da biologia e função dos fagócitos mononucleares. Os estudos de Cohn e Hirsch ganharam destaque na literatura científica abordando eventos posteriores à fagocitose (Cohn e Hirsch, 1960b;

Cohn e Hirsch, 1960a; Hirsch e Cohn, 1960). Nesse período, houve uma notável progressão nos estudos da biologia celular dos fagócitos, especialmente por meio dos modelos murinos desenvolvidos nos estudos pioneiros de Cohn e Hirsch. Os aspectos fisiológicos e metabólicos foram avaliados utilizando especialmente os leucócitos polimorfonucleares, e foi, primeiramente nessas células, que a presença de grânulos no citoplasma celular foi relatada (Cohn e Hirsch, 1960a). Os grânulos ricos em enzimas hidrolíticas e um agente bactericida nomeado "*phagocytin*" (fagocitina) (Hirsch, 1956), presentes no citoplasma celular ou no vacúolo citoplasmático dos fagócitos, foram observados subsequentemente ao processo de ingestão da partícula fagocitada (Cohn e Hirsch, 1960a; Hirsch, 1960). A desgranulação levaria à liberação dessas enzimas e agentes antimicrobianos no citoplasma celular em resposta à ingestão de bactérias (Cohn e Hirsch, 1960b; Cohn e Morse, 1960; Hirsch e Cohn, 1960). Foi por meio da micrografia que a fusão dos lisossomos com os fagossomas foi observada no citoplasma celular de polimorfonucleares e, com isso, Cohn concluiu que os grânulos eram lisossomos que descarregavam seu conteúdo no microambiente onde se encontravam os microrganismos ingeridos (Cohn e Hirsch, 1960b).

Apesar de já ser reconhecida a presença de fatores no soro que facilitavam a fagocitose (*opsoninas*), foi Silverstein e colaboradores que descreveram o modelo de zíper para a fagocitose mediada por receptores para a porção Fc (Fração cristalizável) de Imunoglobulinas (Ig) (Fc-R) (Griffin et al., 1975; Griffin et al., 1976). Utilizando experimentos elegantes, os pesquisadores mostraram que as interações entre os receptores e seus ligantes guiavam as extensões dos pseudópodes dos MΦs ao longo da circunferência da partícula

ingerida. Na mesma época, foi descrito um mecanismo distinto para a fagocitose mediada por receptores do complemento (Bianco et al., 1975; Aderem e Underhill, 1999).

De fato, a capacidade fagocítica foi utilizada para classificar vários tipos de células em um sistema. Primeiramente, o sistema reticulo-endotelial foi definido por Aschoff e colaboradores (1924) a partir do estabelecimento dos MΦs como células residentes em diversos tecidos e capazes de ingerir e destruir microrganismos fagocitados. Dentre as células que compunham tal sistema, estavam células endoteliais, fibroblastos, células reticulares do baço e linfonodos, células de Kupffer, esplenócitos e monócitos. Essas células foram classificadas em uma ordem de acordo com sua capacidade fagocítica (Van Furth et al., 1972). No entanto, mais tarde foi reconhecido que as células endoteliais não poderiam ser consideradas fagócitos, já que seu mecanismo de endocitose era completamente diferente dos MΦs e, por isso, o uso do termo sistema reticulo-endotelial não era apropriado. Foi durante uma conferência em 1969 que uma nova classificação para os fagócitos foi proposta. Assim, levando em consideração a morfologia, função e cinética de produção dos fagócitos, foi possível classificar as células mononucleares fagocíticas e seus precursores em um sistema nomeado Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) (Van Furth, 1980; Van Furth, 1981; Van Furth e Cohn, 1968; Van Furth et al., 1972). O SFM foi definido como uma família de células com similaridades morfológicas, funcionais e originadas da medula óssea, o que é mais coerente do que o modelo de Sistema reticulo-endotelial proposto por Aschoff em 1924 (Van Furth et al., 1972).

Nesse contexto, os dados de Ralph van Furth ganharam destaque no final da década de 60, quando descreveu em detalhes as células do SFM, em especial a cinética de produção dessas células sob condições fisiológicas ou inflamatórias (Van Furth e Cohn, 1968; Van Furth e Diesselhoff-Den Dulk, 1970). O SFM compreendia promonócitos e seus precursores presentes na medula óssea, monócitos que circulam na corrente sanguínea, e MΦs e DCs residentes nos diversos tecidos, formando assim, uma linhagem celular originada na medula óssea (Hume, 2006; Hume et al., 2002; Van Furth, 1980; Van Furth, 1981). As células mais imaturas do SFM foram representadas por pró-monócitos, os quais se dividiam duas vezes dando origem a dois monócitos. Os monócitos, por sua vez, circulariam pelo sangue periférico como células imaturas até alcançarem os tecidos, onde se diferenciariam em MΦs com alto potencial fagocítico quando em condições favoráveis (Van Furth, 1970; Van Furth e Diesselhoff-Den Dulk, 1970; Volkman, 1970).

Como revisto em 2006 (Hume, 2006), os fagócitos mononucleares compartilham algumas características como: capacidade endocítica, presença de enzimas no citoplasma celular (hidrolases lisossomais e esterases) e expressão de receptores que favorecem a fagocitose (Fc-R e receptores para moléculas do sistema complemento). Contudo, como os MΦs são células extremamente dinâmicas, com intensas modificações na membrana citoplasmática, processos de fusão que ocorrem durante a endocitose e a fagocitose, nenhuma dessas características realmente define os MΦs teciduais ou os distingue das demais células fagocíticas. A distinção dos MΦs ficou ainda mais complicada após a descrição das células dendríticas (DCs) (Steinman e Cohn, 1973). As DCs, que compartilham diversas características fenotípicas e

funcionais com os MΦs, foram descritas inicialmente como células especializadas em apresentar antígenos aos linfócitos T virgens por meio de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC).

A expressão de cadeia CD11b da integrina Mac-1 parecia uma característica peculiar de MΦs, até ser encontrada também em diversas populações celulares (polimorfonucleares, células NK, DCs e alguns tipos de linfócitos) (Ross, 2000; Shortman e Liu, 2002). Em 1981, Austyn e Gordon demonstraram que o hibridoma produzido a partir da fusão de células esplênicas de ratos imunizados com MΦs peritoneais com um mieloma de camundongo (NS1) produzia um anticorpo monoclonal específico para MΦs, denominado F4/80 (Austyn e Gordon, 1981). Neste trabalho, os autores verificaram que o anticorpo F4/80 se ligava em MΦs peritoneais, MΦs derivados de células da medula óssea e em monócitos, mas não em fibroblastos, polimorfonucleares ou linfócitos (Austyn e Gordon, 1981). A viabilidade desse anticorpo como um marcador específico de MΦs foi testado em diversos órgãos e tecidos, como rim (Hume e Gordon, 1983), medula óssea (Hume et al., 1984b), epitélio (Hume et al., 1984c), órgãos linfóides (Hume et al., 1983b) entre outros (Hume et al., 1984a; Hume et al., 1983a). No entanto, algumas populações de MΦs não apresentam expressão de F4/80, como é o caso dos MΦs alveolares, esplênicos e células de Kupffer (Gordon e Hirsch, 1982; Gordon et al., 1988; Maus et al., 2001), demonstrando que a expressão de F4/80 também não pode ser utilizada como ferramenta exclusiva para definir MΦs. Para avaliar se a molécula F4/80 desempenhava alguma função nos MΦs, foi produzida uma linhagem de camundongo deficiente em F4/80. Com isso, foi demonstrado que as populações de MΦs se desenvolviam

normalmente e que a resposta antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* não apresentava nenhuma alteração na ausência de F4/80 (Schaller et al., 2002).

Apesar das dificuldades existentes para a definição e categorização das subpopulações de MΦs (Geissmann et al., 2010a), a sua importância para o funcionamento do sistema imune é absolutamente reconhecida (Unanue, 1997). Dentre suas funções destacam-se a fagocitose e destruição de microorganismos, apresentação de antígenos para linfócitos T (Villacres-Eriksson, 1995), remoção de células apoptóticas (Aderem e Underhill, 1999), resolução de processos inflamatórios (Leibovich e Ross, 1975), angiogênese (Polverini et al., 1977) e reparo e remodelamento tissular (Werb e Gordon, 1975).

O estágio de maturação pode influenciar o comportamento funcional dos MΦs, já que sua capacidade funcional é intensamente influenciada pelo tempo de vida (Kovacs et al., 2009; Lloberas e Celada, 2002). Nesse contexto, foi relatada uma diminuição da capacidade fagocítica e microbicida, baixa produção de citocinas pró-inflamatórias e radicais livres por MΦs senescentes (Cecilio et al., 2011), e diminuída expressão de moléculas de MHCII, o que leva a uma deficiência no processo de apresentação de antígenos para linfócitos T $CD4^+$. Os MΦs senescentes apresentam também modificações morfológicas e moleculares caracterizadas pelo grande tamanho, presença de um excessivo número de vacúolos citoplasmáticos e expressão do marcador molecular associado à senescência celular β-galactosidase (β-Gal) (Dimri et al., 1995). Além disso, o acúmulo de MΦs senescentes nos tecidos pode comprometer a arquitetura e funcionalidade tecidual (Herrero et al., 2002; Kovacs et al., 2009;

Lloberas e Celada, 2002; Plackett et al., 2004; Plowden et al., 2004; Swift et al., 2001).

1.2.1. Origem dos MΦs

Desde a década de 70, é reconhecido que sob condições fisiológicas ou patológicas algumas populações de MΦs são originadas de monócitos sanguíneos, como é o caso dos MΦs do tecido conectivo, MΦs pleurais, MΦs peritoneais, células de Kupffer e MΦs alveolares (Van Furth, 1970; Van Furth e Diesselhoff-Den Dulk, 1970). Outros trabalhos da mesma época demonstraram que os MΦs do fígado, pulmão, baço e peritônio são células originadas na medula óssea (Balner, 1963; Godleski e Brain, 1972; Goodman, 1964; Pinkett et al., 1966; Rickard et al., 1970; Shand e Bell, 1972; Virolainen e Defendi, 1968).

No entanto, Geissmann e colaboradores demonstraram a existência de duas populações distintas de monócitos murinos, as quais são identificadas pela expressão de receptores e capacidade migratória para os tecidos (Geissmann et al., 2003). Os monócitos inflamatórios expressam elevados níveis de Ly6G ($GR1^+$), CCR2 e a molécula de adesão L-selectina (CD62L) e são recrutados preferencialmente para sítios inflamatórios. O segundo subtipo de monócitos foi nomeado como monócitos residentes pois migram tanto para tecidos inflamados como não inflamados. Os monócitos residentes são caracterizados pelo seu pequeno tamanho, expressão de LFA-1 e CX_3CR1, porém não expressam Ly6G ($GR1^-$), CCR2 e CD62L. Ambos os subtipos de monócitos são encontrados em humanos, onde os monócitos $CD14^+CD16^-$ correspondem aos monócitos murinos inflamatórios ($GR1^+$), enquanto os monócitos $CD14^{low}CD16^+$ compartilham as mesmas características dos monócitos residentes ($GR1^-$) (Geissmann et al., 2003). Os monócitos

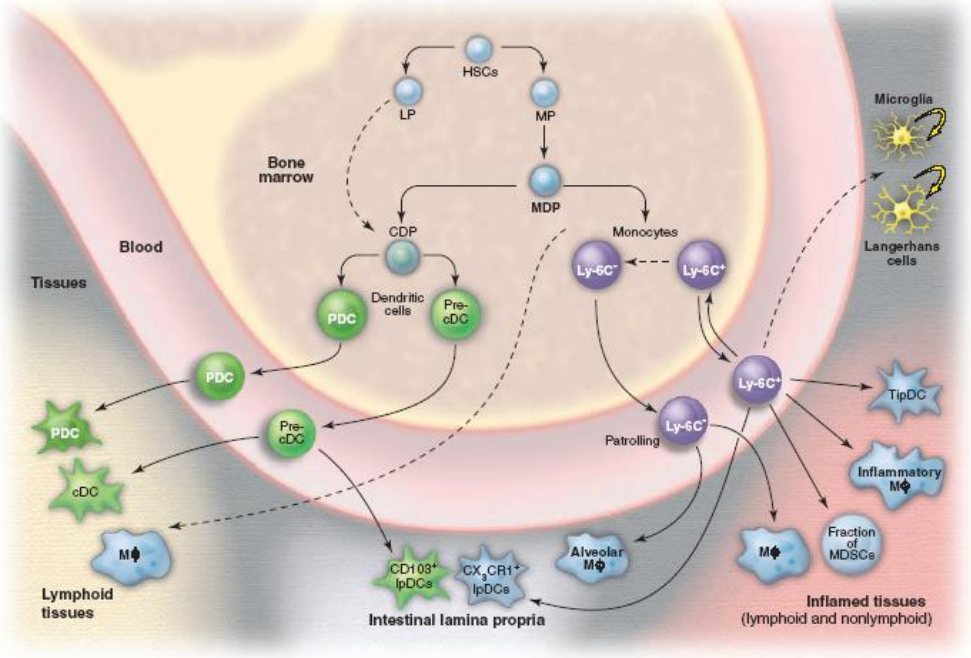
inflamatórios podem se diferenciar em DCs inflamatórias que migram para órgãos linfóides (Cella et al., 2000; Geissmann et al., 2003; Randolph et al., 1999), ou que se estabelecem como células residentes na pele, trato digestivo e pulmão (Ginhoux et al., 2006; Landsman et al., 2007).

Os subtipos de monócitos apresentam maneiras diferentes de trafegar pelo endotélio até extravasar para os tecidos (Auffray et al., 2007). Utilizando microscopia intravital e animais $CX_3CR1^{gfp/+}$, nos quais a proteína fluorescente verde (GFP) é expressa nos monócitos, Auffray e colaboradores demonstraram que os monócitos residentes apresentam um tipo de mobilidade *crawling* (rastejamento). Esses monócitos monitoram tecidos saudáveis por meio de movimentos *crawling* pelos endotélios em situações fisiológicas, e esse tráfego depende da integrina LFA-1 e do receptor para quimiocina CX_3CR1 (Auffray et al., 2007). Além disso, parece que essas células são recrutadas para os sítios inflamados em uma fase tardia, como observado após isquemia do miocárdio, em que os monócitos residentes expressam fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e promovem a angiogênese e deposição de colágeno (Nahrendorf et al., 2007).

Assim, diferente do simples modelo proposto para a origem dos monócitos a partir de um precursor mielóide comum da medula óssea, os quais dão origem também aos neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células dendríticas (DC) (Van Furth, 1985), recentemente foi proposto um novo modelo com a existência de novas ramificações (Auffray et al., 2009a; Auffray et al., 2009b; Liu et al., 2009). MDP (*"Macrophage/DC progenitors"*) seria então um precursor comum para os MΦ e células dendríticas (DCs), os quais podem originar monócitos e também células em estado de diferenciação final como MΦ, DCs

convencionais (cDCs) e DCs plasmacitóides (pDCs), sem um intermediário monocítico. Por outro lado, CDP ("*Common DC precursors*") seria um progenitor restrito ao desenvolvimento de cDCs e pDC (Auffray et al., 2009b; Geissmann et al., 2010b; Liu et al., 2009). Todos esses aspectos foram abordados em uma revisão publicada recentemente pelo grupo de Geissmann (Geissmann et al., 2010b), a qual traz a figura abaixo para ilustrar todos esses aspectos a respeito da origem dos MΦ e DCs, os subtipos de monócitos e também a diferenciação terminal que cada um dos subtipos de monócitos pode assumir.

Figura 1: Diferenciação de DC e MΦ em camundongos. Na medula óssea, células tronco hematopoiéticas (HSCs) produzem precursores mielóides (MP) e linfóides (LP). MDs dão origem aos MDPs, que por sua vez podem originar dois tipos de monócitos, GR1^{+} e GR1^{-}, monócitos ou ainda CDP. CDPs dão origem a pré-cDC, as quais circulam pelo sangue e atingem os tecidos linfóides, onde se diferenciam em cDC CD8^{+} ou CD8^{-}. Alternativamente, essas células podem migrar para órgãos não-linfóides onde se diferenciam em DCs da lâmina propria CD103^{+} (lpDCs). Sob condições homeostáticas, monócitos Ly6C^{-} podem originar MΦ alveolares. Por outro lado, os monócitos Ly6C^{+} podem se tornar lpDC, DCs derivadas de monócitos (DCs produtoras de iNOS e TNF-α - Tip-DC), MΦ inflamatórios ou ainda, células mielóides supressoras associadas a tumores (Myeloid-derived suppressor cells - MDSCs).



Fonte: Geissmann et al., 2010b.

1.2.2 Receptores para padrões moleculares

Os MΦs são considerados sentinelas imunológicas por sua distribuição nos diferentes tecidos do organismo, onde iniciam a resposta imune pelo reconhecimento de padrões moleculares frequentemente associados a patógenos (do inglês *Pathogen Associated Molecular Patherns* - PAMPs) (Kopp e Medzhitov, 2003). O reconhecimento de padrões moleculares é característico da imunidade inata, onde o repertório imunológico segue um padrão básico, não variável de célula para célula.

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 (Iwasaki e Medzhitov, 2004; Pasare e Medzhitov, 2005). 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 receptor 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 (Akira e Takeda, 2004; Janeway e Medzhitov, 2002). Nos últimos 10 anos, foram muitas as contribuições nesse assunto, porém, muitos aspectos envolvidos no reconhecimento diferencial desses padrões moleculares necessitam de maiores elucidações.

Vários tipos de receptores para padrões moleculares (do inglês – *Pathern Recognition Receptors* - PRR) estão presentes em MΦs e DCs e, nesse contexto, os receptores do tipo *Toll* (do inglês *Toll Like Receptors* - TLR)

têm alcançado posição de destaque na literatura científica atual. Os TLR são moléculas transmembranas que contêm um domínio externo à membrana com seqüências ricas em leucina, particular para cada TLR, e uma cauda intracelular que mostra grande homologia com o domínio intracelular do receptor para a citocina IL-1 (IL-1R), chamada TIR (domínio Toll/IL-1R) (Gay e Keith, 1991). A ativação do TLR por seus ligantes induz o recrutamento de proteínas adaptadoras específicas (Carty et al., 2006). Essas proteínas adaptoras transduzem o sinal do TIR, ativando quinases e fatores de transcrição como NF-κB e STAT-1 (Yamamoto e Akira, 2004). 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 TLRs compreende, até o momento, treze proteínas identificadas em mamíferos (13 receptores identificados em camundongos e 11 receptores em humanos) (Kawai e Akira, 2007). Entre seus diversos ligantes, os melhores caracterizados são peptidoglicanas e lipoproteínas bacterianas, âncoras de GPI (glicofosfatidil inositol) presentes em protozoários e zimozan em fungos (ligantes de TLR2), RNA dupla-fita, comuns em vírus (ligante de TLR3), lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede de bactérias gram-negativas (ligante do TLR4), flagelina (ligante de TLR5) e seqüências de DNA ricas em CpG não metilados (ligante de TLR9), presentes em bactérias e vírus, entre outros.

A importância da ativação de MΦs e DCs por receptores TLR para o desenvolvimento e perfil da resposta imune têm sido cada vez mais apreciado

(Pasare e Medzhitov, 2005). Sporri e Reis e Sousa (Sporri e Reis E Sousa, 2005) demonstraram que a ativação por TLR é fundamental para que as DCs se tornem capazes de conduzir o perfil da resposta imune adaptativa. Esses autores demonstraram que, apesar de a ativação de DCs por mediadores inflamatórios induzir um aumento na expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e moléculas coestimulatórias, como CD80 e CD86, essas DCs são incapazes de conduzir a diferenciação de linfócitos T para o perfil Th1 ou Th2, função desempenhada apenas por DCs ativadas via TLR. Ainda, a ligação de padrões moleculares por TLR parece ser de fundamental importância para que DCs possam diferenciar antígenos próprios provenientes de células apópticas ingeridas no foco inflamatório e antígenos não próprios, uma vez que a maturação dos fagossomas dessas células é alcançada somente na presença de agonistas de *Toll* (Blander e Medzhitov, 2006).

Após a descoberta dos TLR, uma nova família de receptores para padrões moleculares tem sido descrita. Os receptores do tipo NOD-LRR (do inglês *Nucleotide-binding oligomerization domain – Leucin rich repeats*- NLR*)* têm como característica peculiar sua localização citosólica e compreendem proteínas NOD, Nalp, Naip, Apaf e Ipaf (Inohara e Nunez, 2003; Lee e Kim, 2007). São proteínas formadas essencialmente por 3 domínios, um domínio efetor N-terminal variável, um domínio central do tipo NOD e uma porção C-terminal com sequências ricas em leucina (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-κB ou da protease caspase-1, dependendo do tipo de receptor recrutado. Como dito anteriormente, o fator de

transcrição NF-κB é capaz de induzir a transcrição de inúmeros genes, culminando na produção de diferentes moléculas efetoras. A caspase-1 ou ICE (*IL-1β converting enzyme*) 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 morte em MΦs infectados, fato que poderia indicar um mecanismo de resistência e controle de patógenos por essas células (Mariathasan et al., 2004; Miao et al., 2010; Zamboni et al., 2006).

1.3 Heterogeneidade dos MΦs

Células residentes em tecidos distintos, os MΦs representam uma população celular altamente heterogênea. A heterogeneidade dessas células está refletida tanto em seus aspectos morfológicos e fenotípicos, como metabólicos e funcionais (Gordon e Taylor, 2005; Mantovani et al., 2004; Mills et al., 2000; Mosser, 2003). De maneira geral, os MΦs são caracterizados fenotipicamente pela expressão de altos níveis da cadeia CD11b da integrina Mac-1 e da glicoproteína F4/80. Porém, a expressão dessas moléculas não é homogênea entre as diferentes subpopulações de MΦs (Taylor et al., 2003). Como exemplo, os MΦs alveolares caracterizados pela alta capacidade fagocítica e diminuída expressão de F4/80; os MΦs do sistema nervoso central, denominados micróglia, que são células F4/80^{+}, assim como os MΦs da medula óssea e as células de Kupffer (Taylor et al., 2003). Ainda que esses exemplos mostrem somente os MΦs residentes em diferentes tecidos, essa heterogeneidade não é determinada apenas pelos fatores ambientais, uma vez que em um mesmo microambiente podemos encontrar populações heterogêneas de MΦs (Taylor et al., 2003). O exemplo típico da expressão diferencial desses marcadores em um único microambiente pode ser visto nos MΦs esplênicos, onde parece haver ao menos três diferentes subpopulações de MΦ (Gordon e Taylor, 2005; Taylor et al., 2003; Taylor et al., 2005). MΦs 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 MΦs, as quais possuem baixa expressão de F4/80. Os MΦs da zona marginal (MZMΦ)

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 MΦs 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 (Gordon e Taylor, 2005; Taylor et al., 2003; Taylor et al., 2005). De acordo com esses mesmos autores, os MΦs peritoneais também podem expressar níveis diferentes de F4/80 de acordo com as condições encontradas no microambiente. Na ausência de estimulação e/ou inflamação da cavidade peritoneal, os MΦs peritoneais, ditos MΦs residentes, são caracterizados pelo fenótipo F4/80^{high}. Em contrapartida, quando elicitado, o peritônio é composto por MΦs inflamatórios, os quais apresentam fenótipo F4/80^{+} (Gordon e Taylor, 2005; Taylor et al., 2005).

Com relação ao perfil metabólico e funcional, os MΦs podem ser subdivididos em M1 e M2 (Mills et al., 2000). De acordo com os autores, em MΦ 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 MΦs provenientes de camundongos de linhagens Th2 (BALB/c e DBA.2), denominados MΦs M2, a via da arginase, com conseqüente geração de ornitina e poliaminas, é predominante. (Gordon e Taylor, 2005; Mantovani et al., 2004; Mills et al., 2000).

As subpopulações de MØs podem assumir perfis funcionais distintos dependendo do estímulo ambiental. Parece haver um consenso de que a

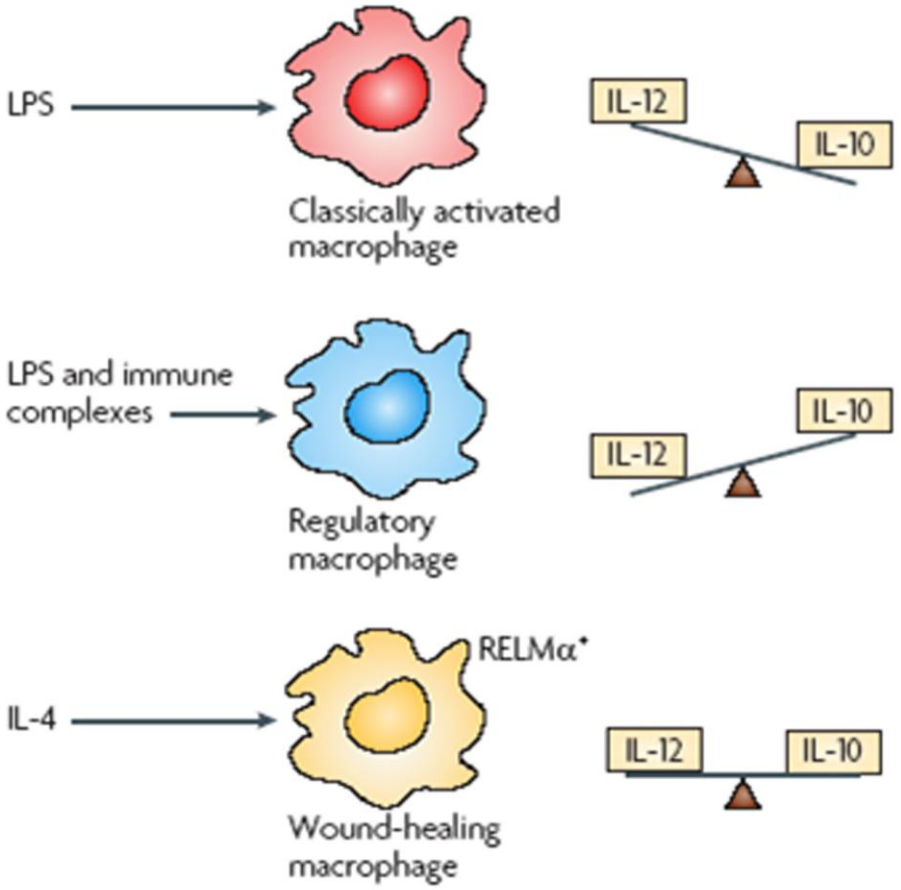
ativação clássica de MΦs se dá pelo estímulo com IFN-γ, resultando na geração de MΦ M1, com alto potencial microbicida e secretores de citocinas pró-inflamatórias como Interleucinas (IL)-1, IL-6, IL-12 e fator de necrose tumoral-α (TNF-α) (Edwards et al., 2006; Gordon e Taylor, 2005; Mantovani et al., 2004; Mosser e Edwards, 2008). Nesse caso, dados de nosso grupo mostraram o envolvimento da IL-12 no comprometimento com o perfil de ativação dos MΦs, uma vez que na ausência de IL-12, MΦ M1 apresentam um desvio para o perfil M2 de ativação (Bastos et al., 2002).

O conceito de MΦs alternativos surgiu quando foi evidenciado que a IL-4 causava o recrutamento de MΦs que adquiriam um perfil fenotípico (expressão do receptor de manose) e funcional distinto dos MΦs classicamente ativados (Stein et al., 1992). Nos anos seguintes, foi descrito que outros estímulos que poderiam induzir uma modificação no perfil funcional dos MΦs (Mantovani et al., 2005; Martinez et al., 2008; Mosser, 2003). Dentre esses estímulos se destacavam os glicocorticóides, IL-10 e imunocomplexos (IC) reconhecidos pelos FcR. O fato desses estímulos induzirem nos MΦs um perfil similar ao adquirido com IL-4 e IL-13, levou a uma confusão no conceito de MΦs clássicos e alternativos e, por isso, várias classificações foram propostas. A mais recente delas define os MΦs classicamente ativados (caMΦ) como M1, e os MΦs ativados por uma via alternativa, como M2a-c (Martinez et al., 2008).

De acordo com Mantovani e colaboradores (Mantovani et al., 2005; Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2008), os MΦs M2a, ditos alérgicos, são induzidos pelas citocinas IL-4 e IL-13, enquanto que MΦ M2c são induzidos por IL-10 e glicocorticóides. Por sua vez, MΦs expostos a imunocomplexos (IC), na presença de agonistas de 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. Essa idéia de diferentes MΦs ativados por uma via alternativa é compartilhada por outros grupos (Gordon, 2003; Gordon, 2007; Gordon e Taylor, 2005) (Edwards et al., 2006; Mosser, 2003; Mosser e Edwards, 2008). Contudo, esses grupos se referem primordialmente ao conceito de MΦ M2a e M2b, ainda que os MΦs M2a sejam nomeados “wound healing” e MΦ M2b como MΦ regulador. Os MΦs M2a foram considerados como responsáveis pelo controle de infecções helmínticas (Mosser e Edwards, 2008; Noel et al., 2004; Rodriguez-Sosa et al., 2002). Já os MΦs reguladores são caracterizados pela capacidade de secretar altos níveis de IL-10 após estimulação e, de maneira interessante, podem preservar a capacidade de secretar NO e ativar células T naïve sem a secreção de IL-12 (Anderson e Mosser, 2002; Edwards et al., 2006; Mantovani et al., 2004; Mosser, 2003; Mosser e Edwards, 2008).

Figura 2 - Perfil de ativação dos MΦs. MΦs ativados por uma via clássica (LPS) produzem altos níveis de IL-12 e baixos níveis de IL-10. Em contrapartida, MΦs reguladores, ativados por imunocomplexos (IC) na presença de agonista de TLR, produzem altos níveis de IL-10, porém baixos níveis de IL-12. MΦs ativados por IL-4 (*wound-healing* ou M2a) produzem baixos níveis de ambas as citocinas, mas expressam RELMα intracelular, marcador que não é expresso por nenhuma outra população.



Fonte – Mosser e Edwards, 2008.

Os MΦ derivados da medula óssea e os MΦs peritoneais são as duas fontes mais convenientes para o isolamento de MΦs. Os MΦs da medula óssea são facilmente derivados a partir de precursores da medula óssea após 7 dias em cultura na presença de GM-CSF (Gr*anulocyte-Macrophages-Colony Stimulant Factor)*. Por outro lado, os MΦs peritoneais residentes, ou seja, provenientes de animais controles, são facilmente obtidos da cavidade peritoneal e purificados pela aderência em placas de cultura de plástico ou vidro. Além disso, a injeção de partículas de Bio-Gel de poliacrilamida, tioglicolato ou amido induz uma resposta inflamatória caracterizada pela presença precoce de neutrófilos, porém após 3-5 dias o peritôneo se torna um microambiente com fácil isolamento de MΦs elicitados. Contudo, os dados da literatura abordando a heterogeneidade dos MΦs peritoneais ainda são escassos, sendo o estudo detalhado dessas células, o objetivo central desse trabalho.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi estudar a heterogeneidade dos macrófagos residentes no compartimento peritoneal e avaliar a dinâmica dos subtipos de MΦs peritoneais após estimulação *in vivo* e *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a importância da co-existência de duas subpopulações de MΦ na cavidade peritoneal por meio da avaliação das características fenotípicas, metabólicas e funcionais basais de cada um dos subtipos de MΦ peritoneais.

- Caracterizar o perfil de ativação dos MΦ peritoneais *in vitro* e *in vivo,* e avaliar a importância de citocinas pró-M1 ou pró-M2 para a manutenção dos subtipos de MΦ peritoneais em condições fisiológicas.

- Determinar a dinâmica das subpopulações de MΦ peritoneais em peritônios elicitados e inoculados com estímulos infecciosos; assim como verificar a contribuição de cada um dos subtipos de MΦ peritoneais para a resposta inflamatória e consequente ativação do compartimento peritoneal após um estímulo infeccioso.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos C57BL/6, IL-12$^{-/-}$, IL-10$^{-/-}$, IL-4$^{-/-}$ e IFN-γ$^{-/-}$, com 6-12 semanas de idade, mantidos em condições “pathogen-free”, foram fornecidos pelo Biotério de camundongos isogênicos do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP). Animais C57BL/6 e CCR2$^{-/-}$ foram utilizados no laboratório do Profº Frederic Geissmann (*King’s College* – Londres, Inglaterra). Esses animais são criados e mantidos pelo próprio laboratório. Todos os animais utilizados neste trabalho foram mantidos com livre acesso à água e ração.

3.2 Tratamento dos animais e obtenção de células

Para a avaliação da ativação dos MΦs peritoneais por ligantes de TLR, camundongos C57BL/6 foram inoculados pela via intraperitoneal (i.p.) com LPS de *Escherichia coli* (1 μg/animal) (Sigma-Aldrich, Inglaterra) ou com flagelina (FliCi) (1 μg/animal). No modelo para obtenção de MΦs elicitados, animais C57BL/6 foram inoculados pela via i.p. com 1 mL de amido de batata (STARCH, 1%). Nos demais estudos dos subtipos de MΦs peritoneais, os camundongos C57BL/6 foram inoculados com zimosan (1 mg/animal), tripomastigotas de *Tripanosoma cruzi (T. cruzi)* (10^6 parasitas/ animal), células apoptóticas (APO) ($4x10^7$/animal). As células apoptóticas foram preparadas a partir de timócitos de animais C57BL/6 irradiados com 1200 mJ e incubadas por 8 h a 37 ºC, em atmosfera contendo 5% de CO_2. Após esse período, pelo menos 85% das células são células apoptóticas.

Alguns experimentos tiveram como controle animais estímulados com PBS (solução salina tamponada com fosfato) no mesmo volume dos demais estímulos.

3.3 Obtenção das células peritoneais

Após os períodos de inoculação dos animais com os diferentes estímulos inflamatórios, as células presentes no compartimento peritoneal foram coletadas através de lavagem peritoneal, utilizando 5 mL de PBS. Logo após a obtenção, as células foram quantificadas em hemocitômetro para determinação do número absoluto de células peritoneais utilizando Tripan Blue (Sigma) para análise de viabilidade celular.

3.4 Cultura de MΦs

As células peritoneais (6×10^5) obtidas dos camundongos tratados ou não tratados, foram colocadas em cultura em meio RPMI suplementado (Sigma) por 4 h a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO_2, em placas de 6 poços (Costar), para que os MΦs fossem enriquecidos por aderência. Após vigorosas lavagens para remoção das células não-aderentes com RPMI, as células aderentes foram retiradas com Accutase (MP Biomedicals) (1 mL/poço). Para os experimentos sequenciais, as células aderentes foram então contadas e incubadas em placas de 96 poços (Costar) na concentração de $2,5 \times 10^5$ células/poço.

Em alguns experimentos, a cultura das células peritoneais foi realizada seguindo o mesmo protocolo, porém, em seguida à lavagem das células não-aderentes, as células aderentes foram estímuladas ou não, conforme o protocolo de cada experimento. Nesse caso, cerca de 6 x 10^5 células foram plaqueadas para que após a remoção das células não aderentes sobrasse no mínimo 3 x 10^5 células/poço.

3.5 Análise fenotípica das células peritoneais

Para avaliação fenotípica, as células peritoneais foram incubadas com anticorpos monoclonais para CD11b (Mac-1, M1/70), MHCII (AF6-120.1), CD11c (HL3), Pan NK (DX5), GR1 (RB6-8C5), CD4 (H129.19), CD8 (53-6.7), Ly6C (AL-21), MHCII (IAb), CD80 (B7.1, 1G10), CD86 (B7.2, GL-1), CD40 (3/23), TLR4 (MTS510), TLR5, CD127 (B12-1), CD25 (PC61), CD62L (MEL-14) e CCR7 (4B12), todos da BD Biosciences (New Jersey, EUA). Os anticorpos para LAP (R&D Systems), F4/80 (CI:A3-1) e para Dectina-1 (2A11) (Serotec) (Düsseldorf, Alemanha), CD19 (eBioOMAK-D) e DC-Sign (LWCO6) da eBioscience (San Diego, EUA) também foram utilizados em alguns experimentos. Os anticorpos eram marcados com FITC, PE, PE-Cy5, Biotina, APC, PECy7 ou Pacific Blue. Quando necessário, uma segunda incubação com estreptoavidina (SA) (Cy-Chrome ou Pacific Blue) foi realizada. A expressão de CD36 foi avaliada usando uma IgA anti-CD36 (63) de camundongo da Cayman Chemical (Michigan, USA) e como anticorpo secundário foi usado anti-IgA de camundongo (C10-1) da BD Biosciences.

O protocolo de marcação das células foi adicionar 25 uL da solução de anticorpos sobre o *pellet* de células e incubar por 20-30 min a 4º C, na ausência de luz. Após o período de incubação, as células eram lavadas com tampão de marcação, adicionando 3 mL desse tampão e centrifugando a 1200 rpm por 10 min. Nos casos de marcação dupla, devido ao uso de anticorpos marcados com biotina, após a lavagem, as células eram submetidas a uma nova etapa de marcação com a SA. Para a leitura das amostras, as células foram ressuspendidas em um volume de pelo menos 200 uL. As células foram captadas em um FacsCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA), ou FacsCanto, ou ainda em um FacsAria II e, pelo menos, 10^5 eventos foram adquiridos por amostra. A análise dos dados foi realizada com o *software FlowJo* (Tree Star). Controles de fluorescência (*Fluorescence-minus-one* (FMO) foram realizados como previamente descrito (Herzenberg et al., 2006; Roederer, 2001) e usados para distinguir a marcação positiva de células autofluorescentes.

3.6 Separação dos subtipos de MΦs peritoneais por Sorting

Os subtipos de Mϕs peritoneais, ou as subpopulações de células F4/80$^+$, dos animais tratados ou não tratados foram separadas por *sorting* para experimentos sequenciais. Para a realização do *sorting*, primeiramente as células peritoneais foram filtradas para remoção de grumos celulares em agulhas 23G ou em tubos de ensaio com tampa contendo filtro (BD Biosciences). Após serem filtradas e lavadas com PBS-soro-azida, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais como descrito no item anterior.

Após a marcação, as células foram lavadas com PBS-soro-azida e ressuspendidas em meio de cultura RPMI suplementado com 3% de SFB em uma concentração de 2-3 milhões de células/mL, para posterior separação por citometria de fluxo em FacsVantage (Becton Dickinson) ou em um FacsAria. Os tubos de coleta (BD Biosciences) utilizados, após a realização do *sorting*, foram preparados com 1 mL de meio de cultura RPMI 3% SFB contendo gentamicina (1:100) e todas as manipulações foram realizadas em condições estéreis.

3.7 Preparo de lâminas para análise morfológica das células

Para avaliação morfológica das populações de MΦs peritoneais, após a separação de cada uma das subpopulações F4/80^{+}, as células isoladas foram utilizadas no preparo de uma lâmina através da *CitoSpin*. As lâminas foram coradas com o *Kit Instant Prov* (NewProv), conforme as instruções do fabricante e posteriormente foram analisadas em um microscópio óptico.

3.8 Opsonização de eritrócitos

Alguns ensaios para avaliação da capacidade fagocítica foram realizados com eritrócitos de carneiro (SRBC; ICN, Costa Mesa, CA, EUA). Cerca de 10^{9} eritrócitos de carneiro foram lavados com PBS gelado por centrifugação a 3000 rpm por 3 min. Esse processo foi repetido por pelo menos 3 vezes, até a obtenção de um sobrenadante límpido. Após as lavagens, os eritrócitos foram quantificados em um hemocitômetro e opsonizados, incubando-os com uma concentração subaglutinante de IgG anti-sRBC

produzida em coelho (Cappel Organon Teknika). Os eritrócitos foram mantidos por 30 min em contato com os anticorpos opsonizantes a 37 ºC e em atmosfera contendo 5% de CO_2. Logo após a incubação a 37 ºC, os eritrócitos foram deixados por 15 min no gelo e então lavados com PBS por mais 2 vezes antes de serem usados nos experimentos.

3.9 Ensaio de Capacidade Fagocítica

As células obtidas por lavagem peritoneal em animais controles ou inoculados i.p. com FliCi ou LPS foram colocadas em cultura para aderir por 5 horas na concentração de 10^6 células/poço em *chambers* de 8 poços (Lab-Tek) a 37 ^oC em 5% CO_2. Passado esse período, as células não aderentes foram removidas por lavagens e os eritrócitos de carneiro opsonizados (5 x 10^6 hemácias/poço) ou zimosan (5 x 10^6 zimosan/poço) foram adicionados à cultura de MΦ por 90 min para o ensaio de fagocitose. Os poços foram lavados com meio de cultura para remoção dos eritrócitos ou das partículas de zimosan não fagocitados. As lâminas foram coradas com o *kit Instant-Prov* (Newprov) de acordo com as instruções do fabricante.

Para os ensaios de fagocitose *in vivo*, os animais foram estimulados i.p. com zimosan (1 mg/animal) e após 30 min as células peritoneais foram coletadas e os subtipos de MΦs peritoneais foram isolados por *sorting*, como descrito no item 3.6. Utilizando os subtipos de MΦs isolados foram preparadas lâminas de *CitoSpin*, as quais foram coradas como descrito acima.

O número de eritrócitos ou partículas de zimosan fagocitadas foi contado em microscópio óptico. O número de eritrócitos ou zimosan

fagocitados por MΦ, foi obtido fazendo a relação do número de partículas ou eritrócitos fagocitados em 100 MΦs pela porcentagem de MΦs que fagocitaram pelo menos uma partícula ou eritrócito.

3.10 Detecção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico foi analisada pelo método de Griess, como descrito previamente (Ding et al., 1988). Em resumo, 50 µl do sobrenadante das culturas foram adicionados a 50 µl do reagente de Griess (preparados com reagentes da Sigma) por 5 min em temperatura ambiente. A concentração de NO_2 foi determinada por leitura da densidade óptica a 550 nm em referência ao padrão da solução de $NaNO_2$. As dosagens foram realizadas em duplicata.

3.11 Detecção de iNOS

Para a realização do *western blotting* para iNOS, os MΦs previamente estimulados e mantidos em cultura por 48 h foram lisados com tampão SDS (sodium dodecyl sulfate) (50mM Tris-HCl, Ph 6,8; 2% SDS, 10% glicerol e 2,5% de β-mercaptoetanol). As amostras foram aquecidas a 100 ºC por 5 min e estocadas a –70 ºC. Posteriormente, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida (8%) contendo SDS e submetidas à eletroforese. As proteínas do gel foram, então, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpos policlonal para iNOS (H-174) (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, EUA). A detecção dos imunocomplexos foi realizada pelo método de

quimioluminescência utilizando o kit ECL (Amershan, Amersham Place, Little Chalfont, Inglaterra), de acordo com as instruções do fabricante.

3.12 Detecção de IL-12 e IL-10 por Facs Intracelular

As células peritoneais (10^6), obtidas de camundongos controles ou previamente inoculados *in vivo* foram incubadas com brefeldina (BD Biosciences), por 10 h, a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO_2. Juntamente com a brefeldina foram adicionados os estímulos *in vitro* com LPS (1 ug/mL) (Sigma) e rIFN-γ (2,5 ou 5 ng/mL) (BD Biosciences), rIL-4 (20 ng/mL), sRBC (4:1), células apoptóticas ($4x10^7$/animal), zimosan (1 mg/animal) ou *T. cruzi* (10^6/animal)). Após as 10 h de incubação, as células foram lavadas com PBS-SBF-Azida (1% SBF e 0,05% de azida) e sobre o *pellet* foi adicionado a solução dos anticorpos extracelulares anti-CD19 (APC), anti-CD11c (PE ou Biotina), anti-F4/80 (FITC) e anti-IA^b (PE ou Biotina) utilizados na marcação extracelular. As células foram mantidas a 4 ºC por 20-30 min, lavadas com PBS-SBF-Azida e marcadas novamente com SA-Cy-Chrome ou Pacific Blue. Após a marcação extracelular, as células foram fixadas com *CitoFix* (100 μl/10^6 células) (BD-Pharmingen) (Jung et al., 1993) por 20 min, a 4 ºC. Após lavagens com PBS-soro-azida, as células foram permeabilizadas com 100 μl de *PermWash* (tampão de permeabilização) (BD Biosciences). Dessa etapa em diante, o tampão utilizado foi o *PermWash*. As células foram incubadas com um anticorpo monoclonal anti-IL-12p70 (C15.6) ou anti-IL-10 (JESE-16E3) (BD Biosciences) de camundongo, seguido por incubação de 30 min em ambiente protegido de luz. Posteriormente, as células foram lavadas,

incubadas com SA (Cy-Chrome ou Pacific Blue) (BD Biosciences). Por fim, as células foram lavadas, ressuspendidas em 200 uL de PBS-soro-azida e analisadas em citômetro de fluxo FacsCalibur (Becton Dickinson), de acordo com a intensidade de fluorescência e a dispersão frontal (FSc) e lateral (SSc) do feixe luminoso. A especificidade da marcação para IL-12p70 ou para IL-10 foi verificada usando o FMO, como descrito no item 3.5.

3.13 β-Galactosidase (β –Gal)

A marcação para β-Gal foi realizada seguindo os protocolos convencionais de marcação de β-Gal como marcador de senescência celular (Dimri et al., 1995). Resumidamente, células peritoneais aderentes de animais controles ou previamente inoculados i.p. com zimosan ou *T. cruzi* foram colocadas em cultura para aderir por 4 h. Após remoção das células não aderentes, as células aderentes foram fixadas com glutaraldeído (0.2%) por 5 min a temperatura ambiente, lavadas com PBS e então incubadas 10 h a 37 °C com o tampão de marcação de β-Gal, o qual é composto por 1 mg/mL de X-gal; 40 mM de ácido cítrico/fosfato de sódio, pH 6.0; 150 mM cloreto de sódio; 2 mM cloreto de magnésio; 5 mM ferrocianeto de potássio; e 5 mM ferricianeto de potássio e com pH 6.0. Após o período de incubação, o tampão de β-Gal foi removido da cultura e as células foram observadas em microscopia óptica, usando um microscópio Nikon TS100 e fotografadas com uma câmera Sony, com um aumento de 40x e zoon digital 3.0.

3.14 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas usando o Teste ANOVA. As diferenças entre os grupos serão consideradas significantes quando o valor p for <0.05 (5%).

RESULTADOS

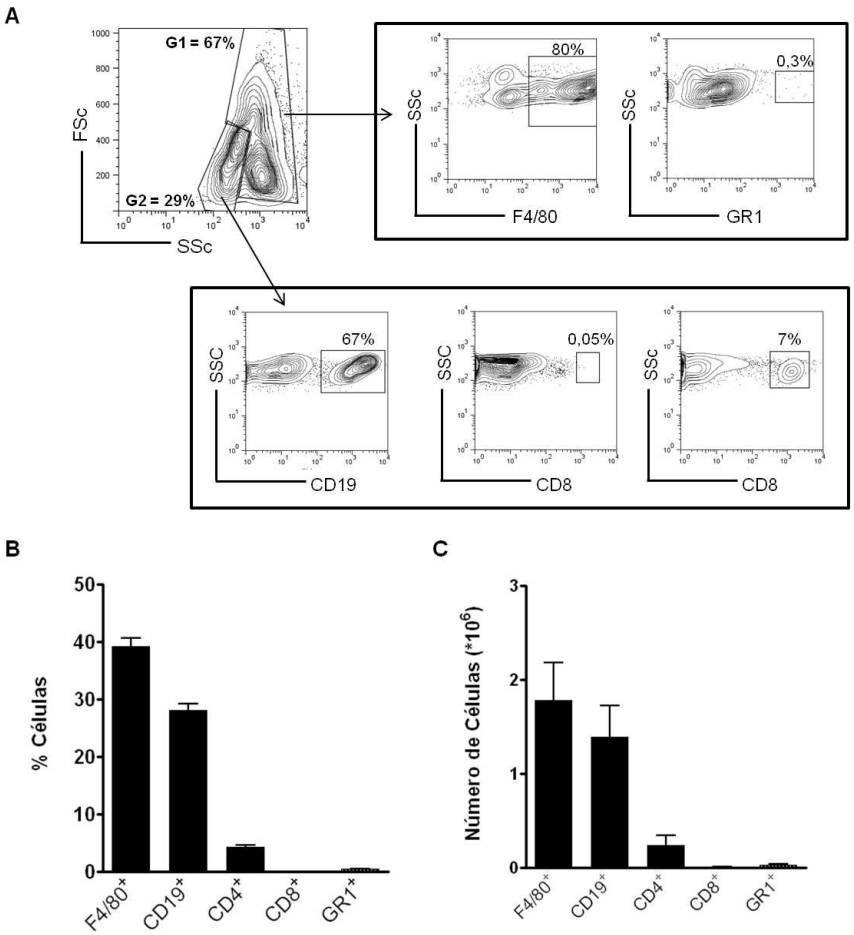
4.1 Os MΦs peritoneais são constituídos por duas subpopulações

4.1.1 A cavidade peritoneal é constituída majoritariamente por linfócitos e MΦs

A cavidade peritoneal é um compartimento extensivamente utilizado em diversos estudos, isso porque as células peritoneais são abundantes e facilmente isoladas. Porém, a respeito da heterogeneidade das populações residentes nesse compartimento pouco se sabe. Para caracterizar as populações celulares presentes no peritônio de animais C57BL/6 não tratados, as células obtidas do lavado peritoneal foram marcadas com anticorpos para marcadores específicos de diversas populações celulares ou para marcadores de ativação celular e submetidas à análise por citometria de fluxo. A análise dos dados da citometria de fluxo foi inicialmente baseada no perfil de dispersão frontal (FSc), ou tamanho, e no perfil de dispersão lateral do feixe luminoso (SSc), ou granulosidade. Dessa forma, as células peritoneais puderam ser separadas em dois *gates (*janela para separação de populações), sendo um de células com alto perfil FSc e SSc *(G1),* ou seja, células grandes e granulosas, e outro *gate* de células com baixo FSc e SSc *(G2),* ou pequenas e pouco granulosas*.* Os gates *G1* e *G2* compreenderam respectivamente 68% e 29% das células peritoneais totais. O *gate G2* foi constituído por aproximadamente 67% de células $CD19^+$ (linfócitos B), além de uma pequena população de células $CD4^+$ (Figura 3A e 3B). No *gate* G1 foram encontradas 80% de células $F4/80^+$, o que formou a população celular majoritária do *G1* (Figura 3A) e representou aproximadamente 38% das células peritoneais totais (Figura 3B).

Mais do que isso, as células F4/80^{+} formaram duas populações com expressão heterogênea desse marcador. Como esperado, no peritôneo de animais controles não foi possível encontrar neutrófilos (GR1^{+}) (Figura 3A, B e C). Assim, podemos dizer que a cavidade peritoneal de animais controles é composta majoritariamente por linfócitos B e MΦs.

Figura 3 – Avaliação da composição celular do peritônio. As células peritoneais de animais C57BL/6 controles foram coletadas e marcadas com anticorpos específicos para F4/80, CD19, CD4, CD8 e GR1. As células foram captadas em um FacsCalibur e pelo menos 10^5 eventos foram adquiridos. Na análise dos dados, as células foram selecionadas em um *gate* de células grandes e granulosas (*G1*) (quadro superior), e um *gate* de células pequenas e não granulosas (*G2*) (quadro inferior). Posteriormente, as células foram avaliadas quanto à expressão de cada um dos marcadores utilizados. Os valores no interior dos *plots* mostram a porcentagem de cada uma das populações celulares (A). A frequência (B) e o número absoluto (C) de cada um dos tipos celulares presentes na cavidade peritoneal estão mostrados no gráfico de barras. Cada barra é representada pela média ± DP, com n=3, de um experimento representativo. Os experimentos foram repetidos 3 vezes, mostrando o mesmo perfil de resultados.



4.1.2 Células F4/80^{+} são compostas por subpopulações com expressão heterogênea de F4/80 e MHCII

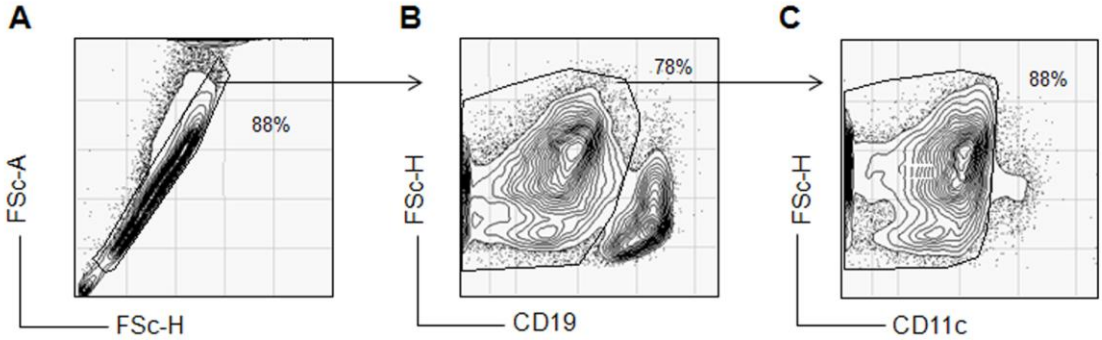
A figura 3A mostra que podemos visualizar a presença de duas populações celulares entre as células F4/80, sendo uma com alta expressão desse marcador (F4/80^{high}) e a outra com baixos níveis dessa glicoproteína, (F4/80^{low}). Esse dado sugere que os MΦ peritoneais são constituídos por duas populações heterogêneas. A avaliação mais criteriosa das células F4/80^{+} residentes na cavidade peritoneal, foi realizada inicialmente com uma estratégia de *gates* para excluir células aderidas entre si (denominadas *doublets*). Para isso, as células foram selecionadas pelos parâmetros FSc-A (Área) e FSc-H (Altura) (Figura 4A). Posteriormente, foram excluídos os linfócitos B (CD19^{+}) (Figura 4B) e as DCs utilizando seus respectivos marcadores CD19 e CD11c (Figura 4C). Entre as células CD19^{-}CD11c^{-} foi selecionada apenas a população F4/80^{+}, que por sua vez representou cerca de 88% das células remanescentes (Figura 4D). Neste *gate* pudemos visualizar as duas populações com expressão heterogênea de F4/80. Levando em consideração o parâmetro SSc, pudemos ainda observar três populações celulares. A população majoritária (87%) que apresentou alta expressão de F4/80 (F4/80^{high}) é comumente designada pela literatura como a população de MΦ residentes (Gordon e Taylor, 2005; Taylor et al., 2003; Taylor et al., 2005). As duas populações F4/80^{low} com diferentes perfis SSc, F4/80^{low}SSc^{high} e F4/80^{low}SSc^{high}, somaram cerca de 10% das células F4/80^{+}.

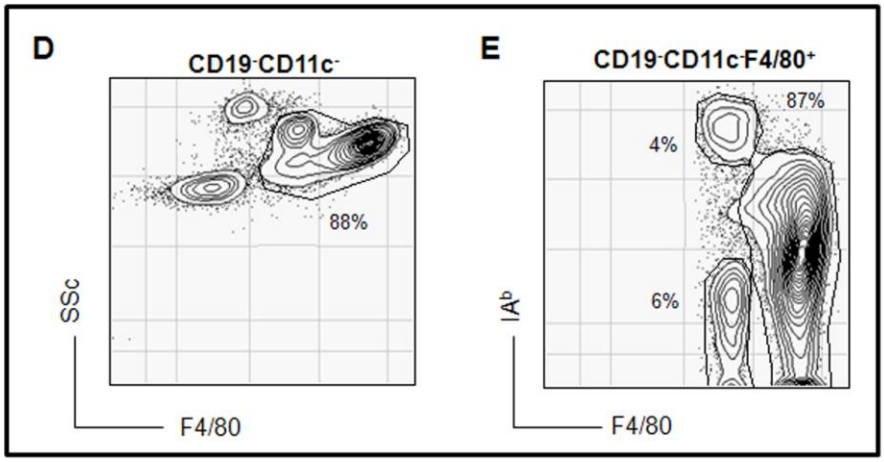
A avaliação das células F4/80^{+}, quanto à expressão de IA^{b}, revelou claramente três diferentes subpopulações, sendo elas: células F4/80^{high}, as

quais não expressam IA^b ($F4/80^{high}IA^{b\text{-}int/neg}$); e duas subpopulações de células $F4/80^{low}$, que puderam ser distinguidas pela expressão de IA^b. Uma delas com alta expressão de IA^b, apresentando o fenótipo $F4/80^{low}IA^{b\text{-}high}$, enquanto a outra não expressava esse marcador, $F4/80^{low}IA^{b\text{-}neg}$ (Figura 4E).

Assim, com base na expressão de F4/80 e MHC classe II, essas subpopulações foram inicialmente designadas como $F4/80^{high}IA^{b\text{-}int/neg}$, $F4/80^{low}IA^{b\text{-}high}$ e $F4/80^{low}IA^{b\text{-}neg}$, as quais representaram, respectivamente cerca de 86%, 4% e 6% das células $F4/80^{+}$.

Figura 4 – Análise fenotípica de células F4/80^{+} peritoneais. Céulas peritoneais de animais C57BL/6 controles foram coletadas e marcadas com anticorpos específicos para F4/80, CD19, CD11c e IA^{b}. As células foram captadas em um FacsCanto e pelo menos 10^{5} eventos foram adquiridos. A análise dos dados se iniciou com, os *doublets* sendo excluídos a partir dos parâmetros FSc-H por FSc-A (A). Em seguida, as células CD19^{-} (B) e CD11c^{-} (C) foram selecionadas em um *gate* e avaliadas quanto à expressão de F4/80 e pelo parâmetro SSc (D). Por fim, as células F4/80^{+} foram avaliadas quanto à co-expressão de F4/80 e IA^{b}, o que definiu claramente a presença de 3 diferentes populações F4/80^{+} (E). Os valores no interior dos gráficos mostram a porcentagem de cada uma das populações celulares separadas em *gates*. Os dados são de um experimento representativo, com n=3. Os experimentos foram repetidos 3 vezes, mostrando o mesmo perfil de resultados.





4.1.3 Dois subtipos de MΦs e granulócitos compõem as células F4/80^{+} do peritônio

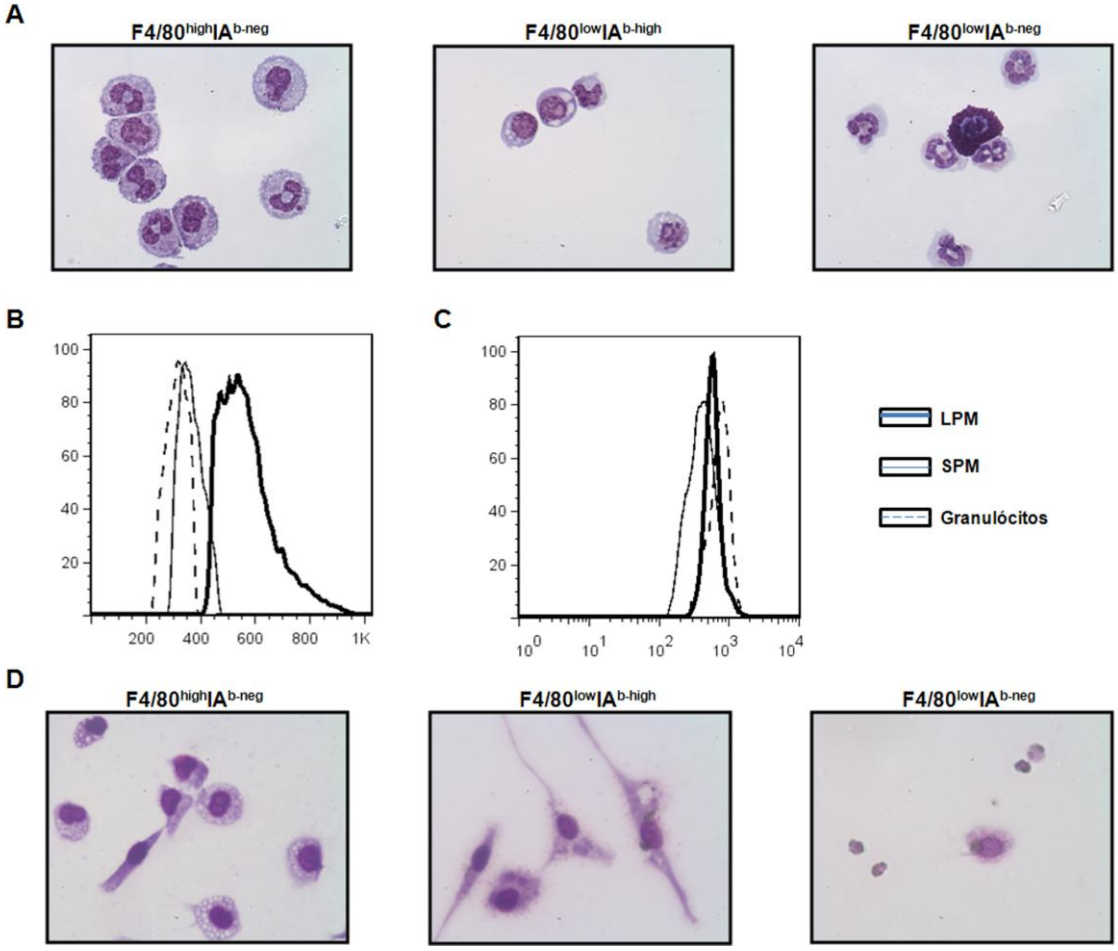
No intuito de verificar se essas três populações F4/80^{+} eram de fato MΦs, as células peritoneais foram marcadas com anticorpos e as populações peritoneais F4/80^{high}IA$^{b\text{-}int/neg}$, F4/80^{low}IA$^{b\text{-}high}$ e F4/80^{low}IA$^{b\text{-}neg}$ do compartimento peritoneal de camundongos C57BL/6 não tratados foram separadas por *sorting,* utilizando-se o FacsVantage. A separação de cada uma das subpopulações gerou uma pureza de 95% (dados não mostrados), mostrando a viabilidade do *Sorting* e possibilitando o preparo de uma lâmina para observação microscópica de cada uma das subpopulações peritoneais F4/80^{+}. A análise *ex vivo* das subpopulações F4/80^{+} revelou que tanto as células F4/80^{high}IA$^{b\text{-}int/neg}$, quanto a subpopulação F4/80^{low}IA$^{b\text{-}high}$ apresentaram morfologia de células mono-mielocíticas. Tal fato poderia indicar a existência de dois subtipos de MΦs no peritônio, uma vez que essas células foram selecionadas entre as células CD11c^{-} (Figura 4). Além disso, esses subtipos de MΦ mostraram diferenças morfológicas: enquanto as células F4/80^{high}IA$^{b\text{-}int/neg}$ apresentaram maior tamanho e a presença de vacúolos citoplasmáticos, a subpopulação F4/80^{low}IA$^{b\text{-}high}$ pareceu ser composta por células de menor tamanho (Figura 5A). Por sua vez, a análise morfológica da população F4/80^{low}IA$^{b\text{-}neg}$ revelou a presença de granulócitos, entre eles mastócitos e, principalmente, eosinófilos (Figura 5A).

A diferença no tamanho das subpopulações de MΦ peritoneais também pôde ser observada pelo seu perfil de dispersão frontal (ou FSc), em que as células F4/80^{high}IA$^{b\text{-}int/neg}$ apresentaram maior FSc do que as células

F4/80^{low}IA$^{b\text{-}high}$ (Figura 5B). As duas subpopulações de MΦs também apresentaram uma diferença na granulosidade ou perfil de dispersão lateral (SSc), o qual revelou que as células F4/80^{low}IAb^{neg}, além de maiores, são também mais granulosas do que as células F4/80^{low}IAb^{high} (Figura 5C). Dessa maneira, as duas subpopulações de MΦ peritoneais foram claramente distinguidas pelo seu tamanho (FSc) e granulosidade (SSc). Por esse motivo, o perfil FSc foi utilizado para nomear essas populações como LPM (*Large peritoneal macrophage*) e SPM (*Small peritoneal macrophage*) no artigo que descreveu essas células (ANEXO I) (Ghosn et al., 2010).

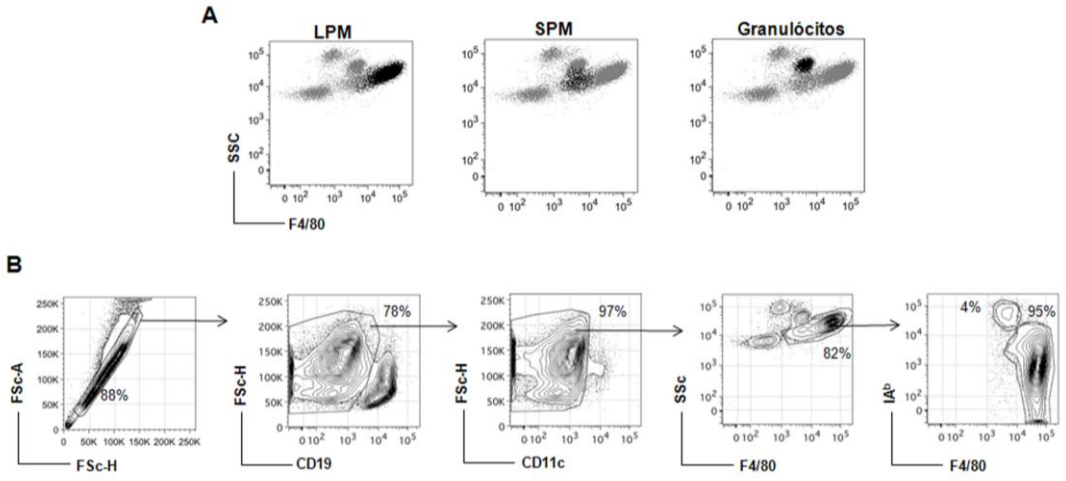
Para verificar a morfologia das subpopulações de MΦs em cultura, as células isoladas por *sorting,* como descrito acima, foram colocadas em lâminas de cultura de 8 poços e mantidas por 4 h. Após esse período, as células foram fixadas com metanol e coradas com hematoxilina e eosina para análise microscópica. Os LPMs se mostraram mais arredondados, com grande citoplasma, apresentando a morfologia clássica descrita para os MΦs. Já a população SPM pareceu adquirir morfologia mais alongada e polarizada, com prolongamentos semelhantes aos dendritos presentes em DCs (Figura 5D).

Figura 5 – Avaliação morfológica das células F4/80^{+} da cavidade peritoneal. As células peritoneais foram coletadas e marcadas com anticorpos para CD19, CD11c, F4/80 e IA^{b} para serem sequencialmente purificadas por *Sorting*. As subpopulações F4/80^{+} foram selecionadas em *gates* distintos, como mostrado na figura 4, e as células peritoneais F4/80^{high}IA$^{b\text{-}int/neg}$, F4/80^{low}IA$^{b\text{-}high}$ e F4/80^{low}IA$^{b\text{-}neg}$ de animais C57Bl/6 controles foram purificadas em um FacsVantage. Para a avaliação morfológica *ex vivo*, as populações F4/80^{+}, previamente separadas, foram utilizadas no preparo de lâminas, utilizando-se *CitoSpin* (A). Nos histogramas está sendo mostrado o perfil dos parâmetros FSc (B) e SSc (C) de cada uma das populações F4/80^{+}, como indicado na legenda da figura. Para a avaliação morfológica *in vitro* das subpopulações F4/80^{+}, as subpopulações previamente purificadas foram colocadas em lâminas de culturas de 8 poços e mantidas por 24, h com meio de cultura RPMI. (D). As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina, utilizando-se o *Kit Instant Prov* e observadas em microscópio óptico. As figuras representam um aumento de 40x de imagens captadas pela câmera Sony (zoon 3.0). Os dados são de um experimento representativo. Os experimentos foram repetidos 3 vezes, mostrando o mesmo perfil de resultados.



Uma vez que tanto a co-expressão de F4/80 e o perfil SSc, quanto a co-expressão de F4/80 e IA^b mostraram a presença de duas populações distintas de células $F4/80^{low}$, decidimos avaliar a correlação entre o perfil SSc e a expressão de IA^b e a possibilidade de distinguir os granulócitos dos SPMs pelo perfil SSc. Já que os granulócitos apresentaram uma maior granulosidade do que os SPMs, a distinção entre os MΦs peritoneais e os granulócitos pôde ser facilmente realizada através do perfil SSc e da expressão de F4/80 (Figura 6A). Com base nessas análises, a figura 6B mostra uma estratégia de *gates* que permite a exclusão dos granulócitos já durante a seleção de células $F4/80^+$, tornando a análise mais cautelosa. Essa estratégia é a mesma demonstrada na Figura 4, em que primeiro se descarta os *doublets* e na sequência as células $CD19^+CD11c^+$ são excluídas. Porém, nessa nova seleção, as células $F4/80^{low}$ com alta SSc, que correspondem aos granulócitos, já são excluídas no *gate* de células $F4/80^+$ (Figura 6B). Dessa maneira, foi possível obter uma população de células $F4/80^+$ que só representasse os subtipos de MΦs peritoneais.

Figura 6 – Estratégia de *gates* para distinção de granulócitos e subpopulações de MΦs peritoneais. As células peritoneais foram coletadas e marcadas com anticorpos específicos para CD19, CD11c, F4/80 e IA^b, para análise em um FacsCanto. As populações LPM, SPM e granulócitos foram selecionadas como demonstrado na figura 4 e avaliadas de acordo com a expressão de F4/80 e SSc. Nos *plots* LPM, SPM e os granulócitos são representados pela população na cor preta enquanto as demais células em cinza (A). Estratégia sequencial de *gates* com exclusão de células com alto perfil SSc (B). Os valores no interior dos gráficos representam a porcentagem de cada uma das populações celulares. Os dados apresentam um experimento representativo, com n=3. Os experimentos foram repetidos 3 vezes, mostrando o mesmo perfil de resultados.

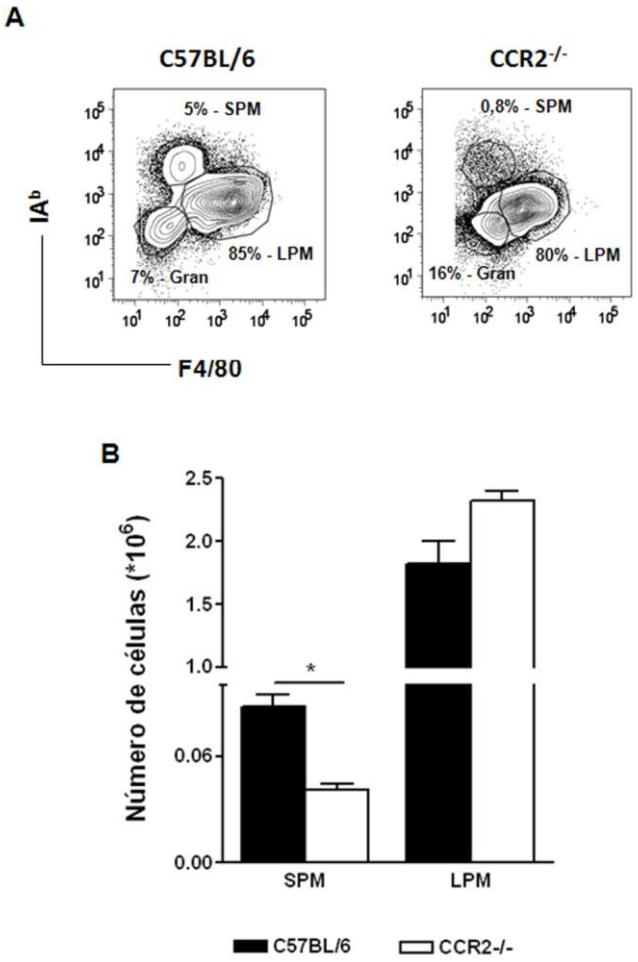


4.1.4 Peritônio de animais deficientes em CCR2 apresenta reduzido número de SPM

A migração de monócitos inflamatórios $GR1^+$ para um tecido inflamado é dependente da expressão de CCR2 (Geissmann et al., 2003). Para avaliar o envolvimento da migração de monócitos inflamatórios para a manutenção do *pool* de SPM e LPM no peritônio, a frequência de LPM e SPM foi avaliada no peritônio de animais deficientes em CCR2. Para isso, foi utilizada a mesma estratégia de *gates* já descrita anteriormente. Os números relativos e absolutos de LPM nos animais deficientes de CCR2 são semelhantes ao observado nos

animais selvagens (C57BL/6) (Figura 7A e 7B). Porém, na ausência de CCR2 foi observada uma marcante redução na frequência de SPM, quando comparado com os animais selvagens (Figura 7A), a qual refletiu em seu número absoluto (Figura 7B). Esses dados indicam o envolvimento de CCR2 na manutenção do *pool* de SPM, mas não de LPM, sob condições fisiológicas.

Figura 7 **–** Avaliação do envolvimento de CCR2 na manutenção de SPM e LPM**.** As células peritoneais de animais C57BL/6 e CCR2$^{-/-}$ não tratados foram coletadas por lavagem peritoneal e marcadas com anticorpos monoclonais. As células foram captadas em um FacsARIA-II e pelo menos 5x10^{5} eventos foram adquiridos. LPM e SPM foram selecionadas como descrito na Figura 4 e avaliadas de acordo com a expressão de F4/80 e MHCII. Os valores no interior dos *plots* representam a porcentagem de cada população (A)**.** Os gráficos apresentados mostram o número total de LPM (B) e de SPM (C), onde as barras são representadas pela média ± DP. * p<0,05 como indicado no próprio gráfico. Os dados apresentados representam um experimento demonstrativo com n=3 para cada grupo.



4.2 LPM e SPM são fenotipicamente e funcionalmente distintas

4.2.1 Subtipos de MΦs peritoneais apresentam expressão peculiar de moléculas envolvidas com ativação celular

Para verificar o fenótipo das subpopulações de MΦs peritoneais, a expressão de CD11b, CD11c, GR1, IA^b, moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, e TLR4 e TLR5 foi avaliada em LPM e SPM, selecionadas como descrito anteriormente. Como controle negativo de cada uma das marcações, foi considerado o FMO (*Fluorescence Minus One*), no qual as células são marcadas com todos os anticorpos que caracterizam a população, exceto aquele de interesse. Assim, as células com marcação acima de seu FMO foram consideradas positivas para cada um dos marcadores em questão.

A expressão de CD11b pôde ser correlacionada com a expressão de F4/80, assim, o subtipo de MΦ LPM expressou os maiores níveis de CD11b em relação à SPM (Figura 8A). Nenhum dos subtipos de MΦ peritoneais apresentaram expressão de CD11c ou DX5, indicando que essas células não são DCs ou células NK. Além disso, ambos os subtipos de MΦ peritoneais diferem dos monócitos na expressão de Ly6C e GR1, já que nenhum deles são positivos para esses marcadores (Figura 8B).

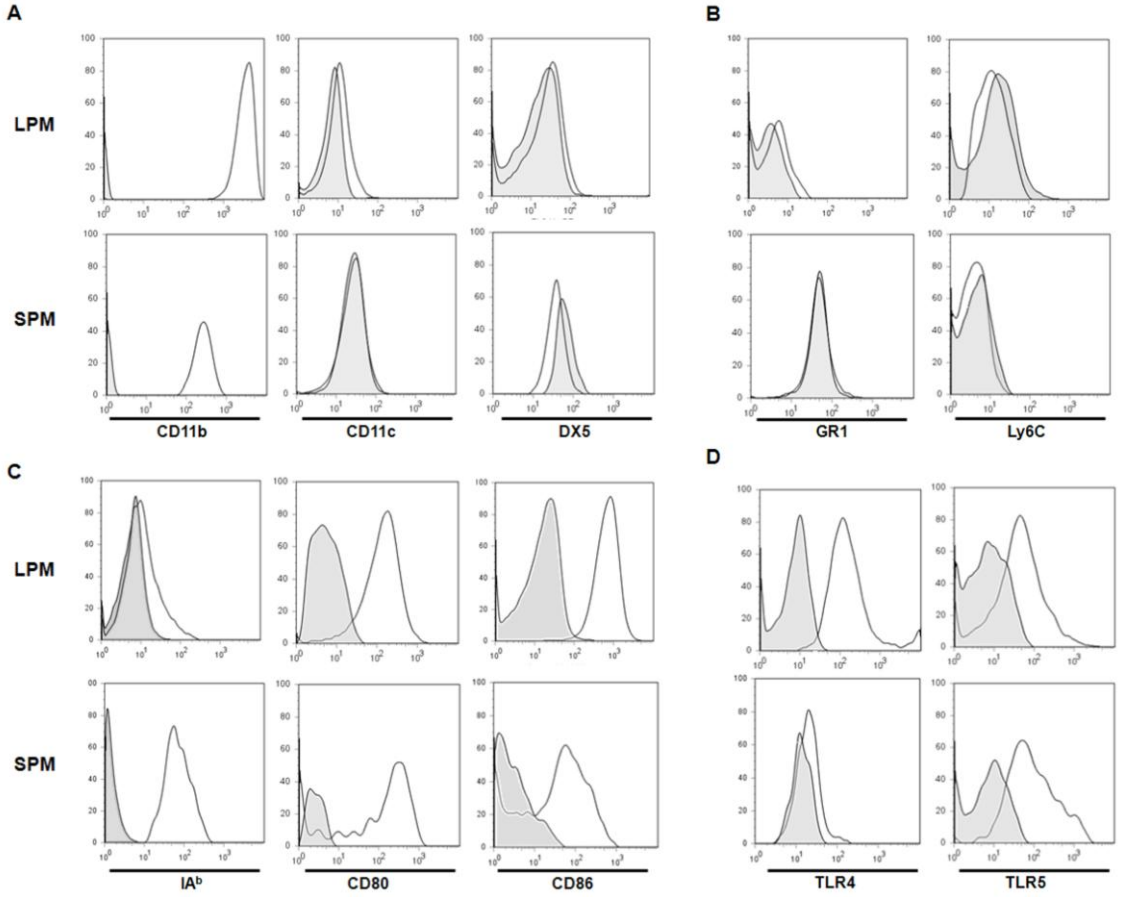
As moléculas MHCII, CD80 e CD86 estão envolvidas com a função de apresentação de antígeno dos MΦs e também podem caracterizar o seu estado de ativação (Carreno e Collins, 2002; Collins et al., 2005). Como descrito anteriormente, SPM apresentou expressão de altos níveis de IA^b, enquanto a LPM não expressou níveis significativos dessa molécula (Figura

8C). Em contrapartida, os LPMs apresentaram maior expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, quando comparados com os SPMs (Figura 8C).

A expressão de TLR é comum nas diversas populações de MΦs, sendo essenciais para o reconhecimento de padrões dos patógenos com consequente início e condução da resposta imune. Ambos os subtipos de MΦs peritoneais apresentaram expressão de TLR4 e TLR5, ligantes para lipopolissacarídeos e flagelina bacterianos, respectivamente (Figura 8D).

Dessa maneira, além dos subtipos de MΦs peritoneais LPM e SPM apresentarem expressão heterogênea de F4/80 e morfologias distintas, essas células também mostraram diferenças fenotípicas importantes.

Figura 8 – Avaliação fenotípica de SPM e LPM. Células peritoneais de animais C57BL/6 controles foram coletadas e marcadas com anticorpos específicos para F4/80, CD19, CD11c e IA^b. As células foram captadas em um FacsCanto e pelo menos 10^5 eventos foram adquiridos. LPM e SPM foram selecionados como descrito na figura 4 e avaliados quanto à expressão de marcadores celulares (CD11b, CD11c, DX5) (A), GR1 e Ly6C) (B), marcadores de ativação celular (IA^b, CD80 e CD86) (C) e dos receptores TLR4 e TLR5 (D). O controle de cada uma das marcações, FMO, foi realizado como descrito nos Materiais e Métodos e é representado nos histogramas pela linha cinza, enquanto a linha sem preenchimento mostra a expressão de cada um dos marcadores avaliados na população de MΦ indicada na figura. Os dados são de um experimento representativo, com n=3. Os experimentos foram repetidos 3 vezes, mostrando o mesmo perfil de resultados.



4.2.2 LPM e SPM são responsivos aos agonistas de TLR4 e TLR5

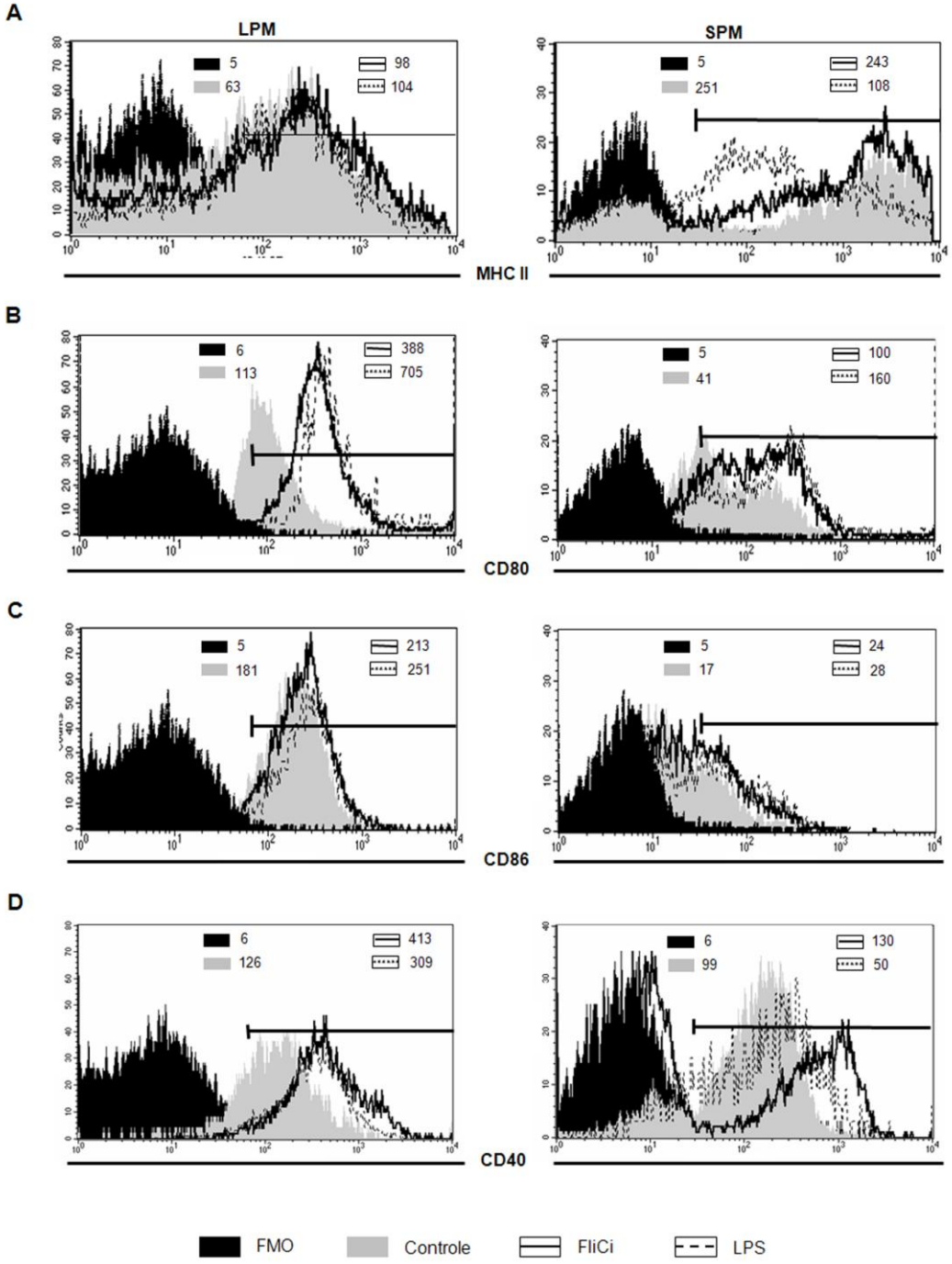
Para verificar a funcionalidade da expressão de TLR4 e TLR5 apresentada por LPM e SPM, seus respectivos agonistas, LPS e flagelina purificada de *Salmonella typhimurium* (FliCi) foram inoculados i.p. em camundongos C57BL/6 e 48 h mais tarde as células foram removidas por lavagem peritoneal para avaliação fenotípica das populações celulares por citometria de fluxo. Como dito anteriormente, os SPMs de animais não tratados apresentaram a maior intensidade média de fluorescência (MFI) de MHCII, enquanto os LPMs mostraram a maior expressão de moléculas co-estimuladoras. A inoculação dos agonistas de TLR não induziu a uma modulação positiva na expressão de MHCII dos SPMs, sendo observada uma redução na expressão desse marcador após estímulo com LPS (Figura 9A). Já a subpopulação LPM, apesar de apresentar valores basais inferiores de MHCII, responderam de maneira mais eficiente aos estímulos, com um aumento de quase 2 vezes na expressão dessa molécula, após a estimulação com ambos os agonistas de TLR (Figura 9A).

Em contrapartida, uma intensa modulação na expressão de CD80 em ambas as populações de MΦ foi observada após a inoculação i.p. de FliCi e, em especial de LPS (Figura 9B). A FliCi e o LPS induziram a um aumento de três e sete vezes, respectivamente, na expressão de CD80 nos LPMs. Já nos SPMs, a expressão de CD80 foi aumentada em cerca duas e quatro vezes pela FliCi e pelo LPS, respectivamente. A modulação da expressão de CD86 nos subtipos de MΦ peritoneais foi um evento mais sutil do que o observado na expressão de CD80, sendo o efeito induzido pela FliCi e pelo LPS semelhante,

tanto nos LPMs quanto nos SPMs (Figura 9C). Diferente do observado na expressão de CD80, a expressão de CD40 nas populações LPM e SPM foi modulada mais intensamente pela FliCi do que pelo LPS. A expressão de CD40 foi aumentada, em cerca de 3 vezes após o estímulo *in vivo* com FliCi, nos LPMs e cerca de 30% nos SPMs. Apesar do LPS ter induzido uma modulação positiva na expressão de CD40 nos LPMs, os SPMs apresentaram uma modulação negativa, diminuindo pela metade a MFI desse marcador (Figura 9D).

De uma maneira geral, a análise da expressão de moléculas envolvidas com a apresentação de antígenos mostrou que os LPMs são mais responsivos aos agonistas de TLR.

Figura 9 – Avaliação do efeito dos agonistas de TLR4 e TLR5 na expressão de IA^b e de moléculas co-estimulatórias por LPM e SPM. Camundongos C57BL/6 foram inoculados i.p com LPS ou flagelina purificada de *Salmonella typhimurium* (FliCi) (1 μg/ animal) e a expressão de IA^b (A), CD80 (B), CD86 (C) e CD40 (D) foi avaliada nos subtipos de MΦ peritoneais LPM e SPM por citometria de fluxo 48 h mais tarde. As células foram captadas em um FacsCalibur e pelo menos 10^5 eventos foram adquiridos. LPM e SPM foram selecionados como descrito na figura 4. Os números apresentados nas figuras representam a média de intensidade de fluorescência (MFI) de cada um dos marcadores analisados. O controle negativo foi considerado o FMO de cada uma das marcações e está indicado na legenda juntamente com as células dos animais não tratados e inoculados com FliCi ou LPS. Os experimentos foram repetidos ao menos três vezes, mostrando o mesmo perfil de resultados. Os dados apresentados representam um experimento demonstrativo com n=3 para cada grupo.

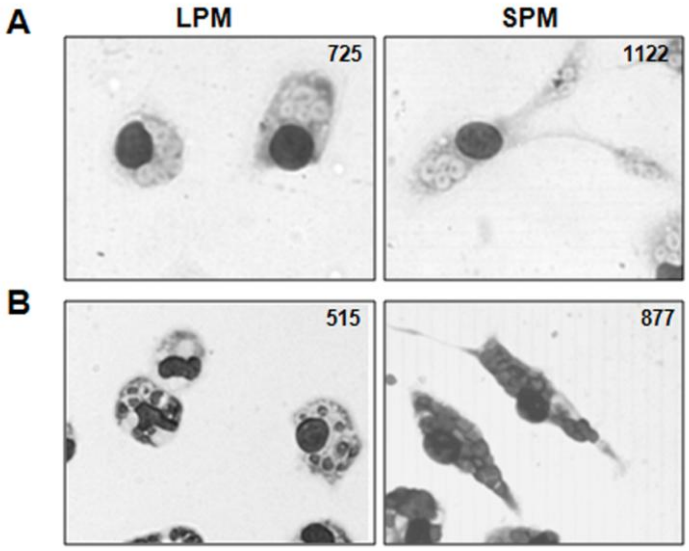


4.2.3 SPM apresenta maior capacidade fagocítica em relação à LPM

No intuíto de demonstrar a capacidade funcional dos subtipos de MΦ peritoneais, foi realizado um ensaio de fagocitose, utilizando-se partículas de zimosan ou eritrócitos opsonizados. Assim, as células peritoneais de camundongos não tratados foram coletadas, colocadas em lâminas de cultura para aderir e às células aderentes foram adicionados eritrócitos de carneiro opsonizados (IgG anti-sRBC produzida em coelho) ou partículas de zimosan (5:1). LPM e SPM foram distinguidas por sua morfologia em cultura, como descrito na Figura 5.

Ambas as populações de MΦs peritoneais foram capazes de fagocitar partículas de zimosan e eritrócitos opsonizados. Contudo, os SPMs de animais não tratados fagocitaram 3 vezes mais partículas zimosan (Figura 10A) ou hemácias opsonizadas (Figura 10B), em comparação com a população LPM, mostrando sua maior capacidade fagocítica. Além disso, a ingestão de eritrócitos opsonizados foi superior à ingestão de partículas de zimosan em ambas as populações de MΦs peritoneais provenientes de animais não tratados (Figura 10).

Figura 10 – Avaliação da capacidade fagocítica de SPM e LPM. Células peritoneais de animais C57BL/6 controles foram coletadas e colocadas em cultura para aderir por 4 h. Após esse período, as células aderentes foram removidas por lavagens e os eritrócitos opsonizados (5:1) (A) ou partículas de zimosan (5:1) (B) foram adicionados à cultura e mantidos por 90 min. Os eritrócitos e zimosan não fagocitados foram removidos por lavagens e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina, utilizando-se o kit *Instant-Prov*. As fotos representam um aumento de 100x em microscopia óptica e foram realizados com uma Câmera Sony (zoon 3.0). Os números representam o número de partículas ingeridas por 100 MΦs. Os dados mostrados são de um experimento representativo. Os experimentos foram repetidos por 3 vezes e apresentaram o mesmo perfil de resultados.

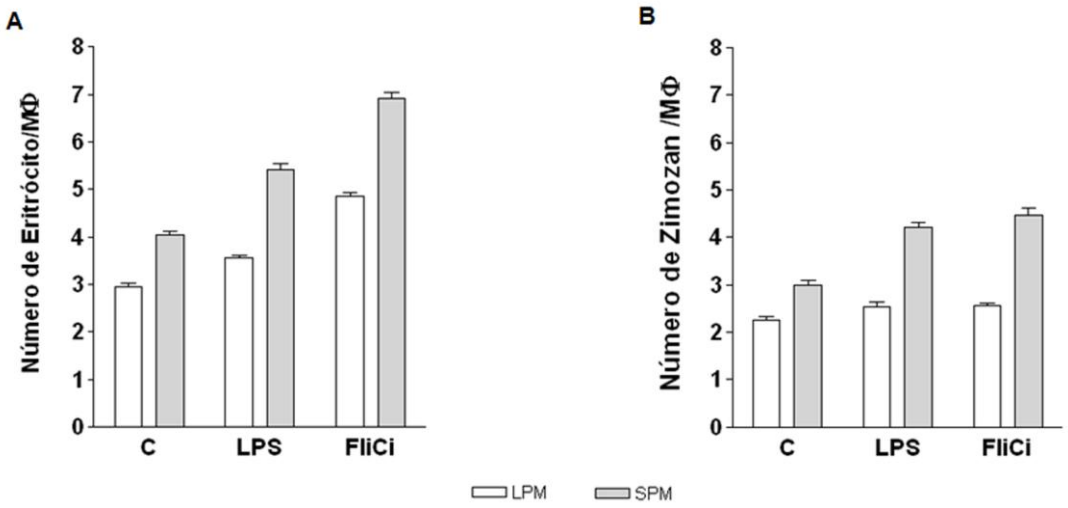


4.2.4 A capacidade fagocítica dos subtipos de MΦs peritoneais é modulada por FliCi e LPS

Para avaliar o efeito dos agonistas de TLR na modulação funcional dos subtipos de MΦs peritoneais, os animais foram estimulados *in vivo* com LPS e FliCi (1 ug/mL), e após 48 h as células peritoneais foram coletadas e colocadas para aderir. Essas células aderentes foram utilizadas em ensaios de fagocitose usando-se eritrócitos de carneiro opsonizados e partículas de zimosan, como descrito na figura 10. Houve um aumento de 50% e 75% no número de eritrócitos fagocitados por SPM de animais previamente inoculados

respectivamente com FliCi e LPS (Figura 11A). A fagocitose de eritrócitos pelos LPMs também foi modulada positivamente, porém, de maneira mais sutil. Em contrapartida, a ingestão de partículas de zimosan foi regulada pelos agonistas de TLR somente nos SPM (Figura 11B). Assim, esses dados demonstraram que o pré-estímulo com os agonistas de TLR foi capaz de modular a capacidade funcinonal das subpopulações de MΦs peritoneais.

Figura 11 – Avaliação do efeito dos agonistas de TLR na capacidade fagocítica de LPM e SPM. Células peritoneais de animais C57BL/6 controles ou tratados com LPS ou FliCi (1 μg/animal) foram coletadas após 48 h do estímulo e colocadas em cultura para aderir por 4 h. Após esse período, os eritrócitos opsonizados (5:1) ou partículas de zimosan (3:1) foram adicionados à cultura e mantidos por 90 min. para a realização do ensaio de fagocitose, como descrito na figura 10. Os gráficos de barra representam o número de eritrócitos (A) ou de partículas de zimosan (B) por MΦ. Os dados demonstram um experimento representativo. Os experimentos foram repetidos por 3 vezes e apresentaram o mesmo perfil de resultados.



4.2.5 LPM e SPM apresentam expressão basal de ambos marcadores M1 e M2

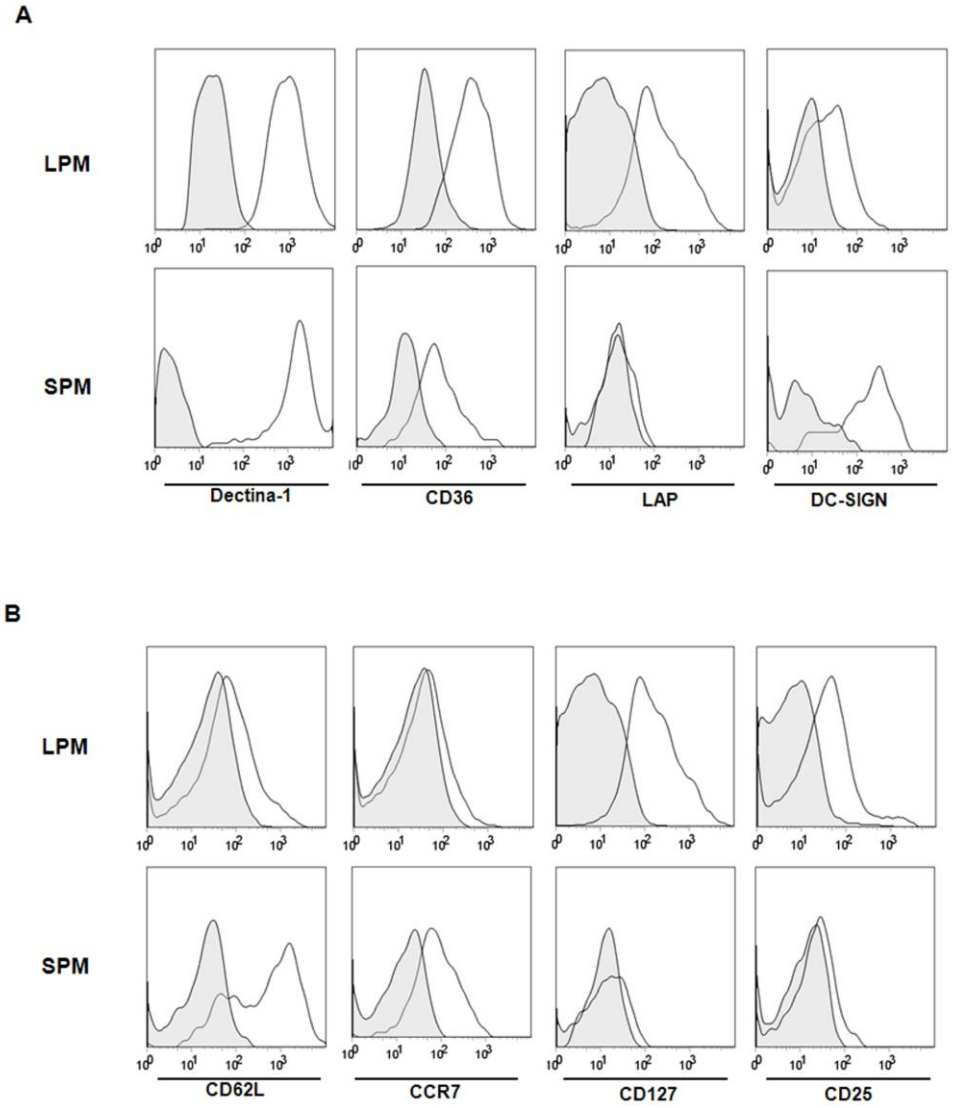
MΦs são classificados, de acordo com seu perfil de ativação, como MΦ M1 (ou clássicos) ou MΦ M2 (ou alternativos) (Gordon, 2003; Gordon e Taylor, 2005; Mantovani et al., 2005; Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2008; Mosser, 2003; Mosser e Edwards, 2008). Uma vez que LPM e SPM se apresentam como populações fenotipicamente distintas, decidimos avaliar o perfil de ativação basal dessas subpopulações de MΦs peritoneais. O primeiro passo foi verificar a expressão de proteínas frequentemente encontradas em MΦs M1 ou M2 (Martinez et al., 2006; Mosser, 2003; Noel et al., 2004; Taylor et al., 2005).

Em comparação com a SPM, a LPM apresentou os maiores níveis de alguns marcadores associados ao perfil alternativo ou M2, como CD36, um membro da família de receptores Scavengers, e do peptídeo associado à forma latente do TGF-β1 (LAP) (Figura 12A). Contudo, altos níveis de moléculas que caracterizam o perfil M1, como CD127 (IL-7R) e CD25 (IL-2Rα), também foram encontradas nos LPMs (Figura 12B). Entre marcadores M1, a LPM ainda mostrou a maior expressão das moléculas co-estímuladoras CD80, CD86 e CD40 (Figura 8).

Por outro lado, a maior expressão dos marcadores de ativação alternativa DC-SIGN (Dendritic Cell Specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin; CD209) e Dectina-1 (Figura 10A) foi observada nos SPMs, os quais também apresentaram a maior expressão de CD62-L (L-selectina), CCR7 (Figura 12B) e IA^b (Figura 8), marcadores de ativação

clássica. Dessa maneira, sob condições fisiológicas, os subtipos de MΦs peritoneais não apresentaram polarização para os perfis M1 ou M2 e, portanto, não puderam ser caracterizados pela expressão de marcadores fenotípicos.

Figura 12 – Análise da expressão de marcadores M1 e M2 nos subtipos de MΦs peritoneais. Células peritoneais de animais C57BL/6 controles foram coletadas e marcadas com anticorpos específicos para F4/80, CD19, CD11c e IA^b. As células foram captadas em um FacsCanto e pelo menos 10^5 eventos foram adquiridos. A análise dos dados foi realizada utilizando-se da estratégia de *gates* descrita na figura 4 e as células foram avaliadas quanto à expressão dos marcadores CD36, LAP, DC-SIGN, Dectina-1 (A), CD127, CD25, CD62L e CCR7 (B). O controle de cada uma das marcações, FMO, foi realizado como descrito em Materiais e Métodos e é representado pelo histograma cinza, enquanto a linha sem preenchimento mostra a expressão de cada um dos marcadores avaliados nas populações indicadas na figura. Os dados demonstram um experimento representativo, com n=3. Os experimentos foram repetidos 3 vezes, mostrando o mesmo perfil de resultados.



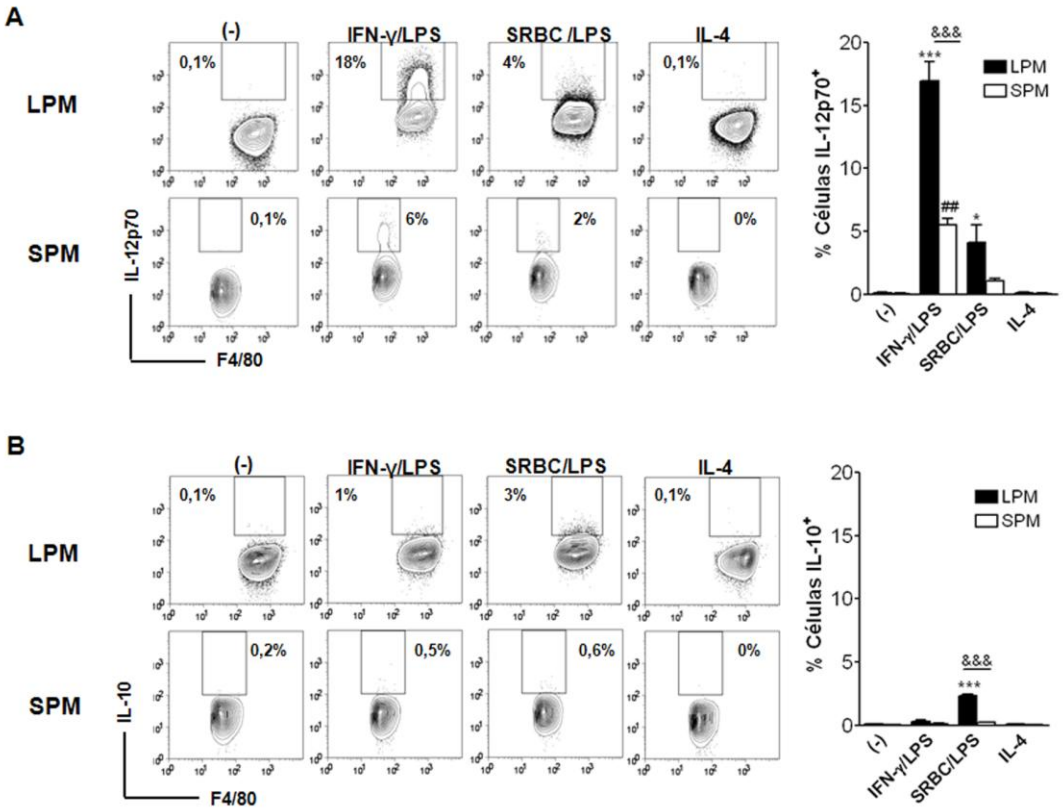
4.2.6 Ambos os subtipos de MΦs peritoneais se diferenciam *in vitro* para M1 e M2

Além da expressão de marcadores, o perfil de ativação dos MΦs também pode ser avaliado de acordo com seu perfil de produção de citocinas mediante estímulos recebidos (Edwards et al., 2006; Mosser e Edwards, 2008). MΦs M1 são ativados por uma via clássica (IFN-γ e LPS), a qual induz alta secreção da citocina pró-inflamatória IL-12. Já os MΦs M2 podem ser ativados por vias alternativas distintas, e por isso, são ainda classificados como MΦ M2 e MΦ regulador (Anderson e Mosser, 2002; Edwards et al., 2006; Mantovani et al., 2004; Mosser e Edwards, 2008). MΦs M2 são induzidos pelas citocinas do tipo Th2, IL-4 e IL-13, e caracterizados por baixa secreção de IL-10 ou IL-12, enquanto os MΦs reguladores são ativados por imunocomplexos (IC) e se tornam capazes de produzir altos níveis de IL-10 (Anderson e Mosser, 2002; Edwards et al., 2006; Mantovani et al., 2004; Mosser e Edwards, 2008). Para avaliar o perfil de ativação de SPM e LPM, células peritoneais de camundongos C57BL/6 foram estimuladas por 10h com rIFN-γ + LPS (condição M1 (Edwards et al., 2006; Gordon e Taylor, 2005; Mantovani et al., 2004; Mosser e Edwards, 2008)), rIL-4 (condição M2 (Edwards et al., 2006; Gordon, 2003; Mosser e Edwards, 2008; Stein et al., 1992)) ou eritrócitos opsonizados (SRBC) + LPS (condição regulador (Edwards et al., 2006; Mosser e Edwards, 2008)) para detecção de IL-12 e IL-10 intracelulares nas subpopulações.

Ambos os subtipos de MΦs peritoneais pareceram se diferenciar *in vitro* para o perfil M1 quando estimulados com rIFN-γ + LPS, uma vez que uma proporção significativa de células IL-12^{+} foi encontrada dentro de ambas as

populações de MΦs peritoneais (Figura 13A). Em adição, a LPM mostrou cerca de 3 vezes mais células produtoras de IL-12 do que a SPM, indicando uma resposta mais intensa frente ao estímulo (Figura 13A). O estímulo com rIL-4 não induziu a presença de SPM nem de LPM produtoras de IL-12 ou IL-10 (Figura 13A e 13B), o que realmente caracteriza o perfil de ativação M2 (Anderson e Mosser, 2002; Edwards et al., 2006; Mosser e Edwards, 2008). A condição reguladora, proporcionada pela presença de SRBC/LPS, induziu uma frequência significativa, ainda que baixa, de LPM IL-10^+ mas não de SPM IL-10^+ (Figura 13B). No entanto, a mesma frequência de LPM IL-12^+ foi encontrada nessas condições (Figura 13A), indicando que SRBC/LPS falhou em induzir a polarização de ambas às subpopulações para o perfil regulador. Esses dados indicam que, *in vitro*, as subpopulações de MΦs peritoneais respondem de maneira similar à diferenciação induzida por estímulos pró-M1 ou pró-M2.

Figura 13 – Diferenciação *in vitro* de SPM e LPM. Células peritoneais de animais C57BL/6 controles foram colocados em cultura com brefeldina por 10 h na presença ou não (-) dos estímulos LPS (1 μg/mL) + rIFN-γ (2,5 ng/mL) (pró-M1); rIL-4 (20 ng/mL) (pró-M2); e LPS (1 μg/mL) + eritrócitos opsonizados (SRBC) (4/MØ) (pró-regulador). As células foram, então, marcadas para CD19, CD11c, F4/80 e IA^b, fixadas e permeabilizadas para posterior marcação intracelular com anti-IL-12 e anti-IL-10. As células foram captadas em um FacsCanto e pelo menos 10^5 eventos foram adquiridos. SPM e LPM foram selecionadas como descrito na figura 4. Os valores no interior dos *plots* mostram a porcentagem de células produtoras de IL-12 (A) ou de IL-10 (B) dentro de cada subpopulação indicada na figura. Nos gráficos de barras, cada barra representa a média ± DP da porcentagem de células $IL12^+$ ou $IL\text{-}10^+$ dentro de cada subtipo de MΦ peritoneal. **p*<0,05 e *** *p*<0.001 quando comparado com LPMs não estimulados, ## p<0,01 quando comparado com SPM não estimulados e &&& p<0,001 quando os dois subtipos de MΦs peritoneais são comparados entre si. Os dados apresentados representam um experimento demonstrativo com n=3 para cada grupo.

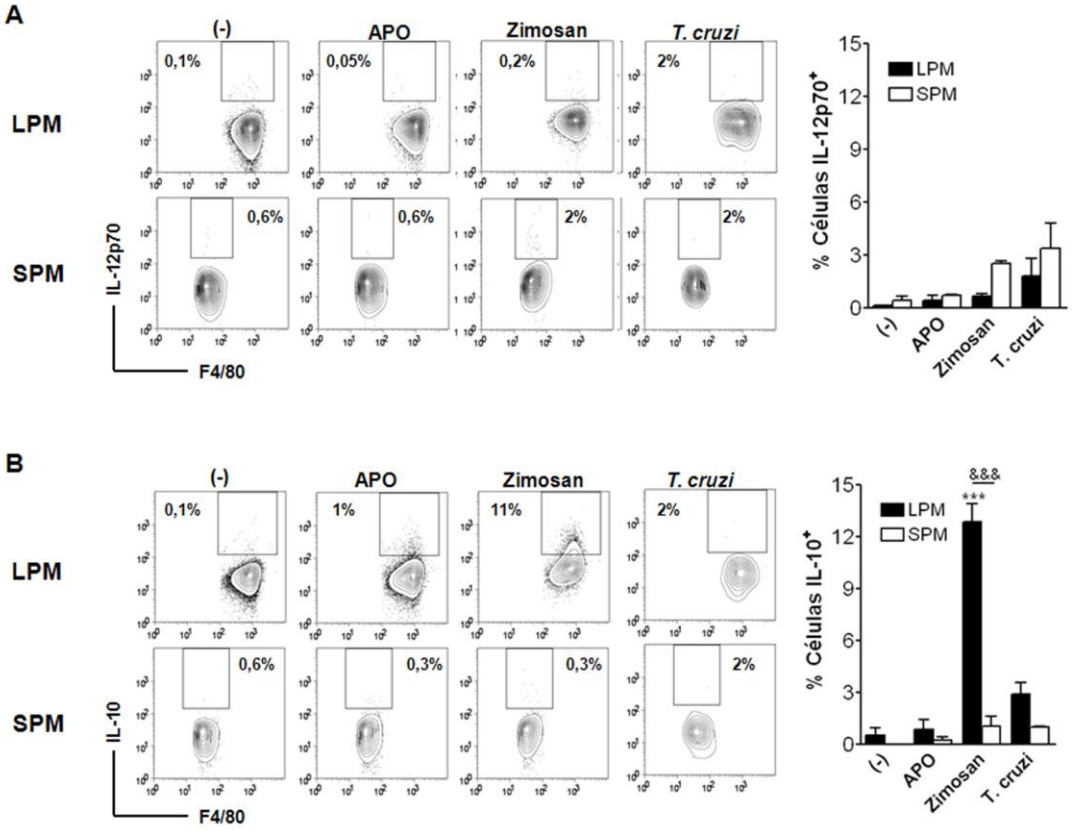


4.2.7 LPM se diferencia para o perfil M2 *in vivo*

A seguir, para avaliar o perfil de citocinas produzido *in vivo* por SPM e LPM, camundongos C57BL/6 foram inoculados i.p. com células apoptóticas (APO), zimosan ou tripomastigotas de *T. cruzi*. Após 30 min, a presença de LPM e SPM produtores de IL-12 ou IL-10 foi avaliada por citometria de fluxo.

O estímulo com células apoptóticas não foi eficaz para a indução de LPM ou SPM produtoras de IL-12 ou IL-10. A inoculação de tripomastigotas de *T. cruzi* induziu a mesma proporção de SPM e LPM produtoras de IL-12 e IL-10 (Figuras 14A e 14B). Já o estímulo com zimosan, induziu uma baixa frequência de SPM IL-12^{+} (Figuras 14A) e também um aumento significativo na proporção de LPM IL-10^{+} (Figuras 14B), mostrando que um mesmo estímulo pode induzir o desenvolvimento de perfis de ativação distintos nos subtipos de MΦ peritoneais.

Figura 14 – Diferenciação *in vivo* dos subtipos de MΦs peritoneais. As células peritoneais de animais C57BL/6 controles ou previamente tratados com células apoptóticas (APO) ($4x10^7$/animal), zimosan (1 mg/animal) ou tripomastigotas de *T. cruzi* (10^6/animal) foram colocados em cultura por 10 h na presença de brefeldina. As células foram, então, marcadas para CD19, CD11c, F4/80 e IA^b, fixadas e permeabilizadas para posterior marcação intracelular com anti-IL-12 e anti-IL-10. As células foram captadas em um FacsCanto e pelo menos 10^5 eventos foram adquiridos. SPM e LPM foram selecionadas como descrito na figura 4. Os valores no interior dos *plots* mostram a porcentagem de células produtoras de IL-12 (A) ou de IL-10 (B) dentro de cada subpopulação indicada na figura. Nos gráficos de barras, cada barra representa a média ± DP da porcentagem de células $IL12^+$ ou $IL-10^+$ dentro de cada subtipo de MΦ peritoneal. *p<0,05 e *** p<0.001 quando comparado com LPMs não estimulados, ## p<0,01 quando comparado com SPM não estimulados e &&& p<0,001 quando os dois subtipos de MΦs peritoneais são comparados entre si. Os dados apresentados representam um experimento demonstrativo com n=3 para cada grupo.



4.3 Dinâmica de LPM e SPM em peritônio elicitado

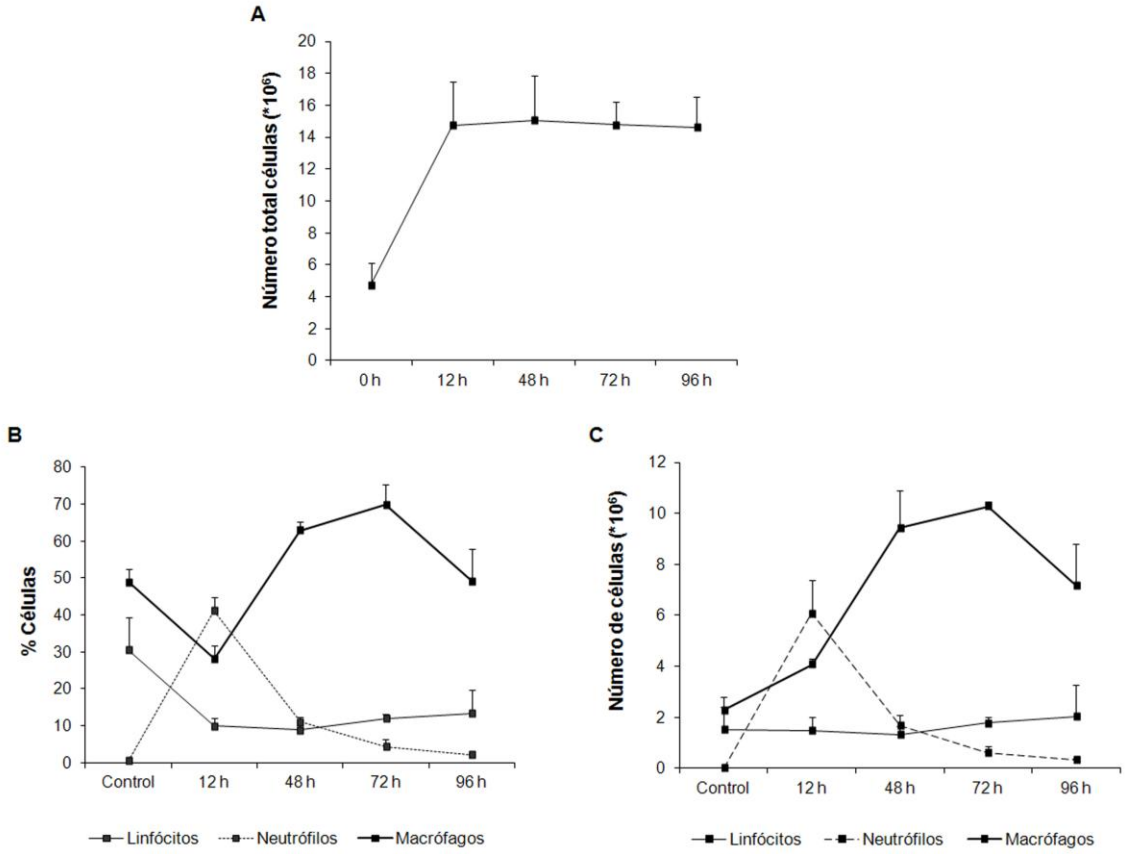
4.3.1 Amido induz um aumento de neutrófilos e MΦs no peritônio

Os MΦs elicitados têm sido amplamente utilizados por diversos grupos de pesquisa, uma vez que são facilmente enriquecidos e isolados da cavidade peritoneal. Contudo, os dados da literatura abordando as populações F4/80$^+$ que constituem os MΦs elicitados ainda são escassos. Em geral, as células peritoneais elicitadas são obtidas entre 4-5 dias após a inoculação do estímulo i.p., que, por sua vez, também pode variar. Neste estudo, o modelo utilizado para a obtenção de MΦs elicitados foi a injeção de 1% de amido. Para avaliação da dinâmica das subpopulações de MΦs peritoneais elicitadas, camundongos C57BL/6 foram inoculados via i.p. com 1 mL de amido (1%) e o lavado peritoneal foi removido 12, 48, 72 e 96 h mais tarde, quando as populações celulares foram identificadas por citometria de fluxo.

O número total de células da cavidade peritoneal aumentou mais de 2 vezes após 12 h do estímulo com amido, permanecendo constante até 96 horas (Figura 15A). As populações celulares presentes no peritônio nos diversos intervalos de tempos após a injeção de amido variaram de maneira bastante expressiva (Figuras 15B e 15C). No período de 12 h, houve uma queda significativa na frequência de MΦs e linfócitos, diminuindo aproximadamente 50% o número relativo de MΦs e 66% de linfócitos. Esse fenômeno foi conseqüência da entrada maciça de neutrófilos que passaram a representar quase 50% das células peritoneais. Após 48h do estímulo, a porcentagem de neutrófilos já se encontrava diminuída, porém, voltou aos

números basais apenas após 96h (Figuras 15B e 15C). O número de MΦs aumentou em torno de cinco vezes após 48 h da injeção de amido, se mantendo até o tempo de 72 h (Figura 15C). No período de 96 h, a frequência de MΦs começou a se igualar ao controle, enquanto a porcentagem de linfócitos ainda se encontrava diminuída, sendo que nesse ponto, os MΦs representaram 90% das células peritoneais (Figura 15B). A queda na porcentagem de MΦs e linfócitos no intervalo de tempo de 12 h não foi refletida no número absoluto dessas células, isso devido a um intenso aumento no número total de células. De fato, não houve um aumento de linfócitos em resposta a injeção de amido, visto que seu número permaneceu constante em todos os intervalos de tempo avaliados (Figura 15C). Esses dados mostraram que os neutrófilos são as primeiras células recrutadas em resposta a estimulação com amido e, em seguida, as células que compõem a população majoritária da cavidade peritoneal são os MΦs.

Figura 15 – Avaliação da composição das células peritoneais após inoculação com amido. Camundongos C57BL/6 foram inoculados i.p. com 1 mL de amido (1%) e após 12, 48, 72 e 96 h, as células presentes no compartimento peritoneal foram coletadas e quantificadas em um hemocitômetro. O número total de células presente no peritônio após cada intervalo de tempo do estímulo com amido está representado no gráfico (A). As células peritoneais foram marcadas com anticorpos específicos para CD4, CD8, CD19 (linfócitos) GR1 (neutrófilos) e F4/80 (MΦs) para análise dos diferentes tipos celulares que migram para a cavidade peritoneal após estimulação. A porcentagem (B) e o número absoluto (C) de cada tipo celular estão apresentados nos gráficos. Cada barra representa a média ± DP da porcentagem ou do número absoluto de cada tipo celular. Dados de um experimento representativo com n=3. Os experimentos foram repetidos 3 vezes, mostrando o mesmo perfil de resultados.



4.3.2 A composição de MΦs peritoneais é alterada após inoculação de amido.

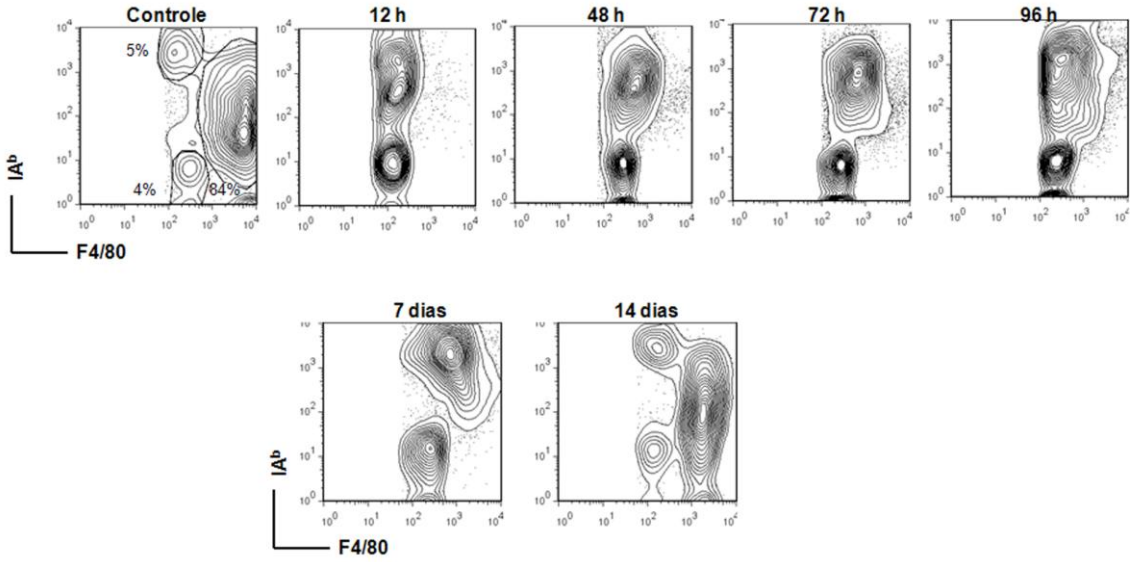
Uma mudança precoce no perfil na composição dos MΦs peritoneais foi induzida a partir do estímulo com amido (Figura 16). A diminuição na frequência de MΦs após 12 h foi um reflexo do desaparecimento dos LPMs, os

quais só voltaram a aparecer no peritônio após 96 h, ainda que em quantidades diminuídas, alcançando níveis semelhantes aos encontrados nos animais controles após 14 dias da inoculação de amido (Figura 16).

Concomitantemente ao desaparecimento dos LPMs, após 12 h do estímulo i.p. com amido, houve um intenso aumento da população SPM e dos granulócitos, os quais passaram a representar respectivamente 20% e 40% das células $F4/80^{+}$ do peritónio (Figura 16). Além disso, foi verificado a presença de uma população com fenótipo $F4/80^{low}IA^{b\text{-}int}$ que não se encontrava nos animais controles. No período de 48 h, a população $F4/80^{low}IA^{b\text{-}int}$, juntamente com os granulócitos se tornaram as populações majoritárias do compartimento peritoneal. As células com fenótipo $F4/80^{low}IA^{b\text{-}int}$ apresentavam elevada expressão de Ly6C, sugerindo que eram monócitos inflamatórios (dados não mostrados). Apesar do perfil das células $F4/80^{+}$ da cavidade peritoneal observado após 48 h ter sido mantido até o período de 7 dias, parece que a população $F4/80^{low}IA^{b\text{-}int}$ adquiriu expressão de MHCII ao longo do tempo, sendo que após 7 dias essas células apresentaram níveis de MHCII semelhantes ao encontrado nos SPMs (Figura 16).

Esses resultados mostram que os MΦs elicitados são populações celulares distintas dos MΦs residentes, sendo constituídos basicamente por SPM e monócitos.

Figura 16 – Análise das células F4/80 elicitadas. Camundongos C57BL/6 foram inoculados i.p. com 1 mL de amido (1%) e após 12, 48, 72, 96 h, 7 e 14 dias as células presentes no compartimento peritoneal foram coletadas e marcadas com anticorpos específicos para F4/80, CD19, CD11c e MHCII para posterior leitura em um FacsCalibur. A estratégia de *gates* utilizada para a distinção dos subtipos de MΦs peritoneais foi a mesma descrita na figura 4. Dados de um experimento representativo com n=3. Os experimentos foram repetidos 3 vezes, mostrando o mesmo perfil de resultados.



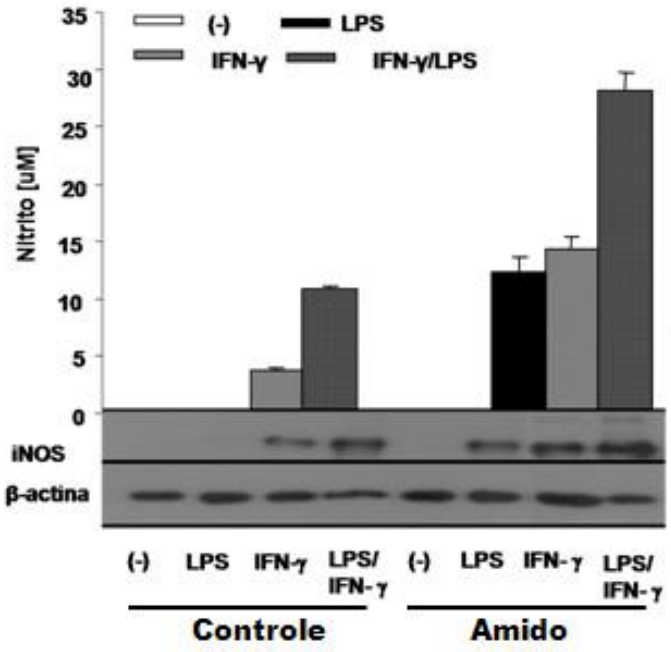
4.3.3 MΦs elicitados são potentes produtores de NO

Como os MΦs elicitados são distintos dos MΦs residentes no compartimento peritoneal, foi avaliado a produção de NO e a expressão de iNOS por células aderentes de animais C57BL/6 não tratados e tratados com amido. Para isso, os animais foram inoculados i.p. com amido (1%) e 48 h mais tarde as células peritoneais foram coletadas e colocadas para aderir por 4 h. Posteriormente, as células aderentes provenientes de animais controles ou inoculados com amido foram removidas, quantificadas e plaqueadas novamente (2,5 x 10^5 céls/poço) na presença ou não dos estímulos com LPS (1 ug/mL), rIFN-γ (2,5 ng/mL) ou LPS + rIFN-γ. Após 48 h, o sobrenadante das culturas foi removido para determinação da concentração de NO e as proteínas

das células aderentes foram extraídas para avaliação da expressão de iNOS por *Western Blotting*. Como esperado, as células aderentes de animais tratados e não tratados não foram capazes de produzir NO, nem expressar iNOS na ausência de estímulos (Figura 17). Ainda, somente as células aderentes elicitadas foram capazes de ativar iNOS e produzir NO em resposta ao LPS. As células dos animais não tratados responderam somente à estimulação com LPS+IFN-γ, ainda que apenas com cerca de 10 uM de nitrito. Em contrapartida, quando estimuladas com LPS ou rIFN-γ, as células aderentes elicitadas produziram cerca de 15 uM de nitrito, enquanto o estímulo com LPS+rIFN-γ induziu os maiores níveis de NO nas culturas, mostrando que essas células são responsivas a todos os estímulos proporcionados (Figura 17).

A expressão de iNOS pelas células aderentes mostrou o mesmo perfil observado na produção de NO. As células aderentes de animais controles ou inoculados com amido não apresentaram expressão de iNOS, assim como as células de animais controles estimuladas *in vitro* com LPS. Apenas na presença de rIFN-γ (com ou sem LPS) foi observada ativação da iNOS por células aderentes não elicitadas, ainda que em níveis três vezes inferiores aos observados com células elicitadas. Esses dados mostram claramente que as células aderentes provenientes dos animais tratados com amido são mais potentes para a produção de NO do que as células dos animais controles.

Figura 17 – Produção de NO e expressão de iNOS por células aderentes elicitadas com com amido. Camundongos C57BL/6 foram inoculados i.p. com 1 mL de amido (1%) e após 48 h as células presentes no compartimento peritoneal foram coletadas e colocadas em cultura para aderir por 4 h. As células não aderentes foram removidas por lavagens e as células aderentes foram removidas com *accutase*, contadas e replaqueadas em placas de 96 poços ($2,5x10^5$). Essas células foram estimuladas *in vitro* com apenas meio de cultura (-), LPS (1 µg/mL), IFN-γ (2,5 ng/mL) ou LPS + IFN-γ. Após 48 h da estimulação *in vitro*, o sobrenadante foi coletado para análise da produção de NO pelo método de Griess, e as células foram lisadas para avaliação da expressão de iNOS e β-actina por *Western Blotting*. Cada barra representa média ± DP com n=3. Os experimentos foram repetidos 3 vezes, mostrando o mesmo perfil de resultados.



4.4 Dinâmica dos subtipos de MΦ peritoneais frente a estímulos infamatórios

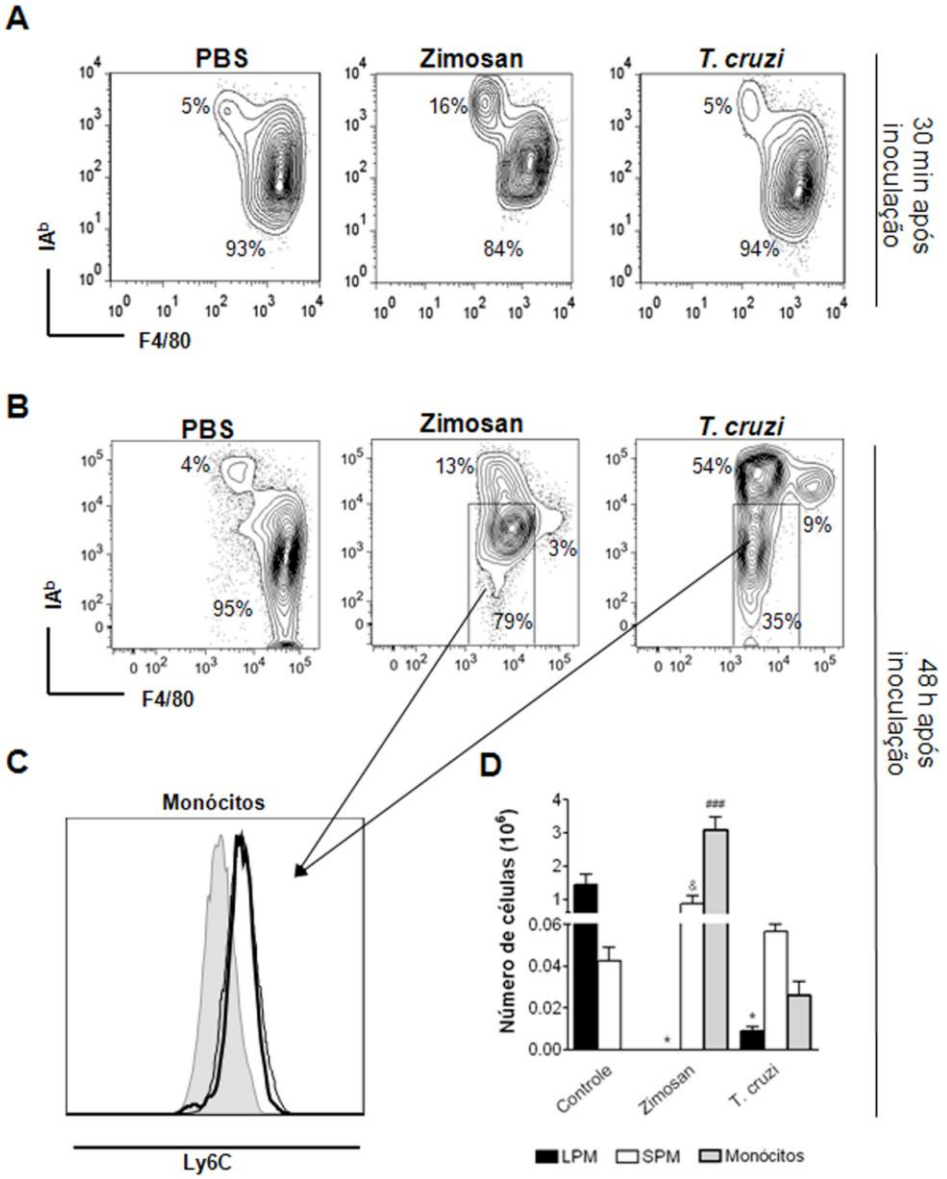
4.4.1 Estimulação com zimosan e *T. cruzi* modifica o balanço entre SPM e LPM

De fato, a cavidade peritoneal é um compartimento dinâmico que tem sua composição alterada em resposta a diferentes estímulos, como exemplificado anteriormente com amido. Para avaliar a dinâmica das subpopulações de MΦs peritoneais em resposta a estímulos infecciosos, animais C57BL/6 foram inoculados i.p. com zimosan ou *T. cruzi* e após 30 minutos ou 48 h, as células peritoneais foram coletadas para avaliação por citometria de fluxo. No período de 30 min após a inoculação de *T. cruzi* nenhuma alteração significativa na proporção de SPM e LPM foi verificada. Porém, neste período foi possível observar o efeito do zimosan, o qual induziu um aumento de 3 vezes na frequência de SPM acompanhado por uma diminuição na proporção de LPM (Figura 18A). Em contrapartida, após 48 h da inoculação i.p. com zimosan ou *T. cruzi* houve uma forte alteração na composição celular do compartimento peritoneal. Ambos os estímulos induziram uma diminuição na proporção (Figura 18B) e no número absoluto (Figura 18D) de LPM, sendo que o efeito do zimosan foi mais intenso do que o efeito induzido pelo *T. cruzi* (Figura 18B). Além disso, a redução de LPM foi acompanhada por um aumento no número relativo e absoluto de SPM após o estímulo com zimosan (Figuras 18B e 16C). Após estímulo com *T. cruzi,* a SPM se tornou a população majoritária dos MΦs peritoneais (Figura 16B).

Juntamente com o aumento de SPM e o desaparecimento de LPM, houve um intenso influxo de uma população com fenótipo F4/80^{low}IA^{b-int}Ly6C^{hihg}, após ambos os estímulos, em especial após a inoculação de zimosan, quando essas células se tornaram a população majoritária (Figuras 18B, 18C e 18D). Como monócitos e SPM apresentam o mesmo nível de expressão de F4/80, a distinção entre esses dois subtipos celulares foi realizada pela expressão de MHCII e Ly6C, já que a SPM apresenta alta expressão de MHCII e a expressão de Ly6C foi encontrada somente nos monócitos (Figura 16C).

Assim, nossos dados mostram que as alterações na composição celular do peritônio induzidas pela inoculação i.p. de zimosan e *T. cruzi* são distintas, ainda que a proporção de SPM se sobreponha à frequência de LPM em ambos os casos. Isso devido aos monócitos terem se tornado a população majoritária 48 h após estímulo com zimosan, enquanto as SPM foram as células dominantes em resposta ao *T. cruzi* após esse mesmo período.

Figura 18 – Avaliação de LPM e SPM após inoculação de zimosan e *T. cruzi*. Animais C57BL/6 foram inoculados via i.p. com zimosan (1 mg/animal) ou *T. cruzi* (10^6 parasitas/ animal) e 30 min (A) ou 48 h (B) após a estimulação i.p., as células peritoneais foram coletadas por lavagem peritoneal com PBS e marcadas com anticorpos para CD19, CD11c, F4/80 e IA^b. As células foram captadas em um FacsCanto e pelo menos 10^5 eventos foram adquiridos. LPM e SPM foram selecionadas como descrito na figura 4 e analisadas quanto à co-expressão de F4/80 e MHCII. Os números no interior dos *plots* representam a porcentagem de cada uma das subpopulações dentro das células $F4/80^+$. Após 48 h da estimulação i.p., a expressão de Ly6C foi avaliada na população indicada na figura. No histograma a linha cinza mostra o FMO, enquanto as linhas pretas são representadas pelas células dos animais inoculados com zimosan (negrito) e com *T. cruzi* (normal) (C). O número total de cada subtipo de MΦ peritoneal e dos monócitos após inoculação de zimosan ou *T. cruzi* está mostrado no gráfico de barras. * $p < 0,05$ em relação a LPM dos animais controles, & $p < 0,05$ em relação a SPM dos animais controles e ### $p < 0,001$ em relação aos monócitos dos animais controles (D). Os dados apresentados representam um experimento demonstrativo com n=3 para cada grupo. Os experimentos foram repetidos ao menos três vezes mostrando o mesmo perfil de resultados.



4.4.2 As modificações no compartimento peritoneal após estimulação resultam em uma renovação celular

É extensivamente descrito que células senescentes podem se acumular nos tecidos e comprometer sua funcionalidade (Herrero et al., 2002; Kovacs et al., 2009; Lloberas e Celada, 2002; Plackett et al., 2004; Plowden et al., 2004; Swift et al., 2001). Como a inoculação de estímulos inflamatórios modificou intensamente a composição dos MΦ peritoneais, decidimos avaliar o impacto dessa alteração na senescência celular pela verificação da marcação de β-Galactosaminidase (β-Gal), a qual é um marcador molecular específico para senescência (Dimri et al., 1995).

A grande maioria das células aderentes de animais controles mostrou marcação positiva para β-Gal (Figura 19). Em contrapartida, um reduzido número de células aderentes do peritônio de animais estimulados com zimosan ou *T. cruzi* apresentou marcação para essa enzima (Figura 19). Como dito anteriormente, a população majoritária da cavidade peritoneal dos animais controles é composta de LPM, correlacionando, dessa maneira, com a presença de um grande número de células senescentes. Esses dados sugerem que grande parte dos LPMs presentes no peritônio de animais controles são células senescentes. Em contrapartida, a entrada de monócitos e SPMs nos peritônios estimulados se correlaciona com uma renovação celular observada nessa cavidade.

Figura 19 – Análise da marcação para β-Gal em células peritoneais aderentes de animais inoculados com zimosan ou *T. cruzi*. Animais C57BL/6 foram inoculados via i.p. com zimosan (1 mg/animal) ou *T. cruzi* (10^6 parasitas/ animal) e, 48 h mais tarde, 10^6 células peritoneais foram coletadas e colocadas para aderir por 4 h em lâminas de cultura de 8 poços. Após esse período, as células não aderentes foram removidas e as células aderentes foram fixadas e marcadas com β-Gal, como descrito em Materiais e Métodos. As fotos foram realizados utilizando um aumento de 40x em microscopia óptica e captados com uma câmera Sony (zoon 3.0). Os dados apresentados representam um experimento demonstrativo com n=3 para cada grupo.

4.4.3 Renovação peritoneal após estimulação é acompanhada pela presença de NO e IL-12 em resposta a estimulação subsequente com LPS

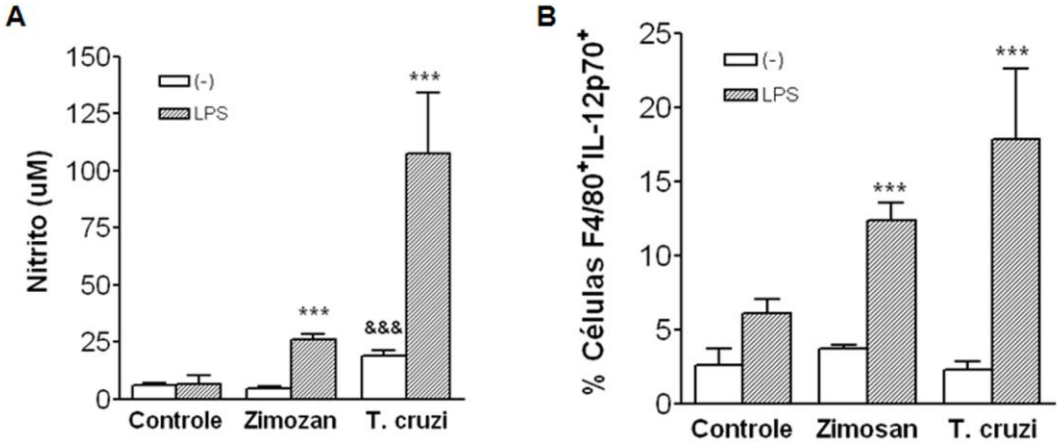
O próximo passo foi avaliar se a renovação celular que ocorre na cavidade peritoneal após estimulação com zimosan e *T. cruzi* foi acompanhada por uma modificação funcional. Para isso, foi verificada a produção de NO por células aderentes do peritônio de animais tratados ou não com zimosan ou *T. cruzi* e reestimuladas *in vitro* com LPS. A produção de NO foi avaliada utilizando as células aderentes da cavidade peritoneal de animais não tratados, representadas por basicamente LPM, e de animais tratados com zimosan ou *T. cruzi*, as quais compreendem SPM e monócitos. Apenas as células aderentes do peritônio de animais inoculados com *T. cruzi* foram capazes de secretar NO na ausência de LPS (Figura 20A). A estimulação *in vitro* com LPS não foi capaz de induzir a produção de NO por células aderentes de animais não tratados

(Figura 20A). Contudo, quando as células peritoneais aderentes dos animais estimulados *in vivo* com zimosan foram re-estimuladas *in vitro* com LPS houve secreção de altos níveis de NO, especialmente nas células aderentes dos animais inoculados com *T. cruzi* (Figura 20A).

Uma vez que a IL-12 é uma citocina importante para a indução da produção de NO em resposta ao LPS e IFN-γ (Bastos et al., 2002; Bastos et al., 2007; Bastos et al., 2004; Bogdan e Schleicher, 2006; Frucht et al., 2001) e as células de animais tratados mostraram altos níveis dessa molécula microbicida após re-estímulo com LPS, foi avaliada a presença de células IL-12$^+$ dentro da população F4/80$^+$ da cavidade peritoneal dos animais inoculados ou não. Somente o estímulo *in vivo* com zimosan ou *T. cruzi* não foi suficiente para promover a presença de células F4/80$^+$IL-12$^+$ (Figura 20B). Contudo, as células F4/80$^+$ dos animais tratados também se mostraram sensíveis a estimulação *in vitro* com LPS, já que esse estímulo induziu um aumento de 2-3 vezes no número de células F4/80$^+$ produtoras de IL-12 quando comparado com as células dos animais controles que também foram re-estimuladas (Figura 20B).

Esses dados indicam que a estimulação peritoneal com zimosan ou *T. cruzi* induz uma renovação celular acompanhada por um ganho funcional evidenciado pela produção de NO e pela presença de células IL-12$^+$.

Figura 20 – Avaliação funcional de células peritoneais aderentes de animais inoculados com zimosan ou *T. cruzi*. Animais C57BL/6 foram inoculados via i.p. com zimosan (1 mg/animal) ou *T. cruzi* (10^6 parasitas/animal) e, 48 h mais tarde, as células peritoneais foram coletadas e colocadas para aderir por 4 h em placas de 96 poços. Após esse período, as células não aderentes foram removidas e estímulo com LPS (1 ug/mL) foi adicionado ou não (-) na cultura. O sobrenadante foi coletado após 48h para dosagem de NO pelo método de Griess, como descrito em Materiais e Métodos. Barras representam a media ± DP de triplicatas. ***$p < 0.001$ em relação ao grupo não estimulado e &&& $p < 0.001$ quando comparado com o grupo dos animais não tratados *in vivo* e não estimulados *in vitro* (A). A porcentagem de células $F4/80^+IL\text{-}12^+$ foi avaliada nas células peritoneais de animais inoculados com zimosan ou *T. cruzi*. As células foram mantidas por 10 h em cultura na presença ou não de LPS (1 μg/mL) e brefeldina. Após esse período, foram marcadas para CD19, CD11c, F4/80 e IA^b, fixadas e permeabilizadas para posterior marcação intracelular com anti-IL-12. O gráfico de barras mostra a porcentagem de células produtoras de IL-12 dentro de células $F4/80^+$, selecionada como descrito na figura 6B. *** p<0,001 em relação as células dos animais controles que foram estimuladas *in vitro* com LPS (B). Os dados apresentados representam um experimento demonstrativo com n=3 para cada grupo.



4.4.4 SPM são as principais células peritoneais produtoras de IL-12 após estimulação

O próximo passo foi avaliar a contribuição de cada subtipo celular, LPM, SPM e monócitos para a ativação da cavidade peritoneal após um estímulo i.p. com zimosan ou *T. cruzi*. No período inicial após a estimulação com zimosan, quando LPM e SPM ainda compõem as populações $F4/80^+$

dominantes do peritônio, a avaliação da capacidade fagocítica revelou que a SPM apresenta maior ingestão de partículas de zimosan em comparação com LPM (Figura 21A).

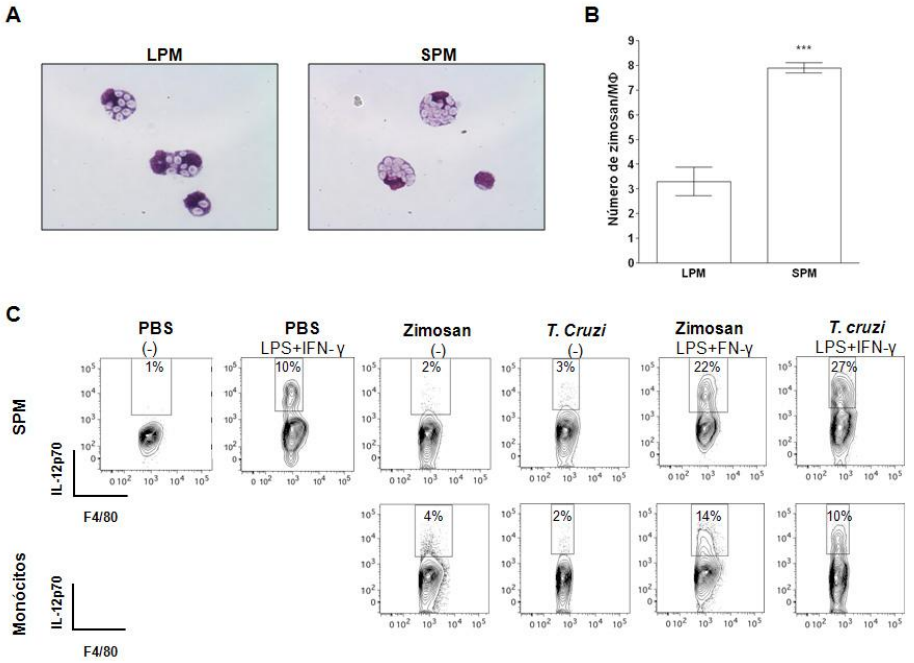
Como as células F4/80$^+$ do compartimento peritoneal de animais tratados com zimosan ou *T. cruzi* são basicamente SPM e monócitos, a figura 21B mostra a porcentagem de células IL-12$^+$ apenas dentro dessas duas populações celulares. Animais controles não apresentam monócitos inflamatórios no compartimento peritoneal e, por esse motivo, a figura correspondente a porcentagem de células IL-12$^+$ dentro do *gate* de monócitos não está representada na figura 21B. A porcentagem de SPM produtora de IL-12 após a estimulação *in vivo* com zimosan ou *T. cruzi* foi similar à freqüência de SPM IL-12$^+$ presente nos animais tratados com PBS (Figura 21B). Quando as células aderentes dos animais tratados com PBS foram estimuladas *in vitro* com LPS + IFN-γ houve um aumento significativo na porcentagem de SPM produtora de IL-12. Contudo, as maiores porcentagens de SPM IL-12$^+$ foram encontradas quando as células peritoneais de animais tratados *in vivo* com zimosan ou *T. cruzi* foram subseqüentemente estimuladas *in vitro* com LPS + IFN-γ. Esse re-estímulo induziu um aumento de, respectivamente, 2 e 3 vezes a freqüência de SPM produtora de IL-12 em relação às células dos animais controles que foram submetidas ao mesmo estimulo *in vitro* (Figura 21B).

De maneira importante, a indução de IL-12 promovida pelo LPS + IFN-γ foi no mínimo 2 vezes mais intensa nos SPMs do que nos monócitos (Figura 21B). A relevância desses dados está no fato de que os monócitos, juntamente com a SPM, são as populações majoritárias do compartimento peritoneal após

estimulação *in vivo* (Figura 21B) e, portanto, neste modelo a SPM parece ser o subtipo celular mais potente para a produção de IL-12.

Dessa maneira, esses dados em conjunto mostraram que após um estímulo i.p. o peritônio sofre uma renovação celular acompanhada por um ganho na capacidade funcional às custas principalmente de SPM.

Figura 21 **–** Avaliação funcional **de** SPM, LPM e monócitos após estímulos infecciosos. Animais C57BL/6 foram inoculados via i.p. com zimosan (1 mg/animal) ou *T. cruzi* (10^6 parasitas/animal) e, 30 min ou 48 h após, as células peritoneais foram coletadas. Os subtipos de MΦs peritoneais foram isolados por *Sorting* (FacsAria II) 30 min após a injeção de zimosan. Com 10^5 células de cada subpopulação previamente isoladas foi realizado uma CitoSpin para a confecção de lâminas, as quais foram coradas com o Kit *Instant Prov* para posterior observação microscópica (40x) (A). O gráfico de barras mostra a média ± DP do número de partículas internalizadas em cada subtipo de MΦ peritoneal. *** $p < 0.001$ quando comparado com o grupo dos LPMs (B). As células peritoneais de animais controles ou inoculados com zimosan 48 h antes foram colocados em cultura por 10 h na presença ou não (-) de LPS (1 μg/mL) + rIFN-γ (2,5 ng/mL) com brefeldina. Após esse período, foram marcadas para CD19, CD11c, F4/80 e IA^b, fixadas e permeabilizadas para posterior marcação intracelular com anti-IL-12. As células foram captadas em um FacsCanto e pelo menos 10^5 eventos foram adquiridos. Na análise dos dados, as células foram selecionadas em *gates* como descrito nas Figuras 4 (SPM e LPM) e Figura 19 (monócitos). Os títulos sobre os *plots* representam as estimulações realizadas *in vivo* e *in vitro*. Os valores no interior dos *plots* mostram a porcentagem de células produtoras de IL-12 dentro de cada subpopulação indicada na figura (C). Os dados apresentados representam um experimento demonstrativo com n=3 para cada grupo.



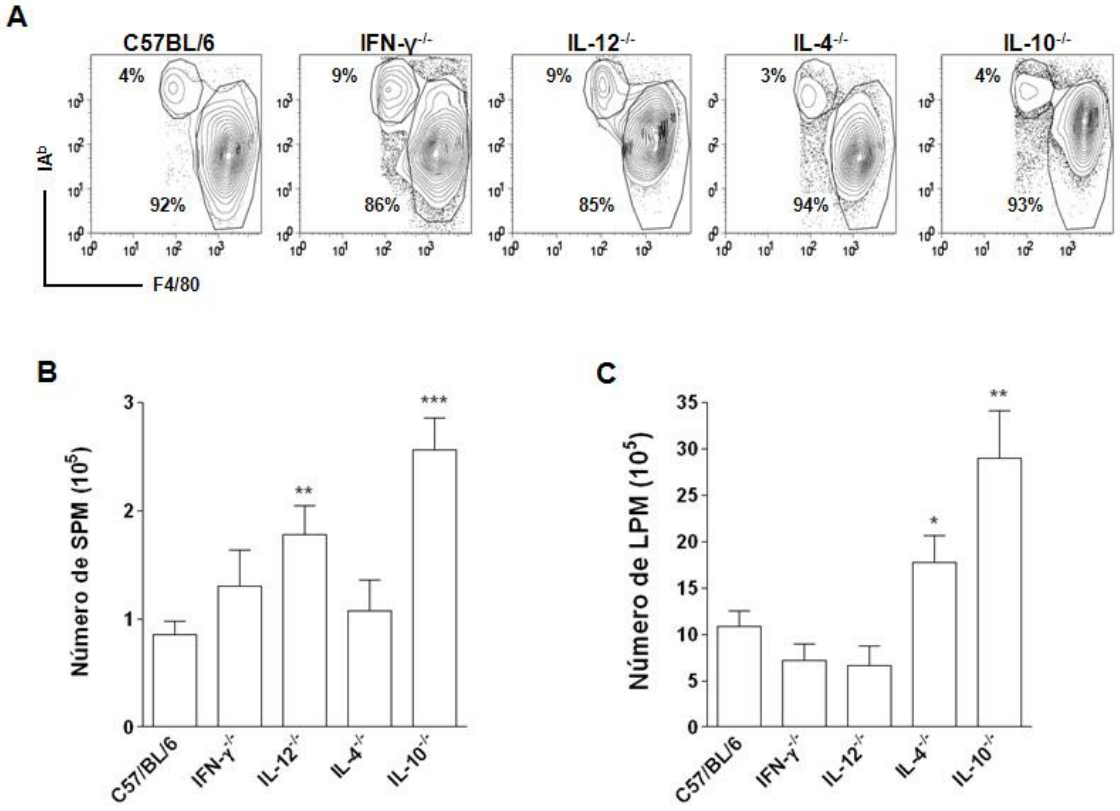
4.4.5 Ambiente pró-M2, como em animais IL-12$^{-/-}$, favorece o acúmulo de SPM

Nosso grupo demonstrou a participação central da IL-12 na regulação do perfil basal de ativação dos MΦ (Bastos et al., 2002). Os MΦs elicitados com amido de animais IL-12$^{-/-}$ apresentam uma baixa produção de NO quando estímulados *in vitro*, mostrando o perfil de ativação M2 observado em linhagens de camundongos pró-Th2, previamente classificados por Mills e colaboradores (Mills et al., 2000). Como os subtipos de MΦ peritoneais apresentam um distinto perfil de ativação *in vivo*, nós decidimos avaliar o papel de citocinas pró-M1 ou pró-M2 na manutenção do *pool* de cada um dos subtipos de MΦs peritoneais.

Nossos dados mostraram que um microambiente M2, como o encontrado em animais deficientes em IL-12 e IFN-γ, promove o melhor desenvolvimento de SPM, uma vez que a cavidade peritoneal desses animais apresentou o dobro de SPM do que os animais selvagens (C57BL/6) (Figura 22A e 22C). Esse perfil é observado tanto na porcentagem, quanto no número absoluto desse subtipo de MΦ (Figura 22C). Por outro lado, a deficiência de IL-10 ou IL-4 não parecem interferir na porcentagem das subpopulações de MΦs peritoneais. Porém, o número absoluto de LPM é significativamente mais elevado nesses animais quando comparado com os animais selvagens, em particular naqueles deficientes de IL-10 (Figura 22C). O aumento no número de LPM em animais IL-10$^{-/-}$ é acompanhado por um aumento de SPM e assim, o aumento no número de ambos os subtipos de MΦ peritoneais pode ser uma consequência do elevado número total de células.

Assim, nossos dados mostram que um ambiente pró-M2 favorece o acúmulo de SPM, uma célula com um perfil de ativação pró-M1 frente à estímulos infecciosos.

Figura 22 – Subtipos de MΦs peritoneais em animais pró-M1 e pró-M2. As células peritoneais de animais C57BL/6, IL-12$^{-/-}$, IFN-γ$^{-/-}$, IL-10$^{-/-}$ e IL-4$^{-/-}$ controles foram coletadas por lavagem peritoneal e marcadas com anticorpos para CD19, CD11c, F4/80 e IA^{b}, como descrito em Materiais e Métodos. As células foram captadas em um FacsCanto e pelo menos 10^5 eventos foram adquiridos. Na análise dos dados, as células foram selecionadas em *gates* como descrito na figura 4 e através da expressão de F4/80 e MHCII os subtipos de MΦs SPM e LPM foram selecionados. Os valores no interior dos plots mostram a porcentagem de SPM ou LPM (A). Os dados da citometria de fluxo foram utilizados para obtenção do número de cada subtipo de MΦ peritoneal, onde cada barra representa a média ± DP do número de SPM (B) e LPM (C). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ quando comparado com os animais C57Bl/6. Os dados apresentados representam um experimento demonstrativo com n=3 para cada grupo.



DISCUSSÃO

Os MΦs, células residentes em diferentes tecidos do organismo, são considerados sentinelas imunológicas, uma vez que discriminam o próprio do não próprio por meio de receptores PRR, codificados na linhagem germinativa. A partir do reconhecimento de PAMPs, uma série de cascatas intracelulares podem ser ativadas, culminando na ativação de genes envolvidos na produção de moléculas microbicidas, indução da resposta inflamatória e início e condução da resposta imune adaptativa. Ainda, a essas células é atribuída a capacidade de regulação do processo inflamatório seguido pela restauração da homeostase tecidual (Leibovich e Ross, 1975). Funções tão diversas desempenhadas por uma população tão heterogênea, suscita a pergunta se os MΦs são, de fato tão plásticos ou se as suas diferentes subpopulações se tornam especializadas. É conhecido o fato das diversas populações de MΦs residentes em diferentes tecidos desempenharem algumas funções comuns e outras funções especializadas, agindo de acordo com estímulos recebidos nesses tecidos. Porém, como fica essa questão no caso de populações heterogêneas que residem no mesmo microambiente?

O presente trabalho mostra que o compartimento peritoneal é constituído por populações heterogêneas de MΦs, as quais foram nomeadas como LPM (*Large Peritoneal Macrophage*) e SPM (*Small Peritoneal Macrophage*) tomando por base seu tamanho [ANEXO I (Ghosn et al., 2010)]. Ao longo das últimas décadas, inúmeras descobertas sobre a biologia dos fagócitos foram realizadas utilizando os MΦs residentes na cavidade peritoneal, por serem abundantes e facilmente isolados. No entanto, o desenvolvimento de técnicas experimentais utilizadas para a fenotipagem mais detalhada de populações celulares, nos permitiu entender a enorme diversidade das células

que residem na cavidade peritoneal. Além de MΦs e linfócitos B-1, que são populações majoritárias, verificamos também a presença de outros tipos celulares na cavidade peritoneal, como linfócitos CD4, CD8, B-1, B-2, NK e NKT, DCs e granulócitos, os quais compreendem eosinófilos e mastócitos. Muitas dessas populações celulares se encontram aderidas entre si, o que caracteriza os *doublets* [Figura 3 e 4 e ANEXO I (Ghosn et al., 2010)]. A maioria dos *doublets* encontrados na cavidade peritoneal pode ser representada por dois linfócitos B-1 aderidos entre si, ou até mesmo por um linfócito aderido a um MΦ. A presença de duas células aderidas pode ser facilmente observada após a preparação de uma lâmina diretamente com as células peritoneais totais e, até mesmo após o isolamento dos MΦs. Durante a análise das populações celulares residentes no peritôneo por citometria de fluxo, os *doublets* foram excluídos por seu tamanho utilizando os parâmetros de FSc-A (área) x FSc-H (altura)

A presença de diversas populações celulares no peritôneo levanta questionamentos a respeito da eficácia do protocolo de aderência amplamente empregado, no intuito de enriquecer a população de MΦ, fato já questionado por outros grupos. Schleicher e colaboradores (Bogdan e Schleicher, 2006) demonstraram que fatores solúveis cuja produção foi anteriormente atribuída aos MΦs peritoneais era, de fato, resultado da contaminação dessas culturas aderentes por linfócitos T e células NK. O mesmo foi observado com MΦs derivados da medula óssea, ainda que nessas populações, a contaminação com outras populações celulares seja menor. Esses aspectos ganham ainda mais importância quando consideramos a heterogeneidade das populações de células peritoneais que podem expressar F4/80, glicoproteína descrita como

preferencialmente expressa em MΦs murinos (Austyn e Gordon, 1981; Taylor et al., 2003). Verificamos que dentro da população de células F4/80 do peritônio, havia eosinófilos e mastócitos, além dos subtipos de MΦs. Os ganulócitos, assim como os SPMs, apresentam baixa expressão de F4/80. Sendo assim, ao longo dos nossos estudos, a análise da expressão de MHCII e a exclusão de células granulosas dentro da população F4/80^{+}, se mostrou a melhor estratégia para seleção das duas populações de MΦs residentes no compartimento peritoneal [Figura 4 e ANEXO II (Cassado et al., 2011)]. A validação dessa estratégia foi confirmada pela separação dessas populações em FacsVantage, e posterior observação em microscopia óptica, a qual revelou os MΦs F4/80^{high}IA$^{b\text{-}int/neg}$ são, de fato, maiores do que os MΦs F4/80^{low}IA$^{b\text{-}high}$, como descrito por nosso grupo (Ghosn et al., 2010). Além disso, os subtipos de MΦs peritoneais SPM e LPM apresentam morfologias muito distintas após cultura *in vitro*, quando SPM se espraiaram de maneira mais alongada e polarizada, com prolongamentos semelhantes aos dendritos presentes em DCs, enquanto os LPMs se mostraram mais arredondados, com grande citoplasma, e com poucos dendritos.

A heterogeneidade das células mielo-monocíticas residentes no peritônio também foi reportada por Dioszeghy e colaboradores (Dioszeghy et al., 2008), que classificou duas populações de MΦs de acordo com a expressão de 12/15-lipoxigenase (LOX). Assim como LPM e SPM, os MΦs 12/15-LOX^{+} e 12/15-LOX^{-} apresentam diferenças fenotípicas e funcionais. A população 12/15-LOX^{+} apresenta elevada expressão de F4/80 e do receptor Scavenger (SR)-A, e secreta mais IL-10 e G-CSF, em resposta ao sobrenadante de *Staphylococcus epidermis* (SES), do que as células 12/15-

LOX$^-$. Esse subtipo celular (F4/80^{high}12/15-LOX$^+$) foi definido pelos autores como MΦs residentes (Dioszeghy et al., 2008), sendo sua frequência na cavidade peritoneal similar à frequência de LPM em condições fisiológicas [Figura 4 e ANEXO I e II (Ghosn et al., 2010; Cassado et al., 2011)]. Por compartilharem características funcionais e fenotípicas, os LPMs e as células F4/80^{high}12/15-LOX$^+$ poderiam representar a mesma população de MΦ peritoneal.

Apesar dos SPMs e das células F4/80^{low}12/15-LOX$^-$ apresentarem o mesmo fenótipo CD11b$^+$F4/80^{low}MHCII^{high}, a expressão de CD11c parece distinguí-las, já que os SPMs são selecionados dentro da população CD11c$^-$ da cavidade peritoneal [Figura 4 e ANEXO I e II (Ghosn et al., 2010; Cassado et al., 2011)], enquanto as células 12/15-LOX$^-$ expressam elevados níveis desse marcador, fato que motivou sua classificação como DCs peritoneais (Dioszeghy et al., 2008). Além da ausência de CD11c, a SPM expressa baixos níveis basais das moléculas co-estimulatórias CD40, CD80 e CD86, quando comparada com a LPM [Figura 8 e ANEXO I e II (Ghosn et al., 2010; Cassado et al., 2011)]. Em contrapartida, as células 12/15-LOX$^-$ expressam altos níveis dessas mesmas moléculas, quando comparado com a população de células 12/15-LOX$^+$ (Dioszeghy et al., 2008). Essas observações aliada à existência de uma população de DCs (CD11c$^+$) no peritônio, ainda que minoritária [Figura 4, ANEXO I e II (Ghosn et al., 2010; Cassado et al., 2011)], nos impedem de classificar SPM como uma população de DCs peritoneais. No entanto, uma vez que a expressão de CD11c, e outros marcadores de superfície, não é homogênea entre as populações de DCs ou MΦ e, o fato, de MΦ e DCs compartilharem muitas características e funções (Geissmann et al., 2010b;

Geissmann et al., 2010b; Hume, 2008), não há como descartar a presença de SPM na população de DCs peritoneais descritas por Dioszeghy e colaboradores e vice versa.

Ainda que SPM não seja considerada uma DC clássica, ela compartilha características que sugerem seu potencial como célula apresentadora de antígeno (APC). Além da alta expressão de MHC, os SPMs, em condições fisiológicas ou sob estimulação adequada, mostram alta expressão de CD62L (L-selectina) [Figura 12 e ANEXO I (Ghosn et al., 2010)] e CCR7 (Figura 12), o que sugere que essas células possam migrar para os linfonodos e atuar como APCs. Nesse contexto, Kool e colaboradores (Kool et al., 2008) demonstraram que monócitos inflamatórios $GR1^+$ migram para o peritônio após estímulo com OVA/ALUM e posteriormente migram para os linfonodos drenantes, juntamente com DCs residentes. No linfonodo, os monócitos inflamatórios adquirem um aumento na expressão de MHCII e moléculas co-estimulatórias, e se diferenciam em DC inflamatórias sendo responsáveis pela indução da proliferação e diferenciação linfócitos T (Kool et al., 2008). Apesar de SPM e LPM não serem encontrados em órgãos linfóides, como baço, linfonodo ou no sangue em condições fisiológicas (Ghosn et al., 2010), estudos adicionais são necessários para entender a capacidade migratória dessas células frente a estímulos infecciosos ou injúria, assim como seu possível papel nesses órgãos.

MΦs e DCs iniciam a resposta imunológica pela discriminação de padrões moleculares. Há várias famílias de PRR expressos nos MΦs, porém a expressão desses diferentes tipos de receptores inatos parece não ser homogênea entre as diferentes subpopulações celulares, como já foi previamente demonstrado para subpopulações de DCs (Iwasaki e Medzhitov,

2004). Nesse trabalho, maiores níveis dos receptores TLR4 e TLR5 (Figura 8) e do receptor *scavenger* CD36 (Figura 12) foram encontrados nos LPMs enquanto os SPMs apresentaram maior expressão dos receptores tipo Lectina, Dectina-1 e DC-Sign (Figura 12). Apesar de ambas as populações se mostrarem responsivas aos agonistas desses receptores, a resposta diferencial de LPM e SPM foi correlacionada aos níveis de PRR preferencialmente expressos nas mesmas. Assim, LPM apresentou significativa modulação positiva nos níveis de CD80 a partir do estímulo com LPS e flagelina, agonistas de TLR4 e TLR5, respectivamente (Figura 9), enquanto a maior expressão de Dectina-1 evidenciada nos SPMs poderia estar correlacionada com o grande número de partículas de zimosan fagocitados por essas células (Figura 11).

Com relação ao perfil de produção de citocinas, os MΦs são classificados genericamente em clássicos, células produtoras de elevados níveis de IL-12, ou alternativos, considerados como excelente fonte de IL-10 (Anderson e Mosser, 2002; Edwards et al., 2006; Gordon, 2003; Hughes et al., 1995; Mantovani et al., 2004; Mosser e Edwards, 2008). Em situações fisiológicas, SPM e LPM não apresentaram polarização para nenhum perfil de ativação específico, uma vez que nem as citocinas IL-10 ou IL-12 ou um perfil específico de marcadores M1 ou M2 foram encontrados nessas células na ausência de estímulos (Figura 12 e 13). A maioria dos estudos aborda o perfil de ativação de MΦs a partir da cultura *in vitro* com estímulos específicos (Anderson et al., 2002; Anderson e Mosser, 2002; Edwards et al., 2006; Gordon, 2003; Mantovani et al., 2004; Mosser e Edwards, 2008). A estimulação *in vitro* de SPM e LPM com LPS e rIFN-γ, clássico estímulo diferenciador de MΦ M1, induziu significativa frequência de células IL-12^{+} dentro das duas

subpopulações. No entanto, ambas as populações de MΦs peritoneais falharam em produzir IL-10 em qualquer condição proporcionada. No caso do estímulo com rIL-4, conhecido diferenciador de MΦs alternativos alérgicos (Gordon, 2003; Mantovani et al., 2004; Mosser, 2003; Stein et al., 1992), não era mesmo esperado a secreção de IL-12 e IL-10. Em contrapartida, o estímulo com imunocomplexos (eritrócitos opsonizados) é utilizado para diferenciar MΦ alternativos reguladores, secretores de IL-10 e não de IL-12 (Anderson e Mosser, 2002; Edwards et al., 2006; Mosser e Edwards, 2008). Em nossas condições experimentais, esse estímulo também falhou em induzir a secreção de IL-10 por SPM e LPM (Figura 13). Esse fato pode ser explicado pela própria natureza dos MΦs peritoneais, uma vez que os dados existentes com relação à diferenciação de MΦs para o perfil diferenciador utiliza MΦs derivados da medula óssea e não MΦ residente em tecidos (Anderson e Mosser, 2002; Edwards et al., 2006).

No entanto, quando estimulados *in vivo,* os LPMs apresentaram uma proporção significativa de células produtoras de IL-10 em tempos precoces (30 min) após a inoculação i.p. de zimosan, sugerindo que no compartimento peritoneal os LPMs são capazes de adquirir um perfil de ativação regulador frente a estímulos infecciosos (Figura 14). No entanto, a inoculação de células apópticas, conhecido indutor de IL-10 não produziu o mesmo efeito que o zimosan nessas células. Ainda, a população SPM não apresentou uma frequência significativa de células IL-10^{+} em resposta aos estímulos com zimosan ou células apoptóticas, sendo encontrada uma frequência pequena de células IL-12^{+} após estímulo com zimosan (Figura 14). A inoculação de *T. cruzi* induziu o surgimento de frequências mínimas e similares de células IL-10^{+} e IL-

12^+ dentro das duas subpopulações. Juntos, nossos resultados indicam que a inoculação de zimosan foi o estímulo que apresentou maior alteração funcional, sendo capaz de modular diferentemente SPM e LPM, duas subpopulações residentes no mesmo ambiente.

Além da secreção de citocinas, os estímulos administrados i.p. induziram uma profunda alteração da composição celular da cavidade peritoneal, efeito já observado em 30 min após estimulação e potencializado em 48 h No tempo de 30 min da injeção de zimosan, foi observado um enriquecimento da população de SPM, porém, os LPMs ainda compunham a população majoritária de MΦs do peritônio. No entanto, 48 h após a estimulação com zimosan ou *T. cruzi*, a composição da cavidade peritoneal foi profundamente alterada, com o desaparecimento de LPM, influxo de monócitos e marcado aumento de SPM. Nesse ponto, os monócitos juntamente com os SPMs, se tornaram as populações majoritárias do peritônio [Figura 18, ANEXO II (Cassado et al, 2011)]. Alterações semlhantes também foram observadas após estímulo i.p. com LPS (Ghosn et al., 2010), flagelina (dados não mostrados) e em peritônios elicitados por tioglicolato [ANEXO I (Ghosn et al., 2010)] e amido (Figura 16).

O desaparecimento dos MΦs peritoneais, após estimulação, é um fenômeno já descrito pela literatura e chamado *"Macrophages Desaperance Reaction"* (Reação de desaparecimento de MΦs) (Kool et al., 2008; Taylor et al., 2003). Esse fenômeno foi descrito, por exemplo, após 4 h da administração i.p. de zimosan (Taylor et al., 2003) e após 24 horas do estímulo i.p. com OVA e OVA/ALUM (Kool et al., 2008). A administração de zimosam induziu o desaparecimento completo das células $F4/80^{high}$,acompanhado pelo surgimento

de MΦs F4/80^{low}, que co-expressavam GR1 e 7/4, sendo estes últimos referidos pelos autores como MΦs inflamatórios (Taylor et al., 2003). Algumas hipóteses podem ser postuladas para o desaparecimento dessas células, como morte celular, migração ou diferenciação das mesmas em outras populações celulares. Cao e colaboradores (Cao et al., 2005) mostraram que o desaparecimento dos MΦs F4/80^{high} da cavidade peritoneal em resposta a tioglicolato foi consequência da migração dessas células para o linfonodo drenante por um mecanismo mediado pela integrina Mac-1. Nossos dados demonstraram que o desaparecimento de LPM do compartimento peritoneal em resposta aos estímulos infecciosos foi acompanhado por uma diminuição na frequência de células positivas para β-Gal, um marcador de senescência celular [Figura 19, ANEXO II (Cassado et al, 2011)]. Diversos estudos apontam a senescência dos MΦs como causa da sua deficiência funcional, o que pode ser evidenciado pela diminuída capacidade de produzir NO (Cecilio et al., 2011), exercer sua função como célula fagocítica (Kovacs et al., 2009; Lloberas e Celada, 2002; Plowden et al., 2004) e expressar MHCII (Herrero et al., 2002). Com base nesses dados, os LPMs parecem apresentar características funcionais e morfológicas de células senescentes, como tamanho aumentado, presença de vacúolos no citoplasma celular (Figura 5), diminuída capacidade fagocítica (Figura 10) e baixa expressão de MHCII (Figura 8). Além disso, essas células não são capazes de produzir NO em resposta ao LPS *in vivo* (Ghosn et al., 2010). De fato, as células aderentes de animais estimulados com zimosan ou *T. cruzi* após 48 h, mostraram uma menor marcação para β-Gal do que as células aderentes de animais não tratados, sendo que a frequência de células marcadas com β-Gal correlacionou com a freqüência de LPM

encontrada nesses peritônios [Figura 19, ANEXO II (Cassado et al, 2011)]. Com esses dados, se torna inevitável levantar a hipótese de que o desaparecimento de LPM da cavidade peritoneal, após estimulação, poderia estar associado com o estágio senescente dessas células.

No caso do amido, o completo desaparecimento de LPM se deu 12 h após a inoculação, ponto em que também houve uma intensa entrada de monócitos (Figura 16) e de neutrófilos (Figura 15). Após 48 h, os monócitos infiltrantes pareceram ganhar expressão de MHCII, apresentando morfologia similiar aos SPMs (Figura 16). Essa população se torna dominante no peritônio e assim permanece por muitos dias, sendo que a composição celular fisiológica só pôde ser observada 14 dias após a inoculação de amido. A análise da composição celular em peritônios elicitados é de extrema importância, já que os MΦs elicitados são amplamente utilizados para estudos morfológicos, metabólicos e funcionais de fagócitos. Nossos dados demonstraram que o melhor ponto para utilização dos MΦs elicitados foi após 4 dias da inoculação de amido, quando 90% das células do peritônio elicitado são MΦs, que por sua vez se apresentam como uma população homogênea F4/80^{low}MHCII^{int}. Além disso, nesse período, a cavidade peritoneal não apresenta mais um elevado número de granulócitos e ocorre uma diminuição de linfócitos. Esses MΦ não apresentaram secreção basal de NO, porém secretam altos níveis dessa molécula em resposta ao LPS, ao contrário do obtido com os MΦ residentes não elicitados (Figura 17).

O aumento de SPM, observado após a injeção de zimosan, *T. cruzi* [Figura 18, ANEXO II (Cassado et al., 2011), amido (Figura 16), LPS e tioglicolato [ANEXO I (Ghosn et al., 2010)], poderia ser atribuído a uma

diminuição na expressão de F4/80 nos LPMs, uma vez que a regulação negativa na expressão de F4/80 em MΦs foi observada em resposta a estímulos diversos como IFN-γ exógeno (Ezekowitz e Gordon, 1982) e infecção intraperitoneal com o bacilo Calmette-Guérin (Ezekowitz et al., 1981). Nesses casos, a regulação negativa da expressão de F4/80 foi acompanhada por uma diminuição da expressão do receptor FcγR, sendo essas modificações associadas à ativação celular (Ezekowitz et al., 1981). Porém, o aumento na frequência de SPM, paralelo ao desaparecimento de LPM, observado após a estimulação do peritônio, não pareceu ser uma consequência da diminuição na expressão de F4/80 nos LPMs, uma vez que essas células foram acompanhadas pela marcação de CFDA-SE e mantiveram o fenótipo de LPM após 9 h e 48 h do estímulo com LPS (Ghosn et al., 2010).

Nos últimos anos, tem sido postulado que as diferentes populações de MΦ e DCs podem ser originadas de diferentes subtipos de monócitos (Auffray et al., 2007; Auffray et al., 2009a; Geissmann et al., 2008; Geissmann et al., 2003; Geissmann et al., 2010b). Os monócitos $GR1^{+}$ e $CCR2^{+}$, nomeados monócitos inflamatórios, migram para o foco inflamatório, enquanto monócitos $GR1^{-}CX_3CR1^{+}$ migram preferencialmente para tecidos não inflamados (Auffray et al., 2007; Geissmann et al., 2003). Assim, esses dois subtipos de monócitos sanguíneos migram de maneira diferencial para os tecidos e se diferenciam em MΦs ou DCs (Auffray et al., 2009a; Geissmann et al., 2008; Geissmann et al., 2010b). Além do aumento de SPM, os estímulos com amido, tioglicolato, LPS, zimosan e *T. cruzi* induziram o influxo de células com fenótipo $F4/80^{low}IA^{b-low}Ly6C^{high}$, condizente com monócitos inflamatórios. Após vários dias no compartimento peritoneal, esses monócitos adquirem uma maior expressão de

MHCII, juntamente com uma diminuição na expressão de Ly6C. O fenótipo F4/80^{low}IA$^{b\text{-}high}$Ly6C^{neg} apresentado por essas células é consistente com o fenótipo dos SPMs, sugerindo que os monócitos inflamatórios que atingem o peritônio após um estímulo inflamatório, se diferenciam em SPM. Uma vez que a migração de monócitos inflamatórios depende de CCR2, os dados mostrando que animais deficientes em CCR2 apresentaram uma marcante redução no número de SPM, quando comparado aos animais selvagens (C57BL/6) (Figura 7) também suportam a hipótese da origem de SPM ser a partir de monócitos inflamatórios. Por outro lado, o *pool* de LPM não foi alterado na ausência de CCR2. Assim, nossos dados são consistentes com o modelo proposto por Geissmann e colaboradores (Geissmann et al., 2003), no qual monócitos inflamatórios migram para o foco inflamatório e se diferenciam em MΦ inflamatórios.

Independente do estímulo e da dominância entre SPM e monócitos, as células peritoneais são realmente mais responsivas à subsequente estimulação *in vitro* com LPS, como evidenciado pelos altos níveis de NO [Figura 20 e ANEXO I e II (Ghosn et al., 2010; Cassado et al, 2011)] e elevada frequência de células produtoras de IL-12 [Figura 20, ANEXO II (Cassado et al, 2011)]. Nesse cenário, a população SPM parece ser a maior fonte de IL-12, uma vez que mostrou uma maior frequência de células IL-12^{+} do que os monócitos, em resposta à subsequente estimulação com LPS/IFN-γ. Além disso, a exposição ao estímulo infeccioso induz ao surgimento de uma população SPM mais responsiva a estímulos subsequentes do que a SPM presente em animais não tratados. Como a IL-12 tem sido descrita como elemento essencial para polarização dos MΦs para o perfil de ativação M1 e sua consequente indução

da produção de NO em resposta a LPS e IFN-γ (Bastos et al., 2002; Bastos et al., 2007; Bastos et al., 2004; Bogdan e Schleicher, 2006; Frucht et al., 2001), podemos sugerir que a substituição de LPM por SPM e monócitos na cavidade peritoneal promove um efeito benéfico para a resposta celular frente a estímulos infecciosos.

Surpreendentemente, animais deficientes em IL-12, cujos MΦ apresentam um perfil M2 (Bastos, 2002), apresentaram um aumento na frequência e no número de SPM na ausência de estímulos (Figura 22). Assim, um microambiente M2 favoreceria o desenvolvimento de SPM, a qual demonstra um perfil de ativação M1 *in vivo*. Talvez isso ocorra devido a um mecanismo de compensação, ou seja, em um microambiente pró-M2, como o encontrado em animais deficientes em IL-12 e IFN-γ, é necessária a presença de um subtipo de MΦ mais apto a desenvolver uma resposta inflamatória. No entanto, estudos mais detalhados com relação à interação entre as duas subpopulações de MΦs peritoneais são necessários para que se entenda a importância da IL-12 para a manutenção de SPM.

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura aborda as diferenças morfológicas e funcionais existentes entre populações de MΦs residentes em tecidos distintos, justificando essas diferenças pela especialização e as funções adotadas por essas células nos diferentes microambientes, tais como: a capacidade de remodelamento ósseo dos osteoclastos, a alta expressão de receptores *scavenger* e receptores para padrões moleculares em MΦs alveolares e a alta capacidade fagocítica e bactericida paralela a baixa produção de citocinas pró-inflamatórias apresentada pelos MΦs da lâmina própria (Gordon e Taylor, 2005). Contudo, a presença de populações

heretogêneas de MΦs num mesmo microambiente é compartilhada por órgãos como o baço, onde parece haver ao menos três diferentes subpopulações de MΦs (Gordon e Taylor, 2005; Taylor et al., 2005): MΦs encontrados na polpa vermelha são células com alta expressão de F4/80 e estão envolvidos com a remoção de eritrócitos; os encontrados na polpa branca desse órgão subdividem-se em duas populações distintas, as quais possuem baixa expressão de F4/80; os MΦs da zona marginal (MZMΦ) são caracterizados pela expressão de altos níveis de receptores para padrões moleculares e receptores *scavenger*, sendo então associados com o *clearance* de patógenos; e os MΦs 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. (Gordon e Taylor, 2005).

Recentemente, alguns dados têm demonstrado especialização de populações de MΦs como os MΦs $GR1^+$ (Mordue e Sibley, 2003), MΦs $LY6C^+$ ou aqueles classificados recentemente como MΦs $FOXP3^+$ (Manrique et al.). Enquanto os MΦs $GR1^+$ são células com perfil inflamatório, envolvidas no controle de infecções e processos patológicos (Mordue e Sibley, 2003; Swirski et al., 2007), os MΦs $FOXP3^+$ e $Ly6C^-$ são células envolvidas com a regulação da resposta imunológica (Manrique et al., 2011). As subpopulações peritoneais LPM e SPM também se mostraram mais especializadas do que plásticas, onde a LPM, população majoritária da cavidade peritoneal de animais controles, apresenta características de células senescentes, e parece adquirir um perfil regulador em resposta a estímulos infecciosos *in vivo*, desaparecendo do peritônio. Já a SPM que enriquece o peritônio em resposta a estímulos infecciosos, parece ser um subtipo de MΦ mais fagocítico e inflamatório, a qual

apresenta produção de IL-12 e NO, condizendo com as características de MΦ M1. Contudo, modelos experimentais utilizando a depleção dos subtipos MΦs peritoneais são indispensáveis para se determinar a contribuição relativa de LPM, SPM e monócitos na cavidade peritoneal durante uma resposta inflamatória e sua possível migração e influência na condução da imunidade adquirida em órgãos linfóides secundários.

CONCLUSÕES

Os MΦs peritoneais são constituídos por dois subtipos celulares que foram nomeados com base em seu tamanho como SPM e LPM. Essas células mostram características morfológicas, fenotípicas, funcionais e metabólicas distintas, porém ambos os subtipos de MΦ peritoneais são capazes de exercer uma das principais características dos MΦ, a fagocitose, ainda que a SPM pareça ser o subtipo de MΦ mais apto a desempenhar tal função (Ghosn et al., 2010, Cassado et al., 2011). Em situações fisiológicas, SPM e LPM não apresentaram polarização para nenhum perfil de ativação específico. *In vitro,* os subtipos de MΦs peritoneais podem ser considerados mais plásticos do que especializados, uma vez que ambos LPM e SPM podem ser polarizados tanto para o perfil de ativação M1, quando estimulados com LPS/IFN-γ, quanto para o perfil de ativação M2 após estimulação com rIL-4.

No entanto, *in vivo*, as subpopulações peritoneais LPM e SPM se mostraram mais especializadas do que plásticas, onde a LPM, que desaparece do peritônio após estimulação, parece se diferenciar para MΦ regulador em resposta a estímulos infecciosos. Já a SPM população que enriquece o peritônio em resposta a estímulos infecciosos, parece ser um subtipo de MΦ mais fagocítico e inflamatório. Apesar de suas particularidades, diversos estímulos como zimosan, *T. cruzi* (Cassado et al., 2011), amido, tioglicolato ou LPS (Ghosn et al., 2010) induzem um efeito semelhante nas alterações celulares do peritônio, caracterizadas pelo desaparecimento de LPM, enriquecimento de SPM e infiltrado de monócitos. Além disso, a inoculação i.p. de zimosan ou *T. cruzi* induz uma renovação celular no compartimento peritoneal caracterizada por uma diminuição na marcação para β-Gal em células aderentes e esse efeito é acompanhado por um aumento na produção

de NO e de células IL-12^{+}, às custas majoritariamente de SPM (Cassado et al., 2011).

,

REFERÊNCIAS

Aderem A, Underhill Dm. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu Rev Immunol. 1999;17:593-623.

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol. 2004;4(7):499-511.

Anderson Cf, Gerber Js, Mosser Dm. Modulating macrophage function with IgG immune complexes. J Endotoxin Res. 2002;8(6):477-81.

Anderson Cf, Mosser Dm. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. J Leukoc Biol. 2002;72(1):101-6.

Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. Science. 2007;317(5838):666-70.

Auffray C, Fogg Dk, Narni-Mancinelli E, Senechal B, Trouillet C, Saederup N, et al. CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. J Exp Med. 2009a;206(3):595-606.

Auffray C, Sieweke Mh, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2009b;27:669-92.

Austyn Jm, Gordon S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. Eur J Immunol. 1981;11(10):805-15.

Balner H. Bone Marrow Transplantation in Total Body Irradiation. Jaarb Kankeronderz Kankerbestrijd Ned. 1963;13:177-80.

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.

Bastos Kr, Barboza R, Sardinha L, Russo M, Alvarez Jm, Lima Mr. Role of endogenous IFN-gamma in macrophage programming induced by IL-12 and IL-18. J Interferon Cytokine Res. 2007;27(5):399-410.

Bastos Kr, Marinho Cr, Barboza R, Russo M, Alvarez Jm, D'imperio Lima Mr. What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells? Microbes Infect. 2004;6(6):630-6.

Bianco C, Griffin Fm, Jr., Silverstein Sc. Studies of the macrophage complement receptor. Alteration of receptor function upon macrophage activation. J Exp Med. 1975;141(6):1278-90.

Blander Jm, Medzhitov R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. Nature. 2006;440(7085):808-12.

Bogdan C, Schleicher U. Production of interferon-gamma by myeloid cells--fact or fancy? Trends Immunol. 2006;27(6):282-90.

Cao C, Lawrence Da, Strickland Dk, Zhang L. A specific role of integrin Mac-1 in accelerated macrophage efflux to the lymphatics. Blood. 2005;106(9):3234-41.

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.

Carty M, Goodbody R, Schroder M, Stack J, Moynagh Pn, Bowie Ag. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. Nat Immunol. 2006;7(10):1074-81.

Cassado A A, Albuquerque JA, Sardinha LR, Buzzo C, Faustino L, Nascimento R, et al. Cellular renewal and improvement of local cell effector activity in peritoneal cavity in response to infectious stimuli. PLoS One. 2011;6(7): 221-41.

Cecilio Ca, Costa Eh, Simioni Pu, Gabriel Dl, Tamashiro Wm. Aging alters the production of iNOS, arginase and cytokines in murine macrophages. Braz J Med Biol Res. 2011;44(7):671-81.

Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. Nat Immunol. 2000;1(4):305-10.

Cohn Za. Determinants of infection in the peritoneal cavity. I. Response to and fate of Staphylococcus aureus and Staphylococcus albus in the mouse. Yale J Biol Med. 1962a;35:12-28.

Cohn Za. Determinants of infection in the peritoneal cavity. II. Factors influencing the fate of Staphylococcus aureus in the mouse. Yale J Biol Med. 1962b;35:29-47.

Cohn Za. Determinants of infection in the peritoneal cavity. III. The action of selected inhibitors on the fate of Staphylococcus aureus in the mouse. Yale J Biol Med. 1962c;35:48-61.

Cohn Za, Hirsch Jg. The isolation and properties of the specific cytoplasmic granules of rabbit polymorphonuclear leucocytes. J Exp Med. 1960a;112:983-1004.

Cohn Za, Hirsch Jg. The influence of phagocytosis on the intracellular distribution of granule-associated components of polymorphonuclear leucocytes. J Exp Med. 1960b;112:1015-22.

Cohn Za, Morse Si. Functional and metabolic properties of polymorphonuclear leucocytes. I. Observations on the requirements and consequences of particle ingestion. J Exp Med. 1960;111:667-87.

Collins M, Ling V, Carreno Bm. The B7 family of immune-regulatory ligands. Genome Biol. 2005;6(6):223.

Dimri Gp, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(20):9363-7.

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.

Dioszeghy V, Rosas M, Maskrey Bh, Colmont C, Topley N, Chaitidis P, et al. 12/15-Lipoxygenase regulates the inflammatory response to bacterial products in vivo. J Immunol. 2008;181(9):6514-24.

Edwards Jp, Zhang X, Frauwirth Ka, Mosser Dm. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. J Leukoc Biol. 2006;80(6):1298-307.

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.

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.

Frucht Dm, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'shea Jj, Koyasu S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. Trends Immunol. 2001;22(10):556-60.

Gay Nj, Keith Fj. Drosophila Toll and IL-1 receptor. Nature. 1991;351(6325):355-6.

Geissmann F, Auffray C, Palframan R, Wirrig C, Ciocca A, Campisi L, et al. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. Immunol Cell Biol. 2008;86(5):398-408.

Geissmann F, Gordon S, Hume Da, Mowat Am, Randolph Gj. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. Nat Rev Immunol. 2010a;10(6):453-60.

Geissmann F, Jung S, Littman Dr. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity. 2003;19(1):71-82.

Geissmann F, Manz Mg, Jung S, Sieweke Mh, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. Science. 2010b;327(5966):656-61.

Ghosn Ee, Cassado Aa, Govoni Gr, Fukuhara T, Yang Y, Monack Dm, et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(6):2568-73.

Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubeau M, Dai Xm, et al. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. Nat Immunol. 2006;7(3):265-73.

Godleski Jj, Brain Jd. The origin of alveolar macrophages in mouse radiation chimeras. J Exp Med. 1972;136(3):630-43.

Goodman Jw. Transplantation of Peritoneal Cells. Ann N Y Acad Sci. 1964;114:496-8.

Gordon S. Alternative activation of macrophages. Nat Rev Immunol. 2003;3(1):23-35.

Gordon S. The macrophage: past, present and future. Eur J Immunol. 2007;37 Suppl 1:S9-17.

Gordon S, Hirsch S. Differentiation antigens and macrophage heterogeneity. Adv Exp Med Biol. 1982;155:391-400.

Gordon S, Keshav S, Chung Lp. Mononuclear phagocytes: tissue distribution and functional heterogeneity. Curr Opin Immunol. 1988;1(1):26-35.

Gordon S, Taylor Pr. Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat Rev Immunol. 2005;5(12):953-64.

Griffin Fm, Jr., Griffin Ja, Leider Je, Silverstein Sc. Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. J Exp Med. 1975;142(5):1263-82.

Griffin Fm, Jr., Griffin Ja, Silverstein Sc. Studies on the mechanism of phagocytosis. II. The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG-coated bone marrow-derived lymphocytes. J Exp Med. 1976;144(3):788-809.

Herrero C, Sebastian C, Marques L, Comalada M, Xaus J, Valledor Af, et al. Immunosenescence of macrophages: reduced MHC class II gene expression. Exp Gerontol. 2002;37(2-3):389-94.

Herzenberg La, Tung J, Moore Wa, Herzenberg La, Parks Dr. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. Nat Immunol. 2006;7(7):681-5.

Hirsch Jg. Phagocytin: a bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes. J Exp Med. 1956;103(5):589-611.

Hirsch Jg. Immunity to infectious diseases: review of some concepts of Metchnikoff. Bacteriol Rev. 1959;23(2):48-60.

Hirsch Jg. Antimicrobial factors in tissues and phagocytic cells. Bacteriol Rev. 1960;24(1):133-40.

Hirsch Jg, Cohn Za. Degranulation of polymorphonuclear leucocytes following phagocytosis of microorganisms. J Exp Med. 1960;112:1005-14.

Hughes Da, Fraser Ip, Gordon S. Murine macrophage scavenger receptor: in vivo expression and function as receptor for macrophage adhesion in lymphoid and non-lymphoid organs. Eur J Immunol. 1995;25(2):466-73.

Hume Da. The mononuclear phagocyte system. Curr Opin Immunol. 2006;18(1):49-53.

Hume Da. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. J Immunol. 2008;181(9):5829-35.

Hume Da, Gordon S. Mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Identification of resident macrophages in renal medullary and cortical interstitium and the juxtaglomerular complex. J Exp Med. 1983;157(5):1704-9.

Hume Da, Halpin D, Charlton H, Gordon S. The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80: macrophages of endocrine organs. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984a;81(13):4174-7.

Hume Da, Loutit Jf, Gordon S. The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80: macrophages of bone and associated connective tissue. J Cell Sci. 1984b;66:189-94.

Hume Da, Perry Vh, Gordon S. Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. J Cell Biol. 1983a;97(1):253-7.

Hume Da, Perry Vh, Gordon S. The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localisation of antigen F4/80: macrophages associated with epithelia. Anat Rec. 1984c;210(3):503-12.

Hume Da, Robinson Ap, Macpherson Gg, Gordon S. The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Relationship between macrophages, Langerhans cells, reticular cells, and dendritic cells in lymphoid and hematopoietic organs. J Exp Med. 1983b;158(5):1522-36.

Hume Da, Ross Il, Himes Sr, Sasmono Rt, Wells Ca, Ravasi T. The mononuclear phagocyte system revisited. J Leukoc Biol. 2002;72(4):621-7.

Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. Nat Rev Immunol. 2003;3(5):371-82.

Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. Nat Immunol. 2004;5(10):987-95.

Janeway Ca, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol. 2002;20:197-216.

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.

Kawai T, Akira S. TLR signaling. Semin Immunol. 2007;19(1):24-32.

Kool M, Soullie T, Van Nimwegen M, Willart Ma, Muskens F, Jung S, et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. J Exp Med. 2008;205(4):869-82.

Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. Curr Opin Immunol. 2003;15(4):396-401.

Kovacs Ej, Palmer Jl, Fortin Cf, Fulop T, Jr., Goldstein Dr, Linton Pj. Aging and innate immunity in the mouse: impact of intrinsic and extrinsic factors. Trends Immunol. 2009;30(7):319-24.

Landsman L, Varol C, Jung S. Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. J Immunol. 2007;178(4):2000-7.

Lee Ms, Kim Yj. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. Annu Rev Biochem. 2007;76:447-80.

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.

Liu K, Victora Gd, Schwickert Ta, Guermonprez P, Meredith Mm, Yao K, et al. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. Science. 2009;324(5925):392-7.

Lloberas J, Celada A. Effect of aging on macrophage function. Exp Gerontol. 2002;37(12):1325-31.

Manrique Sz, Correa Ma, Hoelzinger Db, Dominguez Al, Mirza N, Lin Hh, et al. Foxp3-positive macrophages display immunosuppressive properties and promote tumor growth. J Exp Med. 2011;208(7):1485-99.

Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. Immunity. 2005;23(4):344-6.

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.

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.

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.
Martinez Fo, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. Front Biosci. 2008;13:453-61.

Maus U, Herold S, Muth H, Maus R, Ermert L, Ermert M, et al. Monocytes recruited into the alveolar air space of mice show a monocytic phenotype but upregulate CD14. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001;280(1):58-68.

Metchnikoff, E., On the present state of the question of immunity in infectious diseases. Nobel Lecture. Disponível em http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1908/mechnikovlecture. 1908. Acesso em 23/09/2011.

Miao Ea, Leaf Ia, Treuting Pm, Mao Dp, Dors M, Sarkar A, et al. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. Nat Immunol. 2010;11(12):1136-42.

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.

Mordue Dg, Sibley Ld. A novel population of Gr-1+-activated macrophages induced during acute toxoplasmosis. J Leukoc Biol. 2003;74(6):1015-25.

Moore, P. Embriologia Básica: Elsevier; 2004.

Mosser Dm. The many faces of macrophage activation. J Leukoc Biol. 2003;73(2):209-12.

Mosser Dm, Edwards Jp. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat Rev Immunol. 2008;8(12):958-69.

Nahrendorf M, Swirski Fk, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo Jl, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. J Exp Med. 2007;204(12):3037-47.

Noel W, Raes G, Hassanzadeh Ghassabeh G, De Baetselier P, Beschin A. Alternatively activated macrophages during parasite infections. Trends Parasitol. 2004;20(3):126-33.

Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. Adv Exp Med Biol. 2005;560:11-8.

Pinkett Mo, Cowdrey Cr, Nowell Pc. Mixed hematopoietic and pulmonary origin of 'alveolar macrophages' as demonstrated by chromosome markers. Am J Pathol. 1966;48(5):859-67.

Plackett Tp, Boehmer Ed, Faunce De, Kovacs Ej. Aging and innate immune cells. J Leukoc Biol. 2004;76(2):291-9.

Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Engleman C, Katz J, Sambhara S. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. Aging Cell. 2004;3(4):161-7.
Polverini Pj, Cotran Ps, Gimbrone Ma, Jr., Unanue Er. Activated macrophages induce vascular proliferation. Nature. 1977;269(5631):804-6.

Randolph Gj, Inaba K, Robbiani Df, Steinman Rm, Muller Wa. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. Immunity. 1999;11(6):753-61.

Rickard Ka, Shadduck Rk, Howard De, Stohlman F, Jr. The granulocytic in vitro growth potential of foetal liver. Pathology. 1970;2(4):297-306.

Rodriguez-Sosa M, Satoskar Ar, Calderon R, Gomez-Garcia L, Saavedra R, Bojalil R, et al. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. Infect Immun. 2002;70(7):3656-64.

Roederer M. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. Cytometry. 2001;45(3):194-205.

Ross Gd. Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/alphaMbeta2-integrin glycoprotein. Crit Rev Immunol. 2000;20(3):197-222.

Schaller E, Macfarlane Aj, Rupec Ra, Gordon S, Mcknight Aj, Pfeffer K. Inactivation of the F4/80 glycoprotein in the mouse germ line. Mol Cell Biol. 2002;22(22):8035-43.

Schleicher U, Hesse A, Bogdan C. Minute numbers of contaminant CD8+ T cells or CD11b+CD11c+ NK cells are the source of IFN-gamma in IL-12/IL-18-stimulated mouse macrophage populations. Blood. 2005;105(3):1319-28.

Shand Fl, Bell Eb. Studies on the distribution of macrophages derived from rat bone marrow cells in xenogeneic radiation chimaeras. Immunology. 1972;22(4):549-56.

Shortman K, Liu Yj. Mouse and human dendritic cell subtypes. Nat Rev Immunol. 2002;2(3):151-61.

Sporri R, Reis E Sousa C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. Nat Immunol. 2005;6(2):163-70.

Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. J Exp Med. 1992;176(1):287-92.

Steinman Rm, Cohn Za. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. J Exp Med. 1973;137(5):1142-62.

Swift Me, Burns Al, Gray Kl, Dipietro La. Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. J Invest Dermatol. 2001;117(5):1027-35.

Swirski Fk, Libby P, Aikawa E, Alcaide P, Luscinskas Fw, Weissleder R, et al. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. J Clin Invest. 2007;117(1):195-205.

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.

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.

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.

Van Furth R. Origin and kinetics of monocytes and macrophages. Semin Hematol. 1970;7(2):125-41.

Van Furth R. The mononuclear phagocyte system. Verh Dtsch Ges Pathol. 1980;64:1-11.

Van Furth R. Current view of the mononuclear phagocyte system. Haematol Blood Transfus. 1981;27:3-10.

Van Furth R. Monocyte production during inflammation. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 1985;8(2):205-11.

Van Furth R, Cohn Za. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. J Exp Med. 1968;128(3):415-35.

Van Furth R, Cohn Za, Hirsch Jg, Humphrey Jh, Spector Wg, Langevoort Hl. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. Bull World Health Organ. 1972;46(6):845-52.

Van Furth R, Diesselhoff-Den Dulk Mm. The kinetics of promonocytes and monocytes in the bone marrow. J Exp Med. 1970;132(4):813-28.
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.

Virolainen M, Defendi V. Ability of haematopoietic spleen colonies to form macrophages in vitro. Nature. 1968;217(5133):1069-70.

Volkman A. The origin and fate of the monocyte. Ser Haematol. 1970;3(2):62-92.

Werb Z, Gordon S. Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. J Exp Med. 1975;142(2):346-60.

Yamamoto M, Akira S. [TIR domain--containing adaptors regulate TLR-mediated signaling pathways]. Nippon Rinsho. 2004;62(12):2197-203.

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.

ANEXO I

Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets

Eliver Eid Bou Ghosn[a,b,1], Alexandra A. Cassado[c], Gregory R. Govoni[d], Takeshi Fukuhara[a], Yang Yang[a], Denise M. Monack[d], Karina R. Bortoluci[c,e], Sandro R. Almeida[b], Leonard A. Herzenberg[a], and Leonore A. Herzenberg[a]

[a]Department of Genetics, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305; [b]Department of Clinical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, [c]Department of Immunology, Institute of Biological Sciences - ICB IV, Universidade de São Paulo, São Paulo SP 05588, Brazil; [d]Department of Microbiology and Immunology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305; and [e]Department of Biological Sciences, Universidade Federal de São Paulo, Diadema SP 09972, Brazil

Contributed by Leonard A. Herzenberg, December 28, 2009 (sent for review December 12, 2009)

The peritoneal cavity (PerC) is a unique compartment within which a variety of immune cells reside, and from which macrophages (MØ) are commonly drawn for functional studies. Here we define two MØ subsets that coexist in PerC in adult mice. One, provisionally called the large peritoneal MØ (LPM), contains approximately 90% of the PerC MØ in unstimulated animals but disappears rapidly from PerC following lipopolysaccharide (LPS) or thioglycolate stimulation. These cells express high levels of the canonical MØ surface markers, CD11b and F4/80. The second subset, referred to as small peritoneal MØ (SPM), expresses substantially lower levels of CD11b and F4/80 but expresses high levels of MHC-II, which is not expressed on LPM. SPM, which predominates in PerC after LPS or thioglycolate stimulation, does not derive from LPM. Instead, it derives from blood monocytes that rapidly enter the PerC after stimulation and differentiate to mature SPM within 2 to 4 d. Both subsets show clear phagocytic activity and both produce nitric oxide (NO) in response to LPS stimulation in vivo. However, their responses to LPS show key differences: in vitro, LPS stimulates LPM, but not SPM, to produce NO; in vivo, LPS stimulates both subsets to produce NO, albeit with different response patterns. These findings extend current models of MØ heterogeneity and shed new light on PerC MØ diversity, development, and function. Thus, they introduce a new context for interpreting (and reinterpreting) data from ex vivo studies with PerC MØ.

CD11b | F4/80 | lipopolysaccharide | peritoneal cavity | thioglycolate

The mouse peritoneal cavity (PerC) selectively attracts and maintains specialized immune cells, including the PerC macrophages (MØ) that are our principal focus here. MØ are typically characterized as large cells that express surface F4/80 glycoprotein and CD11b, one of the chains of the Mac-1 integrin (1–3). Initially thought to be a single subset represented in blood as monocytes and in tissues as differentiated "resident MØ" (4, 5), several MØ subsets have now been recognized based on morphological, functional, and phenotypic differences (2, 6, 7). In addition, two subsets of functionally distinct blood monocytes have been described (8, 9).

Much of current fundamental knowledge about MØ biology comes from analysis of cells drawn from mouse PerC, which became widely used as a MØ source as a result of pioneering work by Cohn and collaborators in the 1960s (10). However, although MØ populations present elsewhere in the animal have recently been shown to be functionally and phenotypically heterogeneous, virtually no attention has yet been paid to potential heterogeneity among PerC MØ (2, 9, 11).

Here, we distinguish two coexisting PerC MØ subsets and show that these have unique phenotypic, functional, and developmental characteristics. Based on the size differences that we detect between these subsets, we provisionally refer to them as small peritoneal MØ (SPMs) and large peritoneal MØ s (LPMs).

Both SPMs and LPMs express the typical F4/80 and CD11b MØ surface markers and both show clear phagocytic activity in vivo. However, they differ sharply in their expression of a wide variety of surface molecules, including Gr-1 and MHC-II, and show strikingly different response patterns to stimulation with typical MØ stimuli [e.g., lipopolysaccharide (LPS), thioglycolate]. Furthermore, they are developmentally independent. LPMs, which rapidly disappear from PerC following LPS or thioglycolate stimulation, do not give rise to SPMs, which increase in numbers at this time. Instead, SPMs derive from blood monocytes that migrate into the PerC in large numbers in response to the stimulation.

Thus, we show here that a source traditionally used to obtain MØ for functional studies actually yields two highly distinct types of MØ. We discuss these findings in the context of current views of MØ origins and functions, and tentatively locate at least one of these PerC subsets (i.e., SPMs) in an extended model based on the framework introduced by Geissmann et al. (9) for blood and tissue MØ.

IMMUNOLOGY

Results

Mouse PerC Contains a Variety of Immune Cells from the Lymphoid and Myeloid Lineages. To identify the immune cell subsets present in the mouse PerC, we used high-dimensional flow cytometry (i.e., FACS) with stain sets capable of distinguishing as many as 11 markers per cell. We collected data for single live PerC cells from untreated BALB/c adult mice and gated to reveal the following subsets (Fig. 1): B cells, MØ, dendritic cells (DCs), eosinophils, mast cells, neutrophils, T cells, natural killer cells, and invariant natural killer T cells.

Approximately 40% of the PerC cells are B-lymphocytes ($CD19^+$; Fig. 1, second row). Among the remaining "non-B" PerC cells, the majority coexpress CD11b and F4/80 and hence are appropriately characterized as MØ. Among these, we find the two unique MØ subsets that are the principal focus of this manuscript.

Peritoneal MØ Are Composed of Two Distinct Subsets: SPMs and LPMs. Within the $CD11b^{hi}$ population (gated as in Fig. 1), we find two subsets that differ strikingly in size, surface marker phenotype, and function. Based on size differences determined by FACS scatter profiles and microscopy images (Fig. 2 *A* and *B*), we provisionally refer to these subsets as SPMs and LPMs. LPM is the most abundant MØ subset (approximately 90% of PerC MØ) in unstimulated mice; SPM accounts for the remaining 10% of the PerC MØ (Fig. 1, last panel).

Author contributions: E.E.G. and L.eonore A. Herzenberg designed research; E.E.G. and A.A.C. performed research; G.R.G, T.F., and D.M.M. contributed new reagents/analytic tools; E.E.G., A.A.C., G.R.G., T.F., Y.Y., D.M.M., K.R.B., S.R.A., Leonard A. Herzenberg, and Leonore A. Herzenberg analyzed data; and E.E.G., K.R.B., and Leonore A. Herzenberg wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

[1]To whom correspondence should be addressed. E-mail: eliverg@stanford.edu.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0915000107/DCSupplemental.

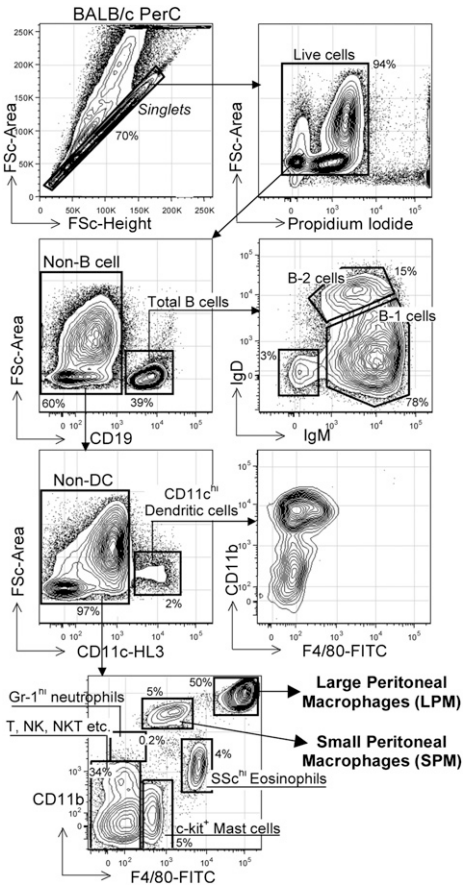


Fig. 1. Naive mouse PerC contains a variety of immune cell subsets. Gating strategy used to identify immune cells present in PerC based on surface molecules. Total PerC cells from unstimulated BALB/c mice were processed and analyzed as described in *Materials and Methods*. Data shown are representative of >10 experiments.

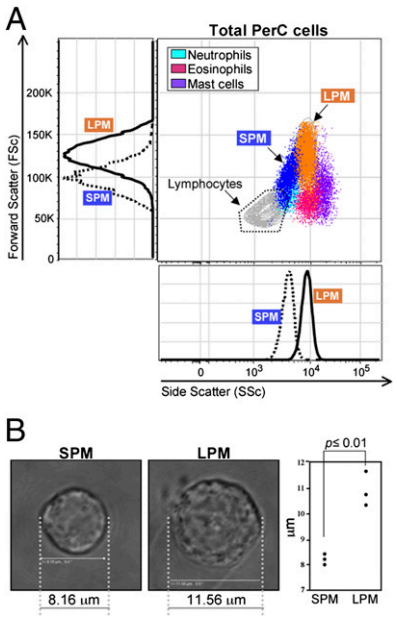


Fig. 2. The two distinct PerC MØ subsets are differentiated by size. (*A*) PerC MØ (and other cell types) were analyzed for their scatter profile (forward and side: size and granularity, respectively) by flow cytometry. (*B*) SPMs and LPMs were FACS-sorted and their diameter were measured. Representative differential interference contrast images are shown.

The expression of a series of surface markers clearly distinguishes SPM from LPM (Table 1). Both subsets express the prototypical MØ markers CD11b and F4/80. However, LPM expresses approximately three times as much CD11b and approximately 80 times as much F4/80 as SPM, setting the two subsets apart from each other and from other PerC cells (Fig. 1 and Table 1).

Importantly, the expression of three additional surface markers qualitatively distinguishes SPMs from LPMs. Thus, LPMs express Gr-1 and AA4.1 whereas SPMs do not (Table 1). In contrast, SPMs express MHC- II (I-A) whereas LPM strikingly do not express this classical marker, measured by FACS analyses (Table 1).

The quantitative expression of a series of other well known surface markers also distinguishes SPMs from LPMs (Table 1). Notably, CD40, CD80, CD86, CD11c (N418 MAb), and TLR4 are all expressed at higher levels on LPMs than SPMs.

Eosinophils, which are commonly found in PerC, will contaminate the SPM and LPM compartments unless explicitly excluded by the gating strategy. The eosinophils express F4/80 at a level intermediate between SPM and LPM (Fig. 1, last panel). However, they can be excluded because they characteristically express low levels of CD11b and low to intermediate levels of Gr-1, and have a unique scatter profile (CD11b^{low}, Gr-1^{int}, and SSc^{hi}; Figs. 1 and 3 and Fig. S1). Therefore, we standardly use a gating strategy that excludes these cells from the SPM and LPM subsets. Importantly, these data strongly argue against the common practice of using either F4/80 or CD11b as the sole surface marker for identifying or isolating MØ.

SPMs and LPMs Are Distinct from DCs and Monocytes. DCs in PerC and spleen are smaller than either SPMs or LPMs and do not express CD11b and F4/80 at the levels found on SPMs and LPMs (Fig. 1, third row). In addition, PerC and splenic DCs both

Table 1. Distinct phenotypic profile of SPMs and LPMs

Surface molecule	SPMs	LPMs	PerC DC	Spleen DC
MHC-II (I-A)	60,000	NS	–	–
Gr-1	NS	6,000	–	–
Ly-6C	NS	NS	–	–
MHC-I (H-2K)	1,600	800	–	–
CD11b	24,000	84,000	–	–
F4/80	1,200	97,000	–	–
AA4.1	NS	12,000	–	–
TLR4	80	540	–	–
TLR4 after in vivo LPS	130	340	–	–
c-kit	NS	NS	–	–
DX5	NS	NS	–	–
CD40	160	600	–	–
CD80	700	3,700	–	–
CD86	140	1,700	–	–
HL3 MAb (CD11c)	300	NS	9,000	33,500
N418 MAb (CD11c)	500	2,900	4,000	10,000

PerC cells from unstimulated BALB/c were harvested and stained and both SPMs and LPMs were analyzed for the expression of several surface markers. SPMs, LPMs, and PerC DsC were identified as in Fig. 1. Spleen DCs were identified as CD11c^{hi}, MHC-II^{hi}, and Lin^{-}. Values are displayed as MFI. The value for the expression of each surface marker was obtained by subtracting the MFI of the full stained cells from the MFI of fluorescence-minus-one control (18, 19). Cells that expressed MFI for a given marker similar or equal to fluorescence-minus-one control were considered negative for this marker and hence were annotated as NS. Data shown are representative of more than five experiments. NS, not significant.

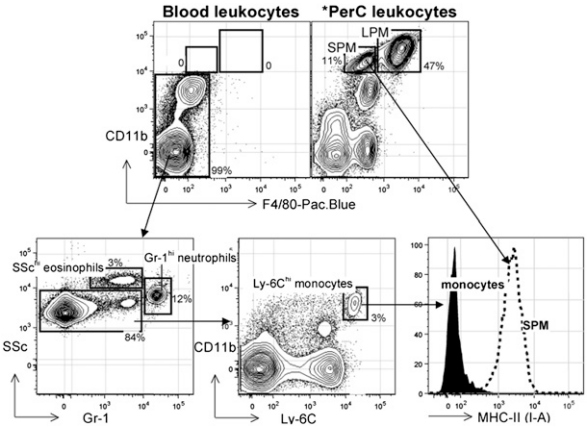


Fig. 3. SPMs and LPMs are absent in mouse blood. PerC and blood cells from unstimulated BALB/c mice were stained and analyzed for specific surface markers. *SPM and LPM were identified as in Fig. 1; blood monocytes were identified as Ly-6C^{hi}, CD11b^{+} cells. SPMs and LPMs are also absent in other naive lymphoid organs, such as spleen and lymph nodes (Fig. S2).

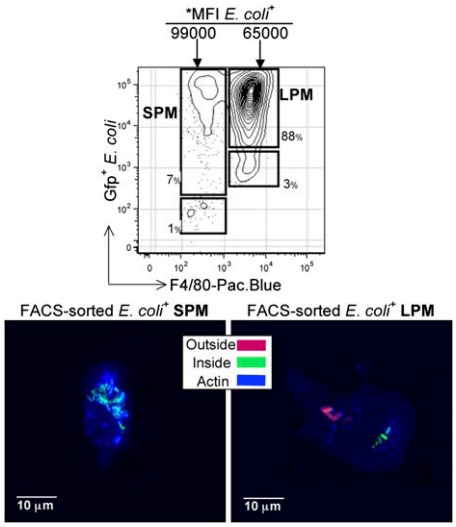


Fig. 4. Both SPMs and LPMs are able to phagocyte bacteria in vivo. *E. coli* (5×10^6) expressing GFP were injected i.p. into BALB/c mice and, after 2 h, PerC cells were harvested and stained as described in *Materials and Methods*. Flow cytometry analysis reveals that most SPMs and LPMs were positive for GFP, indicating that they had internalized bacteria. Confocal images: GFP^{+} SPMs and LPMs were FACS-sorted and analyzed to confirm whether the bacteria had been internalized: green, internalized *E. coli*; blue, actin (phalloidin); red, anti-LPS (red staining indicates that bacteria have remained adherent to the outer cell membrane, i.e., not phagocytized).

express high levels of CD11c, although PerC DCs have only approximately half as much CD11c as splenic DCs (Table 1). SPMs and LPMs, in contrast, express much less CD11c. This difference is detectable when CD11c is revealed by either HL3 or N418 monoclonal anti CD11c. Interestingly, staining with the monoclonal HL3 detects very little (if any) CD11c on LPMs whereas staining with the monoclonal N418 reveals somewhat more CD11c on LPMs than SPMs (Table 1).

Monocytes differ from SPMs and LPMs with respect to phenotype and principal location. Monocytes are present in blood (Fig. 3) and migrate to tissues to become resident MØ (8, 9). In contrast, neither SPMs nor LPMs are detectable in blood (Fig. 3), and these cells are virtually absent in spleen and lymph nodes (Fig. S2). We note, however, that the L-selectin CD62L is expressed on approximately half of SPMs in PerC (Fig. S3), suggesting that, with appropriate stimulation, SPMs may be able to migrate to lymphoid organs.

Phenotypically, SPMs and LPMs are clearly distinct from monocytes. CD11b expression is markedly higher on both SPM and LPM than it is on monocytes, and indeed on all blood leukocytes (Fig. 3). In contrast, Ly-6C is not detectable on SPMs or LPMs but is very high on monocytes (8, 9) (confirmed in Fig. 3). F4/80 expression on SPMs and LPMs also distinguishes these cells from blood leukocytes (Fig. 3), even though the F4/80 levels on SPMs are only a little above background.

SPM and LPM Are Present in All Mouse Strains Tested. SPMs and LPMs are detectable in PerC from all of the strains analyzed in this study, including BALB/c, C57BL/6, 129/S6, FVB/N, SJL/J, and RAG$^{-/-}$ (Fig. S4). The relatively constant frequencies of these subsets in PerC, and their similar proportionality among non-B PerC leukocytes suggests that there may be an evolutionary advantage to maintenance of the composition of the apparently free-living peritoneal leukocytes.

SPM and LPM Are Functionally Distinct. ***Phagocytosis.*** MØ are essential for host protection against infections, in large part because their unique ability to ingest and degrade microorganisms. SPMs and LPMs both have this ability, albeit with somewhat different characteristics. To measure phagocytosis by these cells, we used an in vivo phagocytosis assay in which live GFP-expressing (i.e., fluorescent) *Escherichia coli* were injected intraperitoneally and PerC cells were harvested 2 h later. The harvested cells were immediately chilled, centrifuged to eliminate free bacteria, stained for surface markers, and then analyzed by flow cytometry to determine whether GFP^{+} bacteria were present in SPMs and LPMs.

Findings demonstrate that both SPMs and LPMs phagocytize substantial numbers of GFP^{+} bacteria within 2 h (Fig. 4). These two subsets account for most of the phagocytosis that occurs in PerC, at least among the cells that are free to be harvested from the PerC. Confocal microscopy of sorted GFP^{+} cells confirms that the bacteria are localized inside the cells (rather than adherent to the surface) and hence that they are indeed phagocytized (Fig. 4).

FACS analyses show that there are more bacteria in SPM than LPM. However, quantitative interpretation of these data are difficult because the GFP MFI only reports the presence of intact, and most likely still living, bacteria. Thus, although we find that SPMs have higher bacterial loads (i.e., GFP fluorescence) by this measure than LPMs [99,000 vs. 65,000 GFP median fluorescence intensity (MFI), respectively], we do not know whether this is a result of more efficient phagocytosis by SPMs or more efficient killing of phagocytized bacteria by LPMs. In any event, these phagocytosis studies (Fig. 4) reveal dramatic differences in the way that SPMs and LPMs relate to peritoneal infection.

NO production. MØ are well known to express Toll-like receptor (TLR) and other specialized receptors that can trigger responses to soluble products derived from microorganisms (3). TLR4, which triggers responses to bacterial LPS, is readily detectable on LPMs harvested from unstimulated animals. However, it is only minimally above background on SPMs (Table 1).

Consistent with this finding, ex vivo LPS stimulation for 20 h triggers PerC LPMs to produce large amounts of NO but does not trigger detectable NO production by SPMs in the same culture (Fig. 5*A*).

In vivo, LPS stimulation yields quite different results. It triggers strong NO production by both SPMs and LPMs and, in fact, stimulates more NO production by SPMs than LPMs (4,500 vs. 2,600 NO MFI, respectively; Fig. 5*B*). Further, LPS stimulation results in a modest decrease in TLR4 on LPM by 20 h after stimulation and a modest increase in TLR4 on SPM at this time (Table 1).

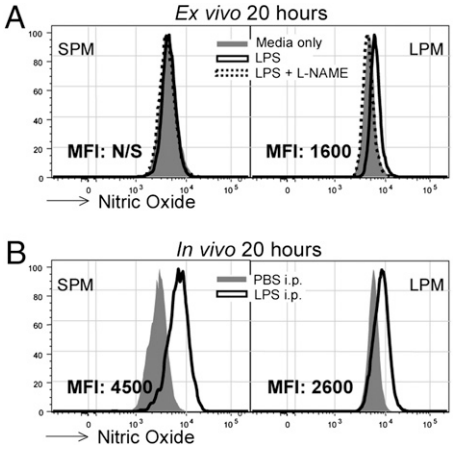


Fig. 5. SPMs and LPMs respond differently to TLR agonists. (*A*) PerC cells (10^6) were incubated with or without 1 μg/mL of LPS for 20 h at physiologic oxygen levels (5% O_2). The specificity of the NO measurement was confirmed by adding 1.5 mM L-NAME reagent into the culture, which specifically inhibits NO formation. (*B*) BALB/c mice were injected i.p. with 5 μg of LPS (or PBS solution control) for 20 h. SPMs and LPMs were identified as in Fig. 1 and Fig. S1. NO production was measured by flow cytometry using DAF-FM diacetate. N/S, not significant. For additional control data, see Fig. S5.

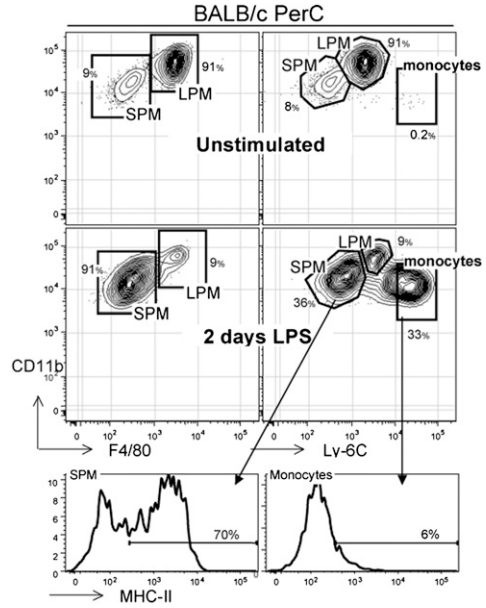


Fig. 6. LPS induces a dramatic shift in the SPM:LPM ratio. BALB/c were injected i.p. with 10 μg of LPS. After 2 d, PerC cells were harvested, stained, and analyzed for the presence of myeloid cells. SPMs and LPMs were identified as described in Fig. 1. Neutrophils and eosinophils were best gated out from this analysis by using the gating strategy shown in Fig. S1.

Collectively, these findings show that LPM produces as much or more NO in response to LPS in vitro as it does in vivo, whereas SPM fails entirely to produce NO in response to LPS in vitro but produces large amounts of NO in response to stimulation with this microbial product in vivo. Thus, whether responses to LPS are compared in vitro or in vivo, SPMs and LPMs behave differently in response to the same stimulus administered in the same environment.

Origins of the SPM Subset. Studies described in the previous section were conducted at 20 h after i.p. LPS injection because, at this time, PerC SPM and LPM frequencies are still comparable to the frequencies in unstimulated mice. However, by 2 d after stimulation, SPM becomes the dominant PerC MØ subset and LPM frequencies dwindle to less than 10% (Fig. 6). The most dramatic shifts occur in mice stimulated with higher doses of LPS (≥10 μg).

To determine whether this shift occurs because LPMs differentiate to SPMs, we sorted LPMs, labeled the sorted cells with CFDA-SE, and transferred them into PerC of unstimulated mice. One hour later, we stimulated the recipient mice with LPS and, at various times thereafter, we harvested PerC and determined the phenotype of the CFDA-SE^+ cells.

Results from these studies showed that, whether tested at 9 h or 2 d after stimulation, the sorted LPM population retains its LPM phenotype (Fig. 7). No CFDA-SE^+ cells appear in the SPM compartment, despite the virtual loss of the resident and the injected LPM cells by 2 d after stimulation. Thus, we conclude that LPS stimulation does not induce LPMs to differentiate to SPMs, and hence that LPM differentiation does not account for the increase in SPM frequency.

In contrast, examination of host PerC cells shows clearly that LPS stimulation induces a massive influx of cells that initially express the phenotype of the circulating monocytes in blood (Ly-6C^{hi}MHC-II^{-}). With time, the phenotype expressed by this large population of "monocytes" shifts toward the typical Ly-6C^{-}MHC-II^{hi} SPM phenotype (Fig. 6). Thus, our findings indicate that a wave of blood monocytes enters the PerC shortly after LPS stimulation and, over time, differentiates to SPMs.

Thioglycolate-Elicited MØ. Intraperitoneal injection of thioglycolate is widely used to enrich the yield of so-called activated PerC MØ, which are commonly collected 4 d after thioglycolate stimulation for use in functional MØ assays (12–14). Examination of PerC harvested from thioglycolate-stimulated animals at this time shows a shift in SPM and LPM frequencies similar to that induced by LPS (Fig. 8). LPM, normally the dominant PerC MØ subset, is

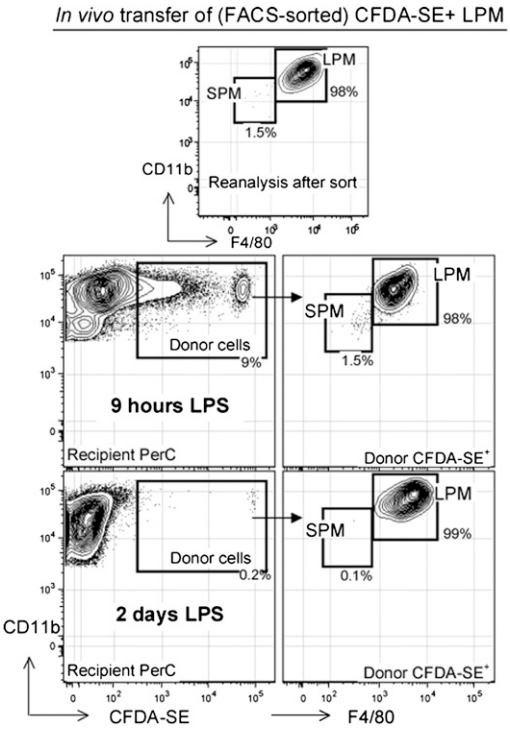


Fig. 7. SPMs are developmentally independent from LPMs. FACS-sorted and CFDA-SE-labeled LPMs (2×10^5) were injected i.p. into BALB/c recipients. Recipient mice were injected i.p. with LPS and, after 9 h or 2 d, PerC cells were harvested and stained and donor (CFDA-SE^+) cells were analyzed for surface phenotype.

barely detectable (<5% of total MØ). Thus, 4 d after thioglycolate stimulation, the myeloid population in PerC mainly contains SPM (FSc^{low}, CD11b^{int}, F4/80^{low}, Ly-6C^{-}, Gr-1^{-}). However, it also contains a small subset of monocytes (Ly-6C^{hi}) that most likely have infiltrated from blood (Fig. 8).

In addition, as in the response to LPS stimulation, we find that the monocyte population in thioglycolate-stimulated PerC shifts with time toward expression of the SPM phenotype. From d 1 onward, the "monocytes" in the thioglycolate-stimulated PerC show decreasing levels of Ly-6C and, somewhat later, increasing levels of MHC-II. By d 4, SPMs predominate with only a small percentage of cells expressing a typical monocyte phenotype (Fig. 8).

Overall, these findings indicate that results from studies with thioglycolate-elicited MØ may mainly reflect the behavior of SPMs and of monocytes that have recently developed into SPMs. However, it is important to recognize that, in addition to MØ, and regardless of harvest day, thioglycolate-stimulated PerC commonly contains additional subsets of immune cells that may participate in the responses being measured. Notably, on d 1 after stimulation, neutrophils can outnumber MØ and lymphocytes. Further, even on d 4, lymphocytes and granulocytes can be present in relatively large numbers (Fig. S1) and can complicate interpretation of findings putatively as a result of the activity of thioglycolate-elicited PerC "macrophages."

Discussion

Phenotypic and functional evidence presented here demonstrates that there are two distinct subsets of MØ in the mouse PerC. We provisionally refer to these subsets as SPMs and LPMs, as they differ in size as determined either by visual observation or by flow cytometric light-scatter measurements. Both subsets phagocytize bacteria in vivo (Fig. 4), and both express the canonical F4/80 and CD11b MØ markers (Fig. 1). However, as we have shown, they differ both qualitatively and quantitatively with respect to expression of several surface markers, including a key difference in the expression of MHC-II, which is expressed by SPMs but not LPMs (Table 1).

In addition, and perhaps most importantly from the standpoint of interpretation of functional data from studies with peritoneal MØ, SPMs and LPMs differ markedly in both their in vitro and in vivo responses to inflammatory stimuli (i.e., LPS or thioglycolate). In vitro, LPS induces LPMs to produce high levels of intracellular NO but fails to induce NO production by SPMs (Fig. 5*A*), even though the SPMs and LPMs are coharvested, cocultured, and costimulated in the same vessel. In vivo, in contrast, LPS stimulates NO production by both LPMs and SPMs, and in fact stimulates more NO production by SPMs than by LPMs (Fig. 5*B*).

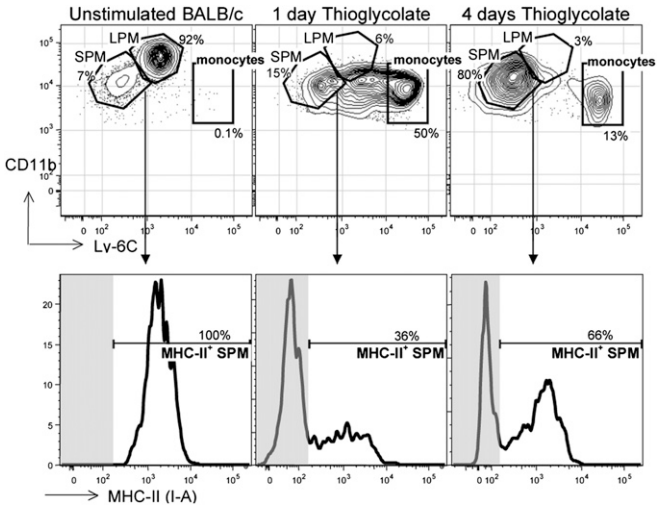


Fig. 8. Thioglycolate stimulation dramatically changes the SPM:LPM ratio. BALB/c mice were injected i.p. with 1 mL of thioglycolate broth. After 1 d and 4 d, PerC cells were analyzed for the presence of myeloid cells. SPMs and LPMs were identified as in Fig. 1. Neutrophils and eosinophils were best gated out from this analysis by using the gating strategy shown in Fig. S1.

Thus, our findings demonstrate that LPMs can respond to stimulation with microbial products presented either in vitro or in vivo. However, SPMs can respond only in a supportive environment, either because these cells are selectively sensitive to an inhibitor encountered in the culture or, more likely, because they require an additional stimulus/signal provided by the in vivo environment.

In principle, the production of NO by SPMs and LPMs should provide a basis for classifying these MØ subsets within the M1 and M2 framework, which assigns inflammatory responses to the M1 subset (2, 6, 7, 15). However, the distinctive responses mounted by LPMs and SPMs to LPS stimulation make it difficult to map LPMs and SPMs into the M1/M2 model. Our in vitro stimulation data would suggest that only LPMs should be classified as M1 because LPMs produce NO in response to LPS stimulation whereas SPMs do not. Conversely, our in vivo stimulation data put both LPMs and SPMs into the M1 classification because both produce large amounts of NO in response to LPS. Therefore, the M1/M2 framework does not readily accommodate the SPM and LPM subsets, or vice versa.

Similarly, there is no clear way to retrospectively assign functions established for thioglycolate-stimulated PerC MØ to LPM or SPM. By 4 d after stimulation, very few cells with the typical LPM phenotype are detectable. Because we have shown that LPMs do not differentiate to SPMs or other peritoneal cells (Fig. 7), we conclude broadly that thioglycolate stimulation kills LPMs, forces them to migrate out of PerC, or stimulates them to adhere to the margins of the peritoneum. SPMs, in contrast, flourish in response to thioglycolate stimulation and become the dominant PerC MØ subset, in part because of the loss of LPMs but mainly because of the influx of blood monocytes and the differentiation of these cells to SPMs (Fig. 8). Under conditions used in previous studies, however, the shift we observe may not have been as dramatic. Further, it is important to recognize that functional activities that were detected could also be a result of other remaining (i.e., resident) or elicited cells in PerC (Fig. S1). Thus, at present, one can at best guess that most of the functions previously attributed to thioglycolate-elicited "macrophages" largely reflect SPM functional activity.

In any event, the changes induced by LPS and thioglycolate stimulation open a window on the origins of SPMs. These stimulations result in the rapid entry of a sizable population of blood monocytes (Ly-6C^{hi}MHC-II^{-}) into PerC and the gradual differentiation of these cells to cells that express the typical SPM phenotype (Ly-6C^{-}MHC-II^{hi}; Fig. 8). This developmental process appears to continually be occurring at low levels in unstimulated PerC (Figs. 6 and 8). However, without the severe disruption of the peritoneal economy by LPS or thioglycolate stimulation, it would have been difficult to detect this apparently continuous developmental process.

These findings extend the model presented by Geissmann and coworkers (8, 9, 16), which subdivides blood monocytes into two subsets: an Ly-6C^{-} "resident monocyte" subset that ultimately differentiates to resident tissue MØ and an Ly-6C^{hi} "inflammatory monocyte" subset that infiltrates tissues following inflammatory stimuli. Consistent with this model, we show that Ly-6C^{hi} blood monocytes infiltrate PerC after inflammatory stimulation but, importantly, we add that this infiltrating subset contains the progenitors for SPMs, which are appropriately defined as resident PerC MØ. Ly-6C^{-} monocytes can also enter PerC and replenish SPMs under some conditions (16). However, our findings clearly indicate that inflammation induced by LPS or thioglycolate stimulation induces the infiltration of Ly-6C^{hi}

inflammatory blood monocytes that differentiate to SPMs that are phenotypically indistinguishable (currently) from typical resident SPMs in PerC from unstimulated animals.

In contrast, our data do not provide insights into the origins of the resident LPM subset in PerC. It could be replenished from the large pool of SPMs present in the stimulated PerC, but we have no data to indicate that this is so.

Conversely, our demonstration that approximately half of the SPMs in PerC express the L-selectin CD62L (Fig. S3) supports the idea that appropriately stimulated SPMs may migrate to lymph nodes and serve as antigen-presenting cells. Indeed, a recent study (17) shows that i.p. immunization with antigen plus alum results in the migration of myeloid cells to lymph nodes, where they differentiate to DCs that can participate in stimulating antibody responses. As the phenotype of the migrating cells was shown to be similar to the SPM phenotype, we suggest that SPMs are sensitive to alum immunization and respond by migrating to locations where they can trigger immune responses.

Materials and Methods

Mice and Tissue Preparation. BALB/c, C57BL/6, 129/S6, FVB/N, SJL/J, and RAG1-KO mice, 6 to 8 weeks old, were purchased from Jackson Labs or bred locally. All mice were maintained at the Stanford Medical School Animal Care Facility. All experiments were conducted with institutional animal care and use committee approval. Peritoneal cells were harvested by injecting 7 mL of staining medium (deficient RPMI plus 3% newborn calf serum) into PerC. Spleen and lymph nodes were disrupted and resuspended to obtain single cell suspensions. Mouse blood was drawn into heparin-containing PBS solution. All cell samples were resuspended at 25×10^6 cells/mL using custom RPMI 1640 medium deficient in biotin, L-glutamine, phenol red, riboflavin, and sodium bicarbonate (Invitrogen).

FACS. Cell suspensions were preincubated with anti–CD16/CD32 mAb to block FcγRII/III receptors and stained on ice for 15 min. with the following fluorochrome-conjugated mAb in an 11-color staining combination: FITC-labeled anti-Ly-6C (AL-21), F4/80 (BM8), CD80 (16-10A1), or CD49b (DX5); PE-labeled anti–I-A^d (AMS-32.1), H-$2K^d$ (SF1-1.1), CD40 (3/23), TLR4-MD-2 (MTS510), or CD49b (DX5); PECy5-labeled anti-CD5 (53–7.3); PECy5.5-labeled anti-CD19 (1D3) or CD11c (N418); PECy7-labeled anti–Gr-1 (RB6-8C5) or IgM (331); APC-labeled anti-B220 (RA3–6B2), CD86 (GL-1), CD117 (c-kit 2B8) or AA4.1; Alexa700-labeled anti-IgD (11-26); APCCy7-labeled anti-CD11b (M1/70); Pacific Blue–labeled anti-F4/80 (BM8) or Gr-1 (RB6-8C5) and biotin-labeled anti-CD11c (HL3). Cells were then washed and stained again on ice for 15 min with streptavidin Qdot 605 (Invitrogen) to reveal biotin-coupled antibodies. Antibodies were either purchased (Invitrogen and BD Pharmingen) or conjugated in our laboratory. After washing, stained cells were resuspended in 10 μg/mL propidium iodide, to exclude dead (i.e., propidium iodide–negative) cells. Cells were analyzed and sorted on Stanford FACS facility instruments (Becton Dickinson LSRII or FACSAria). Data were collected for 0.2 to 1×10^6 cells. Staining protocols were designed with CytoGenie software (WoodSideLogic); data were analyzed with FlowJo software (TreeStar). To distinguish autofluorescent cells from cells expressing low levels of individual surface markers, we established upper thresholds for autofluorescence by staining samples with fluorescence-minus-one control stain sets (18, 19) in which a reagent for a channel of interest is omitted.

In Vitro and in Vivo Stimulation. In vitro, 10^6 PerC cells were cultured with and without 1μg/mL of LPS (*E. coli* 055:B5; Sigma) in a final volume of 500 μL of RPMI-1640 plus 10% FCS. Cells were incubated at physiologic oxygen levels (5% O_2) for indicated times. For NO measurement, cells were resuspended in 1mL of medium containing 0.1% probenecid (pH 7.4) and maintained subsequently in this medium. Cells were incubated in the presence of 1 μM of 4-amino-5-methylamino-2′,7′-difluorescein (DAF-FM) diacetate (Molecular Probes) at room temperature for 30 min and stained and analyzed by flow cytometry. In vivo, 1 mL of thioglycolate broth or 5 μg or 10 μg of LPS (in 200 μL of PBS solution) were injected i.p. At indicated times, PerC was harvested, stained, and analyzed.

In Vivo Phagocytosis Assay. *E. coli* (K-12) bacteria (5×10^6) expressing GFP were taken from overnight culture and resuspended in 500 μL of PBS solution. The GFP^+ bacteria were then injected into the PerC of BALB/c mice. After 2 h, total PerCs were harvested, stained, and analyzed for the presence of GFP^+ bacteria.

Confocal Microscopy. GFP^+ SPMs and LPMs were FACS-sorted directly onto a coverslip, fixed in 4% formalin for 15 min, washed in PBS solution, and air-dried. Finally, the coverslip was mounted to the slide using ProLong Gold antifade reagent containing DAPI (Invitrogen; Molecular Probes). The images were collected on a microscope (Optiphot-2; Nikon) attached to a confocal laser scanning (MRC1024; Bio-Rad) by using LaserSharp software (Bio-Rad). To identify extracellular bacteria, we used primary rabbit polyclonal anti-LPS followed by Alexa594-labeled goat anti-rabbit antibodies. Thus, bacteria that have remained attached on the cell membrane (not internalized) appear red. Internalized bacteria were visualized as green. The blue staining shows phalloidin coupled to Alexa647, which stains actin and gives the outline of the cell cytoplasm. Volocity 3.0 software (Improvision) was used to format and then merge the green (GFP), red (Alexa594), and blue (Alexa647) images. To measure individual cell size (Fig. 2), differential interference contrast images were acquired by confocal microscopy (LSM 510 META; Zeiss) with a ×63 Plan Apochromat objective lens (NA 1.4). Cell diameter was determined using Zeiss software.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Megan Phillips for outstanding technical help, Thomas Henry for bacterial killing by MØ; Lauren Higdon for MHC staining; Robert Axtell for supportive discussion; P. Sadate-Ngatchou, N. Zimmerman, K. Atkuri, and Y. Gernez for critical reading of this manuscript; and John Mantovani and Claudia Weber for administrative support. This work was supported by National Institutes of Health Grant AI076434.

1. Taylor PR, Brown GD, Geldhof AB, Martinez-Pomares L, Gordon S (2003) Pattern recognition receptors and differentiation antigens define murine myeloid cell heterogeneity ex vivo. *Eur J Immunol* 33:2090–2097.
2. Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5:953–964.
3. Taylor PR, et al. (2005) Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol* 23:901–944.
4. Cohn ZA (1968) The structure and function of monocytes and macrophages. *Adv Immunol* 9:163–214.
5. van Furth R (1985) Monocyte production during inflammation. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 8:205–211.
6. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM (2000) M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164:6166–6173.
7. Mantovani A, et al. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25:677–686.
8. Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19:71–82.
9. Geissmann F, et al. (2008) Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol* 86:398–408.
10. Steinman RM, Moberg CL (1994) Zanvil Alexander Cohn 1926-1993. *J Exp Med* 179:1–30.
11. Bogdan C, Schleicher U (2006) Production of interferon-gamma by myeloid cells—fact or fancy? *Trends Immunol* 27:282–290.
12. Cohn ZA (1978) Activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy, and future. *J Immunol* 121:813–816.
13. Lagasse E, Weissman IL (1996) Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *J Immunol Methods* 197:139–150.
14. Takahashi M, Galligan C, Tessarollo L, Yoshimura T (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), not MCP-3, is the primary chemokine required for monocyte recruitment in mouse peritonitis induced with thioglycollate or zymosan A. *J Immunol* 183:3463–3471.
15. Martinez FO, Helming L, Gordon S (2009) Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 27:451–483.
16. Auffray C, et al. (2007) Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317:666–670.
17. Kool M, et al. (2008) Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 205:869–882.
18. Roederer M (2001) Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry* 45:194–205.
19. Herzenberg LA, Tung J, Moore WA, Herzenberg LA, Parks DR (2006) Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nat Immunol* 7:681–685.

ANEXO II

Cellular Renewal and Improvement of Local Cell Effector Activity in Peritoneal Cavity in Response to Infectious Stimuli

Alexandra dos Anjos Cassado[1,2], José Antônio Tavares de Albuquerque[2], Luiz Roberto Sardinha[3], Carina de Lima Buzzo[1,2], Lucas Faustino[2], Rogério Nascimento[2], Eliver Eid Bou Ghosn[4], Maria Regina D'Império Lima[2], Jose Maria Mosig Alvarez[2], Karina Ramalho Bortoluci[1]*

1 Departamento de Ciências Biológicas, Campus Diadema e Centro de Terapia Celular e Molecular (CTC-Mol), Universidade Federal de São Paulo, Diadema, São Paulo, Brasil, **2** Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, **3** Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, São Paulo, Brasil, **4** Department of Genetics, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, United States of America

Abstract

The peritoneal cavity (PerC) is a singular compartment where many cell populations reside and interact. Despite the widely adopted experimental approach of intraperitoneal (i.p.) inoculation, little is known about the behavior of the different cell populations within the PerC. To evaluate the dynamics of peritoneal macrophage (MØ) subsets, namely small peritoneal MØ (SPM) and large peritoneal MØ (LPM), in response to infectious stimuli, C57BL/6 mice were injected i.p. with zymosan or *Trypanosoma cruzi*. These conditions resulted in the marked modification of the PerC myelo-monocytic compartment characterized by the disappearance of LPM and the accumulation of SPM and monocytes. In parallel, adherent cells isolated from stimulated PerC displayed reduced staining for β-galactosidase, a biomarker for senescence. Further, the adherent cells showed increased nitric oxide (NO) and higher frequency of IL-12-producing cells in response to subsequent LPS and IFN-γ stimulation. Among myelo-monocytic cells, SPM rather than LPM or monocytes, appear to be the central effectors of the activated PerC; they display higher phagocytic activity and are the main source of IL-12. Thus, our data provide a first demonstration of the consequences of the dynamics between peritoneal MØ subpopulations by showing that substitution of LPM by a robust SPM and monocytes in response to infectious stimuli greatly improves PerC effector activity.

Citation: Cassado AdA, de Albuquerque JAT, Sardinha LR, Buzzo CdL, Faustino L, et al. (2011) Cellular Renewal and Improvement of Local Cell Effector Activity in Peritoneal Cavity in Response to Infectious Stimuli. PLoS ONE 6(7): e22141. doi:10.1371/journal.pone.0022141

Editor: Patricia T. Bozza, Fundação Oswaldo Cruz, Brazil

Received January 26, 2011; **Accepted** June 16, 2011; **Published** July 22, 2011

Copyright: © 2011 Cassado et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Brazil) (grant 08/50958-8 to KRB), Brazilian Research Council (CNPq-Brazil) and CAPES. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: kbortoluci@gmail.com

Introduction

The mouse peritoneal cavity (PerC) is a unique environment characterized by the co-habitation and interaction of many cell types, like within secondary lymphoid organs. In steady state conditions, the majority of peritoneal cells (PC) are macrophages (MØ) and B-1 cells; conventional B-2 cells, T cells, natural killer (NK) cells, dendritic cells (DC) and granulocytes (mostly eosinophils) are also present [1,2]. In addition to the complexity of the cellular composition in the PerC, we have recently demonstrated that peritoneal MØ comprise two distinct subsets named small peritoneal MØ (SPM) and large peritoneal MØ (LPM) [1]. SPM and LPM differentially express a variety of surface markers, including pattern recognition receptors (PRR) and proteins involved in antigen presentation and cell migration [1]. Importantly, SPM and LPM appear to have distinct responses to LPS stimulation *in vitro* and *in vivo*, indicating that these peritoneal MØ cannot be considered a single population.

As a heterogeneous population, MØ play a wide range of roles in the immune system; they are involved in the removal of apoptotic cells and cellular debris under steady state conditions [3], microorganism ingestion and elimination [4,5], antigen presentation and consequent T cell activation [6,7], resolution of inflammatory processes, angiogenesis and tissue repair [8]. The functionality of MØ subsets is influenced by factors that include their maturation state and activation profile.

The maturation state influences the functional behavior of MØ; their performance is particularly compromised as they age [9–14]. Age-related debilitation is reflected in activities associated with MØ microbicidal function, including impairment in phagocytic ability and in the production of inflammatory cytokines, chemokines and free radicals; additionally, expression of MHCII molecules is diminished, which may contribute to poor $CD4^+$ T cell responses. Morphologically, senescent MØ adopt a flattened, enlarged morphology and exhibit molecular markers like the senescence-associated β-galactosidase (β-gal) [15]. Accumulation of senescent MØ can compromise the tissues architecture and fitness [9–13].

MØ subsets can assume distinct functional profiles depending on environmental stimuli. Classically-activated MØ, also known as M1 MØ, are generated in the presence of LPS and IFN-γ; they exhibit high microbicidal ability and secrete pro-inflammatory cytokines [16–19]. Conversely, alternative or M2 MØ are generated in the presence of immune-complexes (IC) or Th2 cytokines and appear to be responsible for the control of

inflammatory processes and tissue repair. They have also been implicated in managing helminth infections [20,21].

It is reasonable to assume that in each tissue, MØ develop particular characteristics and become capable of unique functions. For instance, osteoclasts have the unique capacity for bone remodeling, alveolar MØ possess the ability for self/non self discrimination and lamina propria MØ exhibit high microbicidal and phagocytic capacities coupled with low production of pro-inflammatory cytokines [5]. However, distinct MØ subpopulations have been found in the same environment [1,5], and little is known about their relative contribution to tissue/organ function. Since the majority of studies focus on *in vitro* MØ activities, many questions about MØ behavior and function inside tissue microenvironments remain unsolved. In the present work, we examined the dynamics between SPM and LPM within the PerC in response to exposure to zymosan, an insoluble carbohydrate from the cell wall of yeast, and live *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) parasites.

Materials and Methods

Mice and parasites

Six- to eight-week-old female C57BL/6 mice were bred in our animal facilities at the University of São Paulo under standard pathogen-free conditions. All animal studies and protocols were approved by the University of São Paulo Committee for the Use and Care of Animals (Number 109/07). *T. cruzi* trypomastigotes of the Sylvio-X10/4 strain were purified from LLC-MK_2 cells (a monkey epithelial cell line derivative from American Type Culture Collection (ATCC CCL-7), USA).

Peritoneal cell suspensions

Peritoneal cells (PC) were harvested by flushing the PerC of mice, as previously described [22]. Total PC and purified peritoneal MØ subsets obtained after cell-sorting were cultured in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with L-glutamine (2 mM) and 3% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) at 37°C and 5% CO_2. All supplements were purchased from Life Technologies (Rockville, MD).

In vivo stimulation

For *in vivo* stimulation assays, mice were injected i.p. with zymosan particles (1 mg/mouse) or *T. cruzi* trypomastigotes of the Sylvio-X10/4 strain (10^6 parasites/mouse). PC were harvested after 30 min or 48 h.

In vitro stimulation

Total PC (10^6 cells) from naive or *in vivo*-inoculated mice were cultured for 10 h in the presence of brefeldin A (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) at 37°C and 5% CO_2. Cells were stimulated with LPS from *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich) (1 μg/mL) and rIFN-γ (5 ng/mL) (BD Biosciences). Purified MØ subsets (2×10^5) were cultured in 8-well chambers for 12 h at 37°C and 5% CO_2. Next, cells were fixed and labeled according to the InstantProv KIT (NewProv, Brazil) instructions.

Flow cytometry

Cells were phenotypically analyzed by flow cytometry as previously described [23], with some modifications. Briefly, cell suspensions were stained for 30 min with a combination of following biotin- or fluorochromes- conjugated monoclonal antibodies (mAbs): fluorescein-isothiocyanate (FITC)-labeled anti-F4/80 (CI:A3-1) (Serotec, Düsseldorf, Germany); phycoerythrin (PE)-labeled anti-CD80 (16-10A1), anti-CD86 (GL1), anti-CD40 (3/23), anti-CD11b (M1/70), anti–IA^b (AF6-120.1) or anti-LY6C (AL-21) (BD Biosciences); allophycocyanin (APC)-labeled anti-CD19 (1D3) (BD Biosciences), PerCP- conjugated anti-CD11c (HL3) (BD Biosciences) and biotin-conjugated anti–IA^b (AF6-120.1), anti-TLR-4 (MTS510), anti-DC-Sign (5H10/CIRE) (BD Biosciences) or anti-Dectin-1 (2A11) (Serotec). For the detection of biotinylated antibodies, streptavidin-Alexa Fluor 405 (BD Biosciences) was used. For the detection of intracellular IL-12, PC were stained using the combination of FITC-labeled anti-F4/80, APC-labeled anti-CD19, PerCP- labeled anti-CD11c (HL3) and biotin-conjugated anti–IA^b (AF6-120.1) as described above, fixed with Cytofix (BD Biosciences) for 20 min, and then incubated with PE-labeled polyclonal anti-mouse antibodies against IL-12p70 (C15.6) (BD Biosciences) for 30 min in Cytoperm buffer (BD Biosciences) [24]. For all experiments, 2×10^5 events were acquired. All acquisitions were performed using a 5-color staining combination and acquired on FACSCalibur or FACSCanto II (BD Biosciences). Analysis was carried out with FlowJo software (Tree Star). Fluorescence-minus-one (FMO) controls [23,25] were used to distinguish positive staining from autofluorescent cells. Peritoneal MØ subsets were sorted using a FACSVantage (BD Biosciences), according to the parameters described in Fig. S1.

Adherent-cell culture

PC obtained from control and injected animals (6×10^5 cells) were incubated in 96-well plates (Costar) for 4 h at 37°C and 5% CO_2. The non-adherent cells were removed by vigorous washes with RPMI medium.

Nitric Oxide measurement

Adherent PC from control and injected mice were cultured with medium, LPS from *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich) (1 μg/mL) or LPS plus rIFN-γ (5 ng/mL) (BD Biosciences); supernatants were harvested after 48 h. Culture supernatants were assayed for NO by the Griess reaction. Briefly, 50 μl of supernatant was incubated with 50 μl of Griess reagent for 5 min at room temperature. Nitrite concentration was determined by measuring the optical density at 550 nm in reference to a standard sodium nitrite solution.

β-Galactosidase (β-Gal) staining

β-Gal staining was performed following the conventional protocol for senescence associated (SA)-β-gal staining [15]. Briefly, adherent-PC from naive or injected mice were fixed in 2% formaldehyde/0.2% glutaraldehyde for 5 min at room temperature, washed with PBS and then incubated overnight at 37°C with β-Gal staining solution at pH 6.0. β-Gal solution was composed of 1 mg/mL of X-gal (5-bromo-4-chloro-3 indolyl–galactopiranoside); 40 mM of citric acid/sodium phosphate, pH 6.0; 150 mM sodium chloride; 2 mM magnesium chloride; 5 mM potassium ferrocyanide; and 5 mM potassium ferricyanide. Cells were observed by phase contrast on a Nikon TS100 microscope and photographed at 40× magnification.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the unpaired analysis of variance ANOVA (Tukey Test) test. Differences between two groups were considered significant when $p<0.05$.

Results

F4/80 and MHCII expression distinguishes LPM and SPM

Utilizing a high-dimensional digital FACS with 11-color combination, we recently demonstrated that peritoneal MØ comprises two distinct subpopulations, namely large (LPM) and small peritoneal MØ (SPM); these subpopulations have pheno-

types and functions distinct from monocytes and DC [1]. Here, we demonstrate that these two subpopulations can also be identified using a 4-color flow cytometry staining panel. First, doublet cells (Fig. 1A) and CD19^{high} cells (Fig. 1B) were excluded. Next, CD11c^{high} cells were excluded to eliminate remaining DC (Fig. 1C). The Side Scatter (SSC) profile and F4/80 expression revealed two distinct F4/80^{+} subpopulations among CD19$^{neg/verylow}$CD11c$^{neg/verylow}$ cells (Fig. 1D). In addition, analysis of F4/80^{+} cells according to MHCII (IA^{b}) expression defined three distinct subpopulations (Fig. 1E). Sorting of each population revealed that F4/80^{high}IA^{b-neg}, F4/80^{low}IA^{b-high} and F4/80^{low}IA^{b-neg} correspond, respectively, to LPM, SPM and granulocytes (mostly eosinophils) (Fig. 1F). After 12 h in culture, SPM acquire a polarized morphology whereas LPM exhibit prominent vacuolization. Granulocytes appear to die after *in vitro* culture (Fig. 1G). As granulocytes present a typical SSC profile with no MHCII expression (Fig. 1F and Fig. S1A), F4/80^{+} cells were gated to exclude F4/80^{low}SSC^{high} cells to establish the efficient identification of peritoneal MØ subsets (Fig. S1B). Using a 5-color flow cytometry staining panel, we observed that SPM and LPM displayed the typical expression of surface markers, as previously demonstrated [1] (Table 1). In addition to the previous published phenotypic features [1], higher expression of the endocytic receptors Dectin-1 and DC-Sign (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin, CD209) was observed in SPM as compared to LPM (Table 1).

Table 1. Phenotypic analysis of resident peritoneal MØ subsets.

Surface molecule	LPM	SPM
F4/80	1970	90
CD11b	1700	30
IA^{b} (MHC-II)	= FMO	3100
CD80	140	100
CD86	250	10
CD40	270	230
TLR4	150	80
DC-Sign	10	100
Dectin-1	840	1600
Ly6C	= FMO	= FMO

SPM and LPM were gated as shown in Figure 1 and the median fluorescence intensity (MFI) of F4/80, CD11b, IA^{b}, CD80, CD86, CD40, LY6C, DC-SIGN, Dectin-1 and TLR4 was analyzed by flow cytometry. All acquisitions were performed using a 5-color staining combination. The value for the expression of each surface marker was obtained by subtracting the MFI of the fluorescence-minus-one control (FMO) from the MFI of the whole stained cell population [23,25], as described in the Materials and Methods (M&M) section. Data are representative of more than 3 independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0022141.t001

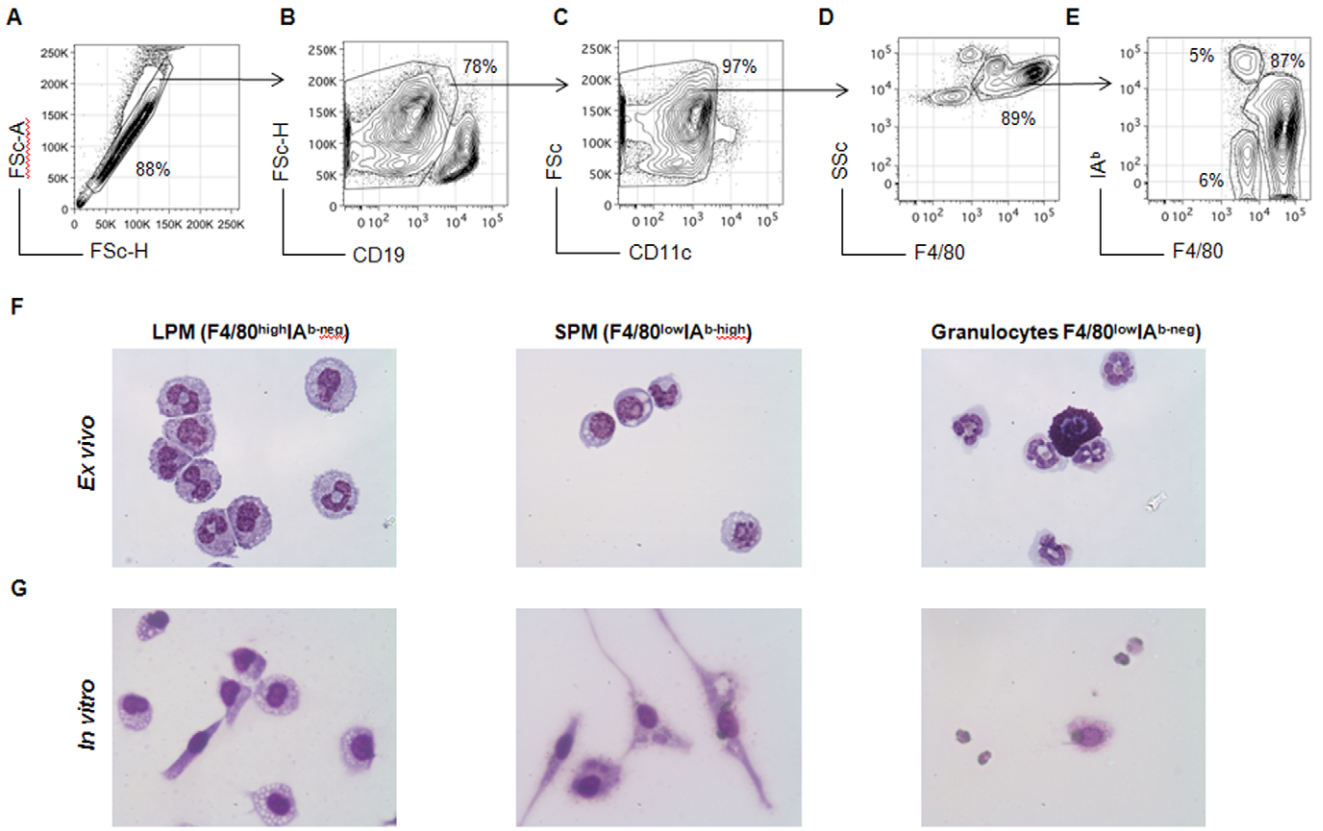


Figure 1. Identification of resident peritoneal MØ subsets. PC from C57BL/6 were harvested and stained with fluorochrome-labeled antibodies directed against F4/80, CD19, CD11c and IA^{b} for flow cytometry analysis. (**A**) Doublet cells were excluded according to forward scatter profiles (FSC-A and FSC-H). Subsequently, (**B**) CD19^{high} cells and (**C**) CD11c^{high} cells were also excluded, and (**D**) F4/80^{+} cells were selected. (**E**) F4/80 and IA^{b} expression defined three populations: LPM (F4/80^{high}IA^{b-neg}), SPM (F4/80^{low}IA^{b-high}) and granulocytes (F4/80^{low}IA^{b-neg}). These three subpopulations were purified by cell sorting on a FACS Vantage, and their morphology was evaluated *ex vivo* from cytospin slides (**F**), or after *in vitro* culture in chamber slides for 12 h (**G**). Slides were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and analyzed by optical microscopy (40×).
doi:10.1371/journal.pone.0022141.g001

Zymosan and *T. cruzi* exposure alter the balance between SPM and LPM

The PerC is a dynamic compartment that selectively attracts immune cells, particularly in response to injury, which can result in major alteration in their cellular composition. To evaluate the dynamics of LPM and SPM in response to infectious stimuli, C57BL/6 mice were injected i.p. with zymosan or live *T. cruzi* trypomastigotes, and PC were collected after 30 min or 48 h. Minor alterations

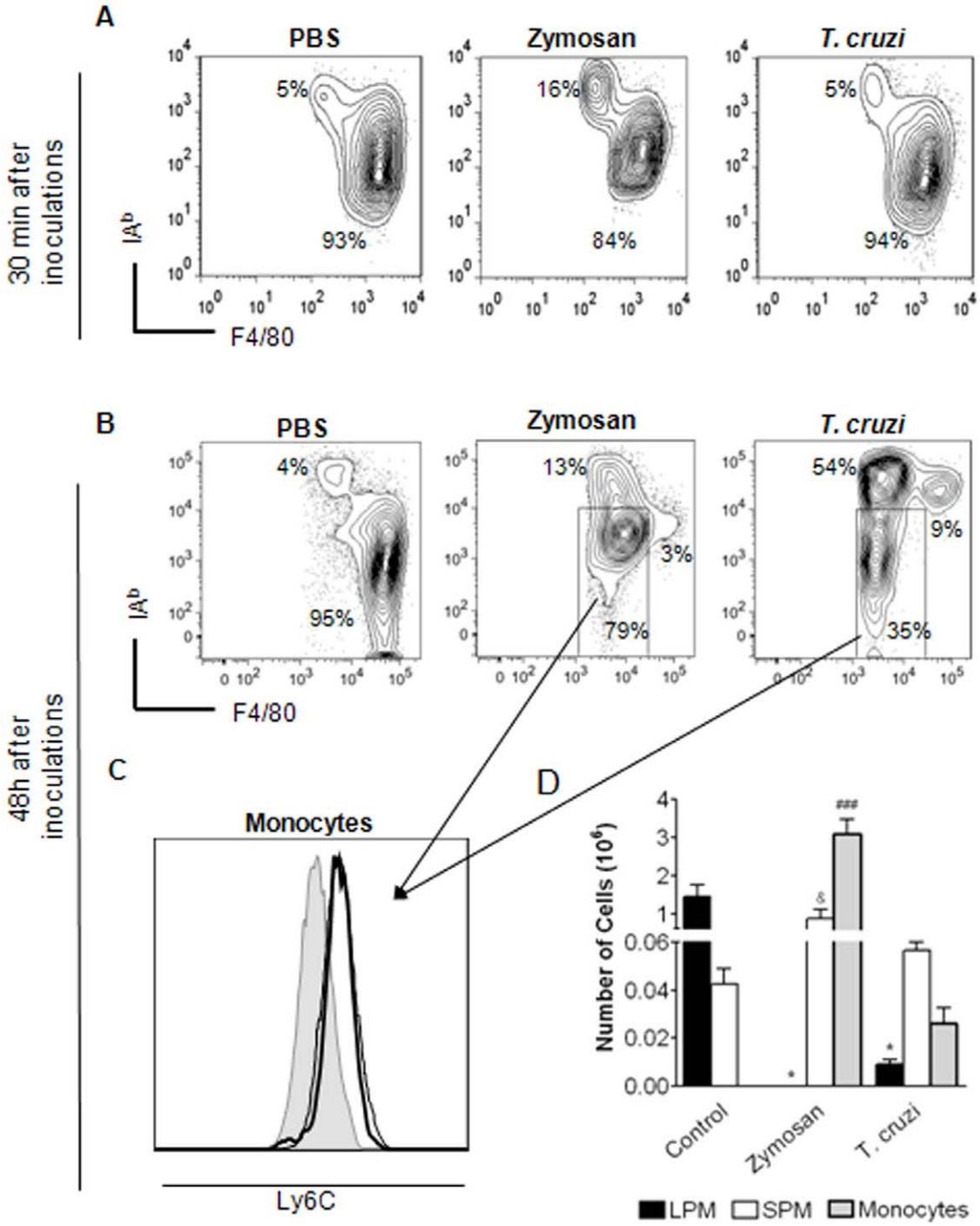


Figure 2. Zymosan and *T. cruzi* injection alters the MØ compartment of PerC. C57BL/6 mice were injected i.p. with zymosan (1 mg/mouse) or *T. cruzi* (10^6 parasites/mouse) and at 30 min (**A**) or 48 h (**B**) after stimulation, PC from naive and injected mice were harvested and stained as described in M&M. Sequential gates were made as shown in Fig. S1. Plots show the frequencies of each subpopulation. (**C**) F4/80^{low}MHCII^{int} cells present within PerC 48 h after injections were evaluated according the expression of Ly6C. Gray lines represent FMO [23,25], the black lines show F4/80^{low}MHCII^{int} cells from zymosan- (hairline) or *T. cruzi*-(bold line)-exposed PerC. (**D**) Total numbers of SPM, LPM and monocytes 48 h after zymosan or *T. cruzi* exposure (within MØ gate) are shown in panel. Data are representative of more than 3 independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0022141.g002

in cell numbers and composition were observed at early time points after i.p. injections (Fig. 2A and data not shown); however, an increase in the frequency of SPM in response to zymosan was observed (Fig. 2A). Conversely, 48 h after zymosan and *T. cruzi* exposure there was a clear alteration in the myelo-monocytic cell compartment of the PerC, characterized by a dramatic decrease in the numbers of LPM coupled with increased frequency of SPM (Fig. 2B and 2D). Moreover, a massive influx of cells with a monocytic phenotype (F4/80^{low}MHCII^{int}Ly-6C^{+}) was noted (Fig. 2B, 2C and 2D). Since both SPM and monocytes that infiltrate PerC showed same levels of F4/80, they were distinguished by Ly-6C and MHCII expression. SPM displayed high levels of MHCII and Ly-6C expression was found only on monocytes (Fig. 2B, 2C and Table 1). The enrichment of monocytes was particularly observed after zymosan exposure when F4/80^{low}MHCII^{int}Ly-6C^{+} cells became the dominant population in the PerC (Fig. 2D). Interestingly, 48 h after *T. cruzi* stimulation, cells displaying the phenotypic features of SPM (F4/80^{low}MHCII^{hi}Ly-6C^{-}) become the major peritoneal myeloid cell population (Fig. 2B and 2D). Despite the fact that *T. cruzi* and zymosan induce distinct modifications in the PerC, both stimuli led to SPM dominancy over LPM.

Modification in the myelo-monocytic compartment results in the PerC cellular renewal and improvement of nitric oxide and IL-12 responses to a subsequent LPS stimulation

Given that peritoneal myelo-monocytic cell composition is profoundly altered 48 h after zymosan and *T. cruzi* exposure, we decided to examine the impact of this alteration for the renewal and response of PC to a subsequent LPS stimulation. As it is well established that senescent cells can accumulate in tissues compromising tissue fitness [9–13,15], we compared β-Gal expression, a marker of cell senescence [15], in PerC from control and 48 h-zymosan or *T. cruzi*-exposed mice. For the enrichment of cells from myelo-monocytic lineage (LPM and SPM within control PerC; SPM and monocytes within stimulated PerC), only adherent cells from PerC were analyzed (a cell population containing 98% of MØ and/or monocytes – data not shown). While a great majority of adherent PC from control mice was positive for β-Gal, a significant reduction in the staining was observed in PC from mice exposed to zymosan and *T. cruzi* (Fig. 3A). Moreover, the frequency of β-Gal-positive cells in control mice correlated with the frequency of LPM present among peritoneal MØ (Fig. 1 and Fig. 2); this finding suggests that the majority of LPM is senescent. In addition, adherent PC from control mice were unable to secrete nitric oxide (NO), a potent microbicidal molecule, even after subsequent LPS stimulation (Fig. 3B). Although adherent PC from *T. cruzi*-exposed mice were able to secrete NO in the absence of LPS, high levels of NO were found in LPS-stimulated PC from both zymosan- and *T. cruzi*-exposed mice (Fig. 3B). As IL-12 is involved in the ability of MØ to secrete NO in response to LPS and IFN-γ [26–30], we next examined the frequency of IL-12-producing cells. After *in vitro* LPS stimulation, two to three times higher frequencies of IL-12-producing cells were found within myelo-monocytic cells from mice exposed to zymosan and *T. cruzi* in comparison to the untreated control mice (Fig. 3C).

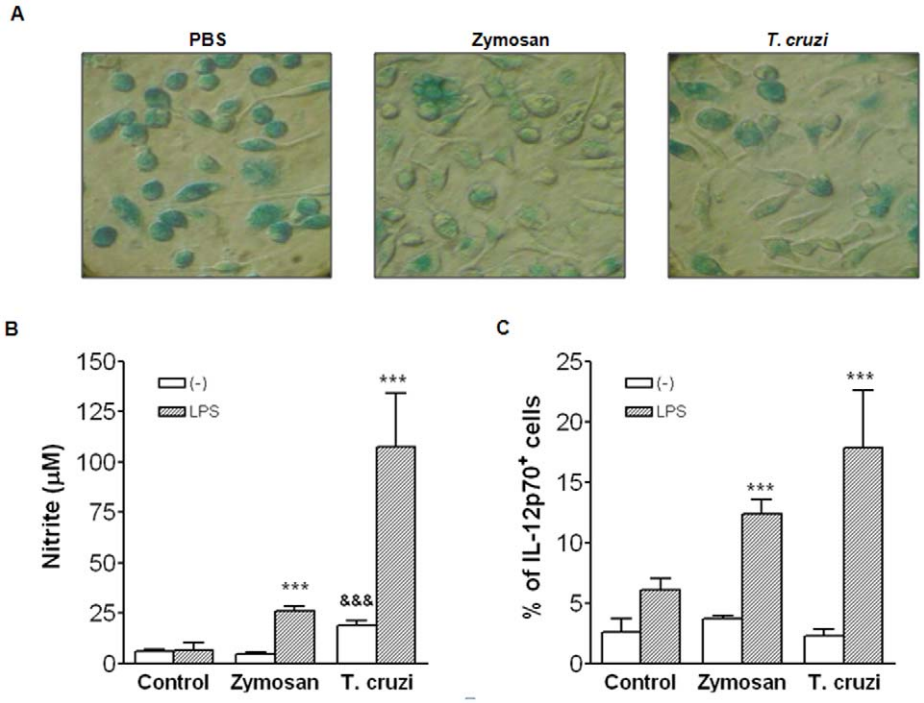


Figure 3. *Zymosan and* T. cruzi *inoculation* leads to PerC cellular renewal and improves local cell effector activities. C57BL/6 mice were injected i.p. with zymosan (1 mg/mouse) or *T. cruzi* (10^6 parasites/mouse) and 48 h later PC from naive and injected mice were harvested and cultured for 4 h. Non-adherent cells were removed by sequential washes. (**A**) β-Gal staining was performed as described in M&M. Slides were analyzed by optical microscopy (40×) and pictures were captured by Sony Camera (zoon 3.0). (**B and C**) Adherent PCs cells from 48 h-exposed mice and controls were stimulated *in vitro* with media or LPS (1 μg/mL). (**B**) Nitrite concentrations in culture supernatants were determined by the *Griess* reaction after 48 h of *in vitro* culture. Numbers represent the mean ± SD of triplicate samples. ***$p<0.001$ in relation to non-stimulated group and &&& $p<0.001$ when compared to the control group. (**C**) Frequencies of IL-12-producing F4/80^{+} cells were evaluated by intracellular staining as described in M&M. Bars indicate the standard deviation (SD). *** $p<0.001$ when compared to the control group. Data are representative of more than 3 independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0022141.g003

Peritoneal myelo-monocytic cell subsets are differentially activated by exogenous stimuli

Next, we evaluated the individual contribution of myelo-monocytic cell populations to the improvement of inflammatory responses found in zymosan or *T. cruzi*-stimulated PerC. At an early time point (30 min) after zymosan or *T. cruzi* exposure, LPM and SPM were still the dominant myelo-monocytic cell populations present in the PerC (Fig. 2A). At this time point, higher numbers of zymosan particles were found inside SPM (Fig. 4A and 4B). Forty-eight hours after zymosan or *T. cruzi* exposure, the frequency of SPM spontaneously producing IL-12 was similar to untreated controls. However, when stimulated with LPS plus IFN-γ *in vitro* we observed two to three times more IL-12-producing SPM from zymosan- or *T. cruzi*-treated mice compared to PBS-injected controls (Fig. 4C). Importantly, the IL-12 response to LPS plus IFN-γ was twice as high in SPM from injected mice than in the respective infiltrating monocytes (Fig. 4C). These data indicate that modifications in the peritoneal myelo-monocytic compartment in response to infectious stimuli include the emergence of a robust SPM cell population.

Discussion

MØ represent a heterogeneous cell population that resides in virtually all tissues of the body where they are able to assume a wide range of immune functions. Depending on their activation profile, these cells have been implicated in pathogen control and the initiation of inflammatory processes, or, conversely, in the regulation of these processes followed by restoration of tissue homeostasis [17–21]. It is currently accepted that tissue-derived factors influence MØ activation profiles. However, distinct MØ subpopulations have been found in the same environment [1,5]. Consistent with this, we have recently described the coexistence of large (LPM) and small (SPM) peritoneal MØ in the PerC [1]. Despite the distinct *ex vivo* and *in vitro* responses to LPS stimulation, the *in vivo* behavior of SPM and LPM remain to be elucidated. Here, we demonstrate that there is a clear alteration in the frequencies of LPM and SPM during inflammatory responses to zymosan and *T. cruzi*. At early time points after zymosan exposure, although LPM remains the major peritoneal MØ subset, the PerC is enriched with SPM. However, 48 h after zymosan and *T. cruzi* stimulation, the cellular composition of the PerC is profoundly altered by the disappearance of LPM and the accumulation of

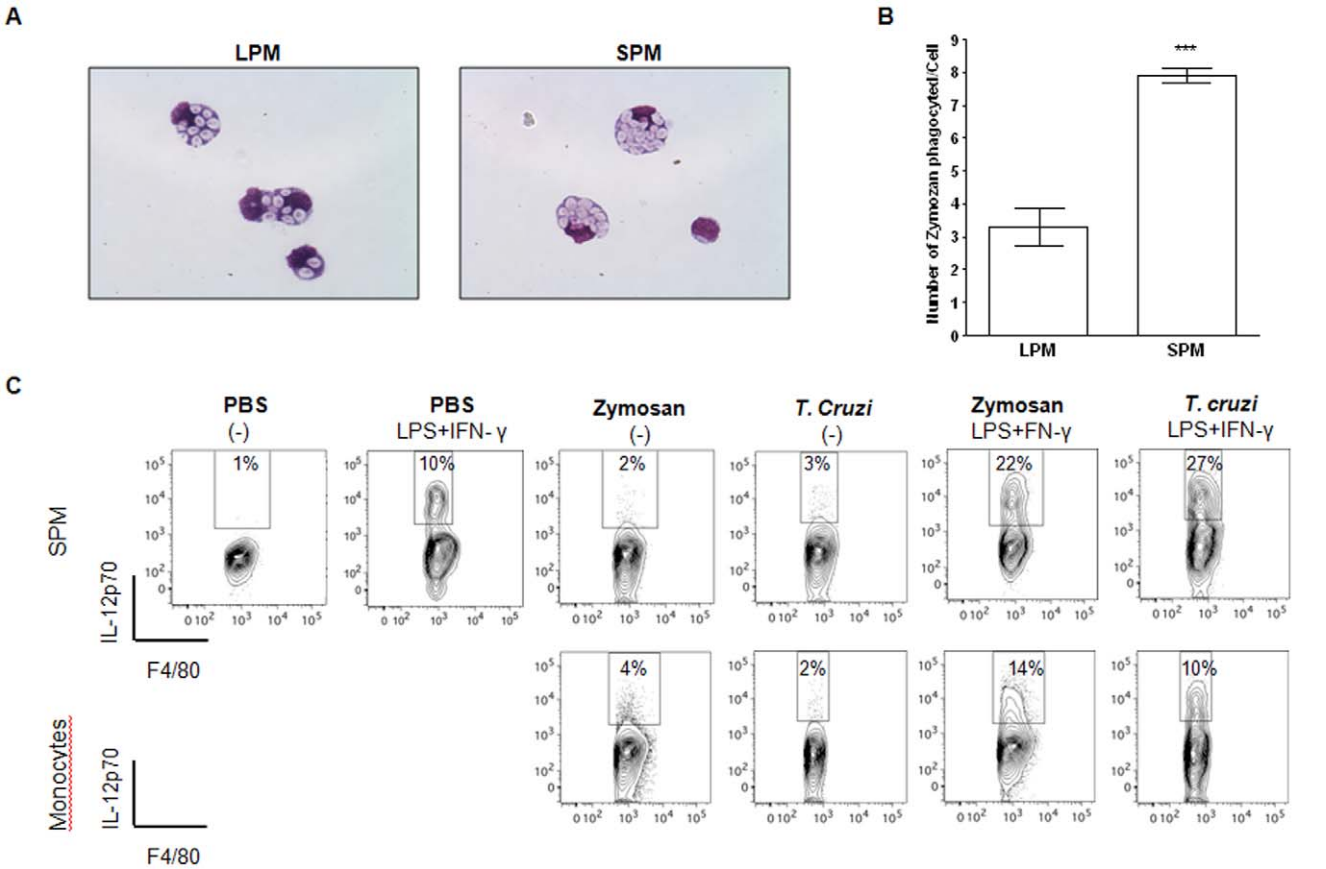


Figure 4. SPM are more responsive than LPM and monocytes to infectious stimuli. C57BL/6 mice were injected i.p. with zymosan (1 mg/mouse) or *T. cruzi* (10^6 parasites/mouse) and PCs were harvested 30 min or 48 h after stimulation. (**A**) SPM and LPM from C57BL/6 zymosan-exposed mice were FACS-sorted 30 min after injection and the presence of internalized zymosan particles was observed by optical microscopy. Slides were made with 10^5 cells from purified MØ subsets, stained with H&E and analyzed by optical microscopy (40×). (**B**) Numbers represent the mean ±SD of internalized zymosan particles per cell in each MØ subset. *** $p<0.001$ when compared to the LPM group. (**C**) PC from control or 48 h-exposed mice were cultured for 6 h in the presence of brefeldin A with or without LPS (1 μg/ml) plus rIFN-γ (5 ng/ml). Titles above plots indicate ***in vivo*** - *in vitro* stimulations. Values inside gates represent the frequencies of IL-12-producing cells in each subpopulation. Data are representative of more than 3 independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0022141.g004

SPM and monocytes. In parallel, cells in the modified PerC appear to lose the expression of the β-galactosamine senescence marker while increase NO secretion and the frequency of IL-12-expressing cells in response to subsequent LPS and IFN-γ stimulation.

Peritoneal MØ have been extensively adopted for experimental models because of their easy enrichment and isolation from the PerC. However, we and others have demonstrated that a variety of cell populations reside in the PerC, including B cells, DC, eosinophils, mast cells, neutrophils, T cells, NK cells, and invariant NK T cells [1,2,31]. Under steady state conditions, B-1 cells and MØ compose the majority of PC [1]. We have recently proposed that resident MØ are represented by two subsets, LPM and SPM [1].

The heterogeneity of resident peritoneal myelo-monocytic cells was also reported by Dioszeghy et al. [31] who also defined two distinct populations of MØ-like cells according to the expression of 12/15-lipoxygenase (LOX). Interestingly, these 12/15-LOX^{+} and 12/15-LOX^{-} MØ-like cells display distinct functional and phenotypic properties. The 12/15-LOX^{+} population expresses higher levels of F4/80 and Scavenger Receptor (SR)-A and secrete more IL-10 and G-CSF in response to *Staphylococcus epidermis* cell-free supernatant (SES) than do 12/15-LOX^{-} cells. This F4/80^{high}12/15-LOX^{+} subset was defined by authors as resident MØ [31] and are present in the PerC at similar frequencies of LPM in steady state conditions [(1) and (Fig. 1 and 2)]. Because they share functional and phenotypic characteristics, F4/80^{high}12/15-LOX^{+} subset and LPM may represent the same cell population.

On the other hand, we believe the F4/80^{low}12/15-LOX^{-} cells and SPM are different cell populations. Despite sharing the same CD11b^{+}F4/80^{low}MHCII^{high} phenotype, the expression of CD11c distinguishes 12/15-LOX^{-} cells and SPM. 12/15-LOX^{-} cells express high levels of the DC marker CD11c [31], whereas SPM was selected among CD11c negative or very low cells (Fig. 1 and [1]). In addition, SPM express lower levels of CD40, CD80 and CD86 costimulatory molecules compared to LPM [(1) and Table 1]. In comparison, 12/15-LOX^{-} cells express higher levels of these same co-stimulatory molecules than its counterpart 12/15-LOX^{+} cells [31].

However, because the expression of CD11c and other surface markers is not homogeneous among DC and MØ subpopulations and the fact that DC and MØ share many of their immune functions [32,33], we consider the possibility that the discrimination between 12/15-LOX^{-} cells and SPM may not be precise. Therefore, we envision the possibility that these two populations partially overlap and, accordingly, the presence of SPM within F40/80^{low}12/15-LOX^{-} cells and vice versa cannot be discarded.

As a dynamic compartment, the PerC recruits effector cells in response to injury. Neutrophil and inflammatory monocyte infiltrates are observed in response to stimuli such as LPS, thyoglicolate, SES or zymosan [1,31,34,35]. A clear alteration in the frequencies of LPM and SPM was observed after zymosan and *T. cruzi* stimulation. After 30 min of exposure, a modest SPM enrichment was observed. However, their numbers were not significantly altered (data not shown). In addition, at late time points after zymosan and *T. cruzi* stimulation, granulocytes, monocytes and SPM appeared to account for the increased cell numbers found in the PerC (Fig. 2B and data not shown). Interestingly, SPM and monocyte enrichment was accompanied by LPM disappearance from the PerC (Fig. 2). We have shown that LPM disappearance in response to thyoglicolate injection cannot be attributed to LPM differentiation into SPM [1]. However, the events underlying LPM disappearance from stimulated PerC that could include cell death or migration remain to be solved.

Many studies have been demonstrated the impact of immune-senescence or age-related immune cell deficiency in MØ functions [9–14]. For example, aging impairs production of NO [14] and phagocytic capacity [9,10,12] of MØ and reduces their expression of MHC class II [13]. LPM seem to exhibit morphological and functional characteristics described in senescent cells, including large size, prominent vacuolization (Fig. 1), reduced phagocytic capacity (Fig. 4) and low expression of MHCII molecules (Fig. 1) [9–14]. Furthermore, these senescent signs were accompanied by defective NO production *in vivo* [1]. In this regard, the senescence could be hypothesized to explain the rapid disappearance of LPM from the PerC after stimulation. In fact, after zymosan and *T. cruzi* exposure, adherent PC exhibited decreased β-Gal staining (Fig. 3) [15], indicating that the loss of LPM correlates to the cell renewal of the PerC. Despite the rapid loss of LPM in response to i.p. stimuli, it is expected that these cells are retained in the tissue for an immunological purpose. In fact, unpublished data from our group demonstrated their marked ingestion of apoptotic cells followed by IL-10 secretion, which suggest they have some early sentinel role in PerC. Since LPM disappearance is accompanied by the enrichment of SPM and monocytes, the PerC appears to be repopulated with other myeloid subsets that are more competent in disturbed milieus.

LPM, SPM and monocyte frequencies found in stimulated PerC were influenced by the nature of the stimuli (Fig. 2). PC from zymosan-stimulated mice exhibited Ly-6C^{+} monocytes as the dominant population, whereas SPM was the major myelo-monocytic subset present in the PerC of *T. cruzi*-stimulated mice. Since infiltrating SPM and monocytes display the same expression of F4/80, these cells were distinguished by Ly-6C expression found only in monocytes as well as the high levels of MHCII expressed by SPM (Fig. 2). Infiltrated monocytes in PerC seem to display reduced Ly-6C expression when compared to blood monocytes [1], suggesting that these cells differentiate in PerC. Therefore, it is not certain whether infiltrating SPM and monocytes represent two distinct populations or, conversely they are the same population in different maturation states. In our previous study, we found that Ly-6C^{+} monocytes infiltrate the PerC in response to thyoglicolate injection and subsequently up-regulate MHCII expression resembling SPM [1]. As Ly-6C^{+} monocytes are believed to give rise to inflammatory MØ [36], the putative origin of SPM could explain the activated profile exhibited by SPM (Table 1 and Fig. 4).

Of note, independent of stimuli and SPM or monocytes dominancy, stimulated-PC appear to be more easily responsive to subsequent *in vitro* LPS stimulation as they secreted higher levels of NO and exhibited higher frequencies of IL-12-positive cells. Finally, SPM rather than LPM or monocytes, appear to be the major source of IL-12 in response to a subsequent LPS plus IFN-γ stimulation. Moreover, exposure to infectious stimuli led to the emergence of a robust SPM population exhibiting a higher frequency of IL-12-positive cells in response to subsequent LPS plus IFN-γ stimulation when compared to SPM from untreated mice (Fig. 4). Since IL-12 has been described as an important element for driving the polarization of peritoneal MØ towards M1 activation profile and the consequent capacity of these cells to produce NO in response to LPS and IFN-γ [26–30], we might propose that in inflammatory conditions PerC is enriched with a primed and easily activated MØ population, which could improve microbicidal responses within this environment.

Thus, the substitution of LPM by SPM and monocytes greatly improves local cell responses to subsequent stimuli. However, lack of experimental models with conditional depletion of MØ subsets prevents us to determine the relative roles of LPM, SPM and monocytes for host protection against infections. Taken together, our data suggest that the infectious stimuli induce the disappearance of senescent LPM, the infiltration of monocytes and the emergence of a robust SPM subset; which collectively provides

cellular renewal and lead to an improvement in the PerC response to a subsequent LPS and IFN-γ stimulation.

Supporting Information

Figure S1 SSC profile discriminates granulocytes and peritoneal MØ subsets. (**A**) Granulocytes present a particular SSC profile (Gray dots, total PC; Black dots, indicated F4/80$^+$ population), which were used for their exclusion in sequential analysis. (**B**) Plots show the sequential gates used for the exclusion of granulocytes and the subsequent identification of LPM and SPM. Experiments were repeated 3 times, showing similar profiles. (TIF)

Acknowledgments

We thank Silvia Lucena Lage and Prof. Dr. Gustavo P. Amarante-Mendes for helpful discussions.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AdAC JATdA KRB. Performed the experiments: AdAC LRS CdLB LF RN. Analyzed the data: AdAC JATdA LRS LF EEBG MRDL JMMA KRB. Contributed reagents/materials/analysis tools: MRDL JMMA. Wrote the paper: AdAC KRB. Critically revised article for important intellectual content: AdAC LRS LF EEBG MRDL JMMA.

References

1. Ghosn EE, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, et al. (2010) Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. Proc NatlAcad Sci U S A 107(6): 2568–73.
2. Schleicher U, Hesse A, Bogdan C (2005) Minute numbers of contaminant CD8+ T cells or CD11b+CD11c+ NK cells are the source of IFN-gamma in IL-12/IL-18-stimulated mouse macrophage populations. Blood 105(3): 1319–28.
3. Aderem A, Underhill DM (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu Rev Immunol 17: 593–623.
4. Gordon S (2002) Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. Cell 111(7): 927–30.
5. Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, et al. (2005) Macrophage receptors and immune recognition. Annu Rev Immunol 23: 901–44.
6. Martinez-Pomares L, Gordon S (2007) Antigen presentation the macrophage way. Cell 131(4): 641–3.
7. Villacres-Eriksson M (1995) 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 102(1): 46–52.
8. Aliberti J (2005) Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by Toxoplasma gondii. Nat Rev Immunol 5(2): 162–70.
9. Lloberas J, Celada A (2002) Effect of aging on macrophage function. Exp Gerontol 37(12): 1325–31.
10. Kovacs EJ, Palmer JL, Fortin CF, Fulop T, Jr., Goldstein DR, et al. (2009) Aging and innate immunity in the mouse: impact of intrinsic and extrinsic factors. Trends Immunol 30(7): 319–24.
11. Plackett TP, Boehmer ED, Faunce DE, Kovacs EJ (2004) Aging and innate immune cells. J Leukoc Biol 76(2): 291–9.
12. Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Engleman C, Katz J, Sambhara S (2004) Innate immunity in aging: impact on macrophage function. Aging Cell 3(4): 161–7.
13. Herrero C, Sebastian C, Marques L, Comalada M, Xaus J, et al. (2002) Immunosenescence of macrophages: reduced MHC class II gene expression. Exp Gerontol 37(2–3): 389–94.
14. Cecilio CA, Costa EH, Simioni PU, Gabriel DL, Tamashiro WM (2011) Aging alters the production of iNOS, arginase and cytokines in murine macrophages. Braz J Med Biol Res pii: S0100-879X2011007500067.
15. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 92(20): 9363–7.
16. Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat Rev Immunol 5(12): 953–64.
17. Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM (2006) Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. J Leukoc Biol 80(6): 1298–307.
18. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, et al. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol 25(12): 677–86.
19. Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat Rev Immunol 8(12): 958–69.
20. Rodriguez-Sosa M, Satoskar AR, Calderon R, Gomez-Garcia L, Saavedra R, et al. (2002) Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. Infect Immun 70(7): 3656–64.
21. Noel W, Raes G, Hassanzadeh Ghassabeh G, De Baetselier P, Beschin A (2004) Alternatively activated macrophages during parasite infections. Trends Parasitol 20(3): 126–33.
22. Schleicher U, Bogdan C (2009) Generation, culture and flow-cytometric characterization of primary mouse macrophages. Methods Mol Biol 531: 203–24.
23. Roederer M (2001) Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. Cytometry 45(3): 194–205.
24. Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C (1993) Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. J Immunol Methods 159(1–2): 197–207.
25. Herzenberg LA, Tung J, Moore WA, Herzenberg LA, Parks DR (2006) Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. Nat Immunol 7(7): 681–5.
26. Bastos KR, Alvarez JM, Marinho CR, Rizzo LV, Lima MR (2002) Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile. J Leukoc Biol 71(2): 271–8.
27. Bastos KR, Barboza R, Sardinha L, Russo M, Alvarez JM, et al. (2007) Role of endogenous IFN-gamma in macrophage programming induced by IL-12 and IL-18. J Interferon Cytokine Res 27(5): 399–410.
28. Bastos KR, Marinho CR, Barboza R, Russo M, Alvarez JM, et al. (2004) What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells? Microbes Infect 6(6): 630–6.
29. Bogdan C, Schleicher U (2006) Production of interferon-gamma by myeloid cells–fact or fancy? Trends Immunol 27(6): 282–90.
30. Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, et al. (2001) IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. Trends Immunol 22(10): 556–60.
31. Dioszeghy V, Rosas M, Maskrey BH, Colmont C, Topley N, et al. (2008) 12/15-Lipoxygenase regulates the inflammatory response to bacterial products in vivo. J Immunol 181(9): 6514–24.
32. Hume DA (2008) Macrophages as APC and the dendritic cell myth. J Immunol 181(9): 5829–35.
33. Geissmann F, Gordon S, Hume DA, Mowat AM, Randolph GJ (2010) Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. Nat Rev Immunol 10(6): 453–60.
34. Taylor PR, Brown GD, Geldhof AB, Martinez-Pomares L, Gordon S (2003) Pattern recognition receptors and differentiation antigens define murine myeloid cell heterogeneity ex vivo. Eur J Immunol 33(8): 2090–7.
35. Rosas M, Thomas B, Stacey M, Gordon S, Taylor PR (2010) The myeloid 7/4-antigen defines recently generated inflammatory macrophages and is synonymous with Ly-6B. J Leukoc Biol 88(1): 169–80.
36. Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity 19(1): 71–82.

ANEXO III

Supplemental Material can be found at:
http://www.jbc.org/content/suppl/2010/08/26/M110.124297.DC1.html

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 285, NO. 42, pp. 32087–32095, October 15, 2010
© 2010 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A.

A Novel Pathway for Inducible Nitric-oxide Synthase Activation through Inflammasomes*[S]

Received for publication, March 16, 2010, and in revised form, July 14, 2010 Published, JBC Papers in Press, August 11, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.124297

Carina L. Buzzo[‡], Julia C. Campopiano[‡], Liliana M. Massis[§], Silvia L. Lage[‡], Alexandra A. Cassado[‡], Rafael Leme-Souza[‡], Larissa D. Cunha[§], Momtchilo Russo[‡], Dario S. Zamboni[§], Gustavo P. Amarante-Mendes[‡¶], and Karina R. Bortoluci[‡‖1]

From the [‡]Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-900, Brazil, the [§]Departamento de Biologia Celular, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 14049-900, Brazil, the [¶]Instituto de Investigação em Imunologia, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, São Paulo 05508-900, Brazil, and the [‖]Departamento de Ciências Biológicas, Campus Diadema and CTC-Mol, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo SP-04044-010, Brazil

Innate immune recognition of flagellin is shared by transmembrane TLR5 and cytosolic Nlrc4 (NOD-like receptor family CARD (caspase activation recruitment domain) domain containing 4)/Naip5 (neuronal apoptosis inhibitory protein 5). TLR5 activates inflammatory genes through MYD88 pathway, whereas Nlrc4 and Naip5 assemble multiprotein complexes called inflammasomes, culminating in caspase-1 activation, IL-1β/IL-18 secretion, and pyroptosis. Although both TLR5 and Naip5/Nlrc4 pathways cooperate to clear infections, little is known about the relative anti-pathogen effector mechanisms operating through each of them. Here we show that the cytosolic flagellin (FLA-BSDot) was able to activate iNOS, an enzyme previously associated with TLR5 pathway. Using *Nlrc4*- or *Naip5*-deficient macrophages, we found that both receptors are involved in iNOS activation by FLA-BSDot. Moreover, distinct from extracellular flagellin (FLA-BS), iNOS activation by intracellular flagellin is completely abrogated in the absence of caspase-1. Interestingly, IL-1β and IL-18 do not seem to be important for FLA-BSDot-mediated iNOS production. Together, our data defined an additional anti-pathogen effector mechanism operated through Naip5 and Nlrc4 inflammasomes and illustrated a novel signaling transduction pathway that activates iNOS.

Innate immune system employs intracellular and extracellular pattern recognition receptors (PRRs)[2] to detect microbial products through the identification of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Among many families of PRRs, Toll-like receptors (TLRs) and NOD-like receptors (NLRs) have been described as central elements in triggering innate immune responses (1, 2).

TLRs and NLRs have been shown to activate distinct biochemical pathways, resulting in diverse mechanisms of resistance to pathogens. These mechanisms may act independently or may cooperate to the resolution of infections. TLRs primarily activate transcriptional factors such as NF-κB and IFN-responsive factors (IRF) (3, 4), culminating in the production of effector molecules such as inflammatory cytokines and type I interferons. The contribution of these pathways to resistance to infection is manifold: recruitment of other inflammatory cells, production of cytotoxic and cytostatic molecules, and activation of adaptive immune response. NLRs, on the other hand, although also capable of activating NF-κB, have a peculiar ability of initiating an inflammatory response through caspase-1 activation via the assembly of a multiprotein complex called inflammasome (5–7). Besides the well known role of caspase-1 on IL-1β and IL-18 maturation and secretion, this protease has also been described to induce macrophages death by a process known as pyroptosis (6, 7). Importantly, pyroptosis has been ascribed as a mechanism of host immune response against certain pathogens, such as *Salmonella*, *Legionella*, *Pseudomonas*, and *Shigella*, although it is still not clear how pyroptosis effectively contributes for pathogen clearance (7).

The recognition of PAMPs by TLRs and NLRs occur independently. However, there are cases where a certain PAMP can be recognized by both TLRs and NLRs. Flagellin, the monomeric subunit of flagella present in several Gram-negative and Gram-positive bacteria is a good example of this redundancy. Extracellular flagellin is recognized by transmembrane TLR5 (8), whereas cytosolic sensing of flagellin requires Naip5 (neuronal apoptosis inhibitory protein 5) and Nlrc4 (NLR family CARD (caspase activation recruitment domain) domain-containing 4), also called Ipaf (ICE-(IL-1-converting enzyme) protease activating factor), both members of the NLR family (9–13). It was recently demonstrated that both Nlrc4 and Naip5 are required for signaling in response to the 35-amino acid of a peptide located on the C-terminal D0 domains of *Legionella pneumophila* and *Salmonella typhimurium* flagellins and that this region of flagel-

* This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-Brazil) and the Brazilian Research Council (CNPq).

[S] The on-line version of this article (available at http://www.jbc.org) contains supplemental Figs. 1–4.

[1] To whom correspondence should be addressed: Dept. of Biological Sciences, Campus Diadema and CTC-Mol, Federal University of São Paulo. R. Mirassol, 207, Vila Clementino, São Paulo SP-04044-010, Brazil. Tel.: 55-11-3091-7362; Fax: 55-11-3091-7224; E-mail: kbortoluci@gmail.com.

[2] The abbreviations used are: PRR, pattern recognition receptor; NLR, NOD-like receptor; TLR, Toll-like receptor; IRF, IFN-responsive factors; Naip5, neuronal apoptosis inhibitory protein 5; CARD, caspase activation recruitment domain; iNOS, inducible nitric-oxide synthase; BMDM, bone marrow-derived macrophage; PM, peritoneal macrophage; z-YVAD-fmk, benzyloxycarbonyl-YVAD-fluoromethyl ketone; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; DOT, DOTAP (lipidic vesicles).

Downloaded from www.jbc.org at CAPES - USP, on September 28, 2011

lin is distinct from the D1 domain sensed by TLR5 (11). Importantly, TLR5 engagement by flagellin leads to NF-κB activation, whereas the recognition of flagellin by Naip5 and Nlrc4 induces the assembly of inflammasomes with the recruitment and activation of pro-caspase-1 (7).

Regardless the particularities between intracellular and extracellular receptor pathways, the relative contribution of TLR5 and Naip5/Nlrc4 inflammasomes to host resistance to infection is still not clear. Here, by using a purified flagellin, we defined an additional anti-pathogen effector mechanism operating through Naip5 and Nlrc4 inflammasomes that was previously associated with TLR pathway (14, 15), namely the activation of inducible nitric-oxide synthase (iNOS), the enzyme responsible for nitric oxide (NO) production (16). Interestingly, distinct from extracellular flagellin, iNOS activation by intracellular flagellin is completely abrogated in the absence of caspase-1 but not with neutralization of IL-1β and/or IL-18. Importantly, this effect is preserved in Myd88-deficient macrophage, ruling out the participation of TLR5. Together, our data indicated that by using distinct pathways, TLR and NLR systems can operate with a certain level of redundancy, which might improve the host resistance against infections.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice—6–8-Week-old wild-type (WT) C57BL/6 and *Myd88*-deficient female mice were bred in our animal facilities at the University of São Paulo. *Nlrc4*- and *caspase-1*-deficient mice were previously described (17) and backcrossed for six generations with C57BL/6. Mice with 99.2% A/J genome harboring the wild-type *Lgn1* allele derived from C57BL/6 were constructed by backcrossing a progeny of C57BL/6 x A/J with A/J for 6 generations as described in supplemental Fig. 1. Briefly, each generation was screened by PCR using 2 pairs primers that amplify fragments within microsatellite regions flanking the *Lgn1* locus, thus, differentiating C57BL/6 from A/J regions of chromosome 13 (13). The resultant mice (F7 AJxB6 $Lgn1^{B6/AJ}$) are heterozygous for the dominant *Lgn1* locus and show full Naip5 functions. In contrast, littermate controls homozygous for the A/J allele (F7 AJxB6 $Lgn1^{AJ/AJ}$) harbors two copies of the defective Naip5 allele from A/J mice (13, 18). Naip5 functions of the F7 mice were monitored by measuring restriction of *L. pneumophila* multiplication in macrophages (supplemental Fig. 1). These mice were bred and constructed in the animal facilities at the University of São Paulo-Ribeirão Preto. Animal studies used protocols approved by the University of São Paulo Committee on Use and Care of Animals.

Preparation of Mouse Macrophages—Bone marrow-derived macrophages (BMDM) were prepared as described (19). Bone marrow cells were cultured for 7 days at 37 °C in 5% CO_2 in RPMI 1640 medium supplemented with 30% L929 supernatant containing macrophage-stimulating factor, 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, and 100 units/ml streptomycin and penicillin. All supplements were purchased from Invitrogen. Peritoneal macrophages (PM) were obtained as described (20). Briefly, peritoneal lavage was collected 4 days after injection of mice with 1% starch solution (Sigma). Adherent macrophages were prepared by overnight culture in RPMI supplemented with 10% heat inactivated FCS and antibiotics, resulting in a population that comprises 97–99% of F4/80$^+$ cells (data not shown).

Stimulation of Macrophages with Flagellin—PM and BMDM (3×10^5 cells seeded in 96-well plates) were cultured for 5–24 h at 37 °C in 5% CO_2 in RPMI 1640 medium supplemented with 3% FCS, amino acids, and antibiotics in the presence of purified flagellin from *Bacillus subtilis* (FLA-BS) or *S. typhimurium* (FliC) (Invivogen) (1–6 μg/ml) in its free form or inserted into DOTAP (Roche Diagnostics), a cationic lipid formulation that permits its delivery to cell cytosol (21). DOTAP was used accordingly to the manufacturer's instructions. Briefly, DOTAP (50 μl) was incubated for 15 min in serum-free media with 9 μg of purified flagellin. After incubation, 2.95 ml of RPMI 1640 medium was added, and an aliquot of 200 μl was added to 3×10^5 macrophages (for 3 μg/ml final concentration). In some cultures endogenous caspase-1 was blocked with specific inhibitor z-YVAD-fmk (Calbiochem) at a final concentration of 2–50 μM, and IL-1β and IL-18 were neutralized by adding anti-mouse IL-1β or IL-18 (AbD Serotec) at final concentration of 1 and 5 μg/ml, respectively.

Measurement of Cytokines and Nitric Oxide—IL-1β and IL-18 were measured in culture supernatants by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) (kits from BD Biosciences) following the manufacturer's instructions. Culture supernatants were also assayed for NO by the Griess reaction. Briefly, 50 μl of supernatant was incubated with 50 μl of Griess reagent for 5 min at ambient temperature, and the NO_2 concentration was determined by measuring the optical density at 550 nm in reference to a standard $NaNO_2$ solution.

Western Blot—Western blot was performed as previously described (22). Cells were harvested, washed once in ice-cold PBS, lysed directly in SDS sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, and 2.5% β-mercaptoethanol), and boiled for 5 min. Samples were resolved under reducing conditions for 2 h at 15 V in SDS-polyacrylamide gels. Proteins were then transferred onto PVDF membranes for 1 h in a semi-dry system. Blots were blocked for 3 h in TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween) containing 0.1% sodium azide and 5% nonfat dried milk and then probed with polyclonal antibodies to iNOS (1:1000) and β-actin (1:20.000) overnight (Santa Cruz Biotechnology). Reactions were detected with suitable secondary antibody (1:2000) conjugated to horseradish peroxidase (The Jackson Laboratory and Amersham Biosciences) using enhanced chemiluminescence solution (Pierce).

Real-time Quantitative PCR—Total RNA was isolated using TRIzol RNA isolation. Concentration and purity of the RNA were verified by spectrophotometer NanoDROP nd-1000. The absorbance ratio at 260/280 nm of all samples ranged from 1.8 to 2.0, indicating they all were contaminant-free. The RNA integrity has been assayed on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide. cDNA was generated from 3 μg of total RNA using oligo(dT) and the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase RNase H (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Quantitative real-time PCR analysis

Downloaded from www.jbc.org at CAPES - USP, on September 28, 2011

was performed with the Taqman System (Applied Biosystems) (catalog no. Mm0130989_m1; Nos2). To standardize all the samples, the housekeeping gene glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (catalog no. 4352932) was used as an endogenous reference gene (TaqMan Endogenous Control concentration-limited primer, Applied Biosystems).

Macrophage Infection with L. pneumophila—BMDMs from C57BL/6- and *Myd88*-deficient mice (2×10^5 cells seeded in 24-well plates) were infected with wild-type or flagellin-deficient mutant FlaA *L. pneumophila* at a multiplicity of infection of 0.015 for 24, 48, and 72 h in the presence or absence of 0.1 mM aminoguanidine (selective inhibitor of iNOS (23); SIGMA). Macrophages were lysed in sterile H_2O, and the cell lysates were combined with the tissue culture supernatant from that well, ensuring that all bacteria in the well would be counted. Serial dilutions from each well were plated on charcoal yeast extract agar plates. Colony-forming units were assessed by counting of bacterial colonies present after 96 h of incubation at 37 °C.

Statistical Analysis—Experiments were performed always in duplicate or triplicate at least three times. Data are presented as the mean values ± S.D. Statistical analysis of the data were carried out using one-way analysis of variance and Tukey as a post-test. Differences between experimental groups were considered significant for $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), and $p < 0.001$ (***).

RESULTS

Recognition of Extracellular or Cytosolic B. subtilis Flagellin Differentially Stimulates Macrophages—We first characterized the macrophage responses to extracellular (FLA-BS) or intracellular (FLA-BSDot) flagellin. PMs were stimulated with LPS, FLA-BS, or FLA-BSDot (1–6 μg/ml), and the secretion of IL-6, IL-1β, and macrophage lysis (monitored by LDH release) were determined respectively as surrogate markers of NF-κB and caspase-1 activation. As expected, only FLA-BSDot induced IL-1β maturation and secretion and caspase-1-dependent macrophage lysis in a dose-dependent manner (Fig. 1, *A* and *B*, and supplemental Fig. 2). Conversely, high levels of IL-6 were only observed in the presence of FLA-BS and LPS (Fig. 1*C*). DOTAP by itself did not induce either IL-1β or IL-6 secretion (Fig. 1). Also, as expected, LPS alone was not able to induce IL-1β secretion (Fig. 1). Moreover, as expected, the level of IL-1β secreted in response to FLA-BSDot stimulation alone is markedly lower than that observed after LPS priming (data not shown). IL-18 was not detected in these conditions (data not shown). Our results are in agreement with the literature showing that TLRs and NLRs drive macrophage activation in different ways.

Cytosolic Flagellin Induces iNOS Expression by Macrophages—FLA-BS stimulation of PMs resulted in iNOS expression, which correlated with NO secretion (Fig. 2*A*). However, unexpectedly, iNOS expression and NO production were also observed when PMs were stimulated with FLA-BSDot. Similar results were also observed using adherent BMDM (Fig. 2*B*), indicating that FLA-BSDot up-regulates iNOS activity in different macrophage populations. Therefore, our data show for the first time that both extracellular and cytosolic flagellins are able to activate iNOS.

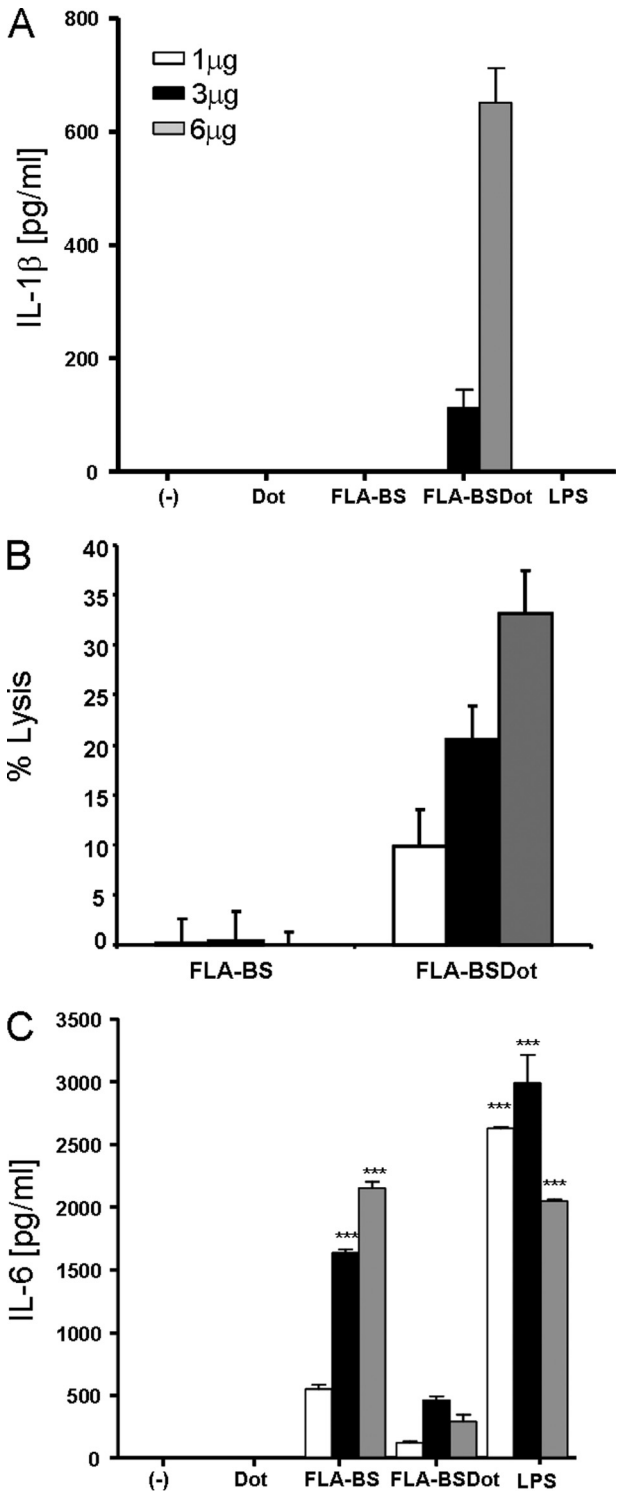


FIGURE 1. **Differential activation of macrophages by extracellular and cytosolic *B. subtilis*.** PM from C57BL/6 mice (3×10^5/200 μl) were stimulated with 1, 3, and 6 μg/ml LPS or purified flagellin from *B. subtilis* in its free form (*FLA-BS*) or inserted into DOTAP, a cationic lipid vesicules that permits its delivery to cell cytosol (*FLA-BSDot*). The release of IL-1β (*A*), IL-6 (*C*), and macrophage lysis (*B*) were determined in culture supernatants at 24 h by ELISA and at 6 h by LHD release, respectively. *Numbers* represent the mean ± S.D. of triplicate samples. Data are representative of three independent experiments.

Nlrc4 and Naip5 Participate in FLA-BSDot-induced iNOS Expression—Because cytosolic flagellin has been shown to be sensed by Nlrc4 and Naip5 inflammasomes (9–13), we next

Downloaded from www.jbc.org at CAPES - USP, on September 28, 2011

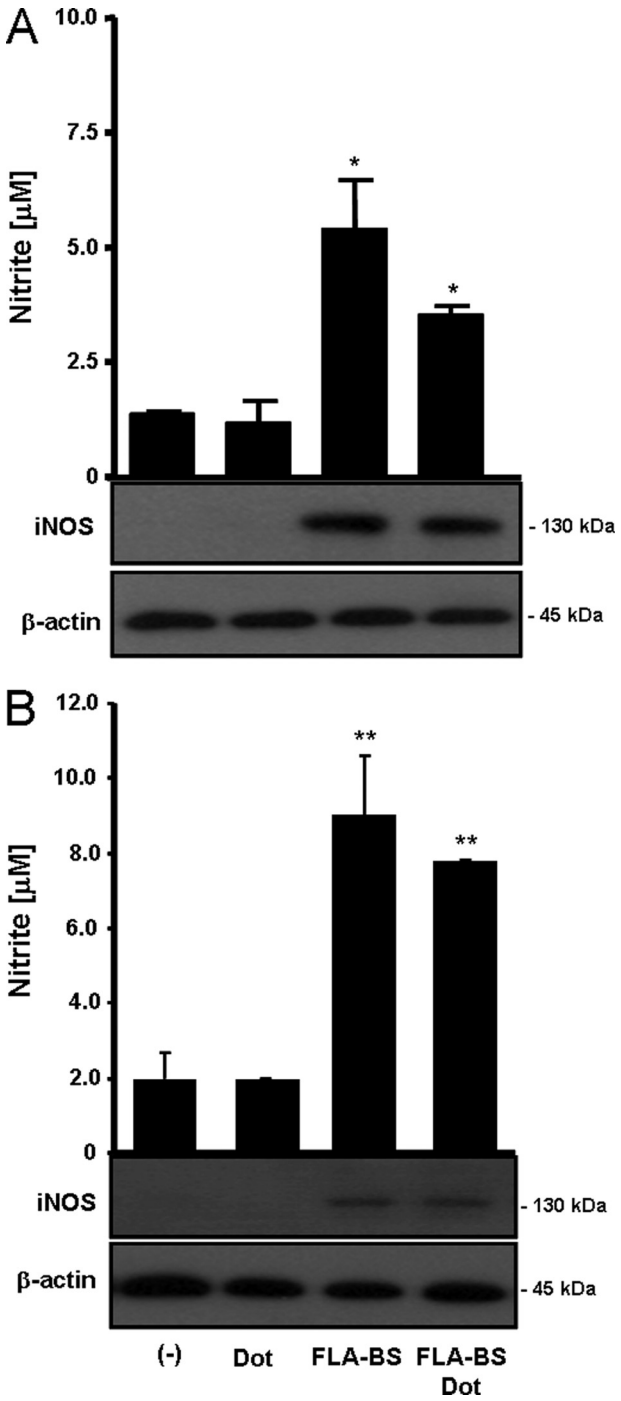


FIGURE 2. **Cytosolic flagellin induces iNOS activation.** PM (*A*) or BMDM (*B*) from C57BL/6 mice (3×10^5/200 μl) were stimulated with 3 μg/ml purified flagellin from *B. subtilis* in its free form (*FLA-BS*) or inserted into DOTAP, a cationic lipid vesicules that permits its delivery to cell cytosol (*FLA-BSDot*). After 24 h iNOS expression was evaluated in cell extracts by Western blot, and nitrite concentrations in culture supernatants were determined by *Griess* method. *Numbers* represent the mean ± S.D. of triplicate samples. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ when compared with control group. Data are representative of three independent experiments.

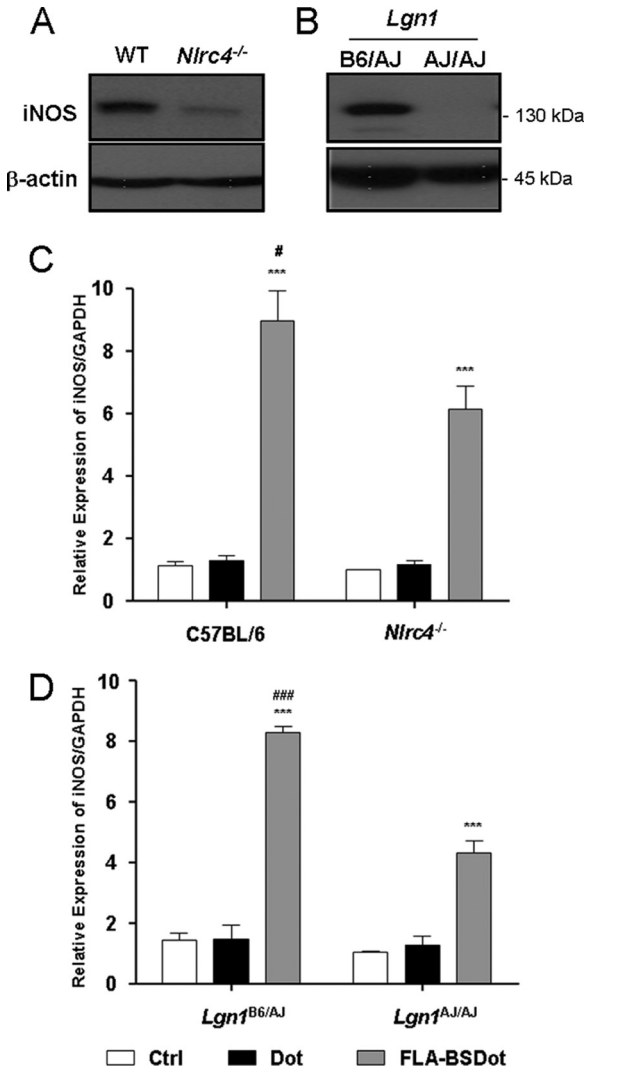


FIGURE 3. **Nlrc4 and Naip5 are required for cytosolic flagellin-induced iNOS expression.** BMDM from wild-type and *Nlrc4*$^{-/-}$ C57BL/6 mice (*A* and *C*) or Naip5-competent (*Lgn1*$^{B6/AJ}$) and Naip5-deficient (*Lgn1*$^{AJ/AJ}$) mice (*B* and *D*) were stimulated with 3 μg/ml purified flagellin from *B. subtilis* inserted into DOTAP, a cationic lipid vesicule that permits its delivery to cell cytosol (FLA-BSDot). After 24 or 5 h, iNOS expression was evaluated in cell extracts by Western blot (*A* and *B*) or at transcriptional levels by real-time RT-PCR (*C* and *D*), respectively. Data are representative of three independent experiments. *Numbers* represent the mean ± S.D. of triplicate samples. ***, $p < 0.001$ when compared with control group. #, $p < 0.05$; ###, $p < 0.001$ when compared with FLA-BSDot group from deficient mice. *Ctrl*, control.

determined their contribution to FLA-BSDot-induced iNOS activation by using BMDM from mice deficient in each of these molecules. As shown in Fig. 3, FLA-BSDot-induced iNOS expression in *Nlrc4*$^{-/-}$ BMDM was significantly lower than observed in WT C57BL/6 cells, but not absent, suggesting that Nlrc4 is important but not essential for iNOS expression in response to cytosolic flagellin (Fig. 3*A*). A similar pattern of results was observed at transcriptional levels by real-time RT-PCR, where a significant decrease in the iNOS expression was observed in *Nlrc4*$^{-/-}$ BMDM when compared with WT C57BL/6 cells (Fig. 3*C*). The *Naip5* allele from A/J mouse strain is partially defective due to a series of amino acid substitutions (18, 24). Thus, we took advantage of these mutations and generated a pair of mice with a similar genetic background (A/J) that differentially expresses functional (*Lgn1*$^{B6/AJ}$) or mutant (*Lgn1*$^{AJ/AJ}$) *Naip5* allele (see "Experimental Procedures" and supplemental Fig. 1). FLA-BSDot stimulates Naip5-competent (*Lgn1*$^{B6/AJ}$) but not Naip5-deficient (*Lgn1*$^{AJ/AJ}$) BMDM to up-regulate iNOS protein levels (Fig. 3*B*). Notwithstanding the absence of iNOS protein in Naip5-deficient (*Naip5*$^{AJ/AJ}$)

Downloaded from www.jbc.org at CAPES - USP, on September 28, 2011

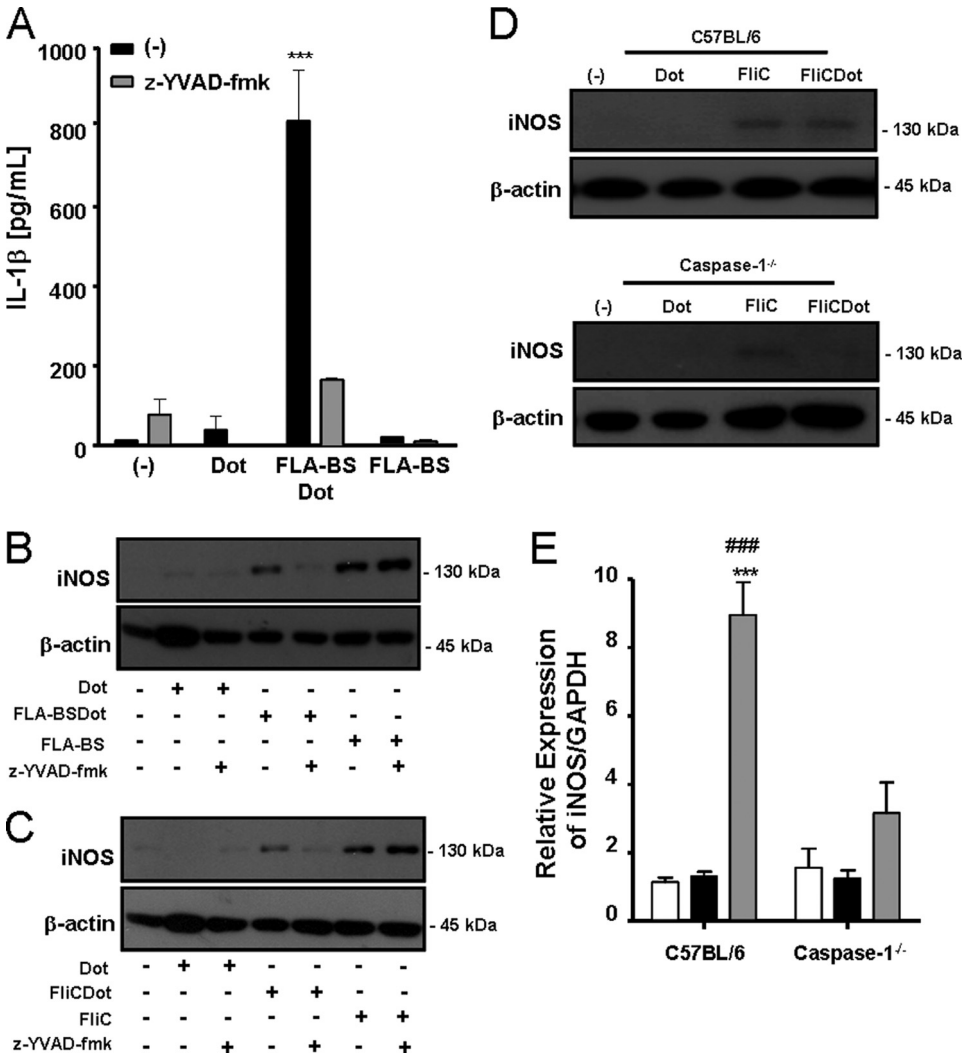


FIGURE 4. **Caspase-1 is required for cytosolic flagellin-induced iNOS expression.** PMs or BMDM from C57BL/6 or caspase-1$^{-/-}$ mice were stimulated with 3 μg/ml purified free (*FLA-BS*) or cytosolic (*FLA-BSDot*) flagellin from *B. subtilis* (*A*, *B*, and *E*) or flagellin from *S. typhimurium* (*FliC* or *FliCDot*, respectively) (*C* and *D*) in the presence or absence of z-YVAD-fmk (2 μM). After 24 or 5 h, iNOS expression was evaluated in cell extracts by Western blot (*B*, *C*, and *D*) or at transcriptional levels by real-time RT-PCR (*E*), respectively. IL-1β secretion was determined in culture supernatants by ELISA (*A*). Numbers represent the mean ± S.D. of triplicate samples. ***, $p < 0.001$ when compared with control group. ###, $p < 0.001$ when compared with FLA-BSDot group from caspase-1$^{-/-}$ BMDM. Data are representative of three independent experiments.

BMDM, low levels of iNOS transcripts were still observed by RT-PCR (Fig. 3*D*). These data indicate that functional Naip5 plays a major role for FLA-BSDot-induced iNOS. Similar results were obtained with flagellin purified from *S. typhimurium* (data not shown), a well characterized Naip5 and Nlrc4 agonist (11). Taken together, our results established that flagellin from *B. subtilis* is also a Naip5 and Nlrc4 agonist and that both receptors are involved in the up-regulation of iNOS.

FLA-BSDot-induced iNOS Expression Is Dependent on Caspase-1—Because cytosolic flagellin recognition by inflammasomes results in caspase-1 activation (9–13), we asked whether caspase-1 was involved in FLA-BSDot-induced iNOS. Therefore, macrophages were cultured with FLA-BS or FLA-BSDot in the presence or absence of z-YVAD-fmk, a synthetic peptide that irreversibly inhibits caspase-1. As expected, z-YVAD-fmk inhibited IL-1β secretion in response to FLA-BSDot (Fig. 4*A*). Importantly, it also abrogated the effect of FLA-BSDot on iNOS expression (Fig. 4*B*). However, no effect of z-YVAD-fmk was observed in FLA-BS-induced iNOS expression (Fig. 4*B*). The same results were obtained with FliC and FliCDot from the Gram-negative *S. typhimurium*, showing that the effect was not restricted to flagellin from the Gram-positive *B. subtilis* (Fig. 4*C*). The requirement of caspase-1 for iNOS induction in response to cytosolic flagellin was confirmed at protein (Fig. 4*D*) and transcriptional levels (Fig. 4*E*) in *caspase-1*$^{-/-}$ BMDM, demonstrating that extracellular and intracellular flagellin use different pathways to activate iNOS.

FLA-BSDot-induced iNOS Expression Does Not Depend on IL-1β and IL-18—Because caspase-1 activation induced by cytosolic flagellin was shown to result in the secretion of IL-1β and IL-18 (6), we next determined whether these cytokines participate in iNOS up-regulation. Macrophages were cultured with FLA-BSDot in the presence or absence of neutralizing anti-IL-1β and anti-IL-18 antibodies. Anti-IL-1β antibodies sequestered IL-1β present in FLA-BSDot-stimulated PM culture supernatants (Fig. 5*A*) but did not inhibit FLA-BSDot-induced iNOS expression (Fig. 5*B*). On the contrary, if anything, anti-IL-1β antibodies seem to slightly increase iNOS expression. The independence of IL-1β for iNOS activation in response to FLA-BSDot was supported by data obtained with BMDM, which up-regulated iNOS expression (Fig. 5*C*) without any detectable IL-1β production (data not shown). Similar results were obtained with neutralizing anti-IL-18 or the combination of both anti-IL-1β and anti-IL-18 antibodies (Fig. 5, *B* and *C*). It is important to emphasize that IL-18 was not found in the supernatants from FLA-BSDot-stimulated PMs or BMDMs. Together, our data indicate that cytosolic flagellin induces iNOS activation by a mechanism dependent on Nlrc4/Naip5-caspase-1 axis but independent of IL-1β and IL-18.

FLA-BSDot-induced iNOS Expression Is Independent of MYD88—Because IL-1 and IL-18 receptors as well as TLR5 signaling depend on MYD88 adaptor molecule (3, 8, 25), PMs from *myd88*$^{-/-}$ mice were stimulated with FLA-BSDot to evaluate the influence of this pathway on cytosolic flagellin-induced iNOS activation. As shown in Fig. 6, FLA-BSDot-mediated iNOS expression and LDH release are also observed in the absence of MYD88, supporting our claim that these responses are indepen-

Downloaded from www.jbc.org at CAPES - USP, on September 28, 2011

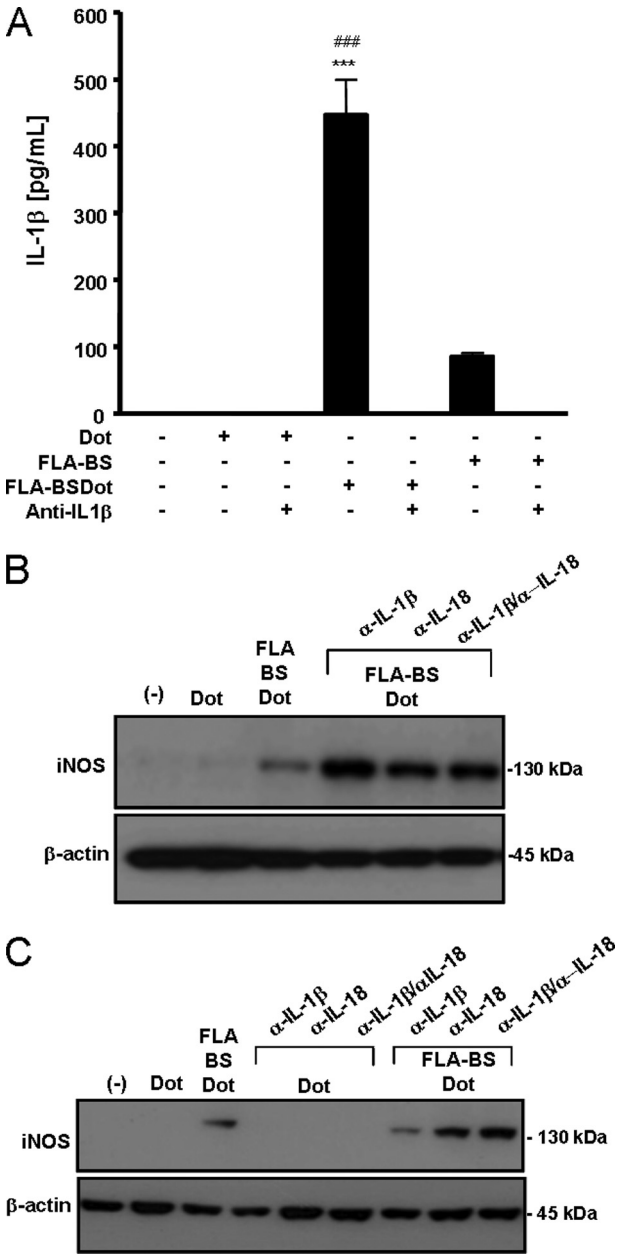


FIGURE 5. **Induction of iNOS expression by cytosolic flagellin is independent of IL-1β and IL-18.** PMs (*A*, *B*) and BMDM (*C*) from C57BL/6 were stimulated with 3 μg/ml purified free (*FLA-BS*) or cytosolic (*FLA-BSDot*) flagellin from *B. subtilis* in the presence or absence of neutralizing anti-IL-1β (1 μg/ml) or anti-IL-18 (5 μg/ml). After 24 h, iNOS expression was evaluated in cell extracts by Western blot, and IL-1β secretion was determined in culture supernatants by ELISA. *Numbers* represent the mean ± S.D. of triplicate samples. ***, $p < 0.001$ when compared with control group. ###, $p < 0.001$ when compared with FLA-BSDot in the presence of neutralizing anti-IL-1β. Data are representative of three independent experiments.

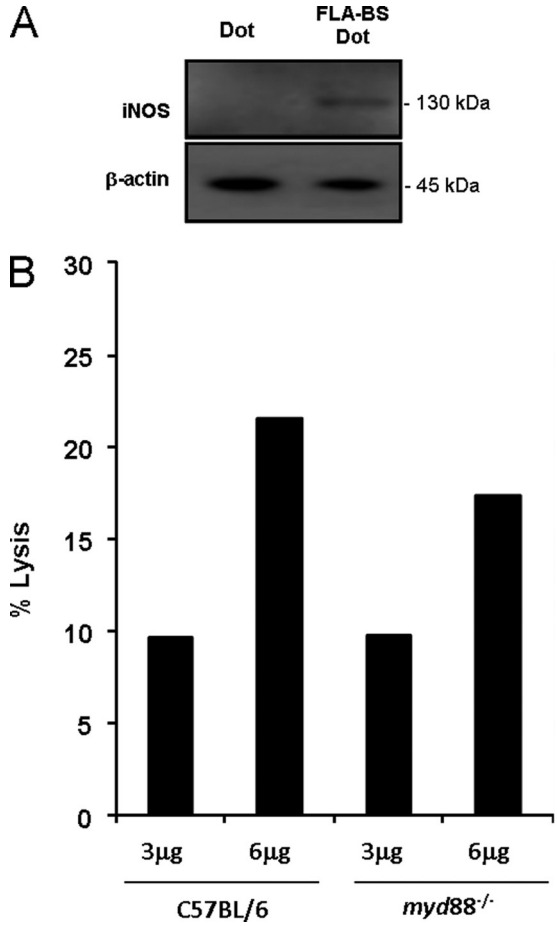


FIGURE 6. **MYD88 is not required for cytosolic flagellin-induced macrophage responses.** PMs from *Myd88*$^{-/-}$ mice were stimulated with 3 μg/ml purified cytosolic flagellin from *B. subtilis* (*FLA-BSDot*). After 6 and 24 h macrophage lysis was monitored by LDH release in culture supernatants (*B*), and iNOS expression was evaluated in cell extracts by Western blot (*A*), respectively. Data are representative of three independent experiments.

dent of IL-1 and IL-18 receptors and TLR5 signaling. Moreover, the flagellin-induced TLR-independent iNOS-activation seems to participate in the restriction of *L. pneumophila* infection. Selective inhibition of iNOS by aminoguanidine increased at the same extent the growth of wild-type *L. pneumophila* in both WT and *myd88*$^{-/-}$ C57BL/6 macrophages (supplemental Fig. 4*A*). However, aminoguanidine had no effect on the growth of the flagellin-deficient mutant FlaA *L. pneumophila* in either macrophage (supplemental Fig. 4*B*). Together, these results indicate that NO induced by flagellin through a TLR-independent pathway participate in the control of *L. pneumophila* infection by macrophages.

DISCUSSION

Flagellin is one of the rare protein structures sensed by the innate immune system and can activate both TLR and NLR receptors. Extracellular flagellin is recognized by transmembrane TLR5 (8), whereas cytosolic flagellin is sensed by Naip5 and Nlrc4 (9–13, 26, 27). Interestingly, TLR5 seems to broadly recognize flagellated bacteria, whereas sensing of Nlrc4 and Naip5 depends on specialized transport systems present in virulent bacteria, such as the type III secretion systems of *Salmonella* (10, 27) and the type IV (T4SS) of *Legionella* (9, 13). These secretion systems allow the delivery of bacterial products directly into the host cell cytoplasm. In experimental models, Nlrc4- and Naip5-induced caspase-1 activation can be achieved by delivering purified flagellin into the host cell cytosol by means of cationic liposomes or by transducing cells with appropriated gene-expression systems (10, 27, 28). Consistent with this view, TLR5 stimulation primarily leads to the activation of microbicidal effector mechanisms that are supposedly effective in controlling less

Downloaded from www.jbc.org at CAPES - USP, on September 28, 2011

aggressive, non-pathogenic bacterial infection. In contrast, a more dramatic effector mechanism consisting of a Nlrc4/Naip5-caspase-1-induce inflammatory cell death is observed only in infections with virulent bacteria (7).

Therefore, the existence of different PRRs capable of sensing the same agonist or different agonists present on the same pathogen is obviously beneficial to the host. The combined action of distinct, non-redundant, specialized responses should lead to a synergistic, more robust immunity against potential pathogens. Extracellular and intracellular recognition of flagellin induces such distinct macrophage responses. High levels of IL-6 were observed only with FLA-BS, whereas IL-1β secretion and pyroptosis were detected only with FLA-BSDot (Fig. 1 and supplemental Fig. 2). However, as the expression of PRRs is not ubiquitous and, therefore, not all host cells are equally prepared to properly recognize and handle potential pathogens, it should be interesting for the host immunity to have different PRR family sharing at least some microbicidal mechanisms.

iNOS activation by TLRs can be considered one of the major effector mechanism for controlling intracellular pathogens (29). TLRs are able to recruit NF-κB and IRF transcription factors, both necessary to induce iNOS expression and activation (30, 31). In contrast, Nod1 and Nod2 are the only NLR members known to activate NF-κB (32), resulting in the activation of a large repertoire of genes, including iNOS (33). Nlrps, Naip5, and Nlrc4 inflammasomes, on the other hand, mediate caspase-1 activation and the consequent IL-1β and IL-18 secretion and/or a programmed cell death called pyroptosis (1, 7, 34). As macrophage activation by cytosolic flagellin occurs independently of TLR5 (10, 27), our data demonstrating iNOS up-regulation by FLA-BSDot (Fig. 2) highlights the plasticity of innate immunity recognition strategies, adding a role for NO on inflammasome-mediated microbicidal pathways.

Despite the fact that both Nlrc4 and Naip5 can induce caspase-1 activation, IL-1β secretion, and pyroptosis in response to *L. pneumophila* and *S. typhimurium* flagellin, it is still obscure how exactly Nlrc4 and Naip5 individually participate in the recognition of flagellin and in the assembly of the inflammasomes. Nlrc4 can bind directly to pro-caspase-1 via a CARD-CARD homotypic interaction, but the molecular partner(s) of Naip5 remains to be solved. Interesting, Naip5 do not participate in every function of the Nlrc4-inflammasome. Nlrc4 has been shown to be crucial in host defense for a number of pathogens such as *Salmonella, Legionella, Pseudomonas,* and *Shigella*, and its genetic defect cannot be substituted by a functional Naip5 (9–12, 17, 35–37). On the other hand, Naip5 is indispensable for the resistance to *L. pneumophila* infection (13). Interestingly, FLA-BSDot-induced iNOS expression was significantly reduced in Nlrc4-deficient macrophages and completely abolished in the absence of a functional Naip5 (Fig. 3). By using highly sensitive techniques such as real-time RT-PCR, we were able to detect a slight transcriptional induction of iNOS in the mice harboring a partially mutant A/J Naip5 allele and still significantly less when compared with Nlrc4-deficient macrophages. The partial functionality of Naip5 from A/J mice (11) could account for the observed flagellin-dependent iNOS mRNA induction, an effect that possibly would not be observed in Naip5$^{-/-}$ mice. Another possible explanation for these results is that Naip5 plays an additional Nlrc4-independent role in the post-transcriptional regulation of iNOS.

Importantly, we show here for the first time that, distinct from free flagellin, the activation of iNOS by cytosolic flagellin via Nlrc4/Naip5 is dependent on caspase-1 (Fig. 4). The genetic or pharmacological inactivation of caspase-1 resulted in the abrogation of iNOS protein and mRNA expression in response to FLA-BSDot. Caspase-1 promotes the release of IL-1β and IL-18, which in turn can activate iNOS (25). In fact, it was recently shown that IFN-γ- and TNF-α-induced iNOS activation in astrocytes and cerebral endothelial cells is dependent on caspase-1-mediated IL-1β secretion (38). However, our data show that neutralization of IL-1β and/or IL-18 with specific antibodies resulted in a rather increased iNOS expression by FLA-BSDot, ruling out the requirement for these cytokines in flagellin-mediated iNOS up-regulation (Fig. 5). These observations are reinforced by the fact that *myd88*$^{-/-}$ macrophages are able to express iNOS in response to cytosolic flagellin (Fig. 6) besides their deficiency in both IL-1 and IL-18 receptor, signaling pathways. Also, the observed up-regulation of iNOS cannot be attributed to unspecific macrophage activation as anti-IL-1β- and anti-IL-18-neutralizing antibodies were not able to activate iNOS in the absence of flagellin (Fig. 5*C*). Moreover, anti-IL-1β and anti-IL-18 have no effect on IL-6 produced in response to FLA-BSDot, showing their particular involvement on iNOS modulation (supplemental Fig. 3). These data indicate that IL-1β and IL-18 are not required for iNOS activation in response to FLA-BSDot but do not discard their participation in some aspects of iNOS regulation.

Because the *iNOS* promoter contains binding sites for NF-κB and IRF-1 (30, 31), additional investigation is required to elucidate whether the up-regulation of iNOS by caspase-1 involves the activation of either or both transcription factors. Recently, it was demonstrated that IRF-1 and IRF-8 transcription factors seem to be regulated during Naip5 and Nlrc4-mediated sensing of *L. pneumophila* (39). Moreover, these authors observed that, in the absence of flagellin, there is a defective activation of *IL-12p40* and *iNOS*, the IRF-1 and IRF-8 transcriptional targets. Despite the clear evidences of Nlrc4 and Naip5-mediated caspase-1 and IRF-1/IRF-8 activation, it is not clear whether these events are correlated.

Additionally, although Nlrc4 can directly interact and activate caspase-1 via its N-terminal CARD domain (40, 41), the activation of caspase-1 by Naip5 possibly requires interaction with other proteins since Naip5 possesses a BIR domains, which for other inhibitor of apoptosis proteins family members are known to interact with different proteins (42). Regardless of the possible interaction between Naip5 and Nlrc4 (13), these NLR do not share all caspase-1-mediated functions (11), opening the possibility of interactions among Naip5 and other unknown proteins. Because multiple complexes containing more than one NLR member can be found within the same cell (34, 43), the sensing of cytosolic flagellin could lead to multiprotein complexes formation including Nlrc4, Naip5, caspase-1, IRF-1,

Downloaded from www.jbc.org at CAPES - USP, on September 28, 2011

IRF-8, or alternatively, to other NLR members and proteins involved in the activation of iNOS.

Although there are still missing pieces in the Nlrc4 and Naip5 inflammasome complexes, their role in macrophage clearance of bacterial pathogens is clear. Defects on Nlrc4 or caspase-1 render macrophages susceptible to infections such as *S. typhimurium* (10, 27), *Pseudomonas aeruginosa* (35, 36) and *Shigella flexneri* (37), whereas Naip5 deficiency lead to susceptibility against *L. pneumophila* infection (13). Because the same defects also lead to resistance to caspase-1-mediated cell death, pyroptosis seems to be the major effector mechanism to control these pathogens. However, the requirement of macrophage death during an infection and the relevance of pyroptosis *in vivo* are still matters of debate (7). In this regard, a Naip5/Nlrc4-caspase-1-dependent caspase-7 activation and phagosome maturation responsible for the inhibition of bacteria replication (44) was recently described.

Here, we are describing a novel pathway for iNOS activation orchestrated by the Naip5 and Nlrc4 and operated through caspase-1, adding a new effector mechanism mediated by inflammasomes. Importantly, this pathway cooperate with TLR-induced NO production for the control of *L. pneumophila* since pharmacological inhibition of iNOS renders higher susceptibility of both WT C57BL/6 and *myd88*$^{-/-}$ macrophages to flagellated *L. pneumophila* but not to flagellin-mutant bacteria (supplemental Fig. 4). The role of iNOS to the resistance against *L. pneumophila* was previously demonstrated (45, 46). However, iNOS seem not to be involved in the control of *L. pneumophila* by macrophages from Naip5-deficient A/J mice (47), corroborating our data showing that the TLR-independent iNOS activation is observed only in the presence of functional flagellin. It remains to be determined how caspase-1-mediated cellular events, such as pyroptosis, pro-inflammatory cytokines secretion, caspase-7, and iNOS activation cooperate to the control of infections.

REFERENCES

1. Franchi, L., Eigenbrod, T., Muñoz-Planillo, R., and Nuñez, G. (2009) *Nat. Immunol.* **10,** 241–247
2. Medzhitov, R. (2007) *Nature* **449,** 819–826
3. Akira, S., and Takeda, K. (2004) *Nat. Rev. Immunol.* **4,** 499–511
4. Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004) *Nat. Immunol.* **5,** 987–995
5. Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S. J., Moran, A. P., Fernandez-Luna, J. L., and Nuñez, G., (2003) *J. Biol. Chem.* **278,** 5509–5512
6. Inohara, Chamaillard, McDonald, C., and Nuñez, G. (2005) *Annu. Rev. Biochem.* **74,** 355–383
7. Bortoluci, K. R., and Medzhitov, R. (2010) *Cell. Mol. Life Sci.* **67,** 1643–1651
8. Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., and Aderem, A. (2001) *Nature* **410,** 1099–1103
9. Amer, A., Franchi, L., Kanneganti, T. D., Body-Malapel, M., Ozören, N., Brady, G., Meshinchi, S., Jagirdar, R., Gewirtz, A., Akira, S., and Núñez, G. (2006) *J. Biol. Chem.* **281,** 35217–35223
10. Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, T. D., Ozören, N., Jagirdar, R., Inohara, N., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E. P., and Núñez, G. (2006) *Nat. Immunol.* **7,** 576–582
11. Lightfield, K. L., Persson, J., Brubaker, S. W., Witte, C. E., von Moltke, J., Dunipace, E. A., Henry, T., Sun, Y. H., Cado, D., Dietrich, W. F., Monack, D. M., Tsolis, R. M., and Vance, R. E. (2008) *Nat. Immunol.* **9,** 1171–1178
12. Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D. M., Vucic, D., French, D. M., Lee, W. P., Roose-Girma, M., Erickson, S., and Dixit, V. M. (2004) *Nature* **430,** 213–218
13. Zamboni, D. S., Kobayashi, K. S., Kohlsdorf, T., Ogura, Y., Long, E. M., Vance, R. E., Kuida, K., Mariathasan, S., Dixit, V. M., Flavell, R. A., Dietrich, W. F., and Roy, C. R. (2006) *Nat. Immunol.* **7,** 318–325
14. Brightbill, H. D., Libraty, D. H., Krutzik, S. R., Yang, R. B., Belisle, J. T., Bleharski, J. R., Maitland, M., Norgard, M. V., Plevy, S. E., Smale, S. T., Brennan, P. J., Bloom, B. R., Godowski, P. J., and Modlin, R. L. (1999) *Science* **285,** 732–736
15. Thoma-Uszynski, S., Stenger, S., Takeuchi, O., Ochoa, M. T., Engele, M., Sieling, P. A., Barnes, P. F., Rollinghoff, M., Bolcskei, P. L., Wagner, M., Akira, S., Norgard, M. V., Belisle, J. T., Godowski, P. J., Bloom, B. R., and Modlin, R. L. (2001) *Science* **291,** 1544–1547
16. Bogdan, C. (2001) *Trends Cell Biol.* **11,** 66–75
17. Lara-Tejero, M., Sutterwala, F. S., Ogura, Y., Grant, E. P., Bertin, J., Coyle, A. J., Flavell, R. A., and Galán, J. E. (2006) *J. Exp. Med.* **203,** 1407–1412
18. Wright, E. K., Goodart, S. A., Growney, J. D., Hadinoto, V., Endrizzi, M. G., Long, E. M., Sadigh, K., Abney, A. L., Bernstein-Hanley, I., and Dietrich, W. F.. (2003) *Curr. Biol.* **13,** 27–36
19. Zamboni, D. S., and Rabinovitch, M. (2003) *Infect. Immun.* **71,** 1225–1233
20. Bastos, K. R., Alvarez, J. M., Marinho, C. R., Rizzo, L. V., and Lima, M. R. (2002) *J. Leukoc. Biol.* **71,** 271–278
21. Simberg, D., Weisman, S., Talmon, Y., and Barenholz, Y. (2004) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **21,** 257–317
22. Weinlich, R., Bortoluci, K. R., Chehab, C. F., Serezani, C. H., Ulbrich, A. G., Peters-Golden, M., Russo, M., and Amarante-Mendes, G. P. (2008) *Cell Death Differ.* **15,** 1901–1909
23. Misko, T. P., Moore, W. M., Kasten, T. P., Nickols, G. A., Corbett, J. A., Tilton, R. G., McDaniel, M. L., Williamson, J. R., and Currie, M. G. (1993) *Eur. J. Pharmacol.* **233,** 119–125
24. Diez, E., Lee, S. H., Gauthier, S., Yaraghi, Z., Tremblay, M., Vidal, S., and Gros, P. (2003) *Nat. Genet.* **33,** 55–60
25. Dinarello, C. A. (2009) *Annu. Rev. Immunol.* **27,** 519–550
26. Ren, T., Zamboni, D. S., Roy, C. R., Dietrich, W. F., and Vance, R. E. (2006) *PLoS Pathog.* **2,** e18
27. Miao, E. A., Alpuche-Aranda, C. M., Dors, M., Clark, A. E., Bader, M. W., Miller, S. I., and Aderem, A. (2006) *Nat. Immunol.* **7,** 569–575
28. Silveira, T. N., and Zamboni, D. S. (2010) *Infect. Immun.* **78,** 1403–1413
29. Bogdan, C. (2001) *Nat. Immunol.* **2,** 907–916
30. Kamijo, R., Harada, H., Matsuyama, T., Bosland, M., Gerecitano, J., Shapiro, D., Le, J., Koh, S. I., Kimura, T., and Green, S. J. (1994) *Science* **263,** 1612–1615
31. Lowenstein, C. J., Alley, E. W., Raval, P., Snowman, A. M., Snyder, S. H., Russell, S. W., and Murphy, W. J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90,** 9730–9734
32. Tattoli, I., Travassos, L. H., Carneiro, L. A., Magalhaes, J. G., and Girardin, S. E. (2007) *Semin. Immunopathol.* **29,** 289–301
33. Tötemeyer, S., Sheppard, M., Lloyd, A., Roper, D., Dowson, C., Underhill, D., Murray, P., Maskell, D., and Bryant, C. (2006) *J. Immunol.* **176,** 4804–4810
34. Ting, J. P., Willingham, S. B., and Bergstralh, D. T. (2008) *Nat. Rev. Immunol.* **8,** 372–379
35. Miao, E. A., Ernst, R. K., Dors, M., Mao, D. P., and Aderem, A. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105,** 2562–2567
36. Sutterwala, F. S., Mijares, L. A., Li, L., Ogura, Y., Kazmierczak, B. I., and Flavell, R. A. (2007) *J. Exp. Med.* **204,** 3235–3245
37. Suzuki, T., Franchi, L., Toma, C., Ashida, H., Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Mimuro, H., Inohara, N., Sasakawa, C., and Nuñez, G. (2007) *PLoS Pathog.* **3,** e111
38. Jüttler, E., Bonmann, E., Spranger, M., Kolb-Bachofen, V., and Suschek, C. V. (2007) *Mol. Cell. Neurosci.* **34,** 612–620
39. Fortier, A., Doiron, K., Saleh, M., Grinstein, S., and Gros, P. (2009) *Infect. Immun.* **77,** 4794–4805
40. Poyet, J. L., Srinivasula, S. M., Tnani, M., Razmara, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (2001) *J. Biol. Chem.* **276,** 28309–28313
41. Martinon, F., and Tschopp, J. (2007) *Cell Death Differ.* **14,** 10–22

Downloaded from www.jbc.org at CAPES - USP, on September 28, 2011

42. Mace, P. D., Shirley, S., and Day, C. L. (2010) *Cell Death Differ.* **17,** 46–53
43. Bergsbaken, T., Fink, S. L., and Cookson, B. T. (2009) *Nature Reviews* **7,** 99–109
44. Akhter, A., Gavrilin, M. A., Frantz, L., Washington, S., Ditty, C., Limoli, D., Day, C., Sarkar, A., Newland, C., Butchar, J., Marsh, C. B., Wewers, M. D., Tridandapani, S., Kanneganti, T. D., and Amer, A. O. (2009) *PLoS Pathog.* **5,** e1000361
45. Summersgill, J. T., Powell, L. A., Buster, B. L., Miller, R. D., and Ramirez, J. A. (1992) *J. Leukoc. Biol.* **52,** 625–629
46. Skerrett, S. J., and Martin, T. R. (1996) *Infect. Immun.* **64,** 3236–3243
47. Gebran, S. J., Yamamoto, Y., Newton, C., Klein, T. W., and Friedman, H. (1994) *Infect. Immun.* **62,** 3197–3205

Downloaded from www.jbc.org at CAPES - USP, on September 28, 2011