

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Revisitando a cavidade peritoneal de camundongos: identificação de
novos subtipos funcionais de linfócitos B-1 e macrófagos

Eliver Eid Bou Ghosn

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo

2008

19468

DEDALUS - Acervo - CQ



30100015061

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Ghosn, Eliver Eid Bou
G427r Revisitando a cavidade peritoneal de camundongos: identificação
de novos subtipos funcionais de linfócitos B-1 e macrófagos /
Eliver Eid Bou Ghosn. -- São Paulo, 2008.
137p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Almeida, Sandro Rogério de

1. Imunologia 2. Anticorpo : Imunologia 3. Macrófago :
Imunologia : Medicina 4. Citometria de fluxo : Prática I. T. II.
Almeida, Sandro Rogério de, orientador.

615.37 CDD

Eliver Eid Bou Ghosn

Revisitando a cavidade peritoneal de camundongos: identificação de
novos subtipos funcionais de linfócitos B-1 e macrófagos

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Sandro R. de Almeida, pela amizade, apoio e incentivo durante o meu programa de doutorado com estágio no exterior (PDEE-CAPES), realizado nos EUA (Stanford University), e pela ajuda na elaboração deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos e membros do laboratório do Prof. Sandro R. de Almeida, em especial à Maria da Glória Teixeira de Sousa, pelas várias ajudas incondicionais e pelas discussões indispensáveis durante toda minha trajetória na pós-graduação.

Deixo aqui meu carinho e agradecimento à maioria das pessoas que trabalham no Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF-USP). Confesso as saudades que sentirei dos professores, dos alunos “amigos de corredor”, das secretárias, das mulheres que cuidam da limpeza e manutenção do prédio e, especialmente, do café e do sorriso da “Dona Dorlei”.

Este trabalho foi realizado em colaboração com os pesquisadores do laboratório da Dra. Leonore A. Herzenberg (Stanford University/EUA). A oportunidade de conviver com a Lee foi, sem dúvida, o maior benefício resultante da colaboração com Stanford. Lee é responsável por me fazer reconhecer minhas excitações e interesses científicos.

Parte dos resultados apresentados aqui foram realizados em colaboração com a Dra. Yang Yang (Stanford University/EUA), a qual admiro muito e agradeço pela prazerosa e produtiva parceria. Os artigos publicados em colaboração com Yang estão incorporados no final deste trabalho, nos Apêndices I e II.

Agradeço ao Dr. James Tung, (atualmente em Las Vegas/EUA). Jimmy (como gostava de ser chamado) foi responsável por minha iniciação no uso da tecnologia de citometria de fluxo. Jimmy me ensinou todos os conceitos do FACS e do software Flowjo, ambos utilizados para coleta e análise dos dados apresentados nesta tese.

Agradeço à Megan Phillips (Stanford University/USA) pela excepcional ajuda técnica para a realização de grande parte dos experimentos apresentados nesta tese.

Agradeço, também, aos meus amigos e membros do laboratório dos Drs. Leonard e Leonore A. Herzenberg, que receberam, desarmados, um brasileiro ansioso e, cientificamente, imaturo.

Agradeço aos amigos Elaine Midori Ychico e Jorge Alves de Lima, secretários da pós-graduação, pela ajuda durante todo o meu período na FCF-USP. Agradeço também pela amizade e reconheço a enorme eficiência com que ambos dirigem a secretaria.

Minha ida aos EUA só foi possível graças ao esforço e ajuda de alguns professores da FCF-USP, em especial Elizabeth Igne Ferreira. Agradeço à sua eficiência e ao seu enorme incentivo e carinho.

Se eu fosse escolher um nome para simbolizar minha passagem pela pesquisa na USP, especialmente na imunologia, certamente seria Momtchilo Russo. Você me fez admirar e respeitar a ciência; sua figura, certamente, influenciou as minhas escolhas. Finalmente, não poderia deixar de agradecer, novamente, por você ter me apresentado ao casal Herzenberg em novembro de 2004. Seu ato, certamente, determinou meu caminho até aqui.

Termino agradecendo à professora Ana Campa. Sem motivos muito claros. Você foi essencial para deixar esse departamento mais humano e também por me fazer sentir apaixonado por várias vezes. Esses sentimentos não me serviram de alicerce, tampouco foram necessários; mas me foram inspiradores, influenciaram muito minha personalidade e ajudaram a desenhar o resultado final.

Este trabalho foi financiado, em parte, pelo National Institute of Health (EUA), através do grant AI 076434. O programa de doutorado “sanduíche” (PDEE) em Stanford foi financiado (bolsa pessoal de pesquisa) pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). O programa de doutorado no Brasil (FCF/USP) foi financiado (bolsa pessoal de pesquisa) pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

RESUMO

A cavidade peritoneal de camundongos abriga uma variedade de células do sistema imune. Inicialmente, devido as limitações metodológicas, acreditava-se que, aproximadamente, 90% das células peritoneais era representada por macrófagos. Em seguida, graças aos extensos estudos com células peritoneais, observou-se que, além dos macrófagos, o peritônio abrigava muitos linfócitos B, principalmente do subtipo B-1. Utilizando metodologias contemporâneas de FACS – citometria de fluxo, este trabalho mostra que, aproximadamente, 30% das células peritoneais são macrófagos, 55% são linfócitos B-1, dos quais 40% pertencem ao subtipo B-1a e 15% ao subtipo B-1b. Os 15%-20% restantes representam outros subtipos celulares, como linfócitos T, linfócitos B-2, linfócitos NK, eosinófilos, além da presença de outras populações de células que não foram possíveis de ser identificadas com os marcadores de superfície utilizados neste trabalho.

Em contraste com a literatura, nossos estudos mostraram que os macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos representam uma população heterogênea. Por meio da co-expressão de CD11b e F4/80, foi possível descrever dois subtipos funcionais de macrófagos, denominados aqui de PM-1 (CD11b^{high}, F4/80^{high}) e PM-2 (F4/80^{low}, CD11b^{int}). As células PM-2 encontram-se em menor abundância (~10% do total de macrófagos) no peritônio não estimulado e, diferentemente de células PM-1, espraíam-se de forma alongada (bipolar) quando colocadas em cultura. Curiosamente, PM-2 são os únicos macrófagos peritoneais que expressam MHC-II e, ainda, 30% dessa população expressa CD11c, o marcador típico de células dendríticas. Já as células PM-1 possuem morfologia arredondada, estão em abundância no peritônio e produzem altas doses de NO após estímulo com LPS. Ambas as células são capazes de fagocitar bactérias *in vivo*, no entanto, as células PM-2 parecem mais eficientes, sendo capazes de internalizar quantidades maiores de bactérias. Após infecção *in vivo*, o número absoluto e a porcentagem de PM-2 aumenta muito no peritônio, chegando a representar metade dos fagócitos da cavidade peritoneal. Os macrófagos PM-1 e PM-2 parecem não representar monócitos já que não compartilham do fenótipo de monócitos presentes no sangue periférico. Deve-se ressaltar que, além das células PM-1 e PM-2, outras subpopulações do peritônio também expressam CD11b e F4/80.

Com base na literatura atual, acredita-se que todas as células B-1 do peritônio expressam CD11b, uma molécula que é co-expressa com CD18 para formar o receptor de complemento e a molécula de adesão Mac-1. Entretanto, os estudos, apresentados neste trabalho, mostram que metade de cada subtipo de B-1 (B-1a e B-1b) não expressa CD11b. As células B-1 CD11b⁺ são maiores, mais granulosas e expressam quantidades maiores de IgM de superfície. As células CD11b⁺ possuem uma curiosa tendência de se juntar e formar duplas (*doublets*) fortemente ligadas entre si que estão presentes em abundância no peritônio de camundongos adultos. Além de ligarem entre si, as células B-1 podem formar duplas com macrófagos PM-1 e PM-2. Durante a ontogenia, as células CD11b⁻ surgem primeiro no peritônio e são as progenitoras das células B-1 CD11b⁺. Após estímulo inflamatório (LPS i.v.) os linfócitos B-1 CD11b⁺ migram do peritônio para o baço, onde proliferam e transformam-se em células secretoras de anticorpos (plasmócitos). No peritônio, as células B-1 não são capazes de se diferenciar em plasmócitos (células CD138^{high}). Os resultados apresentados aqui mostraram que, diferentemente dos macrófagos PM-2, os PM-1 são os responsáveis por inibir a formação de células secretoras de anticorpos derivadas de B-1. Em suma, nossos dados sugerem que, mediante estímulo inflamatório, as células B-1 maduras (CD11b⁺) migram do peritônio para o baço, afastando-se de macrófagos PM-1. Já no baço, as células B-1 encontram um micro-ambiente favorável para se proliferarem e diferenciarem-se em plasmócitos, secretando a maioria dos anticorpos naturais vistos logo nas primeiras horas pós-estímulo.

Palavras-chaves: CD11b. F4/80. LPS. Plasmócitos. FACS (citometria de fluxo)

Revisiting the mouse peritoneal cavity: identification of new functionally distinct subsets of macrophages and B-1 lymphocytes

ABSTRACT

Mouse peritoneal cavity (PerC) represents the source for a variety of cellular subsets of the immune system. In early studies, marred by limited methodological tools, it was thought that macrophages comprise roughly 90% of total PerC cells. Shortly thereafter, it was recognized that, beside macrophages, the mouse peritoneal cavity shelters large amount of B-lymphocytes, specially the B-1 subset. In essence, by applying contemporary technology, studies presented here show that, roughly 30% of PerC cells comprise macrophages, 55% comprise B-1 cells, which 40% represents the B-1a subset and roughly 15% are B-1b cells. The remaining 15%-20% of PerC cells comprise a variety of known immune cells, including B-2, T, NK and eosinophils. In addition, there were some other cellular subsets that could not be identified in these studies, probably due to limited cell surface molecules analyzed.

Surprisingly, the data presented here show that peritoneal macrophages represent a highly heterogeneous population. Based on the co-expression of both CD11b and F4/80, we have identified two functionally distinct subsets of peritoneal macrophages, named here as PM-1 (CD11b^{high}, F480^{high}) and PM-2 (CD11b^{int}, F4/80^{low}). PM-2 are less abundant (~10% within total macrophages) in the PerC of unstimulated mouse, however, unlike PM-1, these cells are able to spread in spindle (bipolar) morphology upon sorting and *in vitro* culture. Curiously, PM-2 is the only PerC macrophage that expresses surface MHC-II. In addition, one third of PM-2 population expresses CD11c, a universal marker for dendritic cells. In turn, PM-1 cells are round shaped cells, represent the majority of PerC macrophages (~90%) and secrete high amounts of NO upon LPS stimulation. *In vivo* phagocytosis assay revealed that both cells could internalize bacteria, however, PM-2 cells showed to be more efficient, in that it was able to phagocyte higher amounts of bacteria when compared to PM-1. After i.p. *in vivo* stimulation, the absolute number and percentage of PM-2 cells increase drastically in the peritoneum, reaching almost half of the total PerC macrophages. Importantly, PM-1 and PM-2 macrophages seem not to represent PerC monocytes since it does not share any of the phenotype expressed by blood monocytes. Interestingly, in addition to PM-1 and PM-2, some other cellular subsets in the PerC, such as eosinophils, are able to express CD11b and F4/80.

PerC B-1 cells have long been known to express CD11b, which is co-expressed with CD18 to form the Mac-1/CR3 complement receptor and adhesion molecule. However, although all PerC B-1 cells are commonly believed to express CD11b, we show here that nearly half of the cells in each of the PerC B-1 subsets (B-1a and B-1b) do not express this surface receptor. The CD11b⁺ cells in each B-1 subset are larger, more granular and express higher levels of surface IgM than the CD11b⁻ B-1 cells. Surprisingly, the CD11b⁺ B-1 subset has the curious tendency to initiate the formation of tightly associated doublets that are present at high frequency in adult PerC. In addition to binding to each other, B-1 cells can also form doublets with PM-1 and PM-2. During ontogeny, CD11b⁻ B-1 cells arise earlier in the mouse PerC and are the progenitors of CD11b⁺ B-1 cells. Upon LPS stimulation, PerC CD11b⁺ B-1 cells migrate to the spleen where they proliferate and differentiate into antibody-secreting cells (plasma cells). Within the PerC, B-1 cells are not able to differentiate into plasma cells (CD138^{high} cells). The data shown in here reveal that, unlike PM-2, PM-1 macrophages are the cellular subset responsible for inhibiting the formation of B-1-derived antibody-secreting cells. Altogether, our data suggest that, upon inflammatory stimuli, mature CD11b⁺ B-1 cells migrate from the PerC to the spleen, avoiding the inhibitory effect of PM-1 cells. In the spleen, B-1 cells find an appropriate environment to proliferate and terminally differentiate into antibody-secreting cells, thus, secreting the majority of immunoglobulin seen in few hours after *in vivo* stimulation.

Keywords: CD11b. F4/80. LPS. Plasma cell. FACS (flow cytometry)

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Descrição dos subtipos de células presentes na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c não estimulados: utilização de Hi-D FACS para análise simultânea de 13 parâmetros.....	57
Figura 2. Co-expressão de CD11b e F4/80 identifica duas subpopulações de macrófagos peritoneais: PM-1 e PM-2	60
Figura 3. Expressão de Gr-1, Ly-6C e CD11c na superfície dos macrófagos PM-1 e PM-2.....	61
Figura 4. Morfologia das células PM-1 e PM-2.....	64
Figura 5. Ensaio de fagocitose <i>in vivo</i>	65
Figura 6. PM-1 secretam mais NO do que PM-2 após estímulo <i>in vitro</i>	67
Figura 7. Os linfócitos B-1 peritoneais não foram capazes de fagocitar bactérias <i>in vivo</i>	68
Figura 8. <i>Doublets</i> de linfócitos B-1 no peritônio	72
Figura 9. As células B-1 <i>singlets</i> do peritônio são as precursoras das células B-1 <i>doublets</i>	74
Figura 10. Microscopia eletrônica de linfócitos B-1 <i>doublets</i>	76
Figura 11. Macrófagos peritoneais também formam <i>doublets</i> com linfócitos B-1.....	79
Figura 12. Granulócitos no peritônio: eosinófilos também co-expressam F4/80 e CD11b.....	81
Figura 13. A expressão de CD11b distingue subtipos de linfócitos B-1 no peritônio.....	86
Figura 14. Células B-1 CD11b ⁻ dão origem às células B-1 CD11b ⁺ em recipientes adotivos	90
Figura 15. Células CD11b ⁺ surgem tardiamente durante a ontogenia, porém expressam o fenótipo típico das células B-1 neonatais, as quais gradativamente alteram-se para o fenótipo predominante de células B-1 adultas	93
Figura 16. Expressão de CD11b marca as células B-1 recém-migradas do peritônio para o baço, no qual transformam-se em células secretoras de anticorpos naturais	95
Figura 17. Diferenciação de linfócitos B-1 em plasmócitos: células totais de peritônio.....	98
Figura 18. PM-1 inibe a formação de plasmócitos <i>in vitro</i>	99
Tabela 1. Os subtipos CD11b ⁻ e CD11b ⁺ de linfócitos B-1 apresentam diferentes expressões fenotípicas.....	87

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Cavidade peritoneal de camundongos.....	8
1.1.1 Populações celulares do peritônio	9
1.2 Macrófagos peritoneais.....	11
1.3 Linfócitos B-1	17
1.3.1 Ontogenia	19
1.3.2 Subtipos de linfócitos B e suas vias de desenvolvimento.....	21
1.3.3 Teoria da evolução em camadas do sistema imune.....	24
1.3.4 Linfócitos B-1b, mais um subtipo celular presente no repertório linfóide do camundongo.....	25
1.3.5 Localização anatômica	29
1.3.6 Repertório.....	31
1.3.7 Fenótipo.....	32
1.3.8 Compartimentos integrados	34
1.3.9 “Na saúde e na doença”.....	35
1.4 Linfócitos B-1, macrófagos e <i>lymphophages</i>: processo evolutivo, promiscuidade celular ou limitações nas metodologias de análise?.....	39
2. OBJETIVO.....	44
3. METODOLOGIA.....	45
3.1 Animais e preparação de células	45
3.2 Citometria de fluxo	45
3.3 Separação de células por FACS e transferência de células <i>in vivo</i>	47
3.4 Transferência de células totais de peritônio e injeção de LPS i.v. para ensaio de migração.....	48
3.5 Indução de plasmócitos <i>in vitro</i> : co-cultura de células separadas por FACS	49
3.6 Dosagem de óxido nítrico (NO) por citometria de fluxo.....	50
3.7 Ensaio de fagocitose <i>in vivo</i> utilizando-se partículas ou bactérias mortas	51
3.8 Ensaio de fagocitose <i>in vivo</i> utilizando-se bactérias vivas expressando green fluorescence protein	51
3.9 Microscopia confocal.....	52
3.10 Microscopia eletrônica	53
4. RESULTADOS	55
4.1 “Janela dos leucócitos FSc ^{high} ”	55
4.1.1 Co-expressão de CD11b e F4/80 identifica duas subpopulações de macrófagos com fenótipo e morfologia distintas: PM-1 e PM-2	58
4.1.2 Células dendríticas estão contidas na população PM-2	59
4.1.3 Morfologia: PM-1 <i>versus</i> PM-2.....	62
4.1.4 Ensaio de fagocitose e produção de NO: PM-1 <i>versus</i> PM-2.....	62

4.2 Doublets de linfócitos B-1 no peritônio	69
4.2.1 As células B-1 <i>singlets</i> (FSc ^{low}) do peritônio são as precursoras das células B-1 <i>doublets</i> (FSc ^{high})	73
4.2.2 Linfócitos B-1 <i>doublets</i> : novos personagens de uma sinapse imunológica?	75
4.2.3 Macrófagos peritoneais também formam <i>doublets</i> com linfócitos B-1	77
4.3 Granulócitos (SSc^{high})	80
4.4 “Janela dos linfócitos”: FSc^{low} e SSc^{low}	82
4.4.1 A expressão de CD11b distingue subtipos de linfócitos B-1 no peritônio	85
4.4.2 Linfócitos B-1 CD11b ⁺ e CD11b ⁻ possuem fenótipos distintos	85
4.4.3 Células B-1 CD11b ⁻ são progenitoras das células B-1 CD11b ⁺	88
4.4.4 A expressão de CD11b é adquirida tardiamente durante a ontogenia de células B-1	91
4.4.5 O fenótipo predominante de células B-1 altera-se durante ontogenia.....	92
4.4.6 A expressão de CD11b marca células B-1 recém-migradas do peritônio para o baço	94
4.4.7 Células B-1 CD11b ⁺ peritoneais migram para o baço e transformam-se em células secretoras de anticorpos naturais	94
4.5 Diferenciação de linfócitos B-1 peritoneais em plasmócitos CD138⁺	96
4.5.1 Linfócitos B-1 isolados de peritônio são capazes de diferenciar-se em células secretoras de anticorpos	96
4.5.2 Macrófagos PM-1 inibem a formação de plasmócitos <i>in vitro</i>	97
5. DISCUSSÃO	100
5.1 Leucócitos Fsc ^{high}	100
5.2 <i>Doublets</i>	110
5.3 Linfócitos.....	117
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
7. APÊNDICE	137
8. ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cavidade peritoneal de camundongos

Durante a ontogenia de espécies “superiores” ocorre o desenvolvimento de três folhetos embrionários: ectoderme, endoderme e mesoderme¹. Este último folheto é responsável pelo desenvolvimento de um tecido de revestimento que abriga a maioria dos órgãos e resulta numa cavidade conhecida como celoma. Entretanto, entre as espécies mais primitivas, como águas-vivas e corais, ocorre apenas o desenvolvimento dos dois primeiros folhetos embrionários (ectoderme e endoderme) e, portanto, estas espécies são carentes de um celoma¹. A cavidade ou celoma abdominal que abriga, principalmente, o aparelho digestório é formada por uma membrana serosa chamada de peritônio e, por isso, é referida como cavidade peritoneal. Entre as diversas funções atribuídas ao peritônio, pode-se destacar a produção de muco para proteção e acomodação dos órgãos internos.

Na vida adulta, a cavidade peritoneal abriga uma variedade de células do sistema imune. Inicialmente estudadas em camundongos, as células da cavidade peritoneal serviam (e ainda servem) como excelente fonte para “isolamento” de fagócitos mononucleares, já que estas células encontram-se em abundância neste compartimento. Os trabalhos com células de cavidade peritoneal, principalmente macrófagos, tiveram avanços no início da década de 1960 graças aos experimentos pioneiros de um grupo de pesquisadores, nos EUA, liderados pelo professor Zanvil Alexander Cohn (1926-1993)²⁻⁴. Grande parte da biologia dos macrófagos conhecida e aceita atualmente deve-se aos estudos de Cohn com células peritoneais de camundongos.

Entre as descobertas de Cohn, utilizando culturas de macrófagos peritoneais, ressalta-se a descrição da função dos lisossomos após o processo de fagocitose^{5,6}. Cohn descreveu que os grânulos de macrófagos representavam lisossomos que, durante os eventos da fagocitose, fundiam-se ao fagossomo (formando o fagolisossomo), onde liberavam seus grânulos para digerir as partículas fagocitadas⁵. Os trabalhos de Cohn foram fundamentais para se construir a base do atual conhecimento da biologia do macrófago, uma célula que esteve em foco já no século XIX com os trabalhos iniciados pelo “pai da fagocitose”, Ilya Ilyich Mechnikov

(também conhecido como Elie Metchnikoff, 1845-1916, Prêmio Nobel de Medicina de 1908).

1.1.1 Populações celulares do peritônio

Durante os estudos iniciais com células de peritônio, principalmente com peritônio de camundongos, considerava-se que os macrófagos fossem as principais células que habitavam esta cavidade. De fato, a grande quantidade destas células no peritônio e sua facilidade de adesão *in vitro*, contribuíram para tal consideração equivocada. Além disso, quando os estudos com células peritoneais se iniciaram, as condições experimentais para caracterização fenotípica de outros subtipos celulares eram muito precárias, favorecendo a hipótese de que a cavidade peritoneal de camundongos fosse constituída por aproximadamente 90% de macrófagos.

O aprimoramento das metodologias de pesquisa aliado ao interesse cada vez maior sobre as células do peritônio foram suficientes para desvendar a complexidade celular e fisiológica da cavidade peritoneal. A descoberta de um novo subtipo de linfócitos B, na década de 1980⁷⁻⁹, introduziu mais um personagem no contexto de células peritoneais¹⁰. Os pesquisadores da *Stanford University* (Califórnia, EUA), liderados pela Dra. Leonore A. Herzenberg, descreveram a existência de uma população de linfócitos B que expressavam níveis detectáveis de *cluster of differentiation* (CD)5, uma molécula até então encontrada apenas em linfócitos T. Estes linfócitos B CD5⁺ apresentavam diferenças notáveis de ontogenia, fenótipo e função quando comparados aos linfócitos B “convencionais”. Essas diferenças permitiram a classificação das células B CD5⁺ em um novo subgrupo celular, denominado de linfócitos B-1 (descritos, em detalhes, a seguir)⁷⁻⁹. Com o avanço nas pesquisas sobre células B-1 observou-se que a cavidade peritoneal de camundongos constituía um dos principais hábitat destas células, as quais permaneciam em abundância no peritônio durante toda a vida adulta do animal.

Essas recentes descobertas aceleraram o interesse sobre a fisiologia das células da cavidade peritoneal, que já dava indícios de representar um importante nicho imunológico. Levou algum tempo até que a comunidade científica reconhecesse que as populações celulares que habitavam o peritônio eram divididas entre macrófagos e células B-1. Conseqüentemente, deu-se início a uma nova fase de estudos sobre resposta imunológica, que adquiriu uma visão mais ampla e

também direcionada ao comportamento celular da cavidade peritoneal frente a diversos estímulos.

O conhecimento a respeito das populações celulares que habitam o peritônio manteve-se inalterado por algum tempo, até o surgimento de novas tecnologias e metodologias de pesquisa, como o *High-Dimensional Fluorescent Activated Cell Sorter* (Hi-D FACS) digital¹¹. O Hi-D FACS permite a análise simultânea de aproximadamente 20 marcadores de superfície celular, utilizando-se de 20 diferentes fluorocromos detectáveis por diferentes *lasers* presentes no aparelho. Dessa forma, com apenas uma amostra de células de peritônio é possível identificar as diferentes populações celulares que habitam a cavidade, num espectro de possibilidades de análise igual a 20! (fatorial). Esse grande avanço tecnológico novamente direcionou os passos seguintes da imunologia, e permitiu descrever diversas outras populações celulares presentes na cavidade peritoneal de camundongos.

Alguns trabalhos, ainda recentes, foram fundamentais para alertar sobre a diversidade celular que se abriga no peritônio. Nesta área, destacam-se as pesquisas lideradas por Christian Bogdan (*University of Freiburg/Alemanha*). Este autor mostrou, de forma pioneira, que, ao contrário do que se acreditava, os macrófagos peritoneais não representam mais do que 50% do total de células do peritônio¹². Utilizando citometria de fluxo como ferramenta de análise, Bogdan e colaboradores identificaram alguns linfócitos T e linfócitos *Natural killer* (NK), os quais, juntos com os macrófagos, co-habitam o peritônio. Mais ainda, os autores mostraram que o protocolo de aderência de células, utilizado para isolar macrófagos peritoneais, é ineficiente para analisar a maioria das funções biológicas destes fagócitos. Foi demonstrado que a mínima contaminação por células NK, durante a aderência de células peritoneais, é suficiente para se detectar altas quantidades de interferon- γ (IFN- γ) na cultura, provenientes destas células "contaminantes"¹². Este resultado obtido pela metodologia (ineficiente) de aderência fez surgir o conceito equivocado de que os macrófagos peritoneais seriam os responsáveis pela secreção (autócrina) das quantidades de IFN- γ detectadas nos sobrenadantes de cultura. Dessa forma, os autores alertaram para a necessidade de se utilizar metodologias contemporâneas que permitissem o isolamento de uma população muito mais pura de macrófagos¹³. Infelizmente, os trabalhos de Bogdan não fazem referência à

existência, há muito tempo comprovada, de uma enorme quantidade de células B-1 no peritônio.

Apesar dos avanços nesta área, a economia e o real conteúdo da cavidade peritoneal ainda não são claramente conhecidos. Sabe-se, no entanto, que diversas células, como linfócitos T, linfócitos NK, macrófagos e, principalmente, linfócitos B, habitam o peritônio, o transformando num verdadeiro “órgão linfóide”. A caracterização dessas populações que habitam o peritônio (por meio de um Hi-D FACS digital) é central neste trabalho e, conseqüentemente, a frequência e o fenótipo de alguns subtipos celulares serão descritos na seção de resultados.

Finalmente, é possível afirmar que as células que habitam a cavidade peritoneal mantêm íntima e persistente comunicação com as células (imunes) presentes em outros compartimentos do organismo. Essa relação é melhor observada mediante estímulos sistêmicos (como, por exemplo, as endotoxinas bacterianas chamadas de lipopolissacarídeos – LPS), que facilmente perturbam as células peritoneais, as quais respondem em poucos minutos¹⁴. Graças a sua imediata resposta ao estímulo, as células presentes na cavidade peritoneal, inclusive as células B-1, são geralmente consideradas como pertencentes ao sistema imune “inato” (dentro da divisão teórica e didática da imunologia, que separa o sistema imune em inato *versus* adquirido). Alguns exemplos da participação ativa (e fundamental) das células peritoneais em resposta às perturbações sistêmicas também serão descritos neste trabalho.

1.2 Macrófagos peritoneais

Já no final do século XIX, Elie Metchnikoff alertava para um fenômeno celular que chamou de fagocitose¹⁵. As células que ele estudava, de larvas de estrela-do-mar, eram capazes de ingerir (e, provavelmente, digerir) as partículas estranhas com as quais eram desafiadas. Metchnikoff interpretou estes dados sugerindo que esse fenômeno, também presente em seres primitivos unicelulares, como as amebas (provavelmente refletindo uma necessidade básica de alimentação), fosse uma herança evolutiva que se reorganizou nos seres multicelulares para (também) participar de um mecanismo mais sofisticado de proteção às infecções¹⁵.

Os macrófagos peritoneais pertencem ao grande “sistema mononuclear fagocítico”, que abriga diferentes subtipos celulares distribuídos por todo o organismo, que incluem: células de *kupffer* no fígado, macrófagos alveolares no

pulmão, microglias no cérebro, osteoclastos, macrófagos presentes em granulomas, células dendríticas e, finalmente, macrófagos peritoneais^{4,16,17}. Estas células são originadas de progenitores hematopoiéticos que, continuamente, renovam o *pool* de células fagocíticas, embora haja evidências de que algumas células mielóides sejam capazes de se auto-renovarem *in situ*¹⁷⁻¹⁹.

O processo de fagocitose é essencial tanto para a proteção contra patógenos como também para a ingestão de resíduos endógenos resultantes de atividades fisiológicas. Esta observação permite concluir que, assim como sugeriu Jules Bordet (1870-1961, Prêmio Nobel de Medicina em 1919), os macrófagos, provavelmente, não devem ter se originado para combater microorganismos, já que o processo de digestão celular – ou fagocitose (utilizado no processo de alimentação de organismos unicelulares, como as amebas) trata-se de uma função primitiva que existiria mesmo na ausência de organismos patogênicos²⁰.

Atualmente, nos vertebrados, o processo de fagocitose realizado pelos macrófagos peritoneais permite a proteção contra patógenos intracelulares ou extracelulares, os quais podem ser facilmente ingeridos após a opsonização tanto com fatores do complemento (fragmentos C3), quanto com anticorpos e proteínas secretadas pelo fígado durante a inflamação. Além do auxílio recebido pelas moléculas opsonizantes, os macrófagos também possuem receptores que podem reconhecer diretamente determinados padrões moleculares presentes nos microorganismos^{21,22}. Em seguida, o material fagocitado é logo digerido por processos enzimáticos derivados dos lisossomos citoplasmáticos e também de rotas bioquímicas de geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

Entretanto, como observou Thomas Kuhn, a ciência geralmente não progride através da acumulação linear de conhecimento, mas enfrenta periódicas revoluções que, freqüentemente, resultam em grandes alterações no paradigma vigente, que logo muda o rumo da nova ciência para recomeçar um novo ciclo²³. Assim, o grande interesse no estudo das células fagocíticas, incentivado por Metchnikoff, logo perdeu espaço para as recentes e “fascinantes” descobertas sobre as células linfóides. Os estudos com linfócitos se expandiram muito e, provavelmente, alcançaram seu ápice na década de 1950 com a “teoria da seleção clonal” descrita pelo virologista e imunologista australiano Frank Macfarlane Burnet (1899-1985, Prêmio Nobel de Medicina de 1960), que pretendia explicar, através da geração de linfócitos, o funcionamento do sistema imune^{24,25}. Ainda, a descrição da teoria de seleção clonal,

proposta por Burnet, foi responsável pela introdução, na área da imunologia, de um conceito teórico muito interessante, porém duvidoso: a descrição do *self* versus *non-self*²⁶. Coincidentemente, essa necessidade de distinguir o que é próprio (*self*) do que é alheio – ou não-próprio (*non-self*) surgiu depois da Segunda Guerra Mundial, num ambiente individualista e egocêntrico que provavelmente influenciou os imunologistas de espírito belicoso a utilizarem metáforas protecionistas para também descrever o *modus operandi* do complexo sistema imune²⁷.

Entretanto, no final dos anos 1980, o entendimento de que as células fagocíticas, que passaram a ser chamadas de “células apresentadoras de antígeno”, são fundamentais para a desejada ativação dos “fascinantes” linfócitos, renovou o interesse dos imunologistas pelos fagócitos, que, além dos macrófagos, passou a incluir as células dendríticas (descobertas na década de 1970 por Zanvil Cohn e Ralph Steinman²⁸). Paralelamente, foi também no final dos anos 1980 que Charles Janeway (1943-2003, professor da *Yale University/EUA*) propôs que o sistema imune inato seria o responsável por decidir se o sistema imunológico responderia ou não a um determinado estímulo antigênico^{29,30}. Sua teoria propunha ainda que o sistema imune inato tomava esta “decisão” através do reconhecimento de padrões moleculares presentes nos microorganismos (*pathogen-associated molecular pattern* – PAMP) e conservados durante a evolução. Estes PAMP seriam reconhecidos pelas células através de receptores específicos para estes padrões moleculares de microorganismos (*pathogen recognition receptor* – PRR). A maioria destes receptores possui sítios de ligação extracelular ricos em repetições de leucina, que foram conservados através da filogenia. Atualmente, são descritos diversos PRR, que estão presentes na maioria das células do sistema imune e iniciam a ativação e a função do sistema imune inato, principalmente através da ativação de macrófagos e de células dendríticas, que, conseqüentemente, iniciam a ativação do sistema imune adaptativo^{21,22,30}.

Vale ressaltar que, no início dos anos 1990, Polly Matzinger (*National Institute of Health/EUA*) introduziu um outro argumento teórico para descrever o funcionamento do sistema imune e fez ressurgir a discussão sobre a teoria, ainda aceita por muitos imunologistas, da discriminação do próprio *versus* não-próprio. Matzinger sugeriu que o sistema imune reconhece, ao invés de padrões moleculares conservados em organismos “não-próprios”, estruturas (endógenas ou exógenas) que alertam sobre um iminente perigo (teoria do *Danger Signal*³¹). Um dos possíveis

ligantes (de perigo) que iniciariam a resposta imune seria a exposição de partículas hidrofóbicas das moléculas dos tecidos em estresse ou de microorganismos. Maztinger argumenta que durante muitos anos as espécies foram exclusivamente aquáticas e, por isso, não expunham suas moléculas hidrofóbicas³². Estas moléculas são, porém, expostas somente sob condição de estresse e, portanto, são reconhecidas por receptores das células do “sistema imune reparador”. Essa teoria do perigo é muito abrangente e procura descrever os fenômenos de resposta imune à infecção, de rejeição aos transplantes, de auto-imunidade, de câncer, de vacinas e de imunidade fetal/materna.

Aparentemente, vive-se um período de crise na ciência, no qual os vários resultados experimentais, que emergem rapidamente, não encontram coerência entre si e, portanto, não podem mais ser acomodados nos paradigmas vigentes de funcionamento do sistema imune. Baseado nos conceitos de Kuhn²³, este momento da imunologia deve marcar uma iminente revolução científica (ou ciência revolucionária), a qual exigirá um novo paradigma teórico para acomodar os novos e divergentes resultados científicos para depois continuar o seu ciclo, que se inicia, novamente, tão logo uma nova crise emergir.

Entre os PRR mais estudados estão os receptores do tipo *Toll* (*Toll-like receptor* – TLR) que reconhecem a maioria das estruturas conservadas de microorganismos^{21,30}. A ativação dos TLR em macrófagos geralmente resulta na indução de fatores de transcrição, fundamentais para a ativação eficaz de todo o sistema imune reparador. Um dos principais fatores de transcrição ativado pelos TLR é o *nuclear factor- κ B* (NF- κ B), que inicia a transcrição de diversas citocinas essenciais. Estima-se que todo mamífero possua entre 10 a 15 diferentes TLR, entretanto, 13 foram identificados em camundongos e alguns ainda não encontram homólogos nos seres humanos. A ativação, por exemplo, do TLR4, um receptor que reconhece LPS bacteriano, induz o macrófago a secretar citocinas do tipo interleucina (IL)-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) que passam a coordenar o início do processo inflamatório. TNF- α e IL-1 β ativam o endotélio local, promovendo a vasodilatação e favorecendo a entrada de produtos/proteínas do soro e migração de leucócitos para o local da inflamação. Já a IL-6 atuará principalmente no fígado, induzindo a secreção de diversas proteínas de fase aguda da inflamação, as quais servirão como importantes opsoninas (como as colectinas e pentraxinas) que serão reconhecidas por receptores presentes nos macrófagos²¹. Essas

proteínas de fase aguda auxiliam os macrófagos logo no início da infecção, disponibilizando o tempo necessário para o sistema imune adaptativo começar a atuar. Além das citocinas, as células também iniciam a produção de proteínas antimicrobianas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio para o processo de *killing*, caso necessário. Em suma, todo este processo, iniciado pelo reconhecimento de PAMP pelos TLR nos macrófagos residentes, permite a iniciação de toda a operação do sistema imune a fim de cessar a causa da inflamação, reparar o tecido eventualmente lesado e, finalmente, retomar a fisiologia.

Outros PRR também foram descritos e compõem o funcionamento do sistema imune inato. Dectina-1³³, por exemplo, é um receptor transmembrana que reconhece açúcares como β -glucana, presentes na parede da maioria dos fungos. Dectina-1 é expresso, principalmente, em macrófagos e células dendríticas e está envolvido na proteção a alguns fungos patogênicos^{34,35}. Além dos receptores transmembrana, existem os PRR intracelulares citoplasmáticos que reconhecem estruturas bacterianas e virais, como os receptores com domínio de ligação de nucleotídeos e também ricos em repetições de leucina – *nucleotide-binding site, leucine rich containing receptor* (NBS-LRR). Existem diferentes subfamílias de NBS-LRR, como NOD, NALP e NAIP. As proteínas da subfamília NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*)³⁶, NOD1 e NOD2, reconhecem fragmentos bacterianos de peptidoglicanas e induzem a secreção de citocinas pró-inflamatórias e de quimiocinas que atraem neutrófilos para o local da inflamação. Enquanto que NALP (*NACHT, LRR e pyrin containing proteins*) e NAIP (*neuronal apoptosis inhibitory proteins*) estão envolvidas na indução da resposta inflamatória mediada por citocinas da família IL-1 (IL-1 β , IL-18 e IL-33)³⁷. Estas citocinas são produzidas na forma inativa (não funcional) e, por isso, necessitam ser clivadas por caspases específicas antes de serem secretadas. Essas caspases são ativadas por “inflamossomos” que, por sua vez, são ativados pela via NALP ou NAIP³⁷. Existem, também, outros receptores intracelulares sensíveis a ácidos nucleicos virais. Entre eles, RIG-I (*retinoic-acid-inducible protein 1*), MDA5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*) e DAI (*DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors*) reconhecem produtos virais e induzem a secreção de IFN do tipo I, que, por sua vez, ativam a transcrição de centenas de genes responsáveis pela atividade antiviral do sistema imune³⁸.

Os macrófagos, porém, representam uma população muito heterogênea e seus fenótipos e funções ainda rendem muita especulação. A ativação do sistema imune geralmente ocorre através da ativação dos macrófagos chamados “residentes”. Estas células são, provavelmente, originadas de monócitos circulantes, os quais migram constantemente para órgãos periféricos e se diferenciam em células fagocíticas como macrófagos e dendríticas. Os macrófagos residentes devem atuar, possivelmente, como sentinelas que podem rapidamente iniciar o processo inflamatório e recrutar novas células linfóides e mielóides para o local da inflamação.

O mecanismo e a cinética de migração e diferenciação de monócitos circulantes em macrófagos residentes não são completamente conhecidos. Sabe-se que, aproximadamente, metade dos monócitos circulantes deixam a periferia a cada 24h e, portanto, especula-se que estas células sejam as principais progenitoras de células mielóides periféricas¹⁹. Essa repopulação de macrófagos periféricos é um mecanismo dinâmico que se intensifica principalmente durante um processo inflamatório tecidual, no qual as células mielóides, recém-migradas, participam dos mecanismos da inflamação e, também, repõe os macrófagos sentinelas.

Os fenótipos e funções das células mielóides recém-migradas para a periferia estão sendo estudados por vários grupos de pesquisa, mas, ainda, pouco se sabe a respeito das células que habitam e repopulam a cavidade peritoneal, seja em condições de estresse ou em estado fisiológico. Os monócitos e macrófagos de camundongos são geralmente identificados pelas suas expressões de CD11b e F4/80. CD11b é a cadeia α da integrina Mac-1 (também conhecida como *complement receptor 3* – CR3). Mac-1 é constituída de uma cadeia α (CD11b) e uma cadeia β (CD18). CD11b/CD18 juntas possuem diversas funções descritas: podem agir como moléculas de adesão, ligando-se à molécula de adesão intercelular (*Intercellular adhesion molecule* – ICAM) e favorecendo a migração das células que a expressam; podem, também, reconhecer fragmentos iC3b do sistema complemento, os quais depositam-se na parede de alguns microorganismos (ou talvez em alguma estrutura endógena). Estes fragmentos opsonizantes são reconhecidos pelo CR3 que, após adequada ativação e sinalização intracelular, inicia o evento de fagocitose da partícula opsonizada.

O marcador F4/80 foi descrito por Siamon Gordon (*University of Oxford/Reino Unido*, ex-membro do grupo de Zanvil A. Cohn) como uma molécula com 7 domínios

transmembrana, expressa exclusivamente em macrófagos murinos e com função pouco conhecida^{39,40}. Embora expressa, quase que exclusivamente, na maioria dos fagócitos, F4/80 não é necessária para o desenvolvimento e distribuição dos macrófagos teciduais. Além do seu possível papel na aderência celular, F4/80 pode contribuir para a indução de tolerância por favorecer a geração de células T reguladoras (T_{reg}). Este fenômeno foi observado em modelo de infecção ocular utilizando camundongos F4/80^{-/-}, os quais recuperam as suas células T_{reg} apenas após transferência adotiva de fagócitos F4/80^{+/+}, obtidos por aderência de células totais de baço ou por diferenciação de células progenitoras da medula óssea⁴¹.

Além de F4/80 e CD11b, os macrófagos e monócitos de camundongos podem ainda expressar Gr-1 (Ly6-C/Ly6-G), L-selectinas (CD62L), receptores de quimiocinas (*amino-terminal cysteines-dependent chemokine receptors*), como CCR2 e CX₃CR1, entre outros inúmeros receptores. São, também, caracterizados pela ausência de moléculas comumente expressas em linfócitos T, B e NK. Alguns marcadores são muito volúveis e podem aumentar ou diminuir sua expressão quando os monócitos/macrófagos são expostos a diferentes estímulos. Finalmente, a diferente distribuição da expressão destes marcadores de superfície pode descrever diferentes subtipos de monócitos/macrófagos, que conseqüentemente podem apresentar funções claramente distintas.

Embora haja literatura extensa a respeito dos receptores, da ativação e da função das células mielóides, principalmente de macrófagos peritoneais, pouco se sabe sobre a economia dos macrófagos que habitam a cavidade peritoneal. A persistente expressão de F4/80 e CD11b na superfície dos macrófagos induz ao hábito de formalmente se referir a todos os macrófagos peritoneais simplesmente como células F4/80⁺ ou células CD11b⁺. Entretanto, os experimentos realizados no presente trabalho retomam este tema e, utilizando metodologias contemporâneas de FACS, mostram que os fagócitos peritoneais representam uma população heterogênea que pode ser dividida, por seu fenótipo e função, em diferentes subtipos de “macrófagos” ainda não descritos.

1.3 Linfócitos B-1

Há mais de 20 anos (início da década de 1980), foi observado que certos clones de linfócitos B que davam origem a leucemia linfóide crônica (LLC), em camundongos e humanos, expressavam a molécula CD5, um marcador comumente

expresso em células T^{42,43}. Essa “promiscuidade” entre as diferentes linhagens hematopoiéticas (T e B), “comprometidas” com sua diferenciação linear, ainda era considerada um fenômeno aberrante e, portanto, linfócitos B CD5⁺ foram, inicialmente, considerados frutos de uma aberração, resultado infeliz de uma provável mutação oncogênica.

Entretanto, esses linfócitos B CD5⁺ ganharam a simpatia de alguns cientistas desconfiados que cogitaram investigar a existência de uma população fisiológica de células B CD5⁺. Ainda no início da década de 1980, os linfócitos B, chamados de Ly-1⁺ (nome antes utilizado para descrever a molécula CD5), foram identificados por Kioko Hayakawa e Richard R. Hardy (na época, pesquisadores no laboratório dos Drs. Leonard e Leonore A. Herzenberg na *Stanford University* e, atualmente, ambos fazem parte do corpo docente da *Fox Chase Cancer Center/EUA*), como uma subpopulação fisiológica encontrada em todas as espécies selvagens de camundongos analisados^{7,8,44,45}. Na mesma época, diversos estudos com células B começaram a surgir e a elencar as várias funções encontradas para essas novas células CD5⁺. Dentre as funções atribuídas a estes linfócitos B, logo destacou-se a secreção espontânea de auto-anticorpos^{46,47}.

Assim, foi mediante às análises de processos patológicos como leucemias e auto-imunidades (esta última sugerida graças ao seu repertório auto-reativo) que os linfócitos B CD5⁺ fisiológicos foram descritos. Vale ressaltar que estas células já foram identificadas em humanos, também em condições fisiológicas, e parecem representar fielmente os linfócitos B CD5⁺ presentes nos camundongos^{48,49}. Em algumas doenças, estes linfócitos já foram vistos em altas ou baixas concentrações no sangue periférico, porém seus mecanismos de ação no ser humano e o seu papel na fisiopatologia ainda não foram devidamente descritos. Portanto, como os linfócitos B CD5⁺ humanos ainda não foram extensivamente estudados, como foram as suas representantes em roedores, a maioria dos dados citados nesta introdução, exceto quando mencionado o contrário, provém de análises realizadas em camundongos.

1.3.1 Ontogenia

Desde sua descrição, os linfócitos B CD5⁺ geraram muitas controvérsias a respeito de sua origem e função. Mais especificamente, a origem e a ontogenia destas células, embora muito especuladas, mantêm-se ainda pouco elusivas. Estudos comparativos de células B, de camundongos nas fases fetal/neonatal e adulta, mostraram que o desenvolvimento de células B CD5⁺ é favorecido e enriquecido durante a fase fetal, principalmente no fígado (logo após a primeira semana de gestação)⁵⁰⁻⁵³. Mais importante: pouca ou nenhuma célula B CD5⁺ é gerada pelo desenvolvimento canônico de células B provenientes da linhagem hematopoiética da medula óssea adulta. Este fenômeno foi elucidado a partir de experimentos de transferência adotiva de células⁵⁴. Estes experimentos mostraram claramente que as células progenitoras do fígado fetal, que ainda não expressavam imunoglobulina (Ig)⁻ de superfície (conhecida como *B-cell receptor* – BCR), eram capazes de gerar, dentro o repertório de células B, somente (ou preferencialmente) células B CD5⁺, mesmo quando colocadas em microambiente da medula óssea adulta. O experimento inverso mostrou que as células progenitoras Ig⁻ obtidas da medula óssea adulta davam origem apenas às células B convencionais, mesmo em microambiente fetal^{53,55-58}. Portanto, ficou estabelecida a existência de duas linhagens progenitoras distintas, a primeira surgiria na fase fetal e estaria comprometida com o desenvolvimento de linfócitos B CD5⁺ e a segunda surgiria mais tardiamente, durante a hematopoiese na medula óssea adulta, e estaria comprometida com o desenvolvimento de linfócitos B convencionais⁵⁸.

Esses dados, também comprovados por outros grupos de pesquisa, foram suficientes para a simples interpretação de que existem duas vias de desenvolvimento de células B e, conseqüentemente, o grupo pioneiro do laboratório dos Drs. Herzenberg nomeou estes dois caminhos de maturação de B: a primeira via de desenvolvimento, que ocorre nas primeiras fases de vida do feto e que gera células B CD5⁺, foi chamada de B-1 e, logo, a segunda via de desenvolvimento, que ocorre na medula óssea durante a vida adulta, foi chamada de B-2^{9,46}. A comunidade científica rapidamente adotou o novo termo e reconheceu que os linfócitos B representam uma população muito heterogênea, seja na origem e, como mostrado posteriormente, na função. Ficou estabelecido que todos os linfócitos B que apresentarem características (fenotípicas, funcionais ou de origem) semelhantes

às células que surgem durante a vida fetal seriam denominados linfócitos B-1. Já o termo linfócitos B-2 seria adotado para descrever todas as células B que percorrerem o desenvolvimento (canônico) na medula óssea adulta, salvo algumas exceções descritas a seguir.

Durante a ontogenia, estes progenitores assumem papéis distintos. Os progenitores de linfócitos B-2 ocupam a medula óssea, fazendo parte da linhagem hematopoiética e repopulando as células B-2 periféricas sempre que necessário. Os progenitores de B-2 persistem por toda a vida adulta, já que há necessidade incessante de manter o número e o repertório de células B-2 periféricas. Por outro lado, os progenitores de células B-1, que surgem no fígado e baço, ocupam a cavidade peritoneal do animal e lá permanecem por um processo chamado de auto-renovação⁵⁹. Este processo faz com que as células B-1, já diferenciadas, dividam-se quando necessário, para, assim, auto-manterem seu número e seu repertório no peritônio. Ensaio de transferência adotiva de células comprovam tal fenômeno⁵⁴. Células totais de medula óssea adulta Ig^- são capazes de gerar linfócitos B-2, como já descrito anteriormente. Portanto, nesta fase adulta, as células Ig^- do peritônio não são capazes de gerar linfócitos B-1. Apenas a transferência direta de células B-1 diferenciadas (Ig^+), para um recipiente congênico, é suficiente para manter o repertório de células B-1 durante toda a vida adulta do animal^{55,56,59,60}. Esse experimento também mostrou que as células B-1 transferidas dividem-se esporadicamente para manter ou restaurar, curiosamente, o mesmo repertório de BCR e o número total de células presentes no peritônio de um animal adulto. Até o momento não se sabe em qual compartimento, ou órgão linfóide, os linfócitos B-1 realizam sua divisão celular para manter seu número e seu repertório, já que vários experimentos mostraram que não há divisão celular ocorrendo na cavidade peritoneal.

Em suma, os dados indicam que, diferente dos progenitores de células B-2, os progenitores de B-1 parecem não persistir no animal adulto, restando ao próprio linfócito B-1 (diferenciado) realizar o processo de auto-renovação. Consistente com estes dados, a eliminação completa de células B-1 $CD5^+$ do animal adulto elimina, ou, pelo menos, altera definitivamente o repertório destas células.

1.3.2 Subtipos de linfócitos B e suas vias de desenvolvimento

No animal adulto existem, pelo menos, três diferentes subtipos de células B periféricas maduras. Excluindo as diversas células que ainda estão em etapas de diferenciação e maturação, como as células B transitórias, que saem da medula e se maturam no baço, as três principais células B periféricas e maduras são: linfócitos B-1, linfócitos B-2 (ou *follicular B-cell* – B-FO, devido à sua localização nos folículos do baço) e linfócitos B de zona marginal (*marginal zone B-cell* – B-MZ). Este último também reside no baço, envolvendo e limitando a polpa branca, separando-a da polpa vermelha^{53,57,58,61,62}.

Devido à semelhança de fenótipo e propriedade de auto-renovação, as células B-MZ são freqüentemente consideradas parte do *pool* de células B-1⁶². Entretanto, a pouca literatura a respeito da origem e função das células B-MZ ainda não permite se elaborar teorias mais concretas a respeito do desenvolvimento e organização entre os três subtipos de células B. Todavia, há evidências de que células B-MZ originem-se a partir de progenitores de linfócitos B-2^{58,61}. Essas evidências surgiram da observação de que algumas células B transitórias do baço, sabidamente de origem B-2 e ainda em processo de maturação, diferenciaram-se em células B-MZ. Até o momento, não existem evidências de um terceiro progenitor exclusivo para células B-MZ e, assim, a teoria atual considera a possibilidade destes linfócitos originarem-se pela via de desenvolvimento B-2.

Embora haja evidências diretas da existência de dois diferentes progenitores (B-1 e B-2) que compõe o *pool* de linfócitos B do sistema imune, não se pode descartar outra linha de pesquisa que também mostra evidências da existência de apenas um progenitor de células B que, durante o desenvolvimento, diferenciar-se-á em B-1 ou B-2 (teoria da “diferenciação”). Alguns experimentos, *in vitro*, realizados por Henry H. Wortis (*Tufts University/EUA*), Geoffrey Haughton (*University of North Carolina/EUA*) e colaboradores mostraram a capacidade plástica de células B-2 que, mediante estímulos apropriados, adquiriam fenótipo de células B-1, como a expressão da molécula CD5⁶³⁻⁶⁵. Klaus Rajewski (*Harvard University/EUA*) e colaboradores também mostraram que, *in vivo*, quando as células B-2 eram condicionadas (sistema transgênico *Cre/LoxP – cyclization recombination/locus of X-over bacteriophage P1*) a expressar o repertório (Ig/BCR) exclusivo de células B-1, estas células B-2 começavam a adquirir o fenótipo típico de B-1^{66,67}. O resultado destes experimentos é freqüentemente usado como referência contra a teoria da

existência de dois progenitores distintos de células B e a favor da teoria de “diferenciação”. Entretanto, esses dados claramente não anulam a teoria de dois progenitores distintos, já que ainda não se sabe com qual frequência (se é que existe alguma) este processo de diferenciação aconteceria *in vivo* e qual seria sua relevância fisiológica.

Ainda a favor da teoria de diferenciação de células B, Hayakawa e colaboradores realizaram um trabalho mostrando que a intensidade de estimulação do BCR é fundamental para determinar se uma célula B se diferenciará em B-1, B-2 ou B-MZ⁶⁸. Para realizar este experimento, foram utilizados camundongos transgênicos, os quais desenvolviam todas as suas células B expressando uma seqüência de BCR específica para o reconhecimento de uma glicoproteína chamada Thy-1 (*Thymocyte-1*), a qual é expressa constitutivamente na superfície dos tímocitos. Vários auto-anticorpos IgM que reconhecem a porção glicosilada da molécula Thy-1 são formados fisiologicamente no animal, sem o desenvolvimento de nenhuma patologia auto-imune. A maioria destes auto-anticorpos (senão todos) é originada de células B-1.

A expressão de Thy-1 pode ser facilmente eliminada ($\text{Thy-1}^{-/-}$), gerando um excelente modelo experimental para determinar o fenótipo de células B que se desenvolve em animais que não expressam Thy-1 e que concomitantemente possuem todos os seus BCR específicos para essa molécula. Nestes animais, as células B anti-Thy-1 desenvolvem-se na medula óssea, vão para o baço como células B transitórias e eventualmente maturam-se como células B foliculares, ou seja, de fenótipo B-2, respeitando todo o processo canônico de desenvolvimento de linfócitos B de fase adulta. Entretanto, estes animais não apresentam células B anti-Thy-1 com fenótipo B-1 ou B-MZ, os quais são formados naturalmente em animais selvagens ($\text{Thy-1}^{+/+}$). Quando o antígeno Thy-1 foi introduzido em grandes quantidades (antígeno solúvel) nestes animais transgênicos (que possuem todos BCR anti-Thy-1), as células que desenvolvem-se na medula entraram em apoptose no baço ou, então, iniciaram o processo conhecido como *receptor-editing*, o qual tenta rearranjar novamente a cadeia leve para evitar a auto-reatividade. As células que obtiveram sucesso no novo rearranjo do BCR entraram para o *pool* de células B-2 maduras do baço. Curiosamente, as células B-1 desenvolveram-se normalmente nestes animais e repopularam toda a cavidade peritoneal, promovendo novamente o acúmulo fisiológico de anticorpos anti-Thy-1 na circulação sanguínea. Por fim,

quando o antígeno Thy-1 foi administrado em doses baixas, houve o predomínio de desenvolvimento de células B-MZ originadas a partir de células B transitórias do baço. Em suma, estes dados mostram a necessidade de forte estimulação do BCR para a geração de linfócitos B-1 auto-reativos fisiológicos anti-Thy-1 (seleção positiva), enquanto que a baixa estimulação do BCR favorece o desenvolvimento de B-MZ e, por fim, a ausência de estimulação do BCR (ou apenas níveis basais de estimulação) favorece o desenvolvimento de células B-2 foliculares (seleção negativa)^{47,53,68}.

Outro exemplo clássico da importância da ativação do BCR para determinar a diferenciação de células B periféricas é o fenótipo de camundongos Xid (*X-linked immunodeficiency*). Estes camundongos são deficientes da tirosina quinase de Bruton (*Bruton's tyrosine kinase* – Btk), um componente importante para a via de sinalização mediada por ativação do BCR⁶⁹. A falta desta tirosina quinase impede a ativação eficiente do BCR, resultando na (quase) total ausência de células B-1 nestes animais⁷⁰. Por outro lado, a baixa estimulação do BCR, destes animais Xid, permite o desenvolvimento de um fenótipo regular de células B-2 periféricas. Embora desenvolvam-se normalmente, vale ressaltar que as células B-2 geradas no camundongo Xid não desempenham suas funções na forma esperada e encontrada em camundongos selvagens (Btk^{+/+}).

Estes dados, em favor da teoria de diferenciação no desenvolvimento de células B, geraram um cenário de muitas controvérsias. Afinal, o desenvolvimento de linfócitos B ocorre através de dois progenitores distintos, e já comprometidos exclusivamente com sua progênie, ou apenas um progenitor é induzido a diferenciar-se em B-1, B-2 ou B-MZ de acordo com seu rearranjo de imunoglobulina e intensidade de estimulação do BCR? Baseado nos dados apresentados é razoável afirmar que estas duas teorias não são mutuamente excludentes.

Considerando-se, como base para o desenvolvimento de linfócitos B, a existência de dois progenitores distintos, pode-se explicar e juntar ambas as teorias da seguinte forma (comunicação pessoal com a Dra. Leonore A. Herzenberg): inicialmente os progenitores de células B já estão comprometidos com o desenvolvimento de linfócitos B-1 ou B-2. Os progenitores de B-1 surgem na fase fetal e os de B-2 surgem mais tardiamente. Os progenitores, porém, já estariam comprometidos com o caminho B-1 ou B-2 muito antes do início do processo de rearranjo gênico, realizado necessariamente para que as células B possam

continuar sua maturação. Dessa forma, as células B já estariam comprometidas antes mesmo de expressarem seu BCR e, conseqüentemente, não poderiam escolher seu caminho (B-1 ou B-2) pelo critério da intensidade de estímulo do BCR.

No entanto, durante o seu desenvolvimento pelo caminho B-1 ou B-2, todas as células B necessariamente rearranjarão seus genes de imunoglobulina e expressarão seus BCR. É apenas neste momento que entra em cena a teoria de intensidade de estimulação do BCR. Durante o desenvolvimento de células B-1, caso estas células encontrarem algum antígeno que reconheça o seu BCR de forma suficiente para realizar uma estimulação intensa, continuarão seu processo de desenvolvimento, que resultará na maturação da célula B-1, geralmente auto-reativa. Caso estas células B-1 não encontrarem nenhum antígeno e, portanto, não estimularem seu BCR, elas poderão entrar em um estado anérgico ou tentarão rearranjar seu BCR (*receptor-editing*) até encontrarem um antígeno agonista. Se nenhum destes mecanismos funcionar essas células B-1 poderão entrar em um processo de apoptose. Já no desenvolvimento de células B-2, o mecanismo será inverso. Quando começar a expressar seu BCR (ou *surrogate light chain* associado à cadeia pesada rearranjada), esta célula não poderá encontrar nenhum antígeno agonista de seu BCR, já que esta célula não suportaria tamanha ativação, podendo entrar em estado anérgico, realizar *receptor-editing* ou morrer por apoptose. Apenas a ausência de estimulação do BCR permitiria que as células B-2 continuassem seu processo de maturação, migrando para o baço como células B transitórias e transformando-se em células B foliculares. O desenvolvimento de células B-MZ seria explicado seguindo o processo de desenvolvimento de células B-2 que, quando adquirem seu BCR, necessitam de baixa (e ideal) ativação para seguir o caminho final de diferenciação para linfócitos B-MZ.

1.3.3 Teoria da evolução em camadas do sistema imune

As diferenças ontogênicas e funcionais entre as duas linhagens de células B serviram como base para a elaboração da teoria de “evolução em camadas”⁷¹ do sistema imune, proposta pela Dra. Leonore A. Herzenberg. Herzenberg sugeriu que a construção do sistema imune ocorresse em camadas (celulares e moleculares) e que uma nova camada de desenvolvimento (mais evoluída) se iniciasse antes mesmo da última camada (primitiva) terminar sua função. Eventualmente, as

camadas se ajustarão entre si sem a necessidade de eliminar a camada anterior, já que algumas funções se manterão a fim de colaborar e cooperar com a nova camada em evolução. A autora propõe ainda que, como uma camada (do sistema imune) deve ser capaz de agir e ser auto-suficiente para manter a homeostasia do indivíduo enquanto a nova camada ainda esteja em formação, seria difícil acreditar que todas as camadas se originassem de um único progenitor. Essa observação, certamente, demonstra uma opinião a favor da teoria de duas linhagens/progenitores distintas de desenvolvimento de células B.

Sabendo que as células B-1 surgem muito cedo no desenvolvimento e apresentam muitas das características de células primitivas como vistas em aves (galinhas) – desenvolvimento neonatal, seguido de auto-renovação na vida adulta e conseqüente produção de anticorpos naturais – Herzenberg sugeriu, já que a ontogenia recapitula a filogenia, que os linfócitos B-1 fariam parte da primeira e mais primitiva camada de evolução do sistema imune, seguida então por uma camada mais evoluída, representada pelas células B-2, que apresentam uma maquinaria molecular mais complexa e necessária para continuar mantendo a homeostasia cada vez mais exigente durante a vida adulta^{57,71}. As células B-1, embora possuam menor repertório de BCR quando comparadas com a capacidade de combinação gênica das células B-2, são capazes de gerar grande quantidade de anticorpos IgM polirreativos (diferentemente das B-2). Esses anticorpos podem reconhecer diversas moléculas próprias e também de microorganismos patogênicos, o que talvez seja importante para proteger e manter a coação interna do sistema (durante a ontogenia) enquanto as células B-2 começam a entrar em atividade (discutido com mais detalhes a seguir).

1.3.4 Linfócitos B-1b, mais um subtipo celular presente no repertório linfóide do camundongo

As recentes descobertas sobre células B progrediram paralelamente aos avanços na tecnologia de citometria de fluxo (FACS), ambas fruto do laboratório dos Drs. Herzenberg e que permitiram rápido progresso na análise de fenótipos e funções das células do sistema imune. Assim, logo foi identificada uma nova subpopulação linfóide que expressava todos os fenótipos e funções características de uma célula B-1, porém não expressava a molécula CD5. Embora a expressão da

molécula CD5 na superfície da célula B fosse, por algum tempo, o marcador universal para caracterizar uma célula B-1, logo seus fenótipos e funções tão singulares foram sobrepondo a simples expressão de CD5 e, assim, as células B CD5⁺ passaram a se chamar linfócitos B-1, englobando um universo vasto de características funcionais. Portanto, como as primeiras células B-1 identificadas expressavam CD5, elas foram chamadas de B-1a. Já as mesmas células B-1 (mesmo fenótipo e função) que não expressavam a molécula CD5 foram chamadas de B-1b^{55,72}. Ficaram estabelecidos quatro subtipos de células B periféricas: B-1a, B-1b, B-2 (folicular) e B-MZ (B de zona marginal do baço).

As células B-1b foram consideradas como um novo subtipo de célula B, baseado em experimentos de transferência adotiva de células B-1a e B-1b (Ig⁺) de peritônio adulto. Estes experimentos mostraram que ambas B-1a e B-1b eram auto-renováveis em recipientes congênicos, porém nenhuma era capaz de dar origem a outra, ou seja, células B-1a reconstituíam apenas o seu nicho e células B-1b não eram capazes de gerar células B-1a e também reconstituíam apenas o seu próprio compartimento B-1b. Estes dados sugeriram que os linfócitos B-1a e B-1b representam compartimentos funcionais distintos dentro do *pool* de células B periféricas^{56,57,72}.

De fato, vários dados subseqüentes mostraram que linfócitos B-1b seguem processos ontogênicos distintos de ambos B-1a e B-2, sugerindo até a existência de um terceiro progenitor responsável por dar origem às células B-1b. Esta especulação, iniciada por Herzenberg, permaneceu, por muitos anos, não elucidada até que, em 2006, um grupo de pesquisadores norte-americanos, no laboratório do Dr. Kenneth Dorshkind (*University of Califórnia, Los Angeles/EUA*), identificou, por marcadores de superfície celular e transferência de células, o progenitor medular responsável pelo desenvolvimento exclusivo de células B-1b⁷³⁻⁷⁵.

Durante o processo de desenvolvimento de células B na medula, a molécula B220 é expressa em etapas anteriores ao surgimento de níveis detectáveis de CD19 que, por sua vez, marca os estágios finais do desenvolvimento de células B. Entretanto, o progenitor de linfócitos B-1b expressa, prematuramente, CD19 e apresenta níveis baixos ou não detectáveis da molécula B220 (CD19⁺, B220⁻), mesmo estando em estágios iniciais de desenvolvimento, contrariando o processo canônico de formação de células B na medula óssea⁷³.

Ainda sobre a caracterização dos progenitores de linfócitos B-1, James Tung (*Stanford University/EUA*, membro do laboratório dos Drs. Herzenberg) e colaboradores mostraram que os progenitores de células B-2 e B-1b, de medula óssea, expressam em sua superfície, logo no início de seu desenvolvimento (processo de rearranjo gênico de Ig), as moléculas MHC-II (*Major histocompatibility complex of class II*) e CD138 (*Syndecan-1*), a qual também é expressa, em altas concentrações, nos plasmócitos⁷⁶. Nos estágios finais de desenvolvimento, apenas o MHC-II permanece expresso, enquanto CD138 desaparece (após o estágio pré-B) e volta a ser expresso quando ocorrer, eventualmente, a indução de células secretoras de anticorpos. Diferentemente, os linfócitos B-1a (desenvolvimento fetal/neonatal) não expressam CD138 durante toda a etapa do seu desenvolvimento e, curiosamente, a expressão da molécula de MHC-II só ocorre em estágio tardio, durante as etapas finais do desenvolvimento e maturação destas células⁷⁶. Assim, fica estabelecida a existência de três vias independentes de desenvolvimento e maturação de células B. Entretanto, cada via é percorrida por diferentes progenitores, os quais são comprometidos com a geração exclusiva de um subtipo de linfócito B (B-1a, B-1b ou B-2 e B-MZ).

Os linfócitos B-1b (CD5⁺) desenvolvem-se mais tardiamente durante a ontogenia; surgem no peritônio logo após o estabelecimento de células B-1a e representam aproximadamente 30% do total de células B-1 (B-1a + B-1b) no peritônio. Sabe-se que os linfócitos B-1a desenvolvem-se no período fetal (fígado fetal) e, após maturação, estas células migram para o peritônio, onde mantêm-se pelo processo de auto-renovação. Diferentemente, as células B-1b parecem ter origem na medula óssea, juntamente com as células B-2. A descoberta do progenitor de célula B-1b na medula, descrita acima, confirma esta hipótese. Provavelmente, as células B-1b desenvolvem-se na medula óssea logo depois do período neonatal e migram automaticamente para o peritônio, justificando o surgimento tardio destas células no *pool* de células B peritoneais.

Ensaio de transferência adotiva de células mostraram que uma fração das células B-1b peritoneais pode ser constantemente renovada através dos progenitores de células B-1b da medula óssea. Estes dados sugerem que, diferentemente do que ocorre com o desenvolvimento de células B-1a, os progenitores de linfócitos B-1b persistem na medula, mesmo após o nascimento, e são responsáveis por repor estas células durante a vida adulta do animal. Estes

dados porém não eliminam a possibilidade das células B-1b possuírem a capacidade de se manterem por auto-renovação, como provado por dados obtidos com a geração de camundongos quiméricos que expressam dois alótipos diferentes de IgM (ex. C57/BL6-IgH-6a e B6.20-IgH-6b). Primeiramente, células totais de medula óssea de camundongos C57/BL6 (IgM^a) e células totais de peritônio de camundongos B6.20 (IgM^b) são simultaneamente injetadas por via intravenosa (i.v.) em hospedeiros RAG^{-/-} irradiados. Após dois meses de quimerismo e completa reconstituição do tecido hematopoiético, observou-se que as células B-1a peritoneais injetadas por via i.v. migraram novamente para o peritônio e que todas apresentaram, na sua superfície, IgM de alótipo “b” (IgM^b), indicando que estas células não se originaram da medula. Estas células eram, portanto, de origem peritoneal e se mantiveram por auto-renovação já que, como discutido anteriormente, células B-1a Ig⁺ do peritônio são capazes de reconstituir seu próprio *pool* por períodos indefinidos, sem a necessidade de progenitores de células B Ig⁻.

Entretanto, metade das células B-1b no peritônio expressavam a IgM de alótipo “a” (IgM^a), revelando ser a sua origem de progenitores derivados da medula óssea do doador. Todavia, o restante das células B-1b expressava IgM^b, mostrando que estas células também derivariam do peritônio do doador e, assim, revelando uma característica de auto-renovação, semelhante às células B-1a. Ensaio de investigação de proliferação celular *in vivo* mostraram que a persistência das células B-1 no peritônio não ocorre apenas pela capacidade destas células de sobreviver por longo período *in vivo*, mas, sim, pelo constante e controlado processo de divisão celular. Por fim, as células B-2 (foliculares) e B-MZ encontradas no camundongo quimera eram todas derivadas da medula óssea do doador (IgM^a), conforme esperado.

Diversos resultados subseqüentes continuam comprovando as diferenças entre as células B-1a e B-1b. Como discutido anteriormente, camundongos transgênicos que recebem mutações em moléculas e estruturas que compõem o BCR e, portanto, alteram a via de sinalização no interior das células B, resultam num desenvolvimento polarizado para uma das três subpopulações de linfócitos B periféricos. Dessa forma, camundongos transgênicos que expressam em excesso a molécula CD19, um co-receptor que participa na ativação de células B mediada por BCR, apresentam grande acúmulo de células B-1a e deficiência de células B-1b. Diferentemente, camundongos *knockout* de CD19 (CD19^{-/-}) apresentam perda,

quase total, de células B-1a e grande acúmulo de células B-1b. Condizente com estes dados, os camundongos Xid (deficientes de Btk), mencionados anteriormente, não são capazes de gerar linfócitos B-1a, porém desenvolvem com sucesso o seu compartimento de células B-1b. Pode-se, então, sugerir que, para sua maturação, linfócitos B-1b necessitam de intensidade de estimulação do BCR menor do que a intensidade exigida pelas células B-1a.

1.3.5 Localização anatômica

O primeiro surgimento de progenitores potencialmente capazes de gerar células B (preferencialmente B-1) ocorre no embrião, na splancnopleura aórtica, após o oitavo dia de gestação⁷⁷. Entretanto, a expressão de IgM na superfície de células B é apenas detectável após a segunda semana de gestação (~17 dias), principalmente no fígado⁷⁸. Durante este período fetal, e continuando nos primeiros dias pós-natal, os progenitores de células B percorrem, quase que exclusivamente, a via B-1, principalmente B-1a. Entretanto, ainda na gestação (depois de 17 dias), já é possível detectar progenitores de células B-2 na medula óssea fetal, na qual tornar-se-ão os principais progenitores de células B da fase adulta. Embora o surgimento e o desenvolvimento de ambas as linhagens de B se sobreponham, a linfopoiese de células B nos períodos fetal e neonatal é predominantemente de células B-1, as quais são encontradas em abundância no fígado ainda fetal e predominam no baço durante os primeiros dias de vida do camundongo.

Após o nascimento do camundongo, as células B-1 migram para diversos órgãos, como baço, cavidade peritoneal, cavidade pleural, intestinos, omento (uma estrutura serosa que cobre o ápice de órgãos abaixo da caixa torácica) e, raramente, alcançam os linfonodos. Especula-se que, nesta fase, os progenitores de células B-1 sejam escassos ou mesmo ausentes e, portanto, as células B-1 nestes compartimentos mantenham-se pelo processo de auto-renovação. É ainda neste momento que as células B-2 assumem a linfopoiese adulta e passam a representar 95% de todas as células B periféricas. Embora, na vida adulta, apenas 5% do total de células B sejam de origem B-1, em alguns compartimentos, como o peritônio, estas células estão enriquecidas e representam a maioria (~70%) dos linfócitos residentes.

Na maioria dos órgãos linfóides adultos, predomina-se, dentro do *pool* de células B, a presença de linfócitos B-2. No baço, por exemplo, aproximadamente 5% das células B expressam o fenótipo B-1, o restante representa as células B foliculares, células B transitórias (que darão origem às células B foliculares e B-MZ) e as células B-MZ, que, por sua vez, ficam dispostas em locais, aparentemente, estratégicos. Neste órgão, a resposta à estimulação antigênica pode ocorrer de forma heterogênea, de acordo com o *pool* de célula B mais susceptível a tal estimulação. Como, por exemplo, antígenos solúveis, geralmente polissacarídeos ou lipídeos de estrutura bacteriana, podem ativar rapidamente células B-1 e B-MZ a secretarem anticorpos independentemente do auxílio de células T, ou ainda, independentes da formação de centro germinativos. Estes anticorpos são, aparentemente, polirreativos, exercendo papel opsonizante crucial para a eliminação de alguns patógenos e, possivelmente, crucial para manter a homeostasia do “sistema imune de reconhecimento”.

Entretanto, as células B-1 representam os principais componentes linfóides que abrigam a cavidade peritoneal. Embora haja células B-2, T e NK no peritônio, estas subpopulações representam uma fração mínima do total de linfócitos peritoneais. Aproximadamente, metade do total de células do peritônio possui fenótipo de linfócitos B-1. Dentre as B-1, 70% são B-1a e o restante B-1b. Nesta cavidade, estas células parecem responder muito rapidamente a estímulos, semelhante às células do sistema imune inato. Mediante estímulo intravenoso, intestinal/oral, ou mesmo peritoneal, estas células respondem em poucos minutos, secretando citocinas, migrando para outros órgãos e produzindo anticorpos, que, por sua vez, pertencem a um limitado repertório de especificidade.

Especula-se que mais da metade dos anticorpos de isótipo A (IgA), encontrados no intestino, é originada de células B-1a. Estes anticorpos exercem papel fundamental não apenas na opsonização de patógenos, mas, principalmente, na manutenção da fisiologia intestinal, reconhecendo e mantendo a microbiota do sistema digestório e impedindo o iminente descontrole do equilíbrio intestinal^{79,80}. Alguns estudos liderados por Sidonia Fagarasan (RIKEN *Research Center for Allergy and Immunology*/Japão) mostraram que parte das células B-1, encontradas no intestino, provém da direta e constante migração de linfócitos B-1 da cavidade peritoneal. Estas B-1 do peritônio migram para o intestino, onde realizam a troca

(*switching*) do isótipo de imunoglobulina (de IgM para IgA) e passam a atuar e interferir na economia intestinal^{81,82}.

1.3.6 Repertório

Embora acredite-se que o mecanismo de geração de diversidade do BCR, pelo rearranjo do gene das imunoglobulinas, seja um evento estocástico e capaz de gerar trilhões de possíveis combinações, os dados obtidos com o desenvolvimento de células B-1 parecem não obedecer tal paradigma. A análise genética do repertório de células B periféricas revela que as células B-1, diferentemente das células B-2, rearranjam seus genes de forma razoavelmente previsível (e não aleatória), gerando um repertório limitado e persistente^{51,53,57,83,84}. O repertório de B-1 expressa, geralmente, as junções íntegras de seqüências VDJ (*variable, diversity e joining*, respectivamente) da linha germinativa. Já as células B-2, durante o seu desenvolvimento, acumulam diversos mecanismos extras de diversidade, como inserção estocástica de nucleotídeos (N-inserção) na seqüência de reconhecimento do BCR e recombinações somáticas (entre outros), o que torna a seqüência de seu BCR cada vez mais distante da linhagem germinativa.

A enzima *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT) é expressa apenas em vertebrados e surge mais tardiamente durante a ontogenia linfopoiética. Esta enzima é responsável pela adição aleatória de nucleotídeos (N-inserção) entre as junções V-D e D-J. Como a maioria dos linfócitos B-1 surge na fase fetal, quando a enzima TdT ainda não é expressa, estas células expressam seu BCR sem adições aleatórias de nucleotídeos, justificando seu repertório pouco variável⁵⁷. Entretanto, vale ressaltar que algumas células B-1 que, provavelmente, surgem mais tardiamente, expressam TdT e, portanto, apresentam repertório mais distante da linhagem germinativa.

Dentre os repertórios de células B-1 mais conhecidos estão a expressão das seqüências variáveis da cadeia pesada (V_H)11 e V_H 12, as quais acoplam-se (freqüentemente) às seqüências variáveis de cadeia leve κ (V_κ)9 e V_κ 4, respectivamente⁸⁵. Este repertório reconhece epítomos de fosfatidilcolina (PtC), um fosfolípido exposto na membrana celular senescente e, portanto, os anticorpos anti-PtC parecem participar na manutenção da homeostasia. As células B-1 V_H 11 representam aproximadamente 6-8% de todo repertório de células B-1 peritoneais de camundongos BALB/c^{83,86-88}. Curiosamente, como será mostrado neste trabalho

(seção Resultados), este repertório surge tardiamente no peritônio e expande-se até atingir seu número ideal, que será mantido durante toda a vida adulta do animal, por meio de processos completamente desconhecidos.

Outros repertórios comumente encontrados no *pool* de células B-1 são, por exemplo: anticorpos chamados T15, que reconhecem fosforilcolina (PC), uma estrutura presente em microorganismos geralmente patogênicos, como *Streptococcus pneumoniae* (causador de pneumonias e meningites), e que também pode participar da patogenia da aterosclerose; anti-Thy-1, um anticorpo que reconhece uma estrutura (Thy-1) presente na superfície de timócitos (auto-anticorpo), discutido anteriormente; anti-dsDNA, anticorpos que reconhecem dupla-fita de DNA (auto-anticorpo envolvido na patogenia do Lúpus Eritematoso Sistêmico); entre outros. Em suma, o processo de escolha das cadeias leve e pesada de células B-1 parece utilizar um molde desenhado pela pressão evolutiva, a qual selecionou e imprimiu no DNA uma linhagem germinativa para expressão de determinadas especificidades de BCR. Estas especificidades do BCR de B-1 parecem reconhecer importantes estruturas endógenas e, também, estruturas (geralmente polissacarídeos) conservadas e persistentes de microorganismos aos quais os seres vivos estiveram susceptivelmente expostos durante a evolução.

Uma das características mais intrigantes das células B-1 é a sua capacidade de auto-manter seu número e repertório durante a vida adulta do camundongo. Dados de transferência adotiva de células B peritoneais mostram, curiosamente, que apenas a transferência de uma fração de células B-1 do peritônio é suficiente para que estas células se expandam e reestabeleçam seu número e repertório no animal recipiente^{54,57,60}. Os mecanismos envolvidos neste processo de auto-controle ainda não são conhecidos.

1.3.7 Fenótipo

Um dos fatores que permite agrupar os linfócitos B em diversos subtipos (B-1a, B-1b, B-2 e B-MZ) é a expressão distinta de suas moléculas de superfície. Os linfócitos B-1 (B-1a e B-1b) expressam grandes quantidades de IgM (IgM^{high}) e pouca ou nenhuma expressão de IgD (IgD^{low}). Ainda, as B-1 expressam baixos níveis da molécula B220 (clone RA3-6B2) e raramente expressam CD23. Dentre os subtipos de células B, as B-1 expressam os maiores níveis de CD19, MHC-II, CD80

e CD86 e ainda expressam níveis baixos, porém detectáveis, da molécula CD5, um marcador universal de células T. As células B-1b apresentam, praticamente, o mesmo fenótipo das células B-1a, com exceção da molécula CD5, a qual não é expressa nas células B-1b.

Já as células B-2 expressam o oposto: elas são $IgM^{-/low}$, IgD^{high} , $B220^{+/high}$ e $CD23^{high}$. Embora as células B-2 também expressem CD19, MHC-II, CD80 e CD86, esta expressão é nitidamente menor do que em células B-1. As células B-2 não expressam a molécula CD5. Finalmente, as células B-MZ do baço parecem apresentar um fenótipo misto, já que se assemelham às células B-1b: IgM^{high} , IgD^{low} , $CD23^{-}$ e $CD5^{-}$, mas expressam níveis de B220 semelhantes às células B-2 ($B220^{+/high}$). Os marcadores universais para detectar células B de zona marginal são as altas expressões de CD21 (receptor de complemento) e CD1d (molécula da família do MHC que parece estar envolvida em apresentação de estruturas glicolipídicas) na superfície destas células. Estes marcadores são expressos (quando expressos) em baixas quantidades nas células B-1 e B-2. Certamente, muitos outros marcadores podem ser utilizados para identificar os subtipos de células B, no entanto, estes fenótipos descritos representam *gold standard* no estudo de células B.

Eventualmente, a ativação de uma célula B (B-1, B-2 e B-MZ) madura resulta na sua diferenciação para uma célula produtora e secretora de anticorpos, também conhecida como plasmócito. Durante esse processo de diferenciação de uma célula B para plasmócito ocorre uma série de transformações moleculares que nos permitem identificar este fenômeno⁸⁹. Por exemplo, a formação de plasmócito é diretamente dependente do aumento significativo dos fatores de transcrição BLIMP-1 (*B-lymphocyte-induced maturation protein 1*) e XBP-1 (*X-box-binding protein 1*), já que ambas as moléculas estão envolvidas na indução da produção e da secreção de anticorpos. Concomitantemente, os plasmócitos expressam altos níveis da molécula CD138 (também conhecida como *Syndecan-1*) na sua superfície⁸⁹. Se considerarmos que a produção da molécula *syndecan-1* representa um dos eventos finais da diferenciação, a alta expressão da molécula CD138 na superfície de um linfócito B já é suficiente para caracterizá-la como uma célula secretora de anticorpos (exceto em raras exceções).

Outro marcador envolvido no estudo de células B é a molécula CD11b, que representa a cadeia α da integrina Mac-1 (dímero de CD11b e CD18), conforme

descrito anteriormente. Durante muitos anos, os pesquisadores de células B consideravam que todas as células B-1 expressavam CD11b (supostamente um marcador da linhagem mielóide). Logo, a expressão de CD11b tornou-se fenótipo definitivo para caracterizar linfócitos B-1 e, ainda, sugerir sua íntima relação com células mielóides, principalmente macrófagos. Entretanto, os dados que contribuíram para tal afirmação foram obtidos utilizando-se metodologias, hoje ultrapassadas, que ofereciam baixa resolução e sensibilidade.

Como será discutido nesta tese (seção Resultados), este tema foi revisto e, utilizando metodologias contemporâneas de FACS, foi mostrado aqui que apenas metade das células B-1 peritoneais expressa CD11b. Ainda, observou-se que a expressão de CD11b representa estágios de diferenciação e desenvolvimento de células B-1 no peritônio. Curiosamente, as células B-1 residentes no baço, assim como as células B-2 e B-MZ, raramente (ou nunca) expressam esta molécula.

1.3.8 Compartimentos integrados

Embora as células B-1 pareçam ocupar compartimentos (órgãos) estratégicos para realizar suas funções, existe uma íntima e contínua “comunicação” entre estes compartimentos. Um excelente exemplo de cooperação entre células B-1 de diferentes órgãos é evidenciado mediante estímulo intravenoso (i.v.) de LPS. Como será discutido neste trabalho (seção Resultados), o estímulo agonista do TLR4, obtido através da injeção i.v. de LPS, ativa, em minutos, as células B-1 peritoneais, as quais logo migram para o baço e transformam-se em células secretoras de anticorpos¹⁴. Um dos principais repertórios estimulados pelo LPS é o BCR V_H11, que logo se expande e se transforma em plasmócitos no baço. Em poucas horas (após o estímulo) já é possível detectar anticorpos IgM anti-PtC (provenientes de células B-1 V_H11) no soro de animais imunizados.

Embora a via de ativação LPS/TLR4 resulte numa expansão oligoclonal ou policlonal de células B-1, sabe-se que a ativação de células B por sinalização direta do BCR (específico para o antígeno) pode gerar expansão monoclonal de células B-1, as quais também participarão ativamente do processo fisiopatológico desenvolvido (dados não publicados de autoria da pesquisadora Yang Yang do laboratório da Dra. Herzenberg). Estas células podem realizar troca (*switching*) de classe de imunoglobulina, geralmente de IgM para IgA, IgG3 e IgG2a, mas

raramente IgG1. Este processo de *switching* pode ocorrer fora do centro germinativo do baço e, conseqüentemente, resultar em células B-1 ativadas (ou de memória) sem hipermutações somáticas, expressando o mesmo (ou muito semelhante) rearranjo gênico do BCR obtido durante seu desenvolvimento. Estas células B-1, ativadas por antígenos específicos, podem sobreviver por longos períodos, atuando como células de memória e participando da fisiopatologia desencadeada pela devida estimulação.

1.3.9 “Na saúde e na doença”

Devido às suas características peculiares, tais quais: 1) rápida ativação/resposta mediante estímulo; 2) reconhecimento de padrões moleculares conservados de microorganismos e auto-antígenos; 3) receptores de superfície de pouca variabilidade, ou seja, expressão de seqüências gênicas de linhagem germinativa, semelhante aos receptores de reconhecimento de padrões moleculares, presentes nos fagócitos; as células B-1 são consideradas pertencentes a um grupo de “linfócitos inatos”, mais conhecidos como *innate-like lymphocytes*. Neste grupo ainda incluem-se células NKT, subtipos de linfócitos T $\gamma\delta$ e células B-MZ⁹⁰. Estas células, geralmente, agem em sítios pré-determinados e parecem rearranjar seus receptores de forma não-aleatória, produzindo número limitado e pouco variável de receptores, como discutido anteriormente.

As células B-1 *innate-like* parecem participar de vários mecanismos fisiológicos, mantendo a “saúde” do organismo. A secreção de anticorpos naturais, produzidos independentemente de estímulos exógenos, parece representar um dos principais mecanismos homeostáticos. Estes anticorpos são produzidos logo no início da ontogenia e, curiosamente, mantêm-se estáveis na circulação periférica dos animais. Mesmo em camundongos condicionalmente livres de microorganismos (*germ-free*), encontra-se anticorpos (naturais) produzidos por linfócitos B-1. Embora a ausência de microorganismos não afete significativamente a secreção de anticorpos naturais por células B-1, sabe-se que a presença da microbiota intestinal também contribui para a seleção e indução do repertório destes anticorpos.

Além da flora intestinal, estruturas protéicas da alimentação também devem contribuir para a ativação de células B-1 e conseqüente secreção de anticorpos naturais. Alguns trabalhos realizados no Brasil, por Ana M.C. de Faria (Universidade

Federal de Minas Gerais/MG), mostraram que a administração, em camundongos, de uma dieta ausente de estruturas protéicas complexas (que representariam “antígenos exógenos”) e constituída apenas de moléculas mais simples (aminoácidos), é suficiente para diminuir drasticamente a produção de IgA secretada *in vivo*⁹¹. Este modelo experimental foi denominado *antigen-free*, já que o animal recebia uma dieta de baixo peso molecular pouco imunogênica.

Estes anticorpos naturais também podem ser ativados mediante estímulos inflamatórios, como LPS, o que resulta numa rápida ativação e secreção de anticorpos (principalmente anti-PtC) por células B-1¹⁴. Estes anticorpos, como já discutido anteriormente, devem participar ativamente como vigilantes das atividades metabólicas do organismo, reconhecendo células apoptóticas e opsonizando moléculas potencialmente inflamatórias como estruturas cromossômicas. Além disso, os anticorpos auto-reativos devem participar de um mecanismo complexo de sustentação do sistema imune, o qual supostamente agiria por reconhecimento e manutenção de estruturas endógenas.

Além dos anticorpos, os linfócitos B-1 contribuem significativamente com a secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Dentre as citocinas mais comumente expressas por linfócitos B-1 estão a IL-10⁹² e TNF- α .

Recentemente, Philip W. Askenase (*Yale University/EUA*) e colaboradores mostraram a inesperada participação de linfócitos B-1 em ambos os processos de hipersensibilidade do tipo tardia (HTT)⁹³ e dermatite de contato (DC)^{94,95}. Estudos de imunização intradérmica mostraram que, após 24h de estímulo, células B-1 específicas ao antígeno aglomeram-se no baço e secretam anticorpos IgM, que, por sua vez, migram até o local do inóculo, ligam-se ao antígeno e recrutam fatores do complemento (especialmente C5). Após as sucessivas clivagens protéicas dos fatores do complemento, ocorre a liberação de C5a, que ligar-se-á aos seus receptores nos mastócitos, que, por sua vez, se degranulará, causando uma vasodilatação necessária para o recrutamento de linfócitos T na região. Em suma, os autores concluíram que o edema inicial de 2h, visto após o re-estímulo antigênico (num modelo de HTT), é o resultado direto da vaso-dilatação causada pelos mastócitos, que, conseqüentemente, favorece massiva infiltração de linfócitos T, a qual ocorre em 24h, representando o intumescimento característico da HTT⁹³. O processo que resulta na dermatite de contato parece ser semelhante; no entanto, os mesmos autores ainda mostraram que as células NKT de receptores invariáveis

($V\alpha 14$ invariant NKT) exercem papel fundamental. Estas células, presentes principalmente no fígado, secretam IL-4 poucas horas após a sensibilização, que, por sua vez, estimulará células B-1 a secretarem rapidamente (24h) os anticorpos IgM específicos, fundamentais para desencadear todo o processo da dermatite de contato, muito semelhante ao processo descrito acima^{94,95}.

Paralelamente aos estudos da participação de linfócitos B-1 na economia e fisiologia do sistema imune, diversos trabalhos surgiram, descrevendo a necessidade destas células para evitar a “doença”, limitando ou eliminando microorganismos patogênicos. Em 1999, Rolf M. Zinkernagel (*University of Zurich/Suíça*, Prêmio Nobel de Medicina de 1996) e colaboradores já alertavam para a importância dos anticorpos naturais na proteção contra infecções⁹⁶. Eles concluíram que o soro de animais C57BL/6 era constituído de anticorpos naturais capazes de opsonizar diversos microorganismos testados. Os autores também utilizaram um modelo de camundongo incapaz de produzir anticorpos (μ MT), mostrando que a simples reconstituição, nestes animais μ MT, com soro de animais selvagens (C57BL/6), era suficiente para conferir proteção contra diversos vírus e também contra *Listeria Monocytogenes*⁹⁶.

Em 2000, Nicole Baumgarth (*University of California, Davis/EUA*) e outros pesquisadores do grupo da Dra. Herzenberg mostraram a existência de uma eficiente cooperação entre células B-1 e B-2, necessária para a proteção contra o vírus *Influenza*^{97,98}. Os autores utilizaram camundongos transgênicos que não secretam IgM, porém podem expressar esta imunoglobulina na sua superfície e são capazes de produzir e secretar outros isótipos de Ig ($sIgM^{-/-}$). Estes camundongos mostraram-se extremamente susceptíveis a infecção por *Influenza*. Entretanto, a criação de camundongos quimeras, nos quais apenas B-1 ou B-2 eram capazes de secretar IgM, mostrou que ambas as células são necessárias para o controle da doença. Os autores concluíram que a IgM natural, produzida pela B-1, é necessária no momento imediato pós-infecção para neutralizar o vírus e conter a disseminação até que as IgM e IgG antígeno-específicas, originadas de células B-2, sejam produzidas e secretadas, resultando na cura do animal. Se qualquer uma destas etapas for interrompida ou prejudicada, logo o animal tornar-se-á susceptível. Curiosamente, a simples ausência de IgM natural secretada pela B-1 é capaz de prejudicar a eficiência de secreção de IgG específicas derivadas de B-2^{97,98}.

Em 2003, Mei Chen (*Chiba University/Japão*) e colaboradores mostraram a importância das células B-1 na proteção contra infecções parasitárias⁹⁹. Eles mostraram que a transferência de células B-1 peritoneais (ativadas previamente *in vivo*) para o peritônio de recipientes μ MT (deficientes de células B) era suficiente para gerar proteção e sobrevivência quando estes recipientes eram desafiados com doses letais de *Toxoplasma gondii*⁹⁹.

Em 2004, Kishore R. Alugupalli (*University of Massachusetts/EUA*) e colaboradores realizaram um importante trabalho que mostrou a participação de células B-1b (T e B-independentes) na proteção contra *Borrelia hermsii*, agente causador das chamadas “febres recorrentes” ou borreliose¹⁰⁰. Os autores mostraram que camundongos deficientes de células T, células B foliculares, células B de zona marginal e células B-1a eram todos resistentes à infecção por *Borrelia hermsii* e ainda geravam proteção contra re-infecção. Entretanto, a proteção vista nestes animais coincidia com a proliferação, o acúmulo e a persistência de células B-1b na cavidade peritoneal. Como prova final, os autores transferiram estas células B-1b (acumuladas em camundongos selvagens após infecção) diretamente para cavidade peritoneal de camundongos RAG (*recombinase-activating gene*) *knockout*. Surpreendentemente, os camundongos RAG^{-/-} reconstituídos adquiriram proteção total contra a infecção e, ainda, desenvolveram imunidade duradoura, resultado da persistência das células B-1b¹⁰⁰. Em consonância com os dados discutidos anteriormente, a respeito da pouca (ou nenhuma) recombinação somática realizada por células B-1, os autores observaram que estas células B-1b protetoras não realizaram *switching* de classe de Ig (mantiveram seu isótipo IgM) e, mais curioso, não apresentaram nenhum indício de mutação gênica.

Em 2005, Karen M. Haas (*Duke University/EUA*) e colaboradores mostraram claramente a divisão de tarefas que existe entre as células B-1a e B-1b para o controle da doença causada pelo *Streptococcus pneumoniae*, agente etiológico de pneumonias e meningites¹⁰¹. Como discutido anteriormente, camundongos transgênicos que superexpressam a molécula CD19 (*human CD19 transgenic* – hCD19Tg) possuem grande aumento no número de células B-1a e conseqüente deficiência de células B-1b. Estes animais mostraram-se resistentes à infecção por *Streptococcus pneumoniae* graças à grande produção de anticorpos naturais, presentes na circulação e responsáveis pela neutralização da bactéria. Diferentemente, camundongos transgênicos que não expressam CD19 (CD19^{-/-}),

não possuem B-1a e, portanto, são incapazes de secretar anticorpos naturais, resultando em grande susceptibilidade à infecção pelo *Streptococcus pneumoniae*. Entretanto, mediante imunização prévia com polissacarídeos dessa bactéria (*Pneumococcal polysaccharide- PPS*), apenas os animais CD19^{-/-} (deficientes de B-1a) resistiram à infecção com doses letais da bactéria. Este dado curioso levou os pesquisadores a observarem um acúmulo de células B-1b no peritônio dos animais resistentes à infecção letal. Estas células B-1b proliferavam e secretavam IgM protetora mediante imunização com PPS¹⁰¹.

Em suma, os autores concluíram que as células B-1a são essenciais para o controle inicial da infecção graças a sua produção de IgM natural, enquanto que as células B-1b participavam da imunidade adaptativa, proliferando-se e secretando anticorpos anti-PPS duradouros e protetores. Estes dados pioneiros, que mostram a geração de células B-1b de memória, devem contribuir significativamente para o estudo de vacinações, já que, até o momento, as imunizações com polissacarídeos eram consideradas não imunogênicas e incapazes de gerar proteção de longo prazo (memória imunológica).

1.4 Linfócitos B-1, macrófagos e lymphophages: processo evolutivo, promiscuidade celular ou limitações nas metodologias de análise?

De acordo com o antigo paradigma, os progenitores hematopoiéticos podem, em essência, percorrer vias de desenvolvimento multidirecionais até, finalmente, atingirem um estágio de diferenciação irreversível, no qual estas células-tronco deixam de ser pluripotentes e passam a percorrer um caminho unidirecional. O exemplo mais clássico do percurso unidirecional e comprometido das células-tronco em desenvolvimento seria a diferenciação final entre os progenitores comuns de linfócitos (PCL) ou os progenitores comuns de mielócitos (PCM). Nesta etapa de diferenciação hematopoiética, acredita-se que a diferenciação para PCL ou PCM é irreversível e, portanto, estes progenitores deveriam seguir sua via única de diferenciação, comprometida para a geração de linfócitos (B, T e NK) ou mielócitos (granulócitos e monócitos), respectivamente.

Entretanto, o desenvolvimento unidirecional e comprometido das linhagens linfóides e mielóides foi questionado, quando Michael Potter (*National Institute of Health/EUA*) e colaboradores, em 1957, observaram que clones de células B neoplásicas (clone P388), obtidos de camundongos DBA/2, perdem,

progressivamente, suas características linfóides para adquirirem características de macrófagos, como a aderência, o espreadimento e a fagocitose¹⁰². Potter descreveu que estes clones P388 “macrofágicos” tinham rearranjado seus genes de imunoglobulinas, confirmando serem esses de origem linfóide. Estes clones cultivados *in vitro* receberam o nome de P388D1 e são utilizados até hoje para estudar atividades biológicas de macrófagos¹⁰³.

Em seguida, confirmando estes dados, o grupo do laboratório da Dra. Ana Cumano (*Pasteur Institute/França*) e depois do Dr. Kenneth Dorshkind (*University of California, Los Angeles/EUA*) encontrou progenitores bipotenciais (no fígado fetal¹⁰⁴ e na medula óssea^{105,106}, respectivamente), os quais, sob cultura, davam origem a ambos linfócitos B e macrófagos. Paralelamente, o grupo do Dr. Richard Phipps (*University of Rochester/EUA*) estudando agora um subtipo de célula B (linfócito B-1) presente no baço, mostrou que, mediante estímulo com a citocina M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*), estas células são capazes de se reprogramar e de se transformar em fagócitos mononucleares *in vitro*¹⁰⁷⁻¹¹⁰.

No Brasil, o grupo do professor Mario Mariano (Universidade Federal do Estado de São Paulo/SP), junto com o professor Dr. Sandro Rogério de Almeida (Universidade de São Paulo/SP), investigou as células da cavidade peritoneal e obteve resultados que sugerem que linfócitos B-1 peritoneais poderiam tornar-se fagócitos quando mantidos sob condições de cultura *in vitro* por 4-7 dias¹¹¹. Estes pesquisadores acreditam que estas células B-1 poderiam representar um resquício evolutivo, evidenciado pela remanescência de características primitivas (como a fagocitose) numa célula linfóide, a qual surgiu nos níveis mais tardios da evolução. Numa adaptação em animais superiores, Mariano acredita, ainda, que estas células poderiam representar constantes progenitores de macrófagos (comunicação pessoal com Dr. Mario Mariano).

Entretanto, numa análise mais crítica da metodologia de obtenção destas células B-1, não se pode excluir a possibilidade de haver uma contaminação por macrófagos (ou monócitos) existentes nestas culturas mistas de células peritoneais. A eventual contaminação destas culturas *in vitro* pode resultar em interpretações equivocadas a respeito deste fenômeno de diferenciação de células B em fagócitos. Por fim, todos os dados mostrados, até então, ainda não são suficientes para confirmar a existência de células B/macrofágicas *in vivo*.

Outro fator importante, que contribuiu para relacionar ambas as linhagens linfóides e mielóides, foi a observação de que os linfócitos B-1 de peritônio expressam fisiologicamente níveis detectáveis do receptor de complemento Mac-1, um marcador universal utilizado para detectar exclusivamente células mielóides, principalmente macrófagos. Vale ressaltar que Mac-1 está diretamente envolvido com a capacidade de fagocitose dos macrófagos. O simples reconhecimento, pelo Mac-1, de fatores do complemento (C3) presentes na superfície das partículas fagocitadas, é suficiente para que estas células organizem seu citoesqueleto (actina) e iniciem o processo de fagocitose. A constante emergência de novos achados relacionados à promiscuidade entre as linhagens celulares induziu a comunidade científica a repensar o paradigma de desenvolvimento e comprometimento de linhagens hematopoiéticas.

A fim de elucidar estes achados e investigar a possível existência, fisiológica e funcional, desta “promiscuidade” de linhagens hematopoiéticas *in vivo*, foi iniciada uma colaboração entre o grupo de pesquisa do Dr. Sandro R. de Almeida, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo (USP), e o grupo da Escola de Medicina da *Stanford University* (no laboratório dos Drs. Herzenberg, que são creditados pela descoberta dos linfócitos B-1 e invenção da tecnologia do FACS). Muito confiante no projeto de identificar células B/macrofágicas fisiológicas *in vivo*, Leonore A. Herzenberg logo sugeriu um novo nome para estas células, baseado nas suas duas características funcionais: *lymphophage* (*lymph* de linfócitos e *phage* de fagócitos). Entretanto, durante meses de investigação, não foi possível identificar estas células *in vivo*.

Independente da frustração pessoal, a nova observação da cavidade peritoneal permitiu descobrir outros fenômenos celulares muito peculiares às células B-1 e, conseqüentemente, à toda economia do peritônio. Observou-se, entre outras coisas, que os linfócitos B-1 caminham intimamente ligados (aderidos) a um terço dos monócitos/macrófagos peritoneais, formando duplas (*doublets*) estáveis. Ainda, foi observado que as células B-1 formam *doublets* com elas mesmas, num mecanismo muito semelhante à sinapse imunológica. O fato dos linfócitos B-1 e monócitos/macrófagos estarem fortemente aderidos entre si dificulta muito as análises de função celular, já que dificilmente se consegue separar ou evitar tal formação *in vivo*.

Esta descoberta induz uma reavaliação sobre o processo de obtenção (e purificação) de macrófagos peritoneais por meio de aderência, já que, inevitavelmente, haverá contaminação por linfócitos B-1. Além da ligação das células B-1 aos monócitos e macrófagos, os próprios linfócitos B-1 também se aderem com muita facilidade nas placas de cultura, tornando o usual processo de obtenção de macrófagos do peritônio uma metodologia de pesquisa inviável e inadequada para se avaliar determinadas funções biológicas (ver pôster em Apêndice III).

Entretanto, recentemente, vários trabalhos retomaram este tema da “promiscuidade” celular e seus dados se agregam em favor da existência de *lymphophage in vivo*, como mostra o trabalho que ganhou a capa da revista *Immunity* na edição de janeiro de 2008: “The Rap GTPases Regulate B cell Morphology, Immune-Synapse Formation, and Signaling by Particulate B Cell Receptor Ligands”¹¹². Este trabalho mostra, através de convincentes imagens, que células B (clone A20 ou células primárias de baço) podem aderir e se espalhar em lamínulas contendo anti-Ig ou anti-LFA-1 e, ainda, iniciam a polimerização citoplasmática de F-actinas para internalizar antígenos particulados, como *beads* opsonizados com anti-Ig, os quais são reconhecidos através do receptor de célula B (BCR)¹¹².

Além desta íntima relação com os macrófagos, parece que as células B também podem adquirir fenótipo de células T, mesmo após terem alcançado seu estágio final de diferenciação. Foi mostrado, num modelo *in vivo*, que as células B já diferenciadas são capazes de se reorganizar geneticamente para se desenvolver em potentes progenitores de células T¹¹³. Esse mecanismo ocorreu graças ao bloqueio condicionado, nas células B diferenciadas, do fator de transcrição Pax-5 (*Paired box-5*), o qual é necessário para manter a identidade dos linfócitos B¹¹⁴. Na busca por possíveis mecanismos fisiológicos de bloqueio de Pax-5, observou-se que o processo de diferenciação de células B para plasmócitos requer necessariamente a deleção deste fator de transcrição¹¹⁵. Outros trabalhos recentes também mostram que fatores secretados pelo osso medular são capazes de inibir a expressão de Pax-5¹¹⁶. Sabendo-se que a ausência de Pax-5 poderia re-programar uma célula B-2 e diferenciá-la numa célula T, resta saber o que a ausência de Pax-5 induziria numa célula B-1. Talvez *lymphophage*.

Os linfócitos B possuem a capacidade de apresentar antígenos via MHC-II e, portanto, devem necessariamente realizar a endocitose e digestão de partículas

geralmente solúveis, reconhecidas através do BCR. Entretanto, já foi observado que as células B, assim como os macrófagos na fagocitose, organizam suas actinas (F-actinas) intracelulares para favorecer o seu processo de endocitose e possuem uma plasticidade de cito-esqueleto, espalhando-se constantemente (imagens *in vivo*) na busca por antígenos^{117,118}. Tudo indica que em certas condições/ativações apropriadas, estas células poderiam também endocitar partículas maiores (não-solúveis), utilizando suas vias clássicas de reconhecimento de regiões Fc (*fragment crystallizable region*) de anticorpos e, também, de proteínas do complemento (CD21 e Mac-1). Para alguns observadores, este fenômeno já poderia ser chamado de fagocitose e incluiria os linfócitos B no *pool* de células fagocíticas. Este tema permanece não elucidado e representa uma área de pesquisa em ascensão.

Finalmente, o projeto que se iniciou com o objetivo de investigar os *lymphophages in vivo* fracassou na sua essência, mas resultou em uma análise mais criteriosa dos subtipos e das funções de células peritoneais, que será descrita a seguir.

2. OBJETIVO

Caracterizar fenotípica e funcionalmente as principais células que habitam a cavidade peritoneal de camundongos, utilizando metodologias contemporâneas de citometria de fluxo. Foram objetivos específicos, identificar:

- as etapas de diferenciação fenotípica de linfócitos B-1 durante a ontogenia,
- subtipos de linfócitos B-1 e macrófagos no peritônio de camundongos *naïves*,
- o comportamento de células do peritônio mediante estímulo inflamatório intravenoso (LPS) e intraperitoneal (bactérias gram-negativas),
- o desenvolvimento de plasmócitos induzidos por LPS *in vitro* e *in vivo*.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais e preparação de células

Camundongos da linhagem BALB/c (alótipo “a” da cadeia pesada de imunoglobulina, IgH-6a), BAB/25, CB.17 (alótipo “b” da cadeia pesada de imunoglobulina, IgH-6b) e camundongos deficientes de RAG-1 (*recombinase-activating gene-1*) foram gerados e mantidos no Departamento de Medicina Comparativa da *Stanford University* (Califórnia, EUA). Células totais da cavidade peritoneal foram obtidas de animais recém-nascidos e adultos (3 dias, 10 dias, 20 dias, 30 dias e 100 dias), por meio de lavagens com meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*)-1640 sem vermelho de fenol acrescido de 3% de soro fetal bovino (SFB). As lavagens foram feitas injetando-se 7mL de meio RPMI na cavidade peritoneal e em seguida o mesmo volume foi retirado com auxílio de uma pipeta de vidro. As células foram ressuspensas no mesmo meio RPMI + 3% de SFB na concentração de 25×10^6 células/mL. Antes do uso, o meio RPMI foi equilibrado em oxigênio fisiológico, incubando-se o meio por 24h em incubadora contendo 5% de O₂.

Para a obtenção de células totais esplênicas, o baço foi retirado, colocado em meio RPMI-1640 e macerado entre duas lamínulas ásperas. A suspensão foi filtrada em membrana de *nylon* e as hemácias foram eliminadas por hemólise, utilizando-se tampão específico. Os leucócitos livres de hemácias foram lavados, filtrados novamente e ressuspensos em meio RPMI-1640 sem vermelho de fenol + 3% SFB na concentração de 25×10^6 células/mL.

3.2 Citometria de fluxo

A suspensão de células totais de peritônio ou baço de cada linhagem de camundongo contendo 10^6 ($40 \mu\text{L}$) células foi pré-incubada no gelo por 15min. com anticorpos anti-CD16/CD32 para bloquear os receptores da região Fc de imunoglobulinas (FcγRII/III). Em seguida foram marcadas por mais 15min. (no gelo) com anticorpos conjugados com diferentes fluorocromos, numa combinação de 11 cores descrita a seguir: FITC-Ly-6C (AL-21), FITC-IgM^a (DS-1) ou FITC-IgD (11-26); PE-CD11b (M1/70), PE-CD23 (B3B4) ou PE-I-A^d (AMS-32.1); PECy5-CD5 (53-7.3); PECy5.5-CD21 (7G6) ou PECy5.5-CD23 (B3B4) ou PECy5.5-MHCII (AMS-32.1);

PECy7-Gr-1 (RB6-8C5), PECy7-IgD (11-26) ou Cy7PE-CD11b (M1/70); Alexa-594-IgM^b (AF6-78.25); APC-B220 (RA3-6B2) ou APC-IgM^b (AF6-78.25); APCCy5.5-IgM total (331); APCCy7-IgM total (331) ou APCCy7-CD11b (M1/70); CasBlu-F4/80 ou Pacific Blue-F4/80; Q(*quantum*)dot 605-VH₁₁ (clone Herzenberg Lab) ou Qdot 605-CD11c (HL3). Quando houve a necessidade de fazer marcações simultâneas com FITC-IgM^a e APC/Alexa-594-IgM^b as 11 combinações foram refeitas de acordo com as cores/reagentes complementares citadas acima.

Após a marcação, as células foram lavadas e centrifugadas. O precipitado celular foi ressuspensionado em meio RPMI-1640 + 3% SFB contendo 10µg/mL de iodeto de propídio (IP). As células marcadas com IP foram consideradas mortas e conseqüentemente excluídas de todas as análises (e separação) de células por FACS. As células foram analisadas e separadas na *Stanford Shared FACS Facility* (SSFC) da *Stanford University* utilizando-se instrumentos *Hi-Dimensional* (Hi-D) FACSaria-II (análise e separação), LSR-II (apenas análise) ou instrumento híbrido montado em Stanford (Flasher-II, análise e separação), acoplado a um aparelho FACS-II e eletrônicos do FACS DiVa (todos instrumentos e software Becton & Dickinson, EUA). Ambos os aparelhos são capazes de analisar pelo menos 14 parâmetros, incluindo-se dispersão de luz (tamanho e granulosidade). Os protocolos de citometria foram desenhados com o *software* CytoGenie (ScienceXperts.com, EUA) e os dados foram analisados com auxílio do *software* FlowJo (Trestar.com, EUA).

Para distinguir células auto-fluorescentes de células que expressam poucas (*low level*) porém reais concentrações de marcadores de superfície, utilizou-se a metodologia de *fluorescence-minus-one* (FMO)¹¹⁹. Controles FMO são determinados através da marcação das células com todos os anticorpos/marcadores exceto aquele que será analisado. Os valores obtidos nessa análise são considerados "limite FMO das células" e todos os valores de fluorescência acima deste limite são considerados verdadeiros positivos. O nível de fluorescência (limite FMO), da população de interesse, obtido no canal no qual será medido um determinado marcador revelará a auto-fluorescência inerente daquela população-alvo. Esse valor permite estabelecer um limite com o qual se faz a distinção entre células auto-fluorescentes e aquelas que expressam um determinante que se ligará ao anticorpo fluorescente usado para detectá-lo. A metodologia de FMO, além de outras tecnologias mais atualizadas para aquisição e análise de dados de citometria, pode

ser encontrada na recente publicação, do grupo da Dra. Herzenberg, na revista *Nature Immunology*, v.7(7), p. 681 (julho 2006), na qual a Figura 1 foi elaborada e fornecida por Eliver Ghosn (*Figure 1: "Data provided by E. Ghosn"*)¹¹.

3.3 Separação de células por FACS e transferência de células in vivo

A separação de células por FACS foi realizada para cinco experimentos diferentes: 1) os linfócitos B-1 e macrófagos foram separados para o ensaio de indução de plasmócitos *in vitro*, conforme protocolo descrito no item 3.5; 2) os linfócitos B-1 e macrófagos foram separados para análise em microscopia confocal, conforme protocolo descrito no item 3.7; 3) as células, aqui denominadas *doublets*, foram separadas para análise em microscopia eletrônica, conforme protocolo descrito no item 3.8; 4) para a análise dos precursores de células *doublets* foi utilizado o procedimento descrito a seguir; 5) os linfócitos B-1 CD11b⁺ e CD11b⁻ foram separados para o ensaio de transferência adotiva de células entre camundongos congênicos, conforme o procedimento descrito a seguir:

- Para a análise dos precursores de células *doublets*, utilizaram-se células totais de peritônio de camundongos BALB/c e foi realizada a separação, por FACS, apenas de células linfóides (FSc^{low} e SSc^{low}) totais. Não foi necessário utilizar nenhum marcador celular (anticorpos marcados), já que a separação foi realizada baseada apenas no parâmetro de *scatters*, FSc^{low} e SSc^{low}, permitindo a separação das células *singlets*. Após separação, 10⁶ células linfóides foram inoculadas por via intraperitoneal (i.p.) em camundongos RAG^{-/-} e mantidas por 3 e 10 dias. Em seguida, as células totais do peritônio dos camundongos recipientes (RAG^{-/-}) foram retiradas, marcadas e analisadas para presença de *doublets*.

- Para a separação de linfócitos B-1 CD11b⁺ e CD11b⁻, seguiu-se o seguinte protocolo: células totais esplênicas ou peritoneais de camundongos BALB/c (IgM^a) foram manipuladas conforme descrito no item 3.2. Os limites de auto-fluorescência para a expressão de CD11b foram estabelecidos de acordo com os valores controles de FMO. Para realizar a separação de linfócitos B-1, células totais de peritônio foram marcadas (FITC-CD3a, PE-CD23, PECy7-CD11b e IP) e uma seqüência de *gates* foi realizada para incluir apenas linfócitos vivos (FSc^{low}, SSc^{low} e IP⁻). Como as células B-1 são as principais células encontradas no *gate* dos linfócitos peritoneais (aproximadamente 70%), considerou-se desnecessária a marcação destas células com anticorpos determinantes de linfócitos B, como anti-

CD19 e anti-IgM, considerando que estes marcadores poderiam desencadear, nestes linfócitos, algum tipo de sinalização indesejada.

A partir do *gate* de linfócitos vivos, as células CD3a⁺ (linfócitos T) e as células CD23⁺ (linfócitos B-2) foram excluídas. As células restantes no gráfico (maioria constituída de linfócitos B-1) foram analisadas de acordo com a sua expressão de CD11b, sendo as células CD11b⁺ separadas, por *FACS*, das células CD11b⁻. Como controle, a mesma população celular foi completamente marcada conforme descrito no item 3.2 (11 cores) para determinar o real rendimento de linfócitos B-1 em cada população CD11b⁺ e CD11b⁻ separadas. Aproximadamente 90% de cada população separada era constituída de linfócitos B-1 e a porcentagem de inter-contaminação entre células CD11b⁺ e CD11b⁻, após *sorting*, foi sempre menor que 5% (95%-99% de pureza).

Em seguida, as células separadas foram ressuspensas em tampão PBS (sem soro). Aproximadamente 5x10⁵ células de cada população separada (CD11b⁺ ou CD11b⁻) foram injetadas no peritônio de camundongos BAB/25 (IgM^b) ou RAG^{-/-}. Após 12 dias, células totais do peritônio ou baço do hospedeiro foram retiradas, marcadas e analisadas conforme descrito no item 3.2.

3.4 Transferência de células totais de peritônio e injeção de LPS i.v. para ensaio de migração

Aproximadamente 3x10⁶ células totais de peritônio de camundongos doadores (CB.17 alótipo “b”) foram obtidas conforme descrito no item 3.1. As células foram ressuspensas em PBS e transferidas por via i.p. para camundongos recipientes (BALB/c alótipo “a”). Cada camundongo recipiente recebeu o total de células contidas no peritônio de um camundongo doador. Dessa forma, cada camundongo recipiente foi inoculado com aproximadamente 10⁶ linfócitos B-1 (contidos em 3x10⁶ células totais de peritônio). Neste protocolo, de utilização de animais com diferentes alótipos de IgM, a purificação (*sorting*) de linfócitos B-1 é desnecessária e a presença de outras células do peritônio é essencial para manter um ambiente celular mais próximo do fisiológico.

Após uma hora de transferência, os animais recipientes receberam 15µg de LPS de *E. coli* (diluído em PBS estéril) por via i.v. num volume final de 200µL. Após 3h, 6h, 24h, 3d e 6d, os animais foram sacrificados e as células totais do peritônio e baço foram retiradas, marcadas e analisadas conforme descrito no item 3.2. Para

determinar, após tratamento com LPS, a migração de linfócitos B-1 do peritônio para o baço, as células totais do baço foram marcadas com anticorpos anti-IgM^b para identificar os linfócitos B-1 provenientes dos camundongos doadores (alótipo "b"). Como controle, os camundongos foram injetados por via i.v. com 200µL de PBS estéril. Os plasmócitos derivados de células B-1 (B-1 secretora de imunoglobulinas) foram identificados através da marcação com anticorpos anti-CD138 (*syndecan-1* clone 281-2) marcados com *phycoeritrin* (PE) ou *allophycocianin* (APC).

3.5 Indução de plasmócitos in vitro: co-cultura de células separadas por FACS

As células totais de peritônio foram preparadas e marcadas conforme descrito nos itens 3.1 e 3.2. As células B-1 foram identificadas por FACS pela alta expressão de CD19. Neste ensaio de separação de células por FACS não foi utilizado nenhum reagente que se ligue aos receptores de célula B, como anti-IgM e anti-IgD. Essa estratégia foi adotada para evitar qualquer ativação/sinalização indesejada nas células B. Os macrófagos foram identificados pelas diferentes expressões de CD11b e F4/80. Como descrito em Resultados, a co-expressão de CD11b e F4/80 pode distinguir dois subtipos de macrófagos: CD11b^{high}, F4/80^{high} e CD11b^{int}, F4/80^{low}. Ambos os subtipos de macrófagos são negativos para outros marcadores linfóides (CD19, CD3, CD5, IgM, IgD, CD23) e granulóides (Gr-1, Ly-6C). Estes dois subtipos de macrófagos foram separados por FACS (aparelho Flasher-II ou Aria-II, item 3.2) seguindo as características fenotípicas descritas acima. Em todos os processos de separação por FACS obtivemos uma pureza > 94%.

Após separação por FACS, 2×10^5 células B-1 foram cultivadas em uma placa de 96 poços na presença de LPS (10µg/mL) por aproximadamente 60 horas. As células foram mantidas em meio RPMI-1640 acrescidos de 10% de soro fetal bovino num volume final de 250µL. Após 60h, as células foram lavadas e marcadas com anticorpos contra a molécula CD138, a qual é expressa e altas concentrações nas células produtoras de anticorpos (plasmócitos). Além da molécula CD138, também foi utilizado um painel de 11 marcadores (descritos no item 3.2) para identificar os linfócitos B e macrófagos após a cultura *in vitro*. Como controle, as células B-1 também foram cultivadas na ausência de LPS.

Para análise da participação dos macrófagos na indução/inibição de plasmócitos *in vitro*, foi realizada uma co-cultura de 2×10^5 células B-1 na presença de cada subtipo de macrófago. Primeiramente, as células B-1 foram tratadas com

LPS (10 μ g/mL) por 3h (para ativar as células B e evitar competição com os receptores de LPS nos macrófagos) e em seguida os macrófagos foram adicionados na cultura em concentrações crescentes (ou equivalente ao número de células B-1): 10⁴, 10⁵ e 2x10⁵. Após 57h (total de 60h de cultura) as células foram lavadas e marcadas conforme descrito anteriormente, sempre incluindo o marcador de plasmócitos CD138.

3.6 Dosagem de óxido nítrico (NO) por citometria de fluxo

A produção de NO foi dosada por citometria de fluxo que detecta a fluorescência (luz) emitida após a interação do reagente 4,5-diaminofluoresceína (DAF) com o NO produzido pelas células (macrófagos) de interesse. O comprimento de onda da luz emitida pela interação DAF-NO foi adquirido pelo mesmo filtro utilizado para a leitura do fluorocromo FITC.

As células totais de peritônio foram obtidas conforme descrito no item 3.1. 2x10⁶ células totais de peritônio foram cultivadas em tubos de 5mL de poliestireno (fundo redondo) contendo 1mL de RPMI-1640 acrescido de 10% de soro fetal bovino. As células foram incubadas em estufas de 37°C ajustadas para manter 5% de CO₂ e 5% de O₂ a fim de aproximar-se ao oxigênio fisiológico, evitando falsos resultados decorrentes do estresse oxidativo. As células foram tratadas com 100ng/mL de LPS (*Escherichia coli*) por 6h e 24h. Como controle, as células foram mantidas apenas em meio de cultura. Após 6h e 24h, as células foram lavadas com RPMI-1640 (sem fenol, usado para marcação de células para citometria), ressuspensas em 1mL de solução de RPMI-1640 acrescido do reagente probenecida (0,074% - pH=7,4). Em seguida, foi adicionado 1 μ L de DAF (concentração final de 1 μ M de DAF) e a solução foi mantida em temperatura ambiente por 30min. A presença de probenecida ajuda a prevenir a eventual excreção do reagente DAF pelas células de interesse. Após 30min. as células são lavadas, centrifugadas e marcadas para análise por citometria de fluxo conforme descrito no item 3.2. Durante todo o processo de marcação utilizamos meio RPMI-1640 acrescido de probenecida. As células foram mantidas vivas e iodeto de propídio foi utilizado para discriminar as células mortas.

3.7 Ensaio de fagocitose in vivo utilizando-se partículas ou bactérias mortas

5×10^6 bactérias *Escherichia coli* mortas (cepa K-12) ou partículas *zymosan* (do fungo *S. cerevisiae*), ambas marcadas com fluorocromo Alexa-488 (Molecular Probes, Invitrogen, EUA), foram inoculadas na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c adultos num volume final de 500 μ L de PBS. Após 5min., 30min., 2h. ou 4h, as células totais de peritônio foram retiradas, marcadas e analisadas conforme descrito no item 3.2. Neste ensaio de fagocitose *in vivo*, utilizando-se 11 cores, é possível determinar qual população celular (subtipos de linfócitos e granulócitos) é capaz de internalizar a partícula ou a bactéria injetada. A leitura da fluorescência emitida pelo Alexa-488 é realizada pelo mesmo canal (filtro de comprimento de onda) utilizado para a leitura do FITC. Portanto, para os ensaios de fagocitose *in vivo* na presença do Alexa-488, a marcação (11 cores) das células totais do peritônio é realizada na ausência de anticorpos marcados com FITC.

Para análise, as células vivas positivas para Alexa-488 foram consideradas fagocíticas. Entretanto, algumas bactérias (Alexa-488⁺) podem depositar-se/aderir-se na superfície extracelular das células do peritônio e, conseqüentemente, aparecerem positivas para Alexa-488, gerando um resultado falso positivo para fagocitose. Para distinguir as células que realmente foram capazes de fagocitar das células que apenas tiveram as bactérias aderidas na sua superfície, foi utilizado um anticorpo anti-Alexa-488 marcado com o fluorocromo Alexa-594 (Invitrogen, EUA). Quando estes dois reagentes (Alexa-488 e Alexa-594) são utilizados no mesmo experimento (11 cores), as células que não forem capazes de fagocitar mas, no entanto, apresentaram bactérias/*zymosan* na sua superfície, aparecerão duplamente positivas para Alexa-488 e Alexa-594 no gráfico de citometria. Já as células que internalizaram as bactérias/*zymosan* apresentar-se-ão como positivas para Alexa-488 e negativas para Alexa-594, já que o anticorpo anti-Alexa-488 não é capaz de alcançar o interior da célula. Estes dados foram confirmados por microscopia confocal.

3.8 Ensaio de fagocitose in vivo utilizando-se bactérias vivas expressando green fluorescence protein (gfp)

Em alguns casos, bactérias vivas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Yersinia* sp.), que expressam constitutivamente *gfp*, foram utilizadas para o ensaio de fagocitose, substituindo as bactérias/*zymosan* descritas no item 3.7. Estas cepas

gfp⁺ foram doadas pelo doutor Gregory Govoni, pós-doutorando no laboratório de Microbiologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia da *Stanford University*, sob supervisão do professor Stanley Falkow.

O ensaio de fagocitose foi realizado seguindo o mesmo protocolo descrito no item 3.5. As bactérias gfp⁺ foram identificadas através de citometria de fluxo, utilizando o mesmo canal de leitura do fluorocromo FITC. Para distinguir as células (linfócitos B-1 e macrófagos) que realmente foram capazes de fagocitar, das células que apenas tiveram as bactérias aderidas na sua superfície, foi realizada uma análise em microscopia confocal de células gfp⁺ previamente separadas por FACS. As células totais de peritônio foram marcadas de acordo com a combinação descrita: gfp-bactéria, PE-CD19, APC-IgM, APCCy7-CD11b, PECy5.5-F4/80, CasBlu-CD3a e CasBlu-CD8. Os dois últimos reagentes foram considerados marcadores *dump*, já que as células positivas para estes marcadores (linfócitos T) foram excluídas da análise/separação. A combinação de 11 cores descrita no item 3.2 não pôde ser usada devido ao limite de canais (filtro de comprimento de onda) de leitura de fluorocromos disponíveis no microscópio confocal. As células IP⁺ foram consideradas mortas e excluídas da análise juntamente com as células T (CD3a⁺ e CD8⁺). As células gfp⁺ foram separadas por FACS de acordo com o fenótipo das células de interesse: linfócitos B-1 (IgM^{high}, CD19^{high}) e macrófagos (CD11b^{high}, F4/80^{high} e CD11b⁺, F4/80^{low}). Em todos os casos, a pureza da separação de células foi superior a 90%. As células separadas foram fixadas em lâminas para análise em microscopia confocal.

3.9 Microscopia confocal

As células de interesse (linfócitos B-1, macrófagos/monócitos) foram separadas por FACS diretamente sobre uma lamínula colocada em uma placa de 24 poços. As lamínulas foram previamente tratadas com polilisina (1% em água destilada) por 10min. para favorecer a aderência dos linfócitos. Após a separação, as células foram mantidas na estufa por 1h em meio RPMI + 3% SFB ou a placa foi centrifugada para precipitar as células. A lamínula, contendo as células separadas, foi cuidadosamente lavada com meio de cultura e fixada com 4% de paraformaldeído por 15min. Após a fixação, as células foram lavadas em PBS e mantidas por 30min.-60min. em uma solução de 1% de albumina bovina para bloquear sítios inespecíficos. Em seguida, a lamínula foi novamente lavada em PBS

e incubada com anticorpos policlonais anti-LPS marcados com fluorocromo (Texas-Red) vermelho. Essa técnica permite distinguir as bactérias fagocitadas das bactérias apenas ligadas à superfície celular, já que o anticorpo anti-LPS não consegue atingir o interior das células fagocíticas. Assim, as bactérias de superfície coram-se de vermelho (anti-LPS) vistas pela microscopia confocal, enquanto que as bactérias (*gfp*⁺) fagocitadas permanecem verdes. Após a marcação com os anticorpos, as células (lamínulas) foram lavadas com PBS e deixadas para secar naturalmente antes da montagem da lâmina. As lamínulas foram fixadas com uma solução contendo DAPI (que cora em azul o material genético) e observadas em microscópio confocal (Zeiss, Carl Zeiss Inc., EUA) do laboratório do professor Stanley Falkow. Para a análise de linfócitos B-1 *doublets*, as células separadas por FACS foram fixadas conforme descrito e montadas diretamente em solução de DAPI, sem a necessidade de outra marcação.

Os fluorocromos dos anticorpos utilizados para a separação de células foram escolhidos de acordo com os canais de leitura disponíveis no microscópio confocal. Dessa forma, a identificação de linfócitos B é feita, em ambas, citometria e microscopia confocal, através da detecção dos mesmos reagentes (APC-IgM ou APC-IgM^b e FITC-IgM^a) utilizados logo no início para o procedimento de *sorting*. O microscópio confocal utilizado é equipado com *lasers* capazes de detectar 3 diferentes fluorocromos (3 canais para leituras de diferentes comprimentos de onda de luz emitidos) 488nm (FITC ou *gfp*: bactérias/*zymosan* ou anti-IgM^a), 594nm (Texas-Red: anti-LPS) e 647nm (APC: anti-IgM ou anti-IgM^b), além de detectar o material genético celular com emissão de cor azul quando o DNA é marcado com DAPI.

3.10 Microscopia eletrônica

As células totais da cavidade peritoneal de camundongos adultos foram obtidas conforme descrito no item 3.1. As células foram marcadas com anticorpos anti-IgM (APC), anti-CD19 (FITC), anti-CD11b (PE) e ressuspendidas em meio de cultura contendo IP (o procedimento de marcação de células está descrito detalhadamente no item 3.2). Para a análise de células B-1 *doublets*, foi seguida a seguinte estratégia de *gating*: as células IP⁺ foram consideradas mortas e excluídas da análise. Em seguida, pelos parâmetros de *scatters* (tamanho e granulosidade), excluiu-se o *gate* de linfócitos e, conseqüentemente, foram analisadas apenas as

células maiores remanescentes, nas quais havia *doublets* de linfócitos B-1. Para que os macrófagos fossem excluídos da análise, utilizou-se anticorpos anti-CD11b. As células duplamente positivas para IgM e CD19 foram consideradas linfócitos B-1 e separadas pelo FACS para conseqüente análise em microscopia eletrônica. Experimentos prévios de caracterização das células grandes (FSC^{high}) de peritônio mostram que apenas linfócitos B-1 são capazes de formar *doublets*, diferente de linfócitos B-2 e T.

Em todas as separações por FACS, a pureza de linfócitos B-1 *doublets* foi maior que 90%. As células separadas foram fixadas por 30min. em solução de 5% de glutaraldeído e, em seguida, foram centrifugadas e ressuspendidas em solução gelada de PBS contendo 8% de sucrose. As células foram centrifugadas novamente e o precipitado foi ressuspendido em 6 μ L de gel de agarose (1%) com 0,5M (molar) de sorbitol. Após lavagens e substituição da solução de gel por uma solução de 1% de acetato de uranila (diluído em água), a amostra foi desidratada com concentrações crescentes de álcool etílico. O álcool é então substituído pela infiltração de resina *epon* adicionada em concentrações crescentes. Após completa infiltração, a amostra foi acondicionada em uma moldura retangular e mantida em forno de 60°C por 24h. Nesta etapa, a resina contendo as células *doublets* ficou pronta para o corte e a análise. Cortes de 85nm foram realizados com instrumento de diamante e corados com solução saturada de acetato de uranila e acetona por 15-20 segundos. Em seguida, os cortes foram corados em solução de 0,2% de citrato de chumbo por 3-4 minutos.

A leitura foi realizada em microscopia eletrônica de transmissão no aparelho JEOL 1230 (www.jeol.com) do Laboratório de Imagens de Células (*Cell Sciences Imaging Facility* – CSIF) da Escola de Medicina da *Stanford University*. O procedimento de fixação e de preparo da amostra foi realizado pelo doutor Takeshi Fukuhara (pós-doutorando do Departamento de Genética, sob supervisão dos Drs. Herzenberg) e entregue ao CSIF para corte, coloração e análise.

4. RESULTADOS

Uma visita à cavidade peritoneal de camundongos adultos: identificação de linfócitos e granulócitos

A cavidade peritoneal representa um nicho imunológico peculiar ainda pouco compreendido, apesar dos macrófagos serem células peritoneais muito estudadas. Os linfócitos B-1 são células encontradas também na cavidade peritoneal e suas funções ainda são pouco conhecidas, embora extensivamente estudadas. Entretanto, junto com os macrófagos e linfócitos B-1, o peritônio abriga ainda uma população muito heterogênea de células do sistema imune.

Com o objetivo de compreender melhor a economia e os personagens do “sistema imune peritoneal”, foi realizada uma análise fenotípica detalhada de todos os subtipos celulares encontrados nesta cavidade. A análise das células totais de peritônio foi realizada dividindo, durante a análise por FACS, as populações celulares em dois grandes grupos: as células que apresentaram, no gráfico de citometria, baixa intensidade de fluorescência nos parâmetros de dispersão de luz (FSc^{low} e SSc^{low} , respectivamente tamanho e granulosidade) foram consideradas pertencentes à “janela dos linfócitos”; e as células que apresentaram alta intensidade de fluorescência nestes mesmos parâmetros (FSc^{high} e SSc^{high}) foram consideradas pertencentes à “janela dos leucócitos FSc^{high} ” (Fig. 1A).

4.1 “Janela dos leucócitos FSc^{high} ”

As células localizadas na “janela dos leucócitos FSc^{high} ” representam aproximadamente 45% das células totais do peritônio (Fig. 1A). Mais da metade destas células (~60%) foi identificada como macrófagos, já que expressam altos níveis da molécula CD11b (Fig. 1C).

Tendo como base apenas a expressão de CD11b e granulosidade (SSc), foi observado que as células pertencentes à “janela dos leucócitos FSc^{high} ” são heterogêneas e dividem-se em pelo menos três subpopulações distintas: $CD11b^{high}$ (macrófagos ~62%), $CD11b^+$ (~34%) e $CD11b^-$ (~3%) (Fig. 1C).

Surpreendentemente, além dos macrófagos, a janela dos granulócitos contém grande quantidade de linfócitos B-1. A identidade de linfócitos B-1 foi determinada graças ao alto nível de CD19 e IgM co-expressos na superfície dessas células

(Fig.1C). Enquanto apenas metade das células B-1 encontradas na “janela dos linfócitos” expressa CD11b na sua superfície (item 4.4.1), na “janela dos leucócitos FSc^{high}” todas as células B-1 expressam esta molécula (CD11b⁺). Embora dados da literatura sugiram a existência de diferentes tamanhos de células B-1 residentes no peritônio (consideradas, neste caso, como células B-1 grandes), a existência de alta porcentagem de linfócitos (B-1) expressando FSc^{high} e SSc^{high} foi um achado inusitado e será esclarecido nos resultados (item 4.2) a seguir.

Além dos linfócitos B-1, existe uma pequena população (~3%) de células IgM⁺, CD19⁺ e CD11b⁻, presentes na “janela dos leucócitos FSc^{high}”. Esta população é muito granulosa (SSc^{high}) e expressa altos níveis da molécula c-kit (dado não mostrado). Esse fenótipo caracteriza mastócitos e/ou basófilos murinos e estas células não serão exploradas nesta tese.

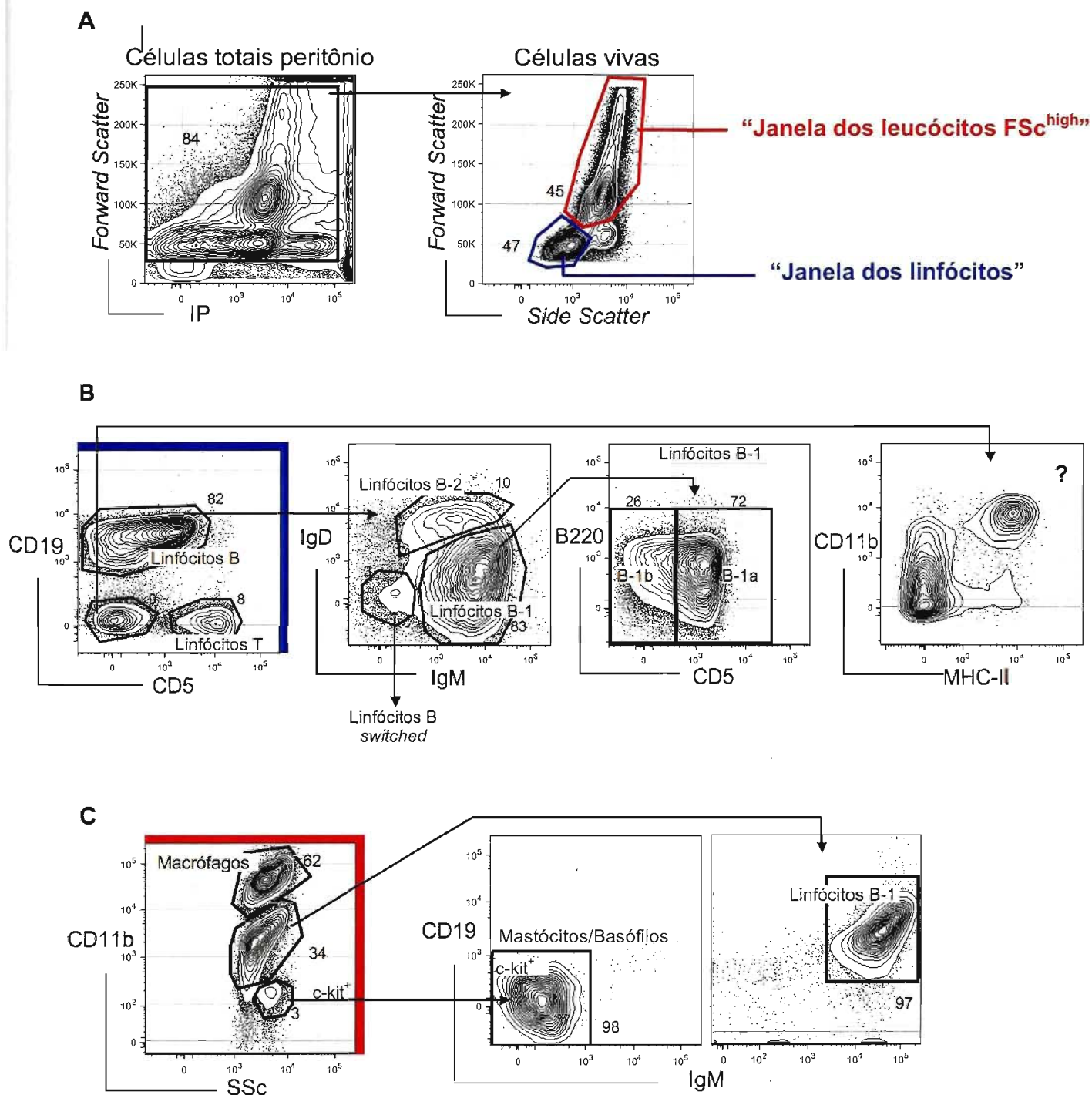


Figura 1. Descrição dos subtipos de células presentes na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c não estimulados: utilização de Hi-D FACS para análise simultânea de 13 parâmetros. Células totais da cavidade peritoneal de BALB/c adulto foram retiradas, marcadas (11 cores) e analisadas conforme descrito em Metodologia. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo software *Flowjo* e a estratégia de *gating*, para determinar os subtipos celulares, está descrita nos itens **A** (células totais de peritônio; iodeto de propídio (IP) foi utilizado para marcar células mortas), **B** (apenas análise de células linfóides FSc^{low} e SSc^{low} do peritônio, identificadas em azul no item **A**) e **C** (análise dos leucócitos restantes – “não-linfóides” – FSc^{high} e SSc^{high} do peritônio, identificados em vermelho no item **A**).

4.1.1 Co-expressão de CD11b e F4/80 identifica duas subpopulações de macrófagos com fenótipo e morfologia distintas: PM-1 e PM-2

A expressão das moléculas CD11b e F4/80 é comumente utilizada para identificar macrófagos murinos. No peritônio, a co-expressão destas moléculas é facilmente detectada nas populações contidas na “janela dos leucócitos FSc^{high}” (FSc^{high} e SSc^{high}). Entretanto, a análise simultânea destes dois marcadores fenotípicos (CD11b e F4/80) em células totais de peritônio revela claramente a presença de duas subpopulações distintas: CD11b^{high}-F4/80^{high}, chamadas aqui de *Peritoneal Myeloid-1* (PM-1) e CD11b^{int}-F4/80^{low}, chamadas aqui de *Peritoneal Myeloid-2* (PM-2) (Fig.6A). Em camundongos *naïve*, a porcentagem de células PM-1 é muito superior à de células PM-2. Entre todas as células que co-expressam CD11b e F4/80 (PM-1 + PM-2) na “janela dos leucócitos FSc^{high}”, aproximadamente 7%-10% são PM-2 e o restante representa células PM-1 (Fig. 2A).

Sabe-se que as células mielóides, principalmente macrófagos e dendríticas, expressam na sua superfície a molécula TLR4, a qual reconhece e responde à molécula de LPS. Este processo representa um mecanismo central e eficiente na ativação dos sistema imune inato e na conseqüente ativação da imunidade adaptativa em resposta aos estímulos endotóxicos. Surpreendentemente, os macrófagos PM-2, ao contrário dos macrófagos PM-1, expressam níveis muito baixos (ou nenhuma expressão) da molécula TLR4 (Fig. 2B). Ainda, um dos fenótipos essenciais aos macrófagos para iniciarem a imunidade adaptativa é a sua expressão da molécula MHC-II. Curiosamente, apenas os macrófagos PM-2 expressam níveis detectáveis de MHC-II, enquanto que os macrófagos PM-1 expressam pouca ou nenhuma molécula de MHC-II (Fig. 2B). Estes achados fenotípicos sugerem possíveis diferenças funcionais entre estes dois subtipos de macrófagos.

A existência de duas populações mielóides que se diferem apenas no seu nível de co-expressão de CD11b e F4/80 poderia sugerir que estas células representem macrófagos (PM-1) e monócitos (PM-2) co-habitando a cavidade peritoneal em condições fisiológicas. Entretanto, não há evidências que sustentem esta hipótese. Por exemplo, realizamos uma análise das células de sangue periférico e identificamos, como já esperado, que as células mielóides do sangue (principalmente monócitos) expressam níveis variados das moléculas Ly-6C e Gr-1 e ainda não expressam níveis detectáveis da molécula MHC-II (dados não mostrados).

Diferentemente dos monócitos periféricos, as células peritoneais PM-2 não expressam níveis detectáveis de Ly-6C e Gr-1 além de expressarem altos níveis da molécula MHC-II (Fig. 3). Estes dados atestam fortemente contra a terminologia de monócitos para as células PM-2, já que não encontramos, no sangue de camundongos *naïve*, nenhuma célula com o mesmo fenótipo que as células PM-2. Em suma, estes resultados mostram que os macrófagos residentes no peritônio representam, pelo menos, duas subpopulações fenotipicamente distintas.

4.1.2 Células dendríticas estão contidas na população PM-2

Como mostrado anteriormente, a população de células PM-2 expressam altos níveis de MHC-II e não parecem representar monócitos migrados do sangue periférico. Conseqüentemente, resolvemos avaliar se estas células representam células dendríticas. Curiosamente, apenas uma parcela desta população (~30%) expressa o marcador de células dendríticas CD11c (receptor de complemento 4 – CR4) (Fig. 3). Embora essa expressão de CD11c, na superfície dessas células, não seja muito alta, podemos considerar que parte das células PM-2 representam células dendríticas convencionais (CD11c⁺ e MHC^{high}). Todavia, não podemos concluir se as células PM-2 restantes (e que não expressam CD11c) sejam as células precursoras das células dendríticas ou, ainda, se as células dendríticas perdem a expressão de CD11c, transformando-se em células PM-2 CD11c⁻. Até o momento, os dados que obtivemos nesta tese nos permite classificar a população PM-2 em dois subtipos: macrófagos (CD11c⁻) e células dendríticas (CD11c⁺). Ainda são necessários ensaios de transferência de células PM-2 (CD11c⁻ e CD11c⁺) *in vivo* para esclarecer a possível relação entre os subtipos celulares presentes na população PM-2.

Vale ressaltar que, devido às limitações metodológicas, em todos os ensaios de separação da população PM-2 por FACS, realizados nesta tese, estarão incluídas ambas as células CD11c⁻ e CD11c⁺. Até o momento, não realizamos nenhum ensaio funcional comparativo entre as células PM-2 CD11c⁻ e as células PM-2 CD11c⁺.

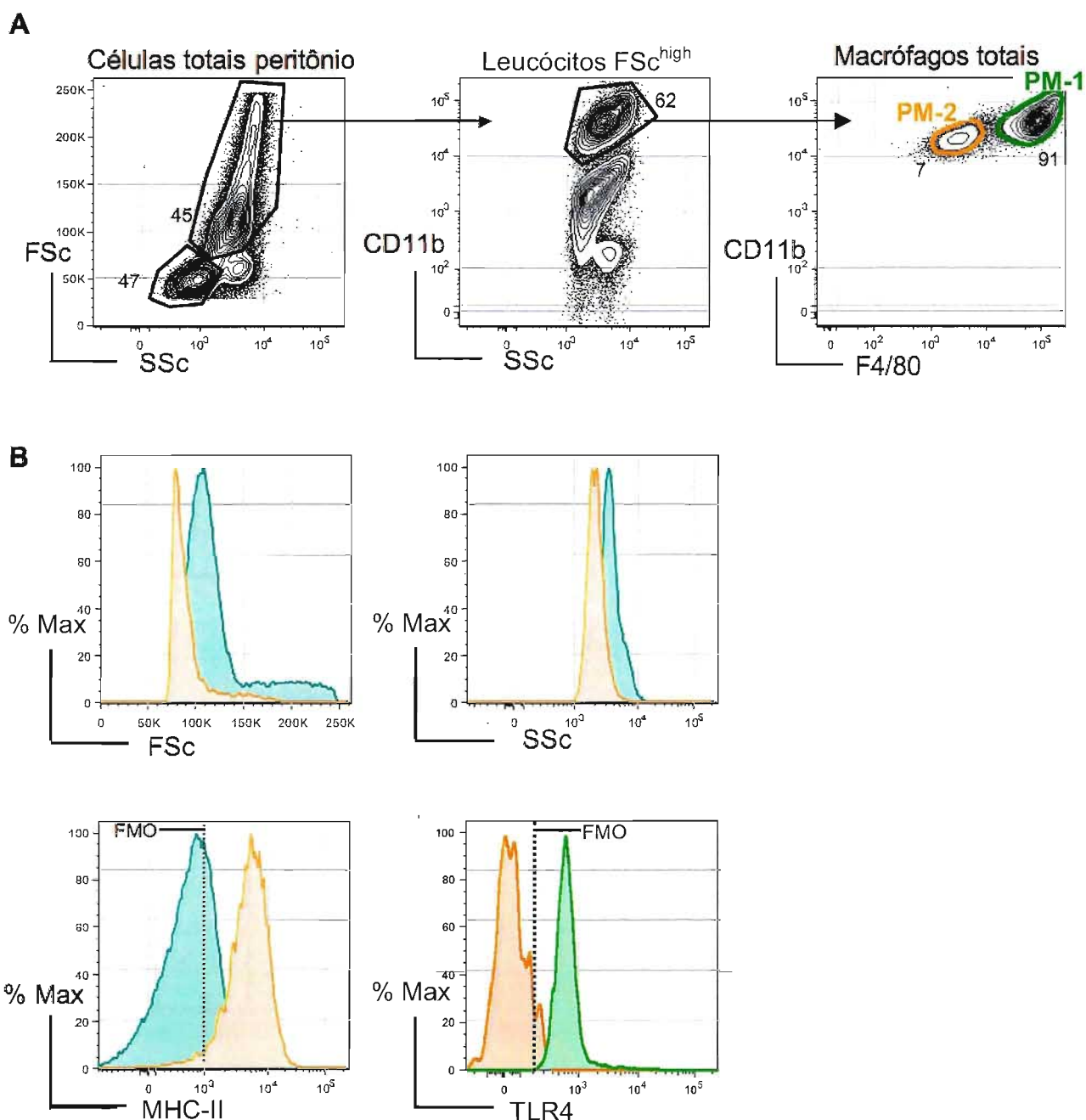


Figura 2. Co-expressão de CD11b e F4/80 identifica duas subpopulações de macrófagos peritoneais: PM-1 e PM-2. As células totais de peritônio de BALB/c foram obtidas e analisadas conforme descrito em Metodologia. **A** – As células totais de peritônio foram analisadas através da estratégia de *gating* (*software Flowjo*) para incluir apenas os leucócitos que estão fora da “janela dos linfócitos”. Em seguida, as células CD11b^{high} (macrófagos) foram analisadas quanto as suas expressões de CD11b e F4/80; **B** – Diferenças nas expressões de FSc (tamanho), SSc (granulosidade), MHC-II e TLR4 entre as duas principais subpopulações de macrófagos: PM-1 (verde) e PM-2 (laranja). Os eventos à direita da linha (pontilhada) de FMO (ver Metodologia) são considerados positivos para o parâmetro analisado no eixo das abscissas (MHC-II e TLR4).

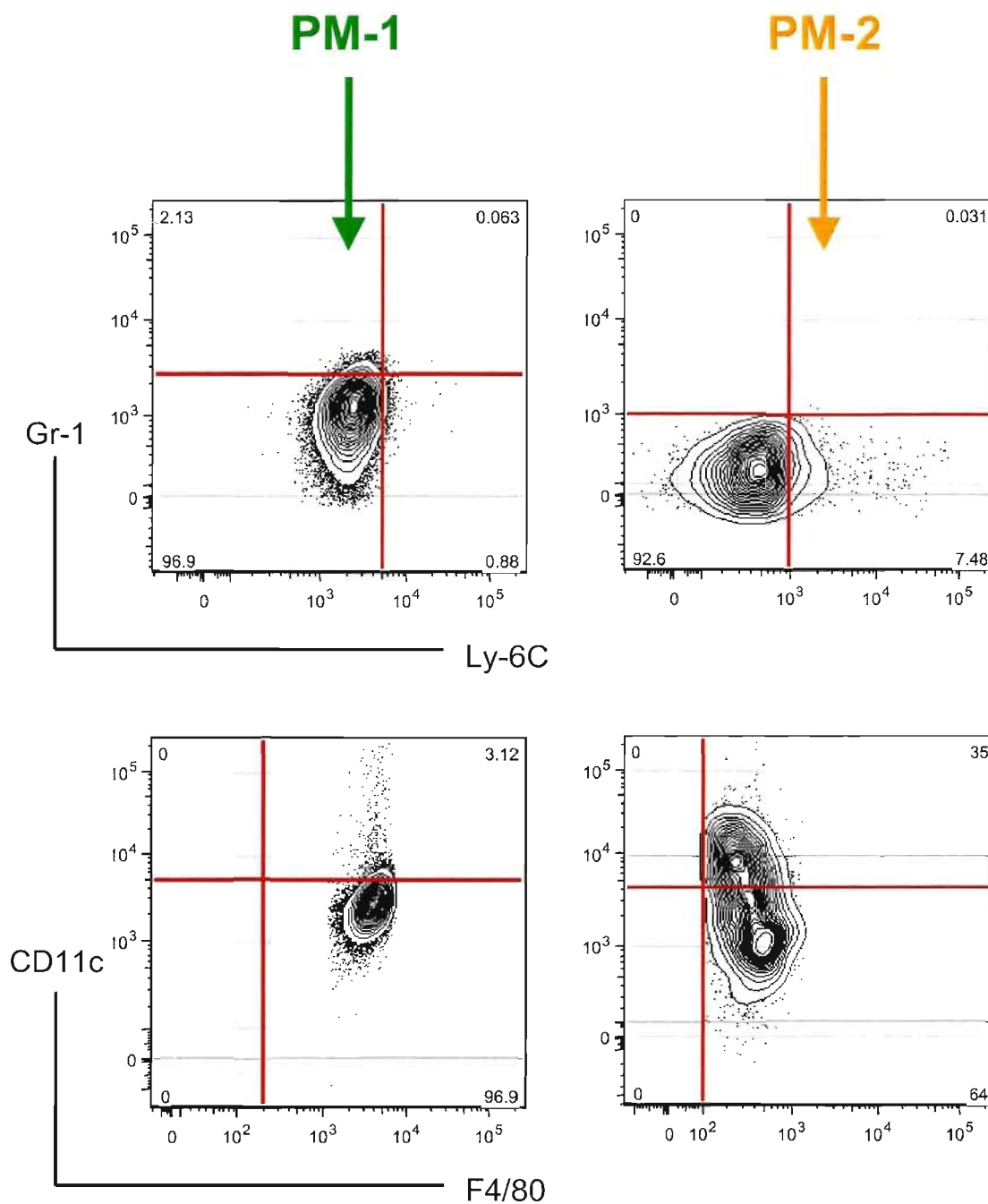


Figura 3. Expressão de Gr-1, Ly-6C e CD11c na superfície dos macrófagos PM-1 e PM-2. As células totais de peritônio de BALB/c foram obtidas e analisadas conforme descrito em Metodologia. As células totais de peritônio foram analisadas através da estratégia de *gating* (software *Flowjo*) para incluir apenas células PM-1 ou PM-2. Diferentemente das células PM-1, as células PM-2 expressam CD11c na superfície (último gráfico, abaixo e à esquerda). Ambas PM-1 e PM-2 não expressam Ly-6C nem Gr-1. As linhas vermelhas indicam o limite de fluorescência do controle FMO (ver Metodologia). Os eventos que aparecem além das linhas vermelhas são considerados positivos para o marcador indicado em um dos eixos.

4.1.3 Morfologia: PM-1 versus PM-2

Sabe-se que os macrófagos peritoneais são células maiores e mais granulosas que linfócitos e, conseqüentemente, são identificados (na análise por FACS) como FSc^{high} e SSc^{high}. Entretanto, quando comparamos tamanho e granulosidade dos macrófagos PM-1 e PM-2 observamos que os macrófagos PM-2 são células menores e menos granulosas que os macrófagos PM-1 (Fig. 2B), embora ambas (PM-1 e PM-2) ainda sejam maiores e mais granulosas que os linfócitos.

Desde muito tempo, os macrófagos peritoneais são utilizados para diversos ensaios *in vitro*, especialmente ensaios de fagocitose. Estas células, comumente, aderem e espraíam-se em placas de cultura. Entretanto, as possíveis diferenças morfológicas entre as subpopulações de macrófagos peritoneais não foram completamente investigadas. Embora a comunidade científica estivesse alerta e consciente sobre possíveis diferenças morfológicas e funcionais entre macrófagos peritoneais, a simplificação prevaleceu e adotou-se o hábito de referir-se aos macrófagos da cavidade simplesmente como uma população de macrófagos peritoneais. De acordo com os dados de fenotipagem de macrófagos peritoneais descritos nesta tese, realizamos uma separação por FACS de cada subtipo de macrófago (PM-1 e PM-2) para uma análise de morfologia. As células foram separadas diretamente sobre uma lamínula de vidro contida em uma placa de cultura de 24 poços e logo foram analisadas sob microscopia óptica.

Curiosamente, a morfologia de células PM-1 e PM-2 é muito diferente, principalmente quando observadas após 30 minutos de cultura em estufa de 37°C, 5% CO₂ e 5% O₂. As células PM-2 apresentaram morfologia alongada com espraíamento bipolar (Fig. 4). Essa morfologia peculiar foi adquirida apenas após separação e cultura das células, já que a análise imediata (antes da cultura) revelou células arredondadas com tamanho muito semelhante ao dos linfócitos. As células PM-1, porém, não foram capazes de alterar sua forma e mantiveram-se arredondadas mesmo após cultura (Fig. 4).

4.1.4 Ensaio de fagocitose e produção de NO: PM-1 versus PM-2

Dentre as diversas formas de analisar a função de macrófagos, destaca-se o ensaio de fagocitose. Com o objetivo de avaliar a capacidade fagocítica de cada subpopulação de macrófagos, foi realizado um ensaio de fagocitose *in vivo*. Para

este ensaio, animais BALB/c foram infectados, por via i.p., com diferentes espécies (vivas ou mortas) de bactérias ou *zymosan*. Após 2h-3h, as células totais do peritônio foram retiradas, marcadas e analisadas conforme descrito no protocolo de microscopia confocal. A separação de células por FACS foi realizada seguindo a estratégia de *gating* (análise seqüencial por janelas desenhadas nos gráficos de FACS) mostrada na Fig. 1. As células PM-1 e PM-2 foram separadas diretamente sobre uma lamínula (placa de 24 poços) e, em seguida, a lamínula foi processada para avaliação da fagocitose através de microscopia confocal.

Surpreendentemente, embora não tenha sido realizada uma análise quantitativa (estatística) do índice fagocítico, pôde-se facilmente observar, por microscopia, que os fagócitos PM-2 internalizaram quantidade muito maior de bactérias/*zymosan in vivo* quando comparados aos PM-1 (PM-1: aproximadamente dois microorganismos por célula fagocítica; e PM-2: aproximadamente dez microorganismos por célula fagocítica – Fig. 5). Embora muito mais eficientes, apenas 40% do total de células PM-2 mostraram-se capazes de fagocitar microorganismos *in vivo*, enquanto que 100% das células PM-1 realizaram eficientemente a fagocitose. Por fim, foi possível notar que as células PM-2 aumentam a expressão da molécula CD62L apenas quando fagocitam as bactérias *in vivo* (Fig. 5).

Foi observado, ainda, grande aumento na porcentagem (e também em valores absolutos) de células PM-2 após infecção *in vivo* (Fig. 5). Como mostrado anteriormente, a população PM-2 representa aproximadamente 7% do total de macrófagos (PM-1 + PM-2) peritoneais de camundongos *naïve* e esta porcentagem sobe para mais de 30% quando o camundongo é desafiado com bactérias *gram* negativas por via i.p. (Fig. 5).

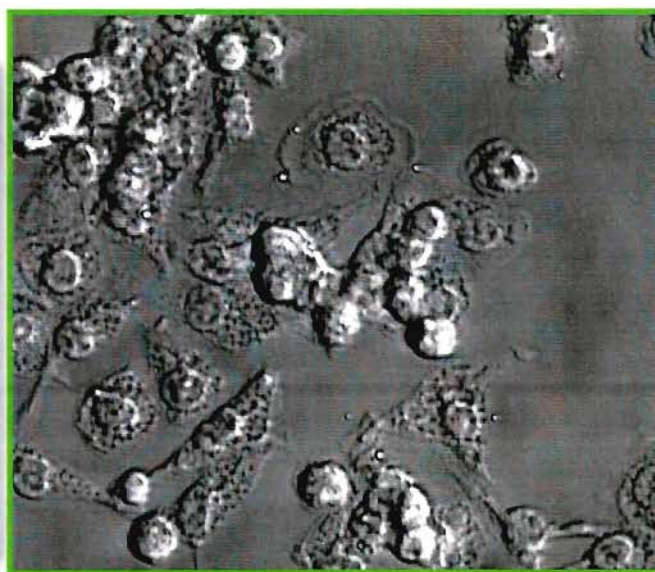
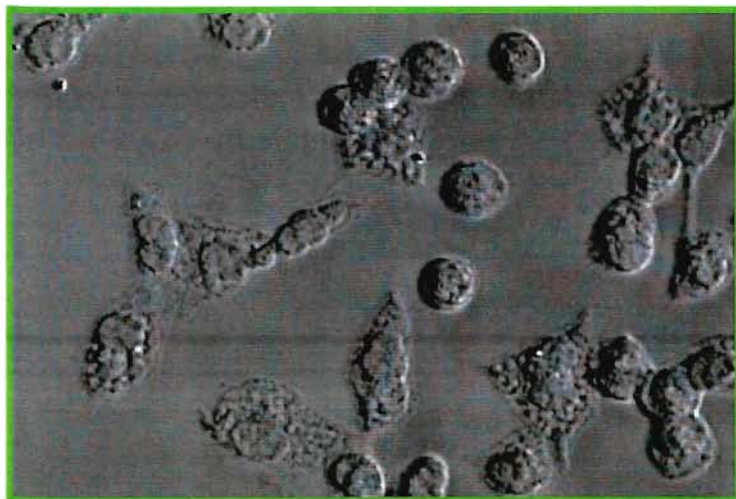
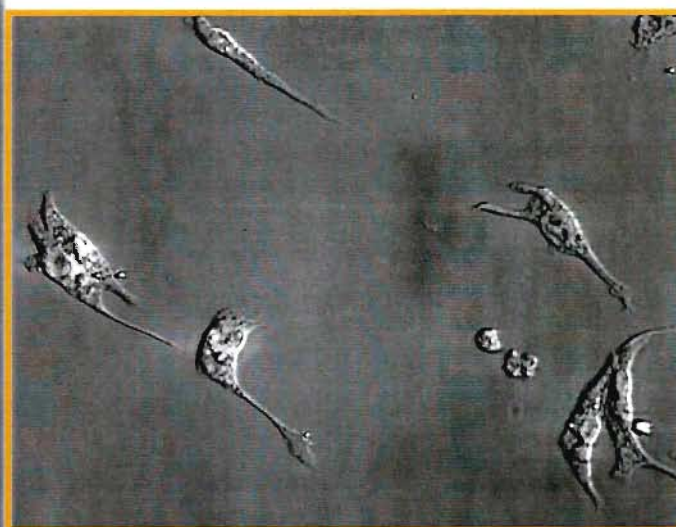
PM-1**PM-2**

Figura 4. Morfologia das células PM-1 e PM-2. As células totais de peritônio foram obtidas, marcadas e separadas por FACS conforme descrito em Metodologia. As células PM-1 e PM-2 foram separadas por FACS diretamente sobre laminulas e foram incubadas por 30min. Em seguida, as células foram fixadas e analisadas sob microscopia óptica, aumento de 640X.

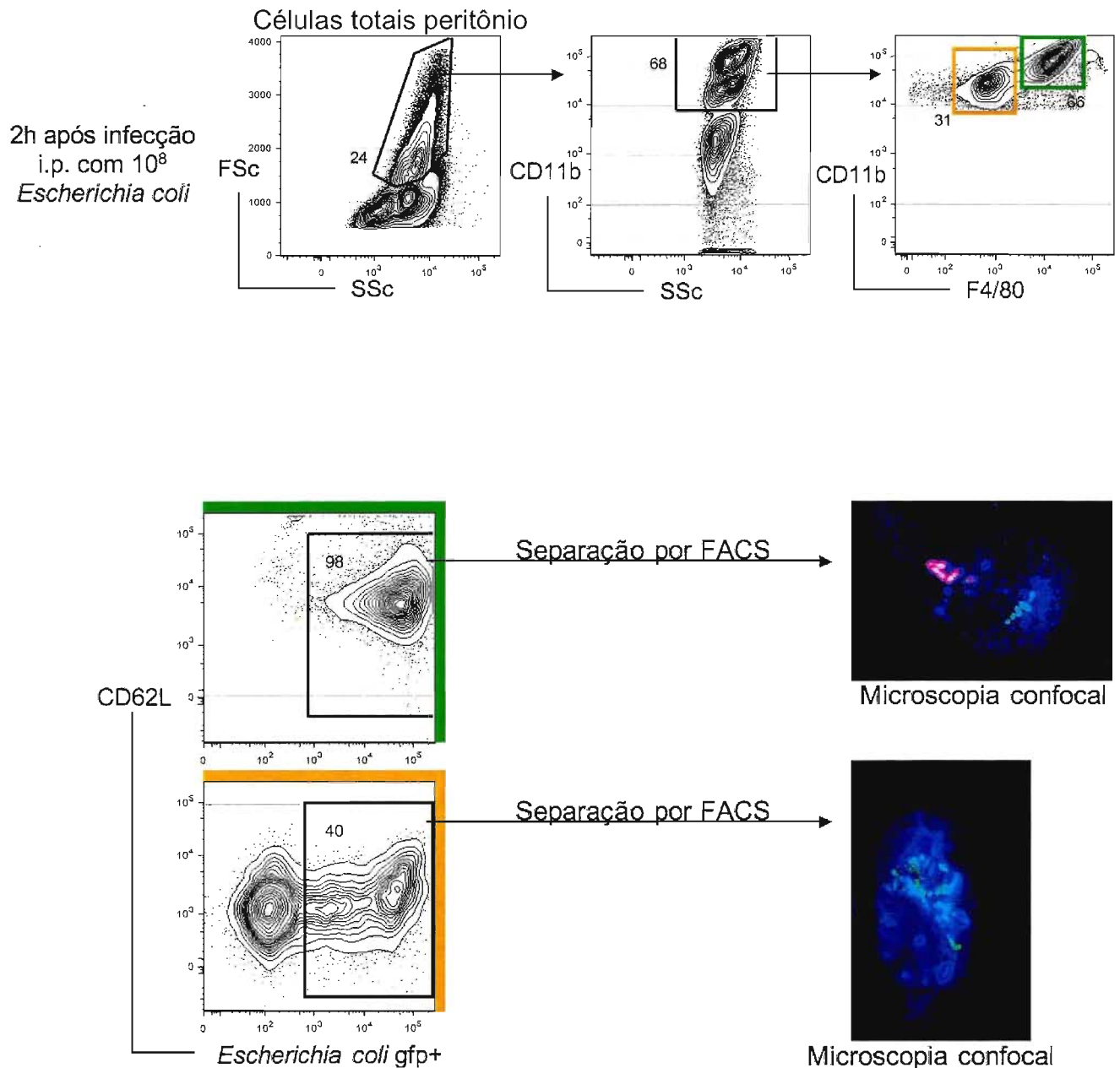
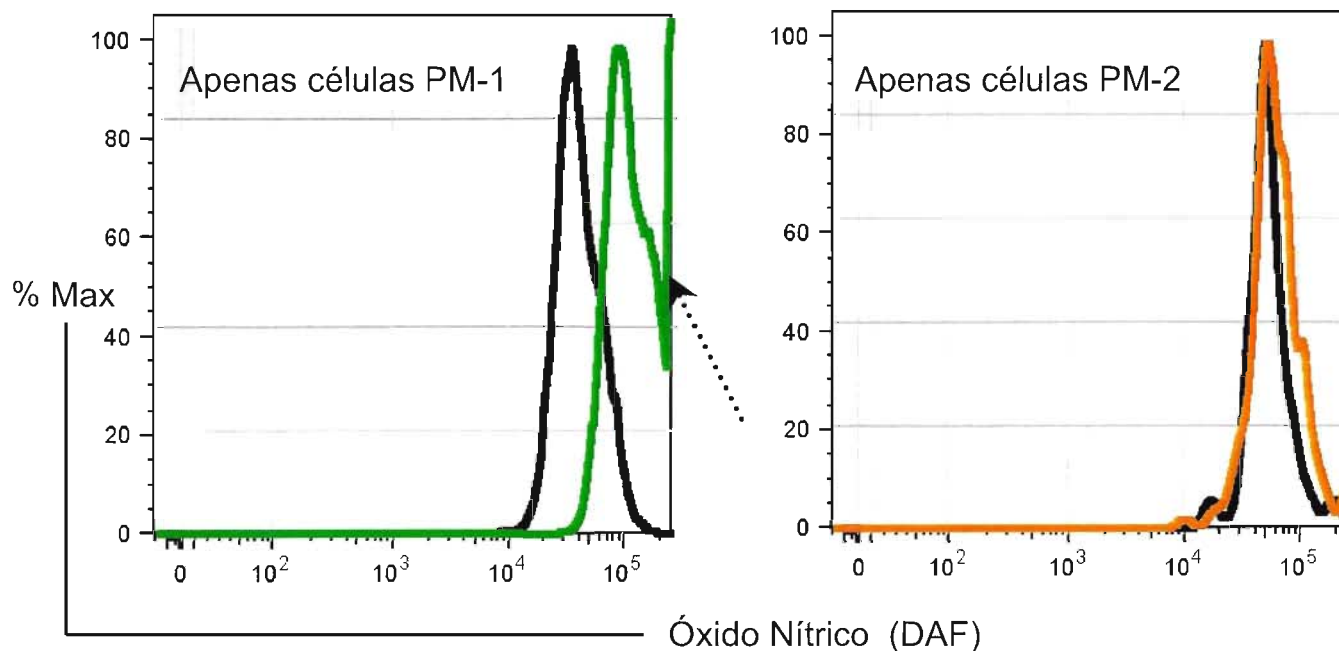


Figura 5. Ensaio de fagocitose *in vivo*. O ensaio de fagocitose *in vivo* foi realizado conforme descrito em Metodologia. As células que se apresentaram positivas para a bactéria (gfp^+) foram separadas por FACS e analisadas em microscopia confocal para determinar o índice de fagocitose. Nos gráficos de FACS: toda a coloração verde representa análise de células PM-1; a coloração alaranjada representa análise de células PM-2. O eixo das abscissas (*Escherichia coli*, gfp^+) representa as células que foram capazes de fagocitar. Apenas as células contidas na “janela” (*gate*) de cor preta, ou seja, positivas para gfp (98% para PM-1 e 40% para PM-2), foram separadas por FACS para análise em microscopia confocal. Na microscopia confocal: DAPI (marcação nuclear)= azul; bactérias fagocitadas (intracelulares)= verde; bactérias não fagocitadas (apenas aderidas à superfície da membrana)= tom avermelhado.

Um dos mecanismos microbicidas (e também prováveis sinalizadores moleculares) é a produção e secreção de óxido nítrico (NO). Para comparar a capacidade de produção e secreção de NO por PM-1 e PM-2, realizamos um ensaio *in vitro* com células totais de peritônio na presença de LPS (100ng/mL). Observamos que durante as seis primeiras horas de cultura não houve diferença na produção de NO, medida, em citometria de fluxo, pelo reagente DAF (ver Metodologia). No entanto, 24h após cultura, as células PM-1 produziram uma quantidade muito maior de NO quando comparada à quantidade produzida por células PM-2 (Fig. 6). Estes dados mostram claramente que, mediante estímulo inflamatório, as células PM-1 respondem em 24h com uma alta produção de NO.

Por fim, na análise por FACS, alguns linfócitos B-1 apresentaram-se positivos para a fagocitose de bactéria *in vivo* (Fig. 7). Para confirmar este resultado, e comprovar se estes linfócitos B-1 são realmente fagocíticos, foi realizada uma nova análise por microscopia confocal. Esta análise possibilita observar se as bactérias/*zymosan* encontram-se, de fato, dentro das células ou apenas aderidas à sua superfície (descrito em Metodologia). Observou-se que, diferente do que sugere os dados de citometria, os linfócitos B-1 não foram capazes de fagocitar. As bactérias associadas aos linfócitos B-1 encontravam-se apenas aderidas na superfície destas células e não internalizadas, como mostra a imagem em 3 dimensões na Fig. 7. Estes dados demonstram que, nas condições adotadas neste estudo, a população de macrófagos peritoneais é a única responsável pela fagocitose de bactérias/*zymosan in vivo* e que, ainda, estas células fagocíticas representam duas subpopulações que se diferem entre si pelo fenótipo, morfologia e função (os dados a seguir – item 4.5.2 – mostrarão diferenças funcionais mais concretas entre as células PM-1 e PM2).

Cultura *in vitro* por 24h

- Controle sem LPS
- PM-1 + LPS (100ng/mL)
- PM-2 + LPS (100ng/mL)

Figura 6. PM-1 secretam mais NO do que PM-2 após estímulo *in vitro*. 10^6 células totais de peritônio foram mantidas em tubos de 5mL de poliestireno num volume final de 1mL (RPMI-1640 + 10% SFB) sob temperatura de 37°C com 5% de CO₂ e 5% de O₂ por 24h, na presença ou ausência de LPS (100ng/mL). Em seguida, as células foram lavadas e marcadas com DAF, conforme descrito em Metodologia. Após a análise por citometria, as células PM-1 e PM-2 foram identificadas com o auxílio do software *Flowjo* e de acordo com a estratégia de *gating* mostrada na Figura 2. Ambas as células (PM-1 e PM-2) mostraram-se positivas para DAF, já que o controle FMO (não mostrado) obteve expressão muito menor do que a expressão mostrada nos gráficos acima. Dessa forma, este resultado sugere que ambas as células (PM-1 e PM-2) são capazes de produzir NO, todavia, PM-1 pode produzir níveis muito altos quando estimulados com LPS. A seta indica que a alta intensidade de produção de NO, pelas células PM-1, resultou em uma expressão que foi além dos valores limites de detecção e display do FACS.

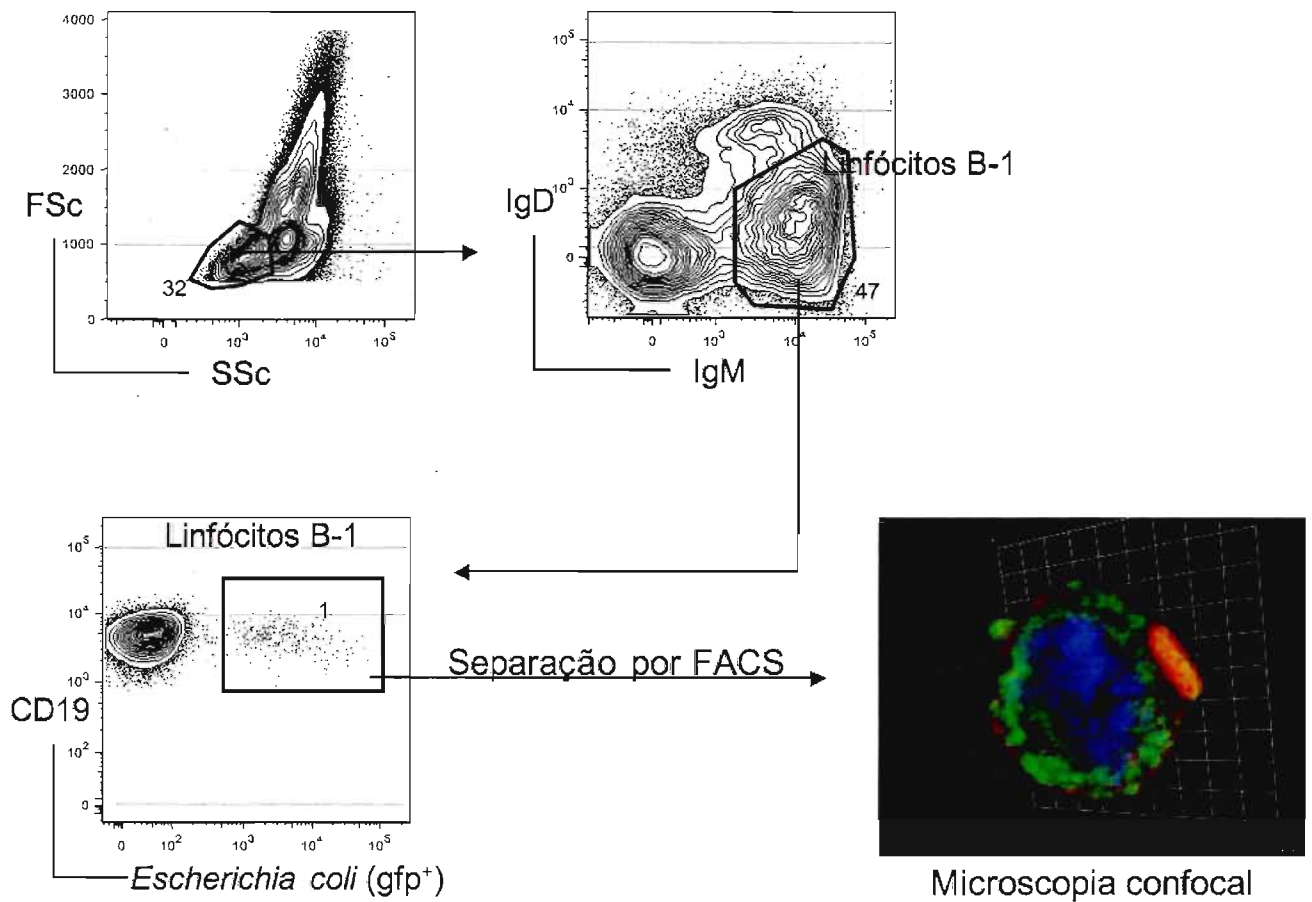


Figura 7. Os linfócitos B-1 peritoneais não foram capazes de fagocitar bactérias *in vivo*. O ensaio de fagocitose foi realizado seguindo o mesmo protocolo da Fig. 5 (conforme descrito em Metodologia). Os linfócitos B-1 foram identificados seguindo a estratégia de *gating* mostrada também na Fig.1B (IgM^{high} e IgD^{low}). As células B-1 que, na análise de FACS, mostraram-se positivas para gfp, foram separadas por FACS e analisadas por microscopia confocal. Microscopia confocal: DAPI= azul; LPS= verde; bactérias extracelular= coloração vermelho-alaranjado; IgM de superfície= linha avermelhada.

4.2 Doublets de linfócitos B-1 no peritônio

Linfócitos B-1 de tamanho grande e pequeno: fato ou artefato? Devido a existência de células com fenótipo B-1 que expressam FSc^{high} (células grandes) na análise de FACS, acredita-se que existam diferentes tamanhos de linfócitos B-1, além do já conhecido tamanho linfóide (FSc^{low}). Portanto, para elucidar estes dados, foi realizado um estudo mais criterioso da morfologia e do tamanho das células B-1 que abrigam a cavidade peritoneal.

Nas análises de peritônio de BALB/c foram encontradas altas porcentagens de células expressando marcadores de linfócitos B (CD19, IgM entre outros) localizados, pelo parâmetro de *scatter*, em FSc^{high} e SSc^{low} (células grandes e pouco granulosas). Através da análise fenotípica e da separação por FACS, observou-se que estas células B, ao invés de grandes, representam duas ou mais células B-1 aderidas entre si e, ainda, cada uma destas células possui um tamanho característico de linfócitos (Fig. 8A). Estas células duplas foram chamadas aqui de *doublets* para diferenciá-las das células individuais chamadas de *singlets*.

Diferente de BALB/c, a análise de células de peritônio de camundongos F1(BALB/cXCB.17) representa um ótimo modelo para estudar linfócitos B-1 aderidos entre si e ainda analisar linfócitos B-1 livres de macrófagos. Nestes animais, metade das suas células B-1 totais expressará exclusivamente um alótipo de IgM do genótipo "a" (IgM^a proveniente do BALB/c) e a outra metade expressará outro alótipo de IgM de genótipo "b" (IgM^b proveniente do CB.17), resultado de um processo conhecido como exclusão alélica. Conseqüentemente, num evento de probabilidades com duas variáveis (IgM^a versus IgM^b), metade das células B-1 *doublets* apresentar-se-á no gráfico de FACS como células duplamente positivas para ambos os fenótipos IgM^a e IgM^b (ou seja, um linfócito B-1 IgM^a aderido a outro linfócito B-1 IgM^b). A outra metade dos *doublets* deverá apresentar-se como positivas apenas para IgM^a (25% IgM^a aderido a outro IgM^a) ou IgM^b (25% IgM^b aderido a outro IgM^b).

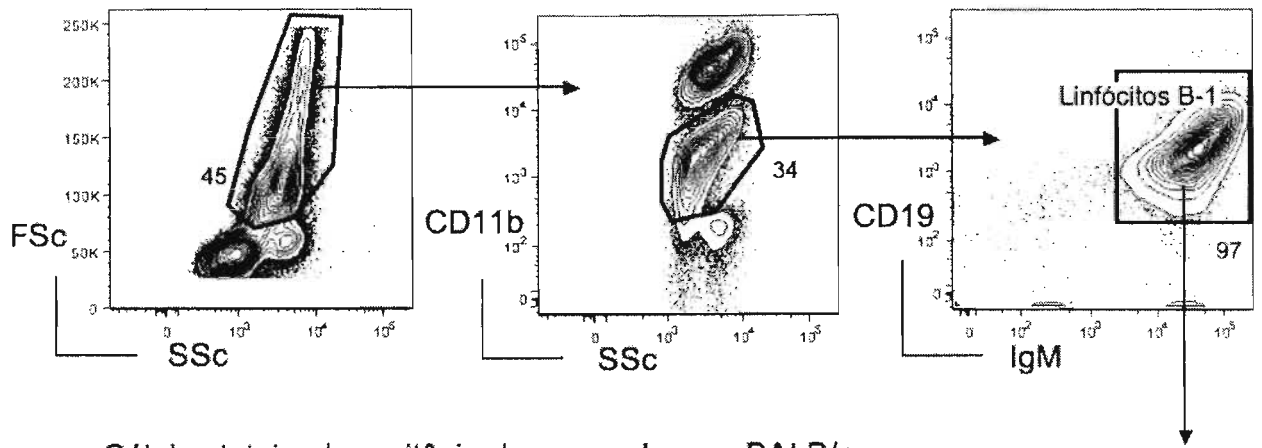
Consistente com os dados obtidos de células peritoneais de camundongos BALB/c (Fig. 8A), a análise de peritônio de camundongos F1 confirmou a presença de *doublets* de B-1 no peritônio (Fig. 8B). Todas as células B que expressavam FSc^{high} apresentaram-se com fenótipo de duas células B-1 aderidas uma a outra (IgM^a+IgM^b, IgM^a+IgM^a e IgM^b+IgM^b), conforme descrito no parágrafo acima. Para confirmação definitiva, foi realizada uma separação, por FACS, de *doublets* de B-1

provenientes de camundongos F1 e, em seguida, estas células foram analisadas por meio de microscopia confocal. A microscopia foi realizada com três cores diferentes: IgM^a foi marcada com FITC (verde), IgM^b marcada com PE (vermelho) e o núcleo celular foi identificado com solução DAPI (azul). Como se pode observar na Fig. 8C, as células B FSc^{high} certamente representam *doublets* de linfócitos B-1. Estes achados comprovam que todas as células B (CD19^{high}, IgM^{high}) presentes no perfil FSc^{high} representam *doublets* de linfócitos B-1 e, contradizendo a existência de B-1 grandes, cada célula pertencente ao *doublet* possui tamanho regular e característico de um linfócito B.

O fenótipo dessas células *doublets* foi comparado com os linfócitos B-1 *singlets* (B-1 FSc^{low}, que representa apenas uma célula) pela análise de diversos marcadores de superfície. Em geral, o fenótipo das células B-1 *doublets* reproduz fielmente o fenótipo encontrado com a soma de dois linfócitos B-1 *singlets*. Entretanto, foi encontrada diferença significativa na expressão da molécula CD11b. Os dados de citometria de fluxo claramente mostram que todas as *doublets* de linfócitos B-1 expressam CD11b (Fig.1C). Diferente das *doublets*, apenas metade dos linfócitos B-1 *singlets* (FSc^{low}) expressa essa molécula (resultados mostrados a seguir no item 4.4.1, Fig. 13). No entanto, os dados não revelam se apenas uma ou ambas as células que formam o *doublets* expressam a molécula CD11b, mas, pode-se afirmar que não existe formação de *doublets* entre duas células B-1 CD11b⁻.

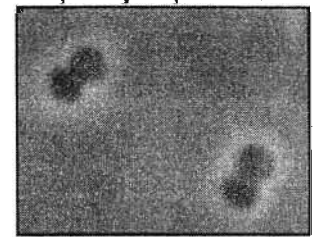
Certamente, o protocolo de obtenção e marcação de células do peritônio, o qual inclui centrifugação e utilização de anticorpos, permite a especulação de que a formação de *doublets* de B-1 representa, simplesmente, um artefato não fisiológico, resultado da manipulação das células *ex vivo*. Para responder esta questão, foi realizado, primeiramente, a obtenção de células totais de peritônio utilizando meio RPMI-1640 equilibrado em oxigênio fisiológico (oxigênio atmosférico equivalente a 20%; oxigênio fisiológico existe entre 2% a 5%). Em seguida, uma alíquota dessas células foi diretamente observada sob microscópio óptico e a outra parte foi diretamente analisada no FACS. Os processos usuais de centrifugação e marcação não foram realizados nessas células a fim de se evitar, ao máximo, qualquer perturbação não fisiológica. Em ambos os dados, de microscopia e FACS, foi possível observar linfócitos *doublets*.

A



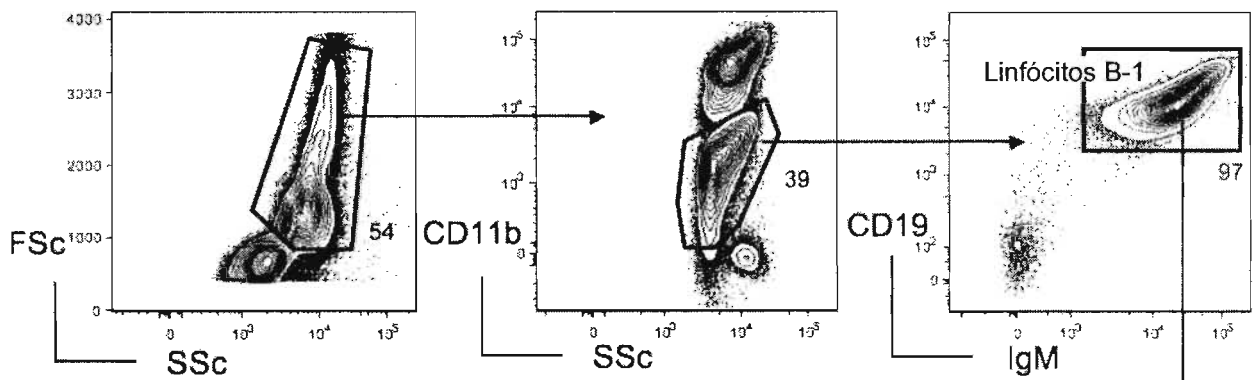
Células totais de peritônio de camundongos BALB/c

Separação por FACS

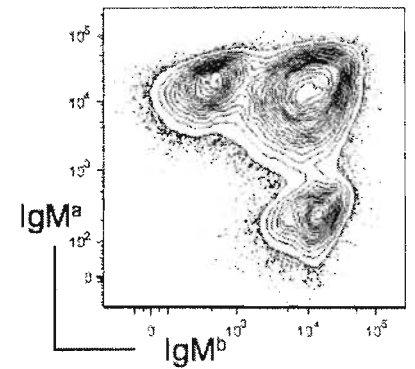


Microscopia óptica

B



Células totais de peritônio de camundongos F1(BALB/cXCB.17)



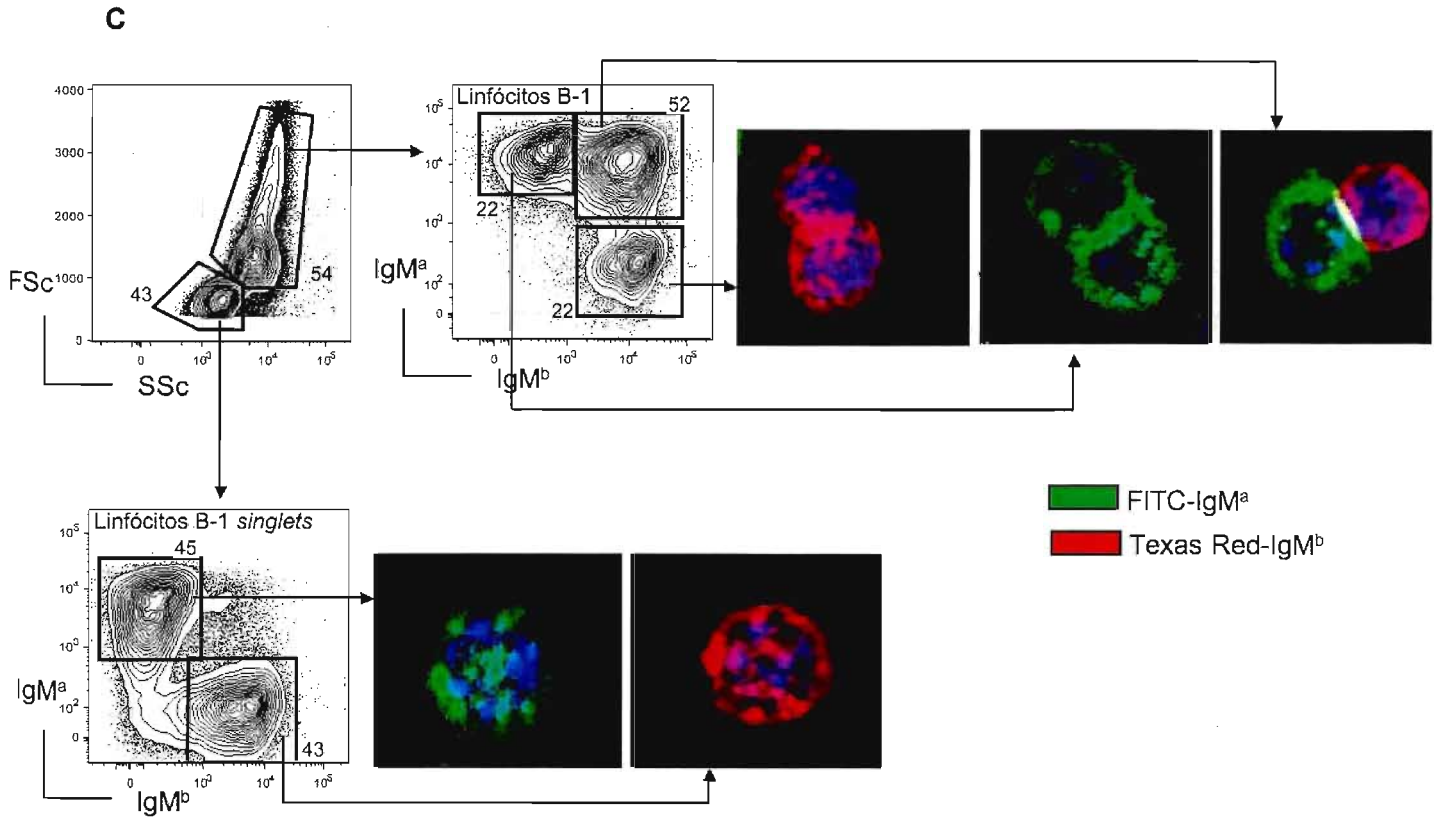


Figura 8. Doublets de linfócitos B-1 no peritônio. Células totais de peritônio de camundongos BALB/c ou F1(BALB/cxCB.17) foram obtidas, marcadas e analisadas conforme descrito em Metodologia. **A** – As células presentes na “janela dos leucócitos FSc^{high}” foram analisadas quanto à expressão de CD11b. As células CD11b⁺ (nível intermediário) que co-expressam CD19 e IgM foram separadas por FACS e analisadas em microscopia óptica (400X). **B** – As células FSc^{high} e SSc^{high} de peritônio de animais F1 foram analisadas quanto à expressão de CD11b. As células CD11b⁺ (nível intermediário) co-expressam CD19 e IgM e foram analisadas quanto à expressão do alelo IgM^a e IgM^b. **C** – As células com fenótipo de B-1 (mesma estratégia de *gating* utilizada no item B) presentes na “janela dos linfócitos” (FSc^{low}, SSc^{low}) e na “janela dos leucócitos FSc^{high}” (FSc^{high}, SSc^{high}) de camundongos F1 foram analisadas quanto à expressão dos alelos IgM^a e IgM^b. Cada fenótipo (IgM^a, IgM^b ou co-expressão de ambos IgM^a e IgM^b) foi separado por FACS e analisado por microscopia confocal, conforme descrito em Metodologia.

Embora esse método não permitisse saber qual o fenótipo destes linfócitos, os dados anteriores, de citometria e microscopia confocal, confirmam que apenas os linfócitos B-1 são capazes de formar *doublets* no peritônio. Estes achados sugerem que a formação de *doublets* no peritônio seja um processo fisiológico de linfócitos B-1, que ocorre *in vivo*.

Em uma análise mais pragmática, a formação constante de *doublets ex vivo* já representaria um fenômeno peculiar capaz de distorcer ou mascarar muitos dados de fenótipo e estatística em citometria de fluxo e, por isso, estas células devem, impreterivelmente, ser consideradas durante uma análise de FACS.

4.2.1 As células B-1 *singlets* (FSc^{low}) do peritônio são as precursoras das células B-1 *doublets* (FSc^{high})

Aproximadamente metade (valor absoluto) das células B-1 do peritônio apresenta-se em forma de *doublets* e essa frequência mantém-se relativamente constante durante a vida adulta do camundongo. Essa estabilidade na frequência de células *doublets versus singlets* sugere um mecanismo regulador, presente no peritônio, que orienta a formação ou separação de *doublets* de uma forma estreitamente controlada. Para confirmar esta hipótese, foi realizado um experimento para se verificar se as células *doublets* do peritônio são formadas pela junção direta de duas células *singlets*, as quais seriam as precursoras e estariam presentes nesse mesmo microambiente peritoneal.

Para isso, as células *singlets* (células contidas na “janela dos linfócitos” FSc^{low} e SSc^{low}) foram separadas por FACS e, para eliminar qualquer contaminação de células *doublets*, eventualmente presentes na “janela dos linfócitos”, excluiu-se da separação toda população que encontrava-se fora da diagonal formada pela análise entre FSc-Height versus FSc-Area (Fig. 9A). As células que não expressaram Height (H – altura do pico da curva de fluorescência lida pelo FACS) e Area (A – área total desta curva de fluorescência) de uma forma diretamente proporcional, foram potencialmente consideradas *doublets*. Esse método de identificação de *doublets* mostra-se muito eficaz (embora não seja suficiente para eliminar todos os *doublets* presentes na amostra) e é usado na rotina de análise de dados de citometria pelos usuários do SSFC da *Stanford University*.

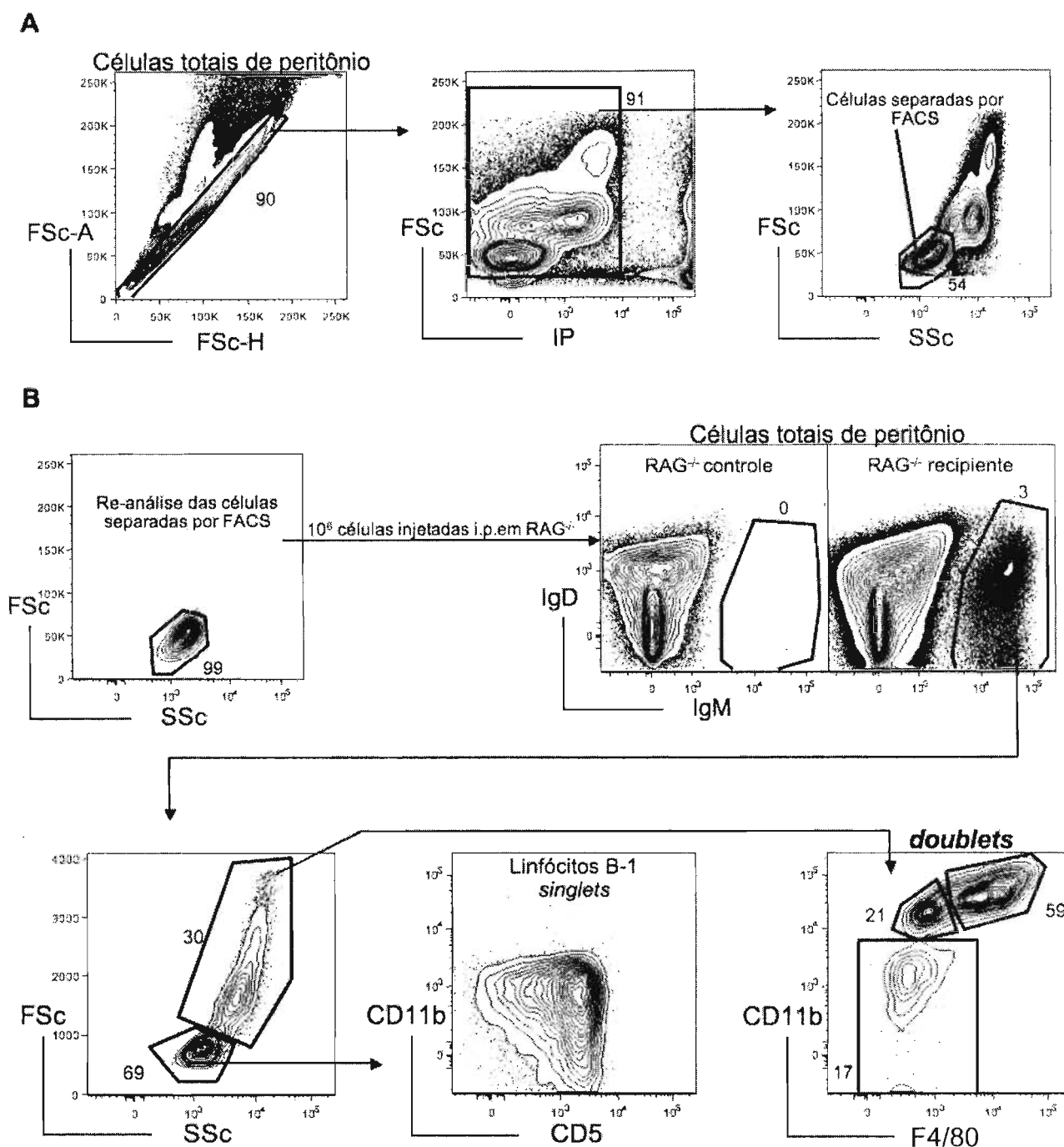


Figura 9. As células B-1 *singlets* do peritônio são as precursoras das células B-1 *doublets*. As células linfóides (FSc^{low}, SSc^{low}) de peritônio de BALB/c, que representam linfócitos *singlets*, foram separadas por FACS conforme descrito em Metodologia. A estratégia de *gating* utilizada para identificar e separar os linfócitos *singlets* está demonstrada no item A desta figura. B – A reanálise da separação de linfócitos *singlets* está demonstrada no primeiro gráfico. Em seguida, as células separadas (10⁶) foram injetadas i.p. em camundongos RAG^{-/-}. Os linfócitos B-1 (identificados como IgM^{high} e IgD^{low}), presentes nos camundongos RAG^{-/-} recipientes, foram analisados quanto à presença de células *doublets* (FSc^{high}).

Após o processo de separação, as células *singlets* foram transferidas por via i.p. para camundongos RAG^{-/-} (deficientes de linfócitos). Depois de três ou dez dias de transferência, as células totais da cavidade peritoneal dos camundongos recipientes foram retiradas e analisadas por FACS seguindo o protocolo descrito em Metodologia.

As células B-1 *singlets*, após transferência, foram capazes de reconstituir o peritônio dos camundongos RAG^{-/-} e apresentar frequência de linfócitos B-1 *singlets* e *doublets* muito semelhante à encontrada nos animais congênicos (Fig. 9B). Este dado demonstra que linfócitos B-1 *doublets* são formados pelas células B-1 *singlets* que co-habitam o peritônio. Entretanto, o mecanismo que determina quando e como as células *singlets* irão juntar-se para formar *doublets*, e vice-versa, ainda não é conhecido.

4.2.2 Linfócitos B-1 *doublets*: novos personagens de uma sinapse imunológica?

Diferente das células T, as células B que participam de uma sinapse imunológica, geralmente, não rearranjam sua estrutura citoplasmática de forma *sui generis*. Mais ainda, o fenômeno da sinapse T-B descrito na literatura é, geralmente, atribuído a linfócitos B-2 e, portanto, não existem dados sobre o comportamento de linfócitos B-1 durante sua eventual participação numa sinapse intercelular.

Para analisar o comportamento organizacional das estruturas citoplasmáticas e de membrana de células B-1 durante a formação de *doublets*, foi realizada, inicialmente, uma análise destas células em microscopia eletrônica. Surpreendentemente, estes linfócitos B-1 parecem estar intimamente aderidos pela interação de suas membranas citoplasmáticas (Fig. 10). Existem ainda os chamados *gaps* (ou espaços abertos entre as duas células), presentes ao longo da região de ligação entre as membranas, nos quais, geralmente, são secretadas citocinas e outras moléculas fundamentais no processo de sinapse imunológica. Observou-se, ainda, que a membrana citoplasmática da células B-1 é capaz de realizar um tímido, porém nítido, pseudópode (ou prolongamento de membrana), o qual permite sua melhor aderência na outra célula B-1.

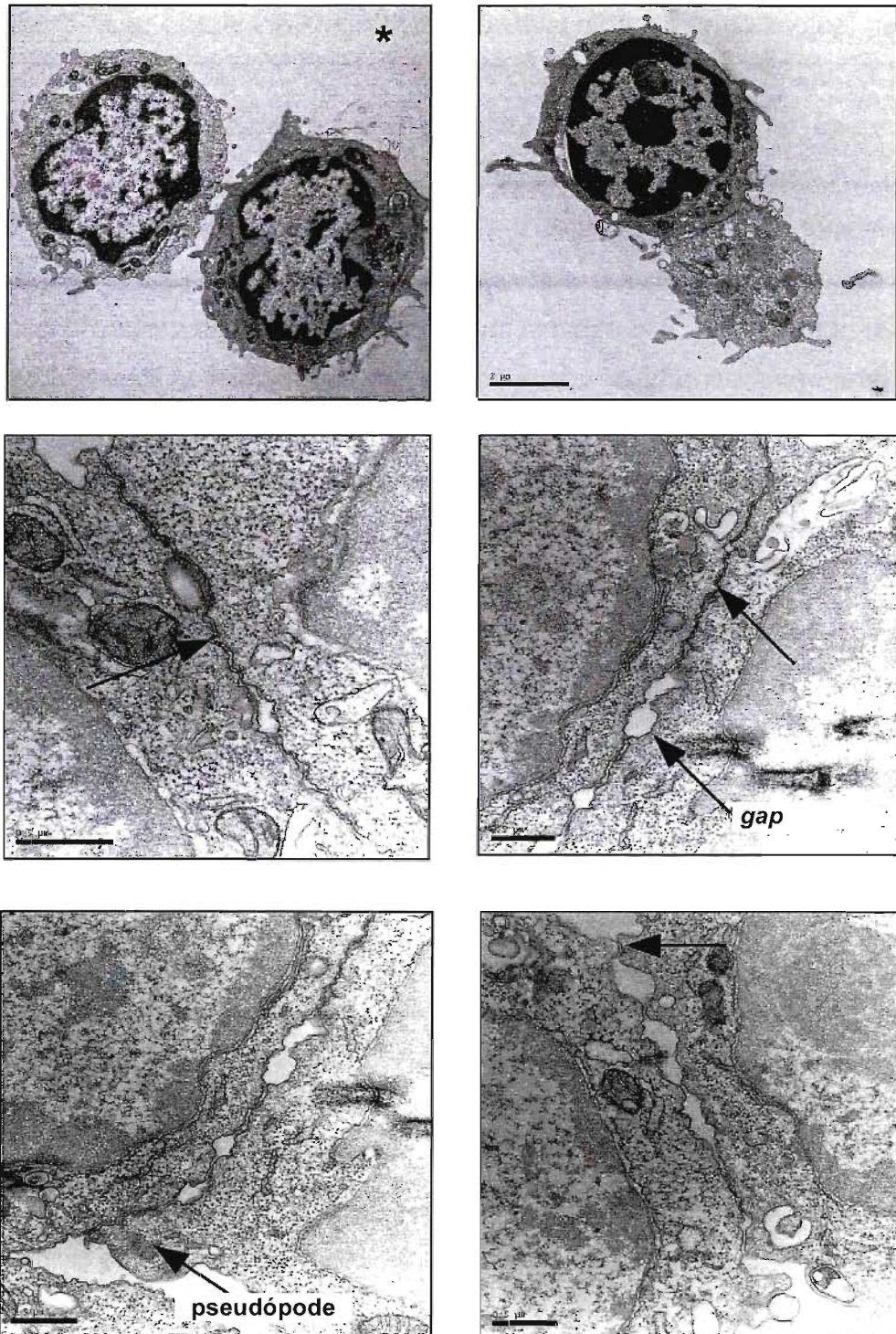


Figura 10. Microscopia eletrônica de linfócitos B-1 *doublets*. Os linfócitos B-1 *doublets* foram identificados seguindo a estratégia de *gating* mostrada na Fig. 8. Estas células de camundongos BALB/c ou F1 foram separadas por FACS conforme descrito em Metodologia. As células B-1 *doublets*, separadas por FACS, foram preparadas para análise em microscopia eletrônica seguindo o protocolo descrito em Metodologia. Resumidamente, os blocos de células foram cortados numa espessura de 85nm e corados com citrato de chumbo por 3-4 minutos. A leitura foi realizada em microscopia eletrônica de transmissão no aparelho JEOL 1230. As setas indicam o local de adesão (sinapse) entre as duas células B-1, além de apontarem para um possível *gap* e pseudópode. * (primeira figura) imagem de células B-1 *singlets*; as restantes representam imagens de células B-1 *doublets*.

Embora essa aderência sugira uma possível sinapse imunológica, ainda não se sabe se esta íntima ligação entre duas células B-1 resulta em alguma ativação intracelular, principalmente de cascatas de fosfoquinases. Entretanto, imagens mais recentes obtidas pela microscopia eletrônica revelaram que as células B-1 parecem concentrar e polarizar suas mitocôndrias para a região da sinapse, indicando uma ativação. Estas imagens de microscopia eletrônica, que revelam a polarização de mitocôndrias citoplasmáticas durante a possível sinapse B-B, estão sendo realizadas na *Stanford University* por meio de uma colaboração e ainda não estão prontas para serem incluídas nesta tese (comunicação pessoal com Takeshi Fukuhara, Ph.D., laboratório do professor Dr. Tony Wyss-Coray, Stanford University/EUA).

Todavia, essa aderência não é dependente de cálcio e nem requer gasto de energia, já que o uso de EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) e azida de sódio não foi suficiente para separar ou impedir a formação de *doublets* (dados não mostrados). Ainda, o processo de separação de células por FACS geralmente impõe uma pressão física suficiente para separar células que estão levemente aderidas. Entretanto, a aderência entre as células B-1 não é perturbada pelo processo de separação por FACS. Em conjunto, estes resultados sugerem que as células *doublets* sejam formadas por meio de uma ligação estável e resistente.

4.2.3 Macrófagos peritoneais também formam *doublets* com linfócitos B-1

Os macrófagos representam, aproximadamente, 30% do total de células da cavidade peritoneal de camundongos adultos (valor calculado com base nos dados apresentados na Fig.1). Neste trabalho, mostrou-se que os macrófagos peritoneais são células heterogêneas, sendo que dois subtipos foram descritos aqui, de acordo com seus perfis de co-expressão das moléculas CD11b e F4/80: CD11b^{high}, F4/80^{high} (PM-1) e CD11b⁺, F4/80^{low} (PM-2). No entanto, pouco se sabe a respeito da interação destes macrófagos com os demais linfócitos que co-habitam o peritônio.

Por meio de uma minuciosa investigação dos dados de citometria de fluxo, observou-se que muitos destes macrófagos peritoneais expressam marcadores de linfócitos B-1. Seguindo a estratégia de análise (*gating*) mostrada na Fig. 11, pode-se observar que aproximadamente 33% das células PM-2 expressam IgM^{high} (marcador de linfócitos B-1 peritoneais). Diferentemente das células PM-2, apenas 7% das células PM-1 expressam IgM.

Sabe-se que as medidas de FSc (tamanho) e SSc (granulosidade) do FACS são diferentes entre os linfócitos B-1 e os macrófagos, já que estes últimos são mais conhecidos por serem uma célula maior e mais granulosa do que os linfócitos. Dessa forma, ficou evidente que os dados obtidos pela citometria não se tratavam simplesmente da expressão típica de um linfócito B-1, já que as células também co-expressavam fenótipos característicos de macrófagos: CD11b, F4/80, FSc^{high} e SSc^{high} (Fig.12).

Para compreender melhor este novo fenótipo celular, estas células “bifenóticas” foram separadas por FACS e analisadas sob microscopia óptica. Surpreendentemente, todas as células “bifenóticas” representavam macrófagos aderidos aos linfócito B-1, formando *doublets* (Fig. 11). Conseqüentemente, concluiu-se que 33% de todos os macrófagos PM-2 e 7% do total de macrófagos PM-1, do peritônio, estão intimamente aderidos a um linfócito B-1 e essa freqüência de *doublets* foi semelhante entre todos os animais analisados.

Como mostrado, um terço dos macrófagos PM-2 adere a uma B-1, enquanto que os macrófagos PM-1 parecem não possuir essa mesma afinidade pelos linfócitos. Porém, vale ressaltar que os macrófagos PM-2 representam apenas, aproximadamente, 10% do total de macrófagos peritoneais (90% são macrófagos PM-1). Conseqüentemente, considerando os valores absolutos, os linfócitos B-1 aderem-se a números equivalentes de macrófagos PM-1 e PM-2. Se for considerado um peritônio com $1,5 \times 10^6$ macrófagos totais, pode-se concluir que aproximadamente $0,5-1 \times 10^5$ representarão *doublets* de linfócitos B-1 com PM-1 e este mesmo número de *doublets* com PM-2. Estes valores foram calculados considerando um peritônio com 5×10^6 células totais, seguindo-se a estratégia de *gating* (para determinar macrófagos) e os valores de porcentagens mostrados nas Fig.1, 2 e 11.

Finalmente, estes estudos introduzem um novo protocolo (algoritmo) para análise de células FSc^{high} e conclui que existe, co-habitando no peritônio, pelo menos três formas de *doublets* de linfócitos B-1: aproximadamente metade dos linfócitos B-1 formam *doublets* entre si (B-1+B-1); ~30% dos macrófagos PM-2 formam *doublets* com linfócito B-1 (PM-2+B-1) e ~5% dos macrófagos PM-1 formam *doublets* com linfócito B-1 (PM-1+B-1).

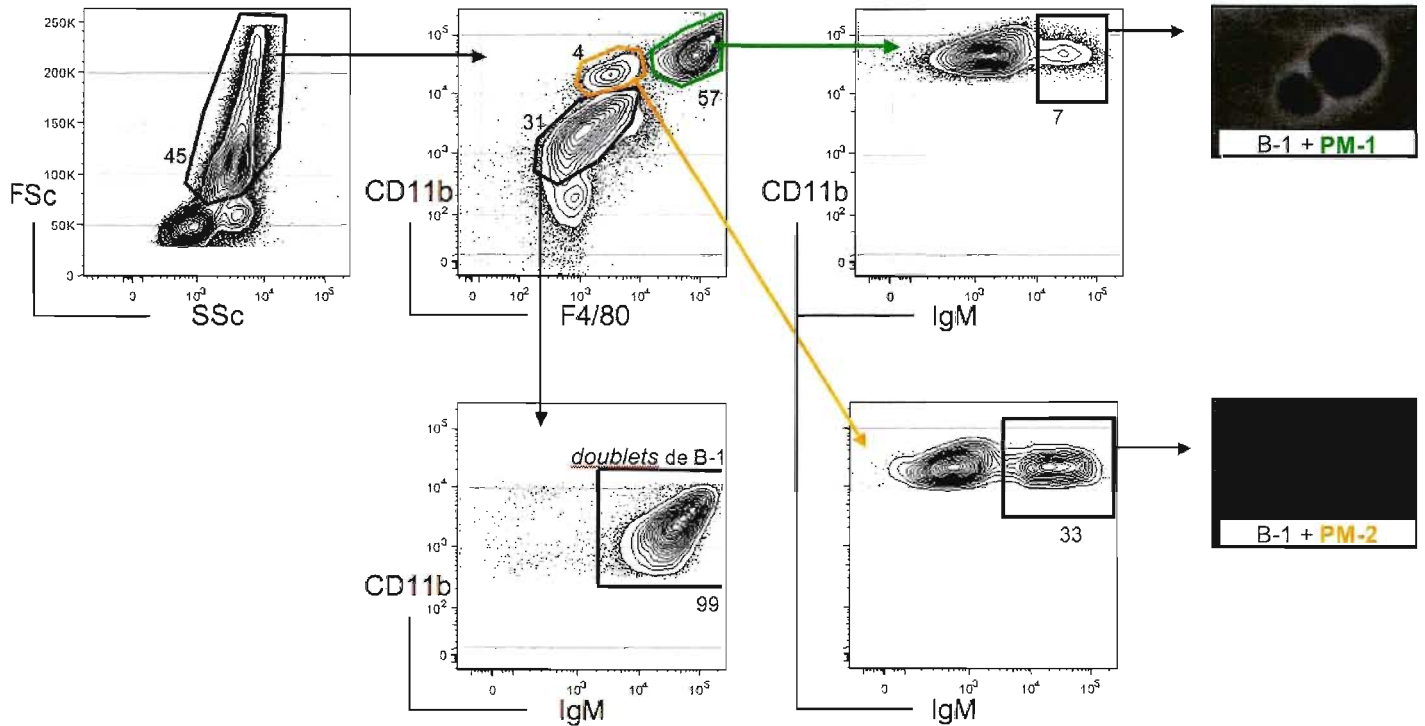


Figura 11. Macrófagos peritoneais também formam *doublets* com linfócitos B-1. Células totais de peritônio de BALB/c foram retiradas e marcadas conforme descrito em Metodologia. As células “não-linfóides” (“janela dos leucócitos FSc^{high}”) foram analisadas quanto as suas expressões de CD11b e F4/80. As populações identificadas como PM-1 (verde) e PM-2 (laranja) foram analisadas quanto a expressão de marcador de célula B (IgM). As células, contidas na “janela” de PM-1 e PM-2, que expressaram IgM de superfície foram separadas por FACS e analisadas em microscopia óptica (400X).

4.3 Granulócitos (SSc^{high})

Existe, ainda, no peritônio, baseado no perfil de expressão de *light scatter* (tamanho e granulosidade), uma terceira população: FSc^{low} e SSc^{high} , ou seja, células pequenas e muito granulosas (Fig. 12A). Sua porcentagem varia de 5%-10% do total de células da cavidade peritoneal de BALB/c e essa frequência pode aumentar em animais mantidos em condições “precárias” de higiene. Embora estas células sejam incapazes de apresentar antígenos via classe II do MHC ($MHC-II^{-}$, Fig. 12A), foi detectada a expressão de níveis intermediários de marcadores expressos em macrófagos como CD11b (expressão maior que em linfócitos B-1 e menor que em PM) e F4/80 (nível de expressão intermediária, com valor de fluorescência abaixo do macrófago PM-1 e acima do PM-2).

Em consonância com a literatura, estas células representam eosinófilos peritoneais^{120,121}. Eosinófilos peritoneais são células que se apresentam, nos gráficos de FACS, muito granulosas e expressam níveis intermediários de CD11b, F4/80 e Gr-1, além de não apresentarem a molécula MHC-II: SSc^{high} , $CD11b^{int}$, $F4/80^{low}$, $Gr-1^{low}$ e $MHC-II^{-}$ (Fig. 12A). Vale ressaltar que a quantidade de eosinófilos aumenta significativamente no peritônio dos camundongos após infecção i.p. ou estímulo com LPS. Ainda, o cruzamento entre camundongos BALB/c e CB.17 resulta numa prole (F1) completamente ausente de eosinófilos no peritônio (dados não mostrados).

Os eosinófilos diferenciam-se de neutrófilos pela expressão de F4/80 e Gr-1, ou seja, neutrófilos não expressam F4/80, porém expressam altas quantidades da molécula Gr-1: $F4/80^{-}$, $Gr-1^{high}$, $CD11b^{int}$, $MHC-II^{-}$ (Fig. 12B). Já os basófilos e mastócitos, além de altamente granulosos e com baixa expressão de Gr-1, expressam altas quantidades da molécula CD117 (c-kit, receptor de citocina) e são caracterizados da seguinte forma: SSc^{high} , FSc^{high} , $c-kit^{high}$, $CD11b^{-}$, $F4/80^{-}$, $Gr-1^{low}$ e $MHC-II^{-}$ (Fig. 12B).

Em suma, nossos dados mostram que o peritônio pode abrigar todos os subtipos conhecidos de granulócitos. Embora seja fundamental compreender a função e a participação destas células para a já complexa economia do peritônio, estas populações de granulócitos não serão exploradas nesta tese.

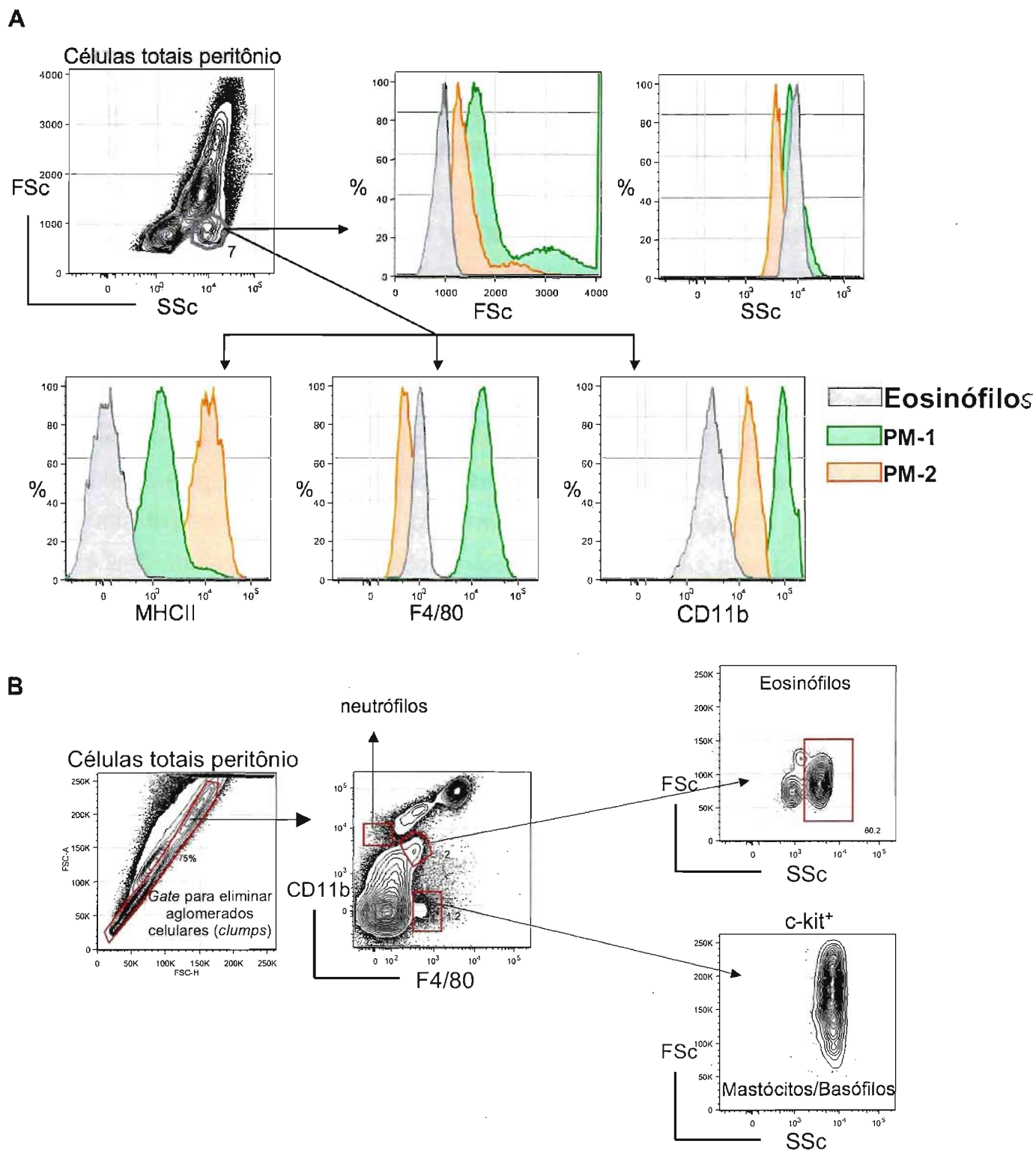


Figura 12. Granulócitos no peritônio: eosinófilos também co-expressam F4/80 e CD11b. As células totais de peritônio de BALB/c foram obtidas, marcadas e analisadas conforme descrito em Metodologia. **A** – As células (eosinófilos, ~7%) que expressam FSc^{low} e SSc^{high} (cor cinza) foram analisadas separadamente e seus níveis de expressão de MHC-II, F4/80 e CD11b foram comparados com os macrófagos PM-1 (verde) e PM-2 (laranja). **B** – Um panorama dos subtipos de granulócitos presentes no peritônio: Eosinófilos co-expressam F4/80 e CD11b e são muito granulosas (SSc^{high}); Os mastócitos/basófilos expressam F4/80, são muito granulosas, grandes e expressam c-kit, mas não expressam CD11b; Os neutrófilos são parecidos com os eosinófilos, porém não expressam níveis detectáveis de F4/80.

4.4 “Janela dos linfócitos”: FSc^{low} e SSc^{low}

Cada lavado de cavidade peritoneal contém, em média, um valor absoluto de 5×10^6 células (contagem por hemocítômetro). Do total de células peritoneais foi observado que, aproximadamente, 50% representam células linfóides, ou seja, células com baixos níveis de expressão de dispersão de luz (*light scatter*): FSc^{low} e SSc^{low} . Todas as células que se apresentaram positivas para IP (células mortas) foram excluídas da análise (Fig. 1A). Os subtipos celulares, presentes dentro deste “gate dos linfócitos”, foram identificados através da análise das suas expressões de diferentes moléculas de superfície. A análise foi realizada seguindo a estratégia de *gating* representada na Fig. 1B.

Utilizando, inicialmente, marcadores para detecção de CD19 e CD5 de superfície, foram identificadas pelo menos três diferentes populações (subtipos) celulares (Fig. 1B, primeiro gráfico). As células B totais foram identificadas através da alta expressão de CD19 e, conforme esperado, representam a maioria (~82%) dos linfócitos peritoneais, seguidos pelos linfócitos T (~8%), que, por sua vez, foram identificados pela alta expressão de CD5 e ausência de CD19 (Fig. 1B, primeiro gráfico). Entretanto, as células B peritoneais são heterogêneas, logo, utilizando marcadores apropriados (IgD versus IgM), foi possível identificar 3 subtipos: a maioria (>83%) representa linfócitos B-1, aproximadamente 10% são B-2 e o restante (~3%) representa linfócitos B que não expressam IgD nem IgM de superfície, ou seja, realizaram uma troca (*switching*) de classe de imunoglobulina (provavelmente após algum estímulo endógeno) (Fig. 1B, segundo gráfico). Entre os linfócitos B-1 identificados, aproximadamente 72% expressam a molécula CD5 e, portanto, são considerados B-1a. A outra população desprovida de CD5 (26%) é considerada linfócitos B-1b (Fig. 1B, terceiro gráfico).

Além dos linfócitos B e T, existe ainda uma terceira população de células, dentro do *gate* dos linfócitos, que se apresenta duplo-negativa para $CD19^-$ e $CD5^-$ (~9% Fig. 1B, primeiro gráfico). Esta população é muito heterogênea e expressa níveis variados de MHC-II e CD11b (Fig. 1B, último gráfico). Surpreendentemente, parte desta população, classicamente considerada linfóide (FSc^{low} e SSc^{low}), co-expressa níveis intermediários de CD11b e MHC-II, sugerindo o fenótipo de uma célula apresentadora de antígeno (Fig. 1B, último gráfico). Este dado não foi especulado neste trabalho, mas, certamente, merece ser analisado. Por agora, a

existência destas células serve, ao menos, para comprovar a complexidade celular que habita a cavidade peritoneal.

Em suma, a cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, não estimulados, abriga diversas populações de células linfóides, entre elas: linfócitos B-1a (~50%), linfócitos B-1b (~19%), linfócitos B-2 (~10%), linfócitos B *switched* (~3%), linfócitos T (~8%); e o restante (~10%) representa uma população muito heterogênea de células que expressam níveis variados de CD11b e MHC-II, não identificáveis até o momento (Fig. 1B, último gráfico). Para que seja possível a caracterização definitiva destas células, outras metodologias de análise ou variedade maior de marcadores fenotípicos devem ser utilizadas. A proporção das diferentes populações de linfócitos encontradas no peritônio manteve-se relativamente constante entre os vários camundongos analisados.

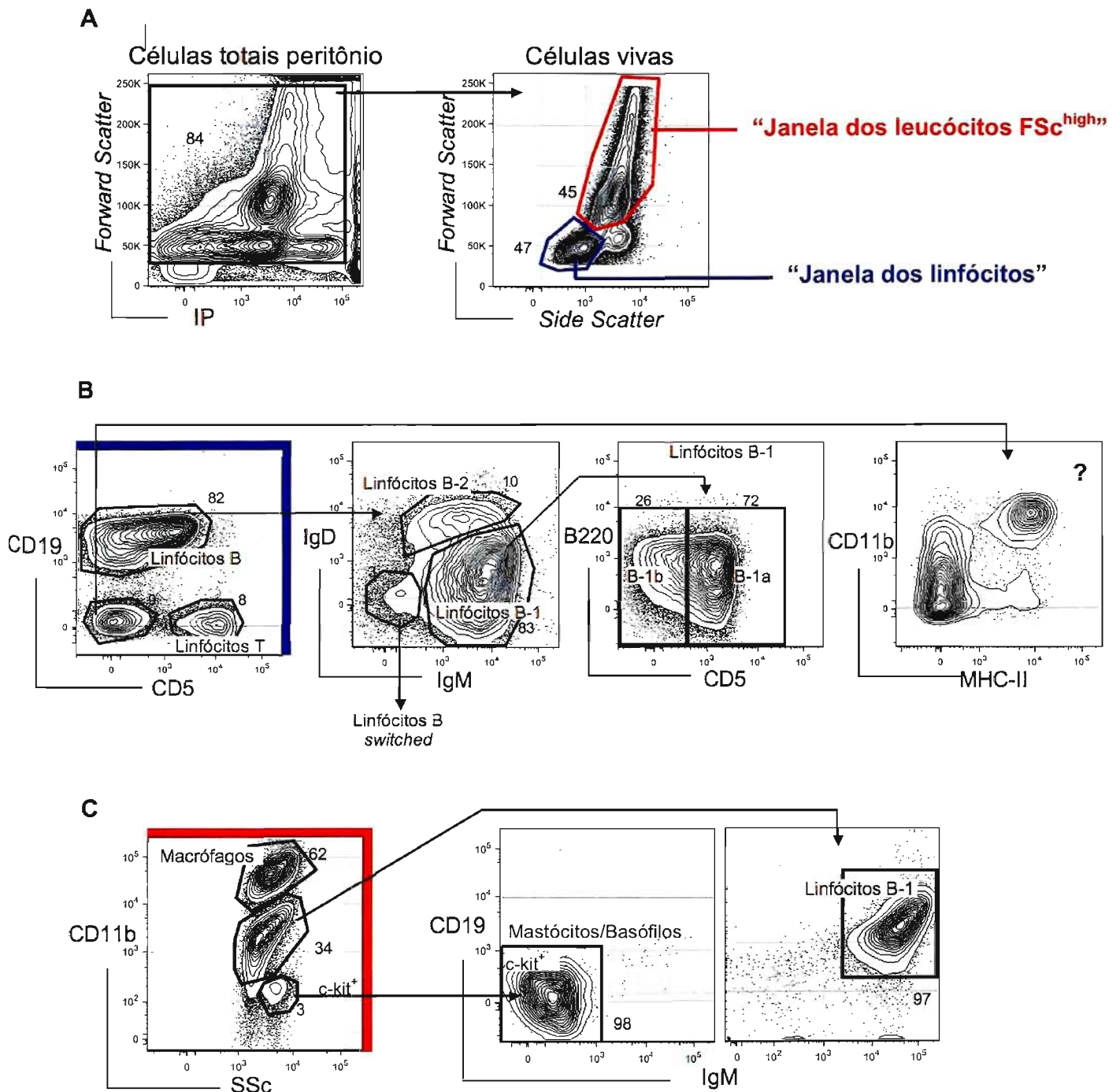


Figura 1. Descrição dos subtipos de células presentes na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c não estimulados: utilização de Hi-D FACS para análise simultânea de 13 parâmetros. Células totais da cavidade peritoneal de BALB/c adulto foram retiradas, marcadas (11 cores) e analisadas conforme descrito em Metodologia. Após a leitura por FACS, os dados foram analisados pelo software *Flowjo* e a estratégia de *gating*, para determinar os subtipos celulares, está descrita nos itens **A** (células totais de peritônio; iodeto de propídio (IP) foi utilizado para marcar células mortas), **B** (apenas análise de células linfóides FSc^{low} e SSc^{low} do peritônio, identificadas em azul no item A) e **C** (análise dos leucócitos restantes – “não-linfóides” – FSc^{high} e SSc^{high} do peritônio, identificados em vermelho no item A).

4.4.1 A expressão de CD11b distingue subtipos de linfócitos B-1 no peritônio

Diferentemente dos dados presentes na literatura atual, foi demonstrado que apenas metade dos linfócitos B-1 da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c adultos expressam CD11b na superfície (Fig. 13A). As células B-1 foram identificadas pela estratégia de *gating* seqüencial, partindo de linfócitos vivos que expressam IgM^{high} e IgD^{low}. Os linfócitos B-1, com expressão de CD11b acima do limiar estabelecido pelo controle de FMO (descrito em Metodologia), foram considerados positivos para a expressão de CD11b (Fig. 13A).

O nível de expressão de CD11b mostrou-se similar em ambas as células B-1a (CD5⁺) e B-1b (CD5⁻) e, aproximadamente, 40 vezes menor do que a expressão em macrófagos (Fig. 1C e 13B). Esse padrão variável de expressão de CD11b nas células do peritônio permite clara distinção entre células B-1 (CD11b^{low}) e macrófagos (CD11b^{high}). Entretanto, as células CD11b⁻ do peritônio representam uma população mista, que contém linfócitos B-1 (CD11b⁻), linfócitos B-2 e linfócitos T (Fig. 13B).

4.4.2 Linfócitos B-1 CD11b⁺ e CD11b⁻ possuem fenótipos distintos

Essas duas subpopulações de linfócitos B-1 expressam níveis distintos de uma variedade de marcadores detectados por citometria de fluxo. Notadamente, células B-1 CD11b⁺ expressam mais IgM e menos IgD de superfície quando comparadas com células B-1 CD11b⁻. Ainda, as análises de *Forward* e *Side Scatter* mostram que as células CD11b⁺ são maiores e mais granulosas que as células CD11b⁻.

Consistentes com as diferenças fenotípicas, os resultados a seguir mostram que estas duas subpopulações de linfócitos representam diferentes estágios de desenvolvimento (seqüencial) de células B-1 no peritônio. Neste modelo, as células B-1 CD11b⁻ representam células mais jovens, menos diferenciadas, que surgem ontogenicamente antes e são progenitoras das células B-1 mais diferenciadas, as quais expressam CD11b. Essas diferenças fenotípicas (associadas a diferenças menos dramáticas mostradas na Tabela 1), sugerem que o desenvolvimento de linfócitos B-1 do estágio CD11b⁻ para CD11b⁺ é acompanhado de alterações significativas na expressão gênica. Até o momento, a expressão de CD11b representa o melhor marcador para diferenciar estes dois subtipos de linfócitos B-1.

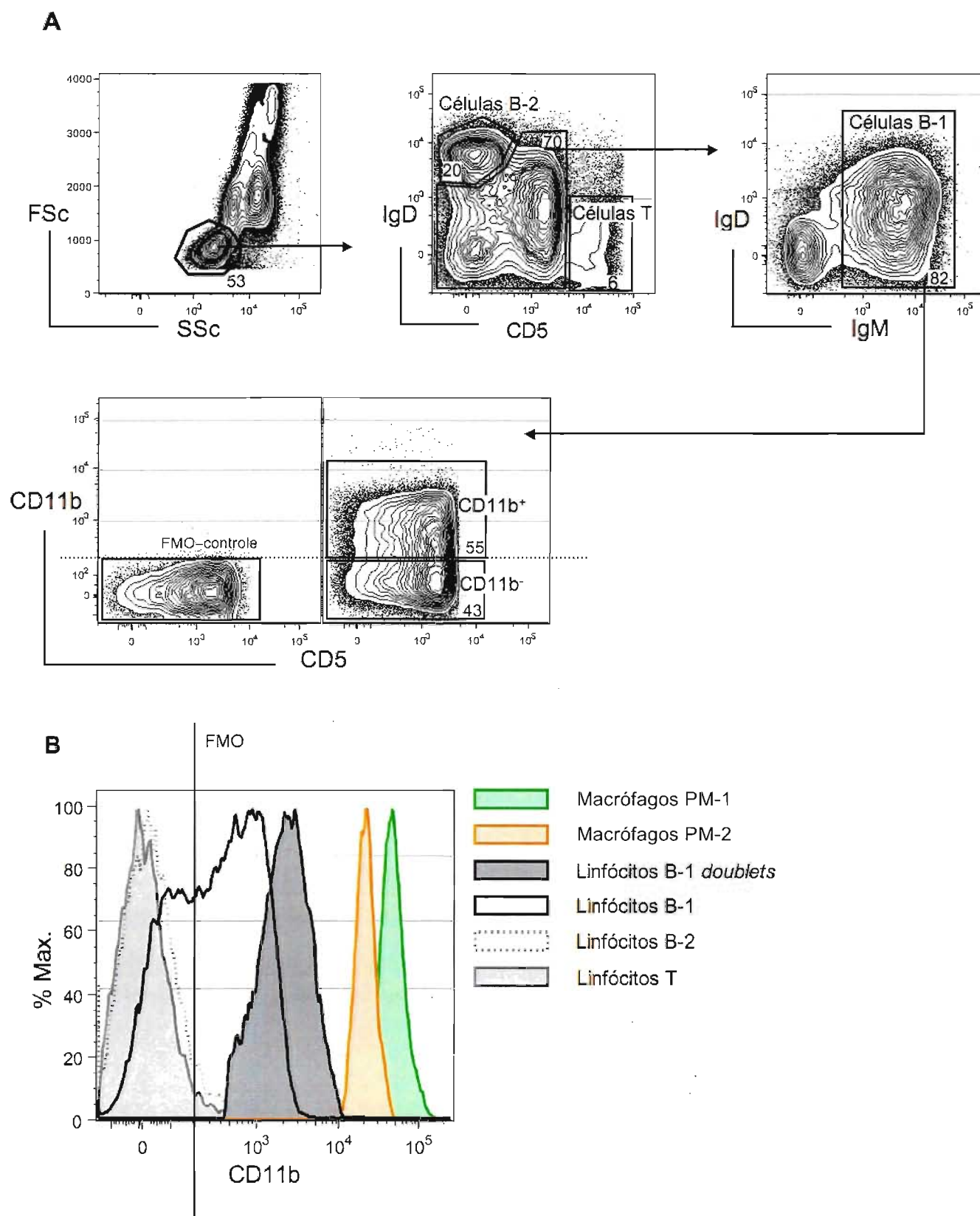


Figura 13. A expressão de CD11b distingue subtipos de linfócitos B-1 no peritônio. Células totais de peritônio de BALB/c foram obtidas, marcadas (11 cores) e analisadas conforme descrito em Metodologia. **A** – Estratégia de *gates* sequenciais utilizados para identificar linfócitos B-1 no peritônio. A expressão de CD11b foi determinada pela fluorescência (controle) expressa pelo FMO (veja em Metodologia). **B** – As células PM-1, PM-2, B-1, B-2 e T foram identificadas pela análise de FACS utilizando a estratégia de *gating* descrita nas Figuras 1 (ou 13) e 2. O histograma mostra e compara a expressão de CD11b entre as diferentes populações celulares do peritônio.

Diferenças fenotípicas expressas em MIF

Marcadores de superfície	Linfócitos B-1 CD11b ⁻	Linfócitos B-1 CD11b ⁺
CD11b	= FMO	3.080
IgM	7.100	13.600
IgD	1.300	890
CD19	5.790	7.040
B220	1.390	1.530
CD5	2.170	2.020
CD21	1.020	790
CD23	500	300
Gr-1	= FMO	= FMO
FSc	830	1.000
SSc	2.260	2.760

Tabela 1. Os subtipos CD11b⁻ e CD11b⁺ de linfócitos B-1 apresentam diferentes expressões fenotípicas. Os valores representam a mediana de intensidade de fluorescência (MIF) obtida na análise de cada um dos marcadores de superfície descritos. Os linfócitos B-1 foram identificados utilizando a estratégia de *gating* mostrada na Fig.2. As análises representam células B-1 de peritônio de camundongos BALB/c adultos. =FMO: indica que os valores de MIF, obtidos na análise deste subtipo de B-1, coincidiram com o valor de MIF de FMO (explicado em Metodologia), conseqüentemente, a expressão deste marcador foi considerada negativa. O valor de MIF de CD23 para as células B-1 CD11b⁺ está logo acima do FMO. Os dados mostrados são representativos da MFI obtida em mais de 10 experimentos. FSc: *Forward Scatter* (tamanho); SSc: *Side Scatter* (granulosidade).

4.4.3 Células B-1 CD11b⁻ são progenitoras das células B-1 CD11b⁺

Como discutido anteriormente, as células B-1 são originadas num processo de desenvolvimento diferente das células B-2 (item 1.3). A maioria das células B-1 (ou talvez todas) é originada durante o desenvolvimento fetal e neonatal numa via muito distinta da via de desenvolvimento medular, a qual é responsável pelo desenvolvimento da maioria (ou talvez todas) das células B-2 (item 1.3.2). Em animais adultos, as células B-1 mantêm sua frequência e repertório, exclusivamente, por um processo de auto-renovação, o qual envolve mecanismos biológicos pouco conhecidos. Os achados de que metade das células B-1 peritoneais não expressam CD11b levantaram a hipótese de que a expressão de CD11b poderia representar diferenças na capacidade de auto-renovação das células B-1 no peritônio.

Para avaliar esta hipótese, linfócitos peritoneais CD11b⁻ e CD11b⁺ foram separados por FACS e cada população foi transferida para cavidade i.p. de camundongos (não irradiados) congênicos, que expressam diferentes alótipos de IgM, um modelo ideal para distinguir, *in vivo*, entre as células do doador e as do hospedeiro. Surpreendentemente, as células B-1 CD11b⁻ foram capazes de reconstituir todos os subtipos de linfócitos B-1 do peritônio, incluindo células B-1a e B-1b CD11b⁺ e CD11b⁻ (Fig. 14A). Entretanto, as células B-1 CD11b⁺ não apresentaram o mesmo potencial e apenas foram capazes de reconstituir seu próprio nicho de células B-1 CD11b⁺ no peritônio.

Baseado nestes dados, pode-se concluir que a população de B-1 CD11b⁻ contém células auto-renováveis que diferenciam-se em células B-1 CD11b⁺. Enquanto que a população de B-1 CD11b⁺ contém células auto-renováveis que não são capazes de se diferenciar em células B-1 CD11b⁻. Portanto, fica estabelecida uma via de desenvolvimento unidirecional de células B-1 no peritônio, onde as células B-1 CD11b⁻ são as progenitoras de células B-1 CD11b⁺.

Consistente com a hipótese de diferenciação de células B-1 CD11b⁻ para B-1 CD11b⁺, a expressão de CD11b não pôde ser detectada nos primeiros 3 dias após a transferência de células. A expressão de CD11b, assim como o número de células B-1 CD11b⁺, começa a aumentar no peritônio depois do terceiro dia e atinge estabilidade por volta de 10-12 dias após transferência.

Estes dados foram igualmente reproduzidos quando as células B-1 (CD11b⁻ e CD11b⁺) foram separadas por FACS e transferidas para camundongos (não irradiados) deficientes de RAG. Entretanto, diferente do que ocorre em

camundongos congênicos recipientes, neste modelo, ambas as células CD11b⁻ e CD11b⁺ expressaram aproximadamente a mesma quantidade de CD11b na superfície (Fig. 14B).

Portanto, as células B-1 CD11b⁻, quando são transferidas para camundongos RAG^{-/-}, expressam o mesmo nível de CD11b encontrado nas células B-1 CD11b⁺. Essa expressão desigual de CD11b observada nas células B-1, quando estas são transferidas para camundongos recipientes congênicos (intactos) ou RAG^{-/-}, deve-se, provavelmente, à interação destas células B-1 com uma população de células ausentes no camundongo RAG^{-/-}, mas presentes no peritônio de camundongos intactos.

Como explicado anteriormente, as células CD11b⁺ tendem a formar duplas (*doublets*) de células, ou seja, duas B-1 fortemente aderidas entre si. Este fenômeno justifica a presença de maior porcentagem de células B-1 FSc^{high} no peritônio dos animais recipientes de células CD11b⁺ quando estes são comparados aos recipientes de células CD11b⁻ (Fig. 14A). Essa tendência de células CD11b⁺ formarem *doublets* dificulta a análise do número (valor absoluto) de células B-1 que habita o peritônio após o ensaio de transferência.

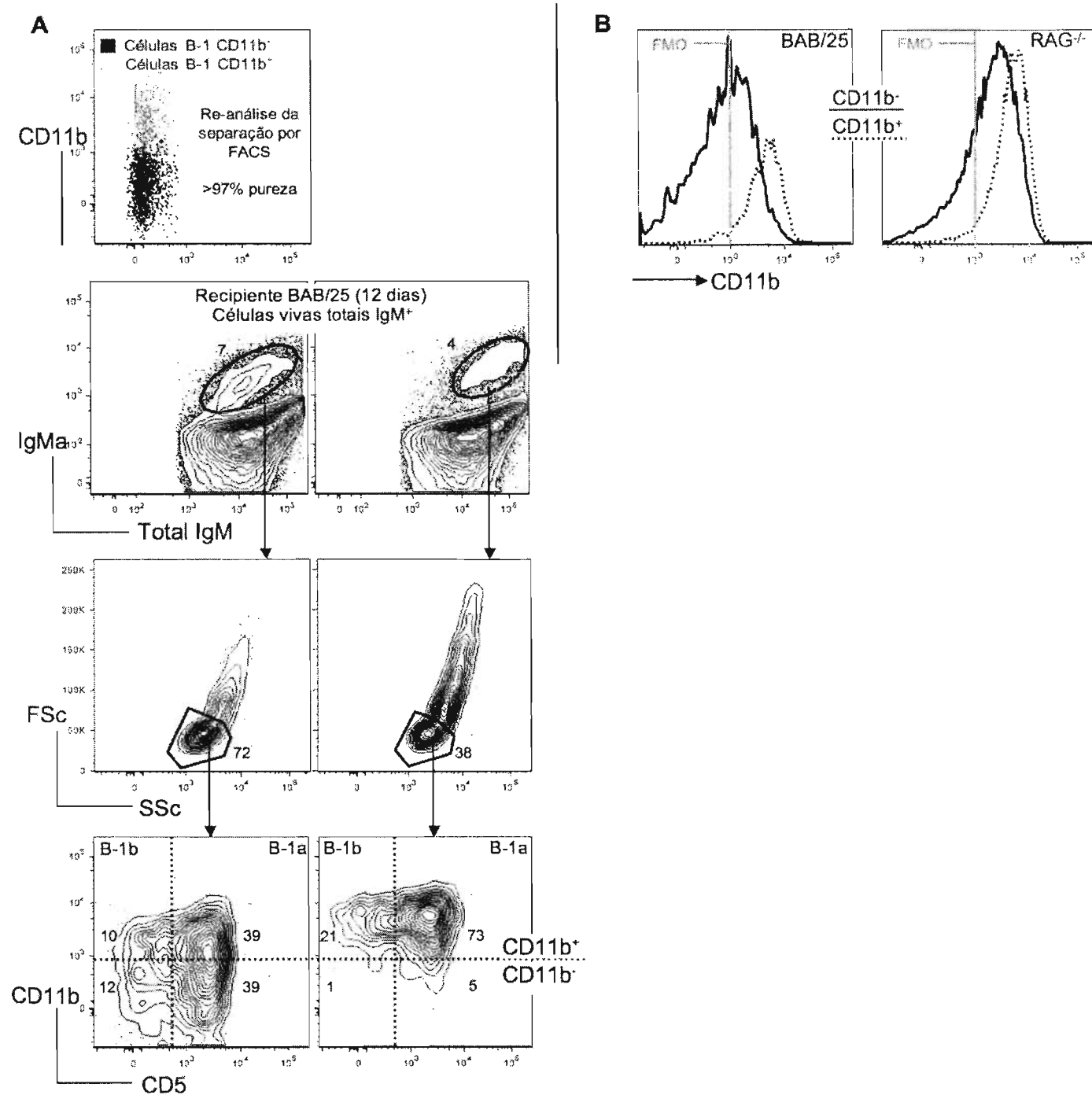


Figura 14. Células B-1 CD11b⁻ dão origem às células B-1 CD11b⁺ em recipientes adotivos. Células CD11b⁻ e CD11b⁺ de peritônio de BALB/c (alótipo IgM^b) foram separadas por FACS conforme descrito em Metodologia. **A** – Cada população separada foi transferida para cavidade peritoneal de camundongos BAB/25 (IgM^b) não irradiados. Após 10-12 dias, as células totais do peritônio de camundongos recipientes foram coletadas e marcadas (11 cores). A análise foi realizada entre as células IgM⁺ vivas presente no recipiente. As células do doador foram identificadas utilizando anticorpos específicos para o reconhecimento do alelo IgM^a (IgH-6a). Em seguida, as células do doador foram analisadas para incluir apenas células linfóides (“janela dos linfócitos”: FSc^{low}, SSc^{low}). A estratégia de *gating* utilizada para identificar as células B-1 e sua expressão de CD11b está descrita na Fig.2. Apenas células B-1 foram encontradas entre a população de células B do doador. **B** – Comparação da expressão de CD11b nas células B-1 após transferência para camundongos BAB/25 ou RAG^{-/-}.

4.4.4 A expressão de CD11b é adquirida tardiamente durante a ontogenia de células B-1

Foi demonstrado aqui que as células B-1 CD11b⁺ representam um estágio posterior de desenvolvimento quando comparadas às células antecedentes CD11b⁻. Esse dado sugere que durante o período neonatal, quando as células B-1 são originadas, predominaria a presença de células B-1 CD11b⁻.

Para testar esta hipótese, foi determinada a frequência de células B-1 CD11b⁺ presentes entre as células totais de peritônio de camundongos BALB/c nos diferentes estágios da ontogenia, desde recém-nascidos até a fase adulta (neonatos, 10d, 20d, 30d, 100d e 6 meses). Nos camundongos neonatos, pouca (ou nenhuma) célula B-1 é encontrada no peritônio, quando apenas macrófagos habitam esta cavidade. Conseqüentemente, a análise iniciou-se, efetivamente, a partir de 10 dias após o nascimento (10d), quando o total de células B-1 no peritônio é de 10⁶ e continua a aumentar até o segundo ou o terceiro mês, quando este número chega a 2-3x10⁶ células B-1, mantendo-se essencialmente estável, pelo menos, até o sexto mês de vida.

Consistentes com a hipótese inicial, os achados mostram que, no dia 10, a maioria das células B-1 (aproximadamente 80%) peritoneais não expressa níveis detectáveis da molécula CD11b. Entretanto, a frequência de células B-1 CD11b⁺ aumenta de 20% a 50% no dia 100 e, esta frequência, mantém-se estável no animal adulto (Fig. 15, gráficos superiores). Este achado, claramente, suporta a idéia de que os linfócitos B-1 CD11b⁻ precedem e dão origem às células B-1 CD11b⁺.

V_H11 é uma seqüência de cadeia variável pesada (V_H: *variable heavy chain*) de um anticorpo que reage com fosfatidilcolina (PtC) e é exclusivamente detectada em células B-1a^{83,86-88}. Os estudos sobre células B que reagem à PtC demonstram que estas células surgem mais tardiamente que outras células B-1 e mantêm estável sua frequência nos animais acima de dois meses de idade.

Utilizando anticorpos monoclonais que reagem com células B expressando V_H11, confirmou-se que as células B-1 V_H11⁺ surgem apenas a partir da quarta semana de vida (30d) do camundongo e representam 6% do total de células B-1 do peritônio. Entretanto, neste momento (30d), a maioria das células B-1 V_H11⁺, recém-chegadas no peritônio, ainda não expressa CD11b (Fig. 15, gráficos superiores). No entanto, no dia 100, enquanto a frequência de células B-1 V_H11⁺ mantém-se estável a 6%, metade destas células expressam agora CD11b, semelhante à frequência de

células B-1 CD11b⁺ (~50%) encontrada no total de células B-1 de um peritônio adulto. Estes achados, que detectam a expressão de CD11b em células B-1 que surgem mais tardiamente no peritônio (V_H11⁺), confirmam a idéia de que a expressão de CD11b marca um estágio tardio no desenvolvimento de linfócitos B-1.

4.4.5 O fenótipo predominante de células B-1 altera-se durante ontogenia

Curiosamente, IgM e CD5 são excessivamente expressos nas primeiras células B-1 que surgem na fase fetal/neonatal. Essa expressão diminui gradativamente até atingir o nível de expressão típico de células B-1 de animais adultos (Fig. 15, gráficos inferiores). Essa alteração de fenótipo, vista durante o desenvolvimento das células B-1 do período neonatal para o período adulto, ocorre igualmente em ambos os subtipos de B-1: CD11b⁻ e CD11b⁺. Entre as células B-1 totais de peritônio, o nível de expressão de IgM e CD5 é muito maior aos 10 dias após o nascimento, intermediário aos 30 dias e atinge nível estável, característico das células B-1 de animais adultos, aos 100 dias de idade (Fig. 15, gráficos inferiores). Já as células B-1b (CD5⁻) surgem mais tardia e gradativamente, durante a alteração de fenótipo das células B-1a.

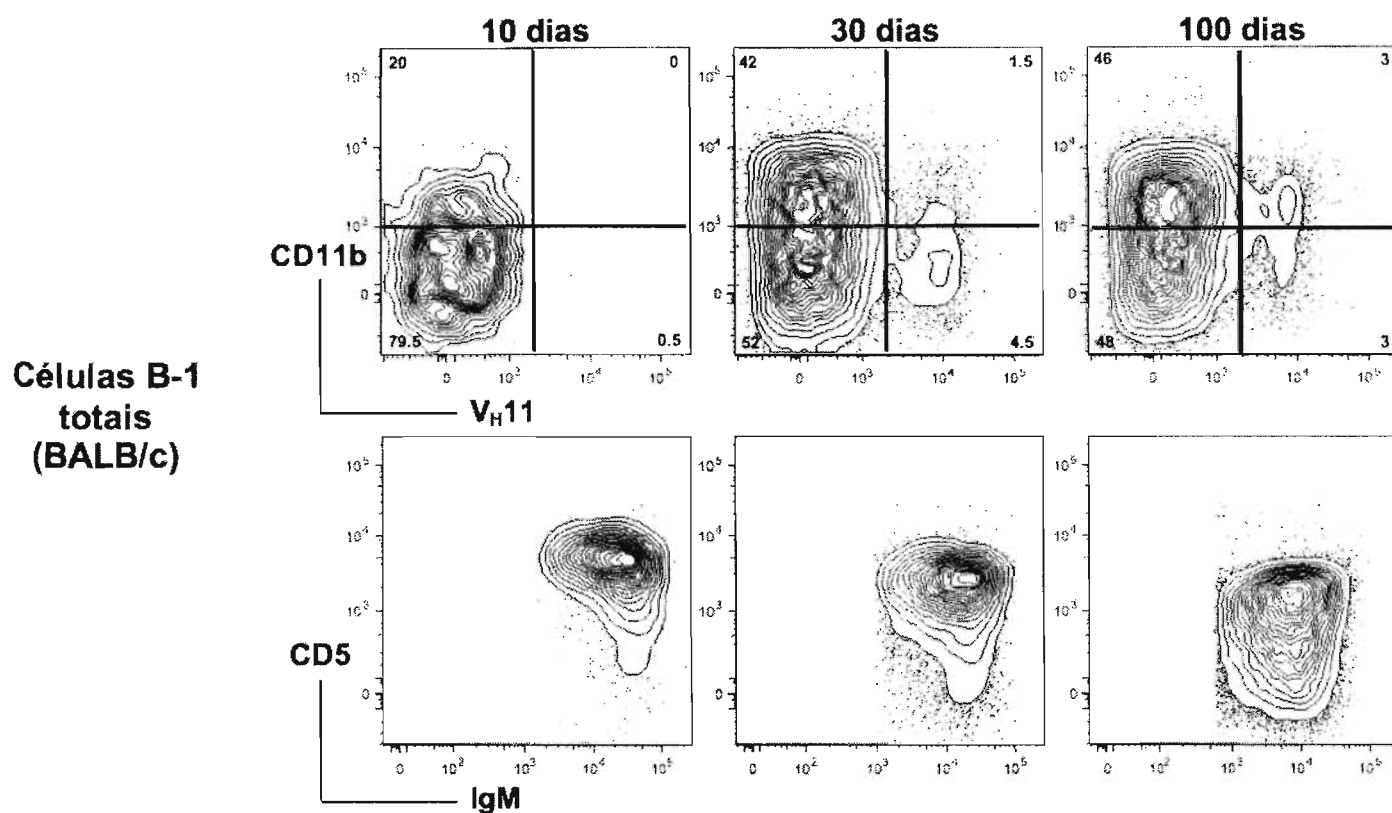


Figura 15. Células CD11b⁺ surgem tardiamente durante a ontogenia, porém expressam o fenótipo típico das células B-1 neonatais, as quais gradativamente alteram-se para o fenótipo predominante de células B-1 adultas. Células totais de peritônio foram obtidas de camundongos BALB/c em diferentes idades (10 dias, 30 dias e 100 dias) e marcadas (11 cores) com uma combinação que permitisse a análise simultânea de CD11b, IgV_H11, CD5 e IgM. As células B-1 foram identificadas seguindo a estratégia de *gating* mostrada na Fig.13. Gráficos superiores: expressão de CD11b e V_H11 na superfície de células B-1 de camundongos em diferentes idades; Gráficos inferiores: expressão de CD5 e IgM na superfície de células B-1 de camundongos em diferentes idades.

4.4.6 A expressão de CD11b marca células B-1 recém-migradas do peritônio para o baço

Embora a integrina CD11b seja expressa em, aproximadamente, 50% das células B-1 do peritônio, essa molécula não é encontrada nas células B-1 esplênicas⁵⁶. No baço, principalmente mediante um estímulo inflamatório, as células B-1 transformam-se em plasmócitos e secretam a maioria dos anticorpos naturais detectados na circulação do camundongo.

Através do ensaio de transferência de células (descrito em Metodologia), o qual utiliza células de camundongos que possuem diferentes alelos de IgM (células B-1 de camundongos IgM^b para cavidade i.p. de camundongos IgM^a), foi observado que as células B-1 do doador (IgM^b) migram do peritônio para o baço, em menos de 24h, após injeção de LPS. Todas as células B-1a que migraram para o baço claramente expressam CD11b (Fig. 16A). O nível de CD11b expresso nestas células segue o mesmo perfil de expressão de CD11b detectado em células B-1 do peritônio. Este nível de expressão permanece por 2 a 3 dias, quando gradualmente começa a desaparecer e, então, estas células adquirem um fenótipo típico de linfócitos B-1 de baço. Seis dias após injeção de LPS, já não é mais possível detectar níveis de expressão de CD11b nestas células (Fig. 16A).

Estes achados suportam a idéia de que CD11b serve como um marcador de células B-1 recém-migradas do peritônio para o baço e ainda demonstra que os linfócitos B-1 CD11b⁺ são células funcionais e, diferente das células CD11b⁻, são responsáveis pela migração para o baço mediante um estímulo inflamatório.

4.4.7 Células B-1 CD11b⁺ peritoneais migram para o baço e transformam-se em células secretoras de anticorpos naturais

Nestes estudos, a presença de células B-1a secretoras de anticorpos foi determinada pela co-expressão, nesses linfócitos B-1, das moléculas IgM, CD5 e CD138 (*syndecan-1*). Em animais adultos não estimulados, por volta de 4% do total de células B-1a do baço representam plasmócitos secretores naturais de IgM. Em animais estimulados com LPS i.v., esse número de plasmócitos (de B-1) aumenta rapidamente: é substancialmente maior um dia após o estímulo e continua aumentando até atingir o pico (~60% do total de B-1a no baço) no dia 3 após LPS (Fig. 16B).

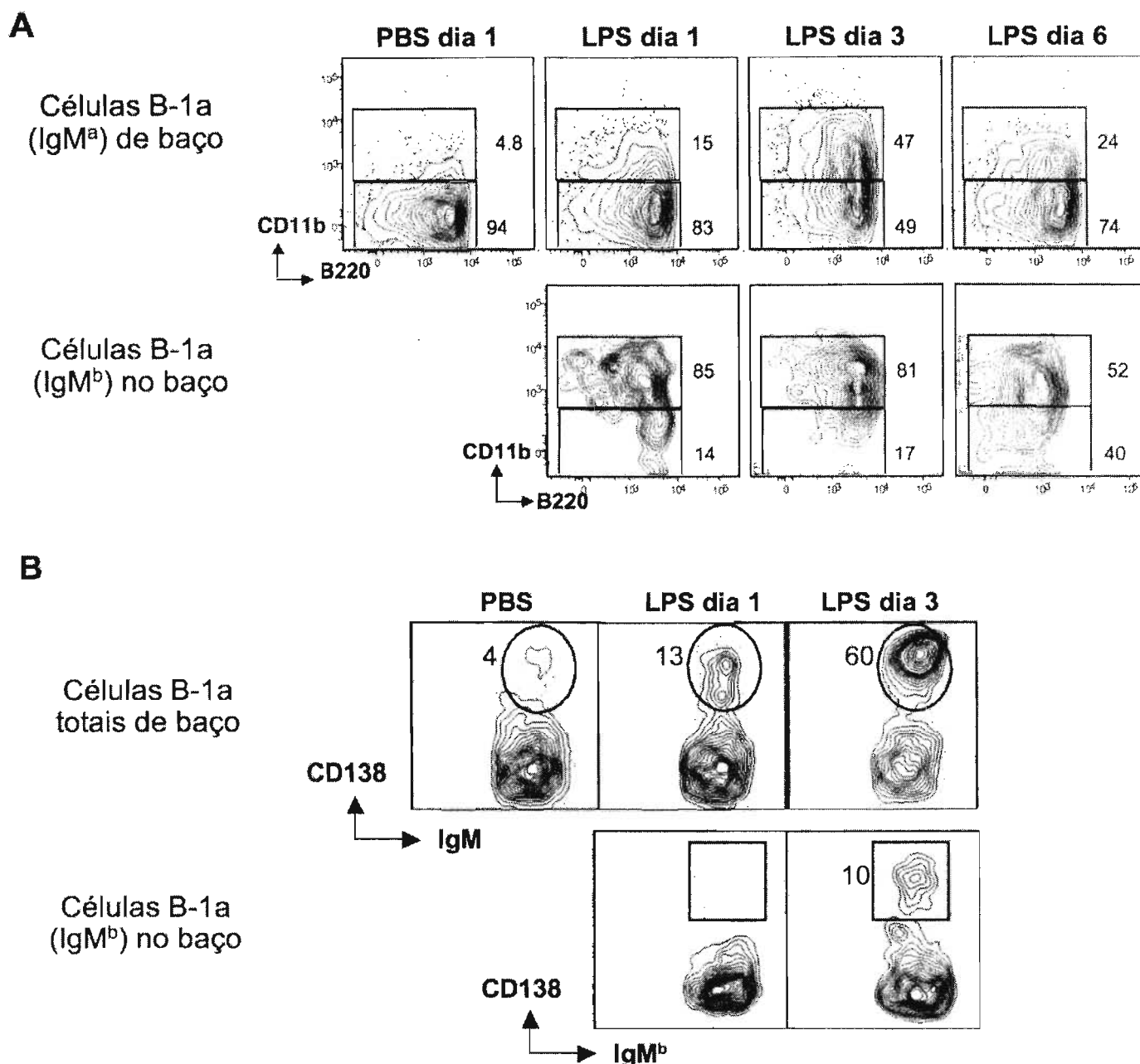


Figura 16. Expressão de CD11b marca as células B-1 recém-migradas do peritônio para o baço, no qual transformam-se em células secretoras de anticorpos naturais. Células totais de camundongos CB.17 doadores (IgM^b) foram transferidas para cavidade peritoneal de camundongos recipientes BALB/c (IgM^a). Os animais recipientes foram estimulados com LPS (i.v.) e suas células B-1a (no baço) vindas dos doadores (IgM^b) ou próprias (IgM^a) foram analisadas nos dias 1, 2 e 3 após estímulo (descrito em Metodologia). A estratégia de *gating* utilizada para identificar as células B-1a de baço está descrita na Fig.1 do artigo (publicado em colaboração com Y. Yang) em Apêndice II. Resumidamente, as células B vivas (CD19⁺ e IP⁺) do baço foram analisadas quanto a expressão de IgD e IgM. As células IgM^{high} e IgD^{low} concentram um *pool* de células B imaturas, B-1a e células B-MZ. Entre estas células, as que expressam CD5⁺ e B220^{low} foram consideradas B-1a. **A** – Todas as células B-1a do doador (IgM^b) chegaram no baço como CD11b⁺ até, gradativamente, perderem essa expressão (gráficos inferiores). As células totais do baço dos recipientes (IgM^a) começaram a expressar CD11b até atingirem o pico (~50%) no dia 3 pós-estímulo. **B** – 24h pós-estímulo, as B-1a totais do baço começaram a se transformar em plasmócitos (CD138^{high}) até atingirem o pico (~60%) no dia 3 pós-estímulo (gráficos superiores). Já as células do doador (IgM^b) parecem demorar mais tempo. Uma pequena parte delas começa a se transformar em plasmócitos apenas no dia 3 pós-estímulo (gráficos inferiores).

Utilizando o mesmo modelo de transferência de células (entre camundongos expressando diferentes alótipos de IgM), observou-se que a cinética de secreção de anticorpos, por células B-1a que recém-migraram do peritônio (ou seja, células do doador IgM^b), parece percorrer um processo mais lento. As células B-1a, que recém-migraram do peritônio para o baço, começam a transformar-se em plasmócitos de IgM apenas a partir do dia 3 após o estímulo com LPS (Fig. 16B). Estes dados mostram que a rápida secreção de anticorpos, vista logo nas primeiras 24h após estímulo, deve-se, principalmente, aos plasmócitos de B-1a residentes no baço ou vindos de outro lugar diferente do peritônio.

4.5 Diferenciação de linfócitos B-1 peritoneais em plasmócitos CD138*

Como mostrado nos resultados anteriores, após estímulo por LPS *in vivo*, os linfócitos B-1 migram do peritônio para o baço, onde transformam-se em células secretoras de anticorpos (plasmócitos). Entretanto, analisamos a capacidade de linfócito B-1 peritoneal de transformar-se em plasmócito *in situ*, ou seja, no próprio peritônio.

Sabe-se que linfócitos B (principalmente B-1) diferenciam-se em plasmócitos e secretam diferentes isótipos de imunoglobulinas quando estimulados *in vitro* com LPS¹²²⁻¹²⁴. Dessa forma, cultivamos células totais de peritônio por 60h na presença de 10µg/mL de LPS *in vitro*. Curiosamente, as células B-1 peritoneais não foram capazes de se diferenciar em plasmócitos (Fig. 17). Em ambas as condições, na presença ou ausência de LPS, os linfócitos B-1 não expressaram níveis detectáveis da molécula de superfície CD138, indicando que estas células não entraram no processo de diferenciação para célula secretora de anticorpos.

4.5.1 Linfócitos B-1 isolados de peritônio são capazes de diferenciar-se em células secretoras de anticorpos

Como mostrado anteriormente, a cultura de células totais de peritônio não permite a diferenciação de linfócitos B-1 para plasmócitos. Todavia, sabe-se que linfócitos B-1 diferenciam-se em plasmócitos quando estimulados com LPS *in vitro*. Portanto, estes dados acima sugeriram que o ambiente peritoneal (células e moléculas) pode estar dotado de um mecanismo que inibe a formação de plasmócitos *in situ*.

Para elucidarmos o efeito de inibição de plasmócitos *in situ*, separamos os linfócitos B-1 por FACS e cultivamos estas células *in vitro* na presença de LPS por 60h. Diferentemente dos dados obtidos com células totais de peritônio, os linfócitos B-1, agora purificados do peritônio, foram capazes de diferenciar-se em plasmócitos (Fig. 18). Este resultado mostra que a presença de outras células peritoneais é fundamental para inibir o desenvolvimento de plasmócitos derivados de B-1.

4.5.2 Macrófagos PM-1 inibem a formação de plasmócitos *in vitro*

A cavidade peritoneal abriga uma variedade de subtipos celulares, os quais compartilham o espaço físico com os linfócitos B-1. Como citado anteriormente, aproximadamente metade das células peritoneais são macrófagos, os quais, nesta tese, foram divididos em PM-1 e PM-2. Dessa forma, realizamos uma co-cultura de linfócitos B-1 com macrófagos a fim de analisar a participação dos macrófagos peritoneais na diferenciação de plasmócitos *in vitro*.

Os linfócitos B-1, PM-1 e PM-2 foram separados por FACS (Fig. 18A). 2×10^5 linfócitos B-1 foram incubadas *in vitro* na presença de LPS ($10 \mu\text{g/mL}$) por 4h numa placa de 96 poços. Após 4h de incubação em LPS, 2×10^5 células PM-1 ou PM-2 foram adicionadas sobre o linfócitos B-1 e esta co-cultura foi mantida por mais 56h em estufa úmida de 37°C , 5% CO_2 e 5% O_2 (total de 60h de cultura *in vitro*).

Surpreendentemente, os macrófagos PM-1 foram capazes de inibir a formação de plasmócitos *in vitro*. Já as células PM-2 não apresentaram o mesmo efeito inibitório, sugerindo que as células PM-1 sejam as células responsáveis por controlar o desenvolvimento de linfócitos B-1 peritoneais em plasmócitos (Fig. 18B). Vale ressaltar que a formação de plasmócitos ocorre apenas na presença de LPS e, portanto, o efeito inibitório de células PM-1 é visto apenas quando as células B-1 são previamente estimuladas *in vitro*.

Cultura *in vitro* por 60h

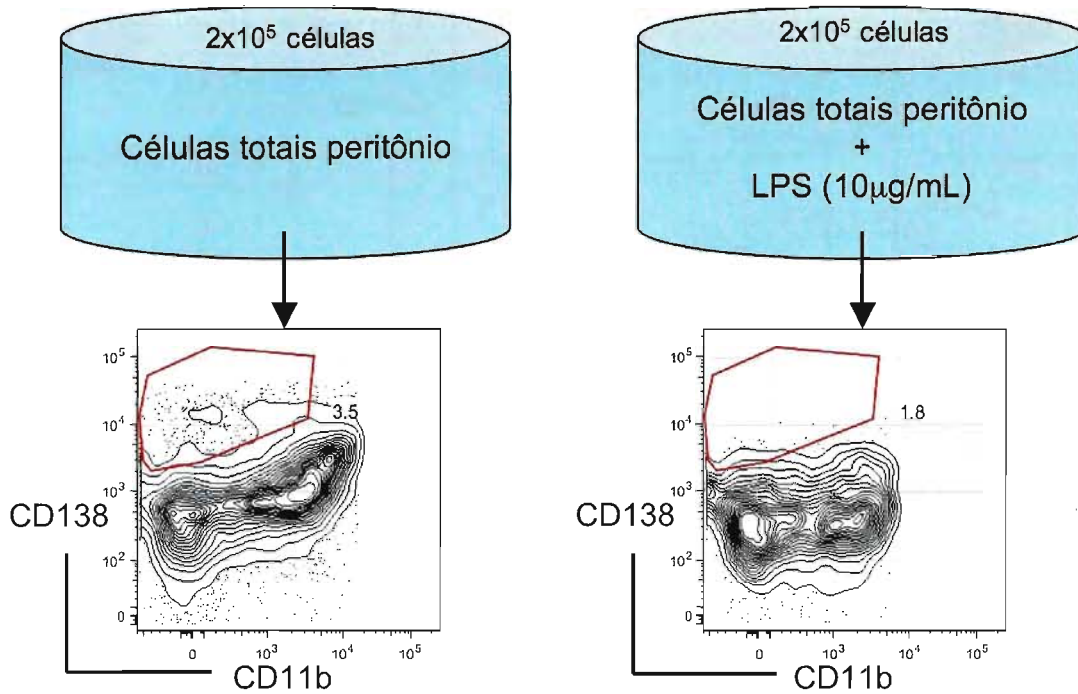


Figura 17. Diferenciação de linfócitos B-1 em plasmócitos: células totais de peritônio. Células totais de camundongos BALB/c foram obtidas conforme descrito em Metodologia. 2x10⁵ células foram incubadas por 60h em placas de cultura de 96 poços num volume final de 250µL. Para induzir a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, as células foram incubadas na presença de 10µg/mL de LPS. Após 60h, as células B-1 presentes na cultura foram analisadas quanto à sua expressão de CD138. OS linfócitos B-1, cultivados na presença de outras células peritoneais, não são capazes de se diferenciar em plasmócitos. O *gate* vermelho indica o controle FMO (ver Metodologia). Todos os eventos presentes neste *gate* são considerados com fenótipo positivo para CD138.

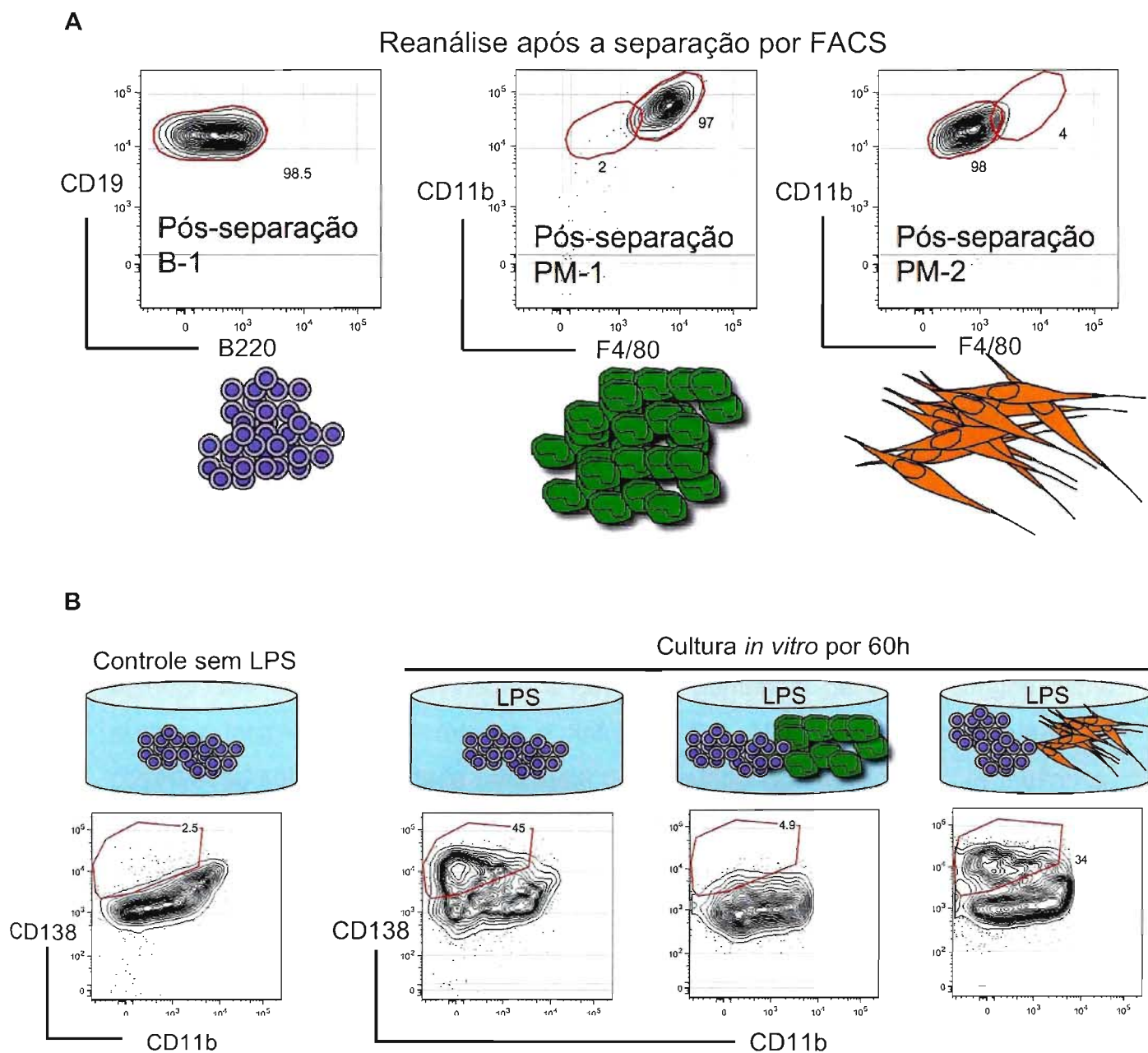


Figura 18. PM-1 inibe a formação de plasmócitos *in vitro*. 2×10^5 células, purificadas por FACS, foram incubadas por 60h em placas de cultura de 96 poços num volume final de $250 \mu\text{L}$. Para induzir a diferenciação de linfócitos B-1 em plasmócitos, as células foram incubadas na presença de $10 \mu\text{g/mL}$ de LPS. Após 60h, as células B-1 presentes na cultura foram analisadas quanto à sua expressão de CD138. **A** – Cada subtipo celular foi separado por FACS (ver Metodologia) e a porcentagem de pureza após a separação foi ilustrada acima. Em todos os ensaios de separação obtivemos uma pureza igual ou maior que 95%. **B** – Os linfócitos B-1 foram incubados na presença de macrófagos PM-1 ou PM-2. Como controle, os linfócitos B-1 foram cultivados na presença (formação clássica de plasmócitos) ou ausência (sem plasmócitos) de LPS. O *gate* vermelho indica o controle FMO (ver Metodologia). Todos os eventos presentes neste *gate* são considerados com fenótipo positivo para os marcadores indicado nos eixos.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, utilizando metodologias contemporâneas, foi realizada análise detalhada das células que habitam a cavidade peritoneal de camundongos e identificou-se novos subtipos funcionais de linfócitos B-1 e macrófagos. Além disso, foi possível identificar e caracterizar a maioria das (sub)populações celulares que co-habitam o peritônio.

Desde o início dos estudos com células da cavidade peritoneal, acreditava-se que, aproximadamente, 90% do peritônio constituía-se de fagócitos, principalmente, macrófagos. Por meio do antigo protocolo de aderência, para obtenção de macrófagos peritoneais, foram realizadas várias descobertas sobre a biologia de fagócitos. Entretanto, quando os linfócitos B-1 foram identificados, os conceitos sobre as populações que abrigam o peritônio e também sobre a obtenção de macrófagos puros, tiveram que ser revistos. Os macrófagos tiveram que “dividir a cena” com uma população linfóide também abundante. Depois de algum tempo, a comunidade científica reconheceu a cavidade peritoneal de camundongos como abrigo principal para macrófagos e linfócitos B-1. Neste estudo, continuando a observação sobre a cavidade peritoneal de camundongos adultos não estimulados, foi demonstrado que, além de macrófagos e linfócitos B-1, o peritônio abriga linfócitos B-2, linfócitos B que realizaram *switching* de classe de imunoglobulina (diferente de IgD e IgM), *doublets* de linfócitos B-1, linfócitos T, eosinófilos, mastócitos/basófilos, neutrófilos, além de diversas outras populações celulares (de linfócitos e granulócitos) que não puderam ser identificadas através da metodologia e marcadores (fenótipos) de superfície utilizados neste estudo.

5.1 Leucócitos Fsc^{high}

Dentre a população peritoneal presente na – aqui chamada – “janela dos leucócitos Fsc^{high} ” (45%), mais de 60% representam macrófagos ($CD11b^{high}$), mais de 30% são *doublets* de B-1 – vale ressaltar que cada evento de *doublets* lido pelo FACS representa duas células B-1 – e o restante (aproximadamente 3%) representa células muito granulosas (SSc^{high}) que expressam a molécula c-kit e, por isso, identificadas como mastócitos ou basófilos (mais experimentos e marcadores fenotípicos são necessários para distinguir mastócitos de basófilos).

Um dos resultados mais inesperados foi a descoberta de duas subpopulações funcionalmente distintas de macrófagos co-habitando o peritônio. Utilizando apenas dois fenótipos típicos de macrófagos murinos (F4/80 e CD11b) foi possível identificar dois subtipos distintos de fagócitos. Foram chamados de PM-1 os macrófagos que co-expressaram altas concentrações de F4/80 e CD11b na superfície. Esta expressão representa o fenótipo tipicamente encontrado em macrófagos peritoneais. Já os macrófagos que co-expressaram estas moléculas em menores concentrações (porém ainda considerada alta expressão) foram chamados de PM-2 (PM é uma abreviação para *peritoneal myeloid cell*). Dentre a população de macrófagos totais de peritônio não estimulado, aproximadamente 90% são PM-1 e o restante PM-2.

Sabe-se que os macrófagos peritoneais aderem-se facilmente quando colocados em cultura, no entanto, não existe nenhum trabalho comparando as possíveis morfologias de macrófagos peritoneais após aderência. Curiosamente, foi observado que os macrófagos PM-2 apresentam morfologia muito diferente das células PM-1 quando aderidas durante cultura *ex vivo*. Os macrófagos PM-2 espriam-se gerando uma estrutura bipolar, ou seja, alongam-se de forma longilínea sobre a lamínula. Já os macrófagos PM-1 mantêm-se mais arredondados, gerando poucos dendritos. Curiosamente, ambas as células, logo após separação por FACS sobre lamínula, apresentam-se arredondadas, muito semelhante aos linfócitos. Os PM-2 são redondos e de tamanho muito próximo aos linfócitos, enquanto que os PM-1, também redondos, apresentam tamanho claramente maior que os linfócitos peritoneais. A morfologia que distingue ambos os subtipos de macrófagos ocorre apenas alguns minutos após cultura na estufa de 5% de CO₂. Aproximadamente 15min. de cultura já são suficientes para se observar os PM-2 iniciarem seu processo de espriamento bipolar (Fig.7A).

Para determinar se essas diferenças fenotípicas e morfológicas entre PM-1 e PM-2 denunciavam uma importante diferença funcional, foram realizados ensaios de fagocitose *in vivo* e comparação na produção de NO *in vitro*. Observou-se que ambas as células PM-1 e PM-2 são capazes de fagocitar partículas bacterianas ou fúngicas (*E. coli*, *S. Typhimurium*, *Yersinia sp.*, partículas de *zymosan* e *E. coli* morta) em poucos minutos (5min.) após inoculação por via intraperitoneal. Entretanto, nem todas as células PM-2 no peritônio apresentaram-se positivas para o ensaio de fagocitose. Enquanto 100% dos PM-1 fagocitaram pelo menos um microorganismo, apenas 40% das células PM-2 realizaram a fagocitose. Entretanto,

como observado na Fig.5, após a infecção *in vivo* muitas células PM-2 migram para o peritônio e passam a representar mais de 30% do total de macrófagos (PM-1 + PM-2) peritoneais. Dessa forma, pode-se sugerir que o baixo índice de fagocitose, visto em células PM-2, se deve, em parte, ao processo contínuo de migração de PM-2 para o peritônio, as quais ainda não encontraram a bactéria injetada e, conseqüentemente, não puderam realizar a fagocitose.

Por meio de ensaio de fagocitose por FACS, pôde-se observar que as células PM-2 são capazes de fagocitar muito mais microorganismos por célula. Este fenômeno foi constatado pelas imagens de microscopia confocal (Fig.5, bactérias verdes – gfp⁺ – intracelulares). Entretanto, os gráficos de FACS não parecem condizentes com tal afirmação. A intensidade de fluorescência do gfp determina a quantidade de bactérias (gfp⁺) fagocitadas. No entanto, observa-se que a intensidade de fluorescência de gfp para as células PM-1 parece maior e mais homogênea do que para as células PM-2. Este fenômeno deve-se, porém, à alta autofluorescência de células PM-1. Estas células, por serem maiores e mais granulosas que PM-2, apresentam um *background* de autofluorescência muito elevado e, portanto, o nível de positividade de gfp para células PM-1 apenas aparenta ser maior, mas na realidade é bem menor do que a intensidade de fluorescência de gfp vista para células PM-2. Em suma, essa diferença pode ser explicada pela distância, no gráfico de FACS, entre as células negativas e positivas para gfp. Essa distância (entre células positivas e negativas) é maior para as células PM-2 (maior número de bactérias fagocitadas) do que para as PM-1. Além das células PM-1 fagocitarem menos, estas células apresentaram muitas bactérias aderidas à sua superfície (Fig.5, bactérias avermelhadas sobre as células PM-1).

Outro fator importante, obtido através da análise das imagens de microscopia confocal, é a observação da capacidade de *killing* (morte das bactérias fagocitadas) de ambas as células PM-1 e PM-2. Este dado pode ser observado devido a expressão contínua de gfp pelas bactérias vivas, ou seja, as bactérias que se mantiverem vivas dentro das células continuarão a expressar gfp e, portanto, aparecerão na cor verde. Já as bactérias mortas deixam de expressar gfp e seu material genético, corado pelo DAPI (azul), aparecerá na confocal com coloração azulada. Aparentemente, ambas as células foram capazes de iniciar o processo de *killing*, já que foram encontradas bactérias azuis no interior de ambas as células fagocíticas (Fig.5). No entanto, numa análise geral, parece que as células PM-1

realizam o processo de *killing* com mais eficiência do que as células PM-2. Este fenômeno poderia ser explicado pela pouca quantidade de bactérias fagocitadas pelos PM-1, que favoreceria a morte destas poucas bactérias quando em contato com espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

Vale ressaltar que estas interpretações são provenientes de observações clínicas das imagens de confocal, e, portanto, estes dados ainda carecem de análise estatística para confirmar tal afirmação especulativa. Entretanto, realizamos um ensaio preliminar para avaliar a viabilidade de bactérias *Escherichia coli* fagocitadas *in vitro*. Este ensaio mostrou que os macrófagos PM-1 são capazes de matar as bactérias internalizadas muito mais rapidamente do que os macrófagos PM-2. Em apenas 2h de incubação *in vitro* (PM-1 + *E. coli*), as células PM-1 mataram mais de 90% das bactérias fagocitadas. Enquanto que as células PM-2 mataram, no mesmo período, 40%-50% das bactérias fagocitadas. Embora as células PM-2 pareçam fagocitar um número maior de bactérias, estas células não são muito eficientes na sua atividade microbicida, diferentemente das células PM-1 (estes ensaios precisam ser repetidos e, por isso, não foram incluídos, como resultados, nesta tese).

Além da capacidade fagocítica, ambas as células (PM-1 e PM-2) parecem produzir óxido nítrico quando cultivadas *in vitro*, mesmo na ausência de estímulos exógenos. No entanto, quando estimulamos estas células com LPS *in vitro*, elas parecem responder pouco em 6h, quando ambas PM-1 e PM-2 expressam baixos níveis de DAF, indicando pouca produção de NO. Já em 24h de estímulo, as células PM-1, diferente das PM-2, expressam altos níveis de DAF, indicando uma alta produção de NO. As células PM-2, após 24h de estímulo, continuam produzindo pouco NO, como mostrado pela Figura 6 (nesta figura mostramos apenas os dados de 24h de estímulo já que em 6h houve pouca produção de NO e essa produção foi semelhante entre as PM-1 e PM2). Vale ainda ressaltar que devemos considerar que as células PM-1 produzem uma quantidade muito alta de NO, já que o desvio à direita, visto no gráfico de FACS, está representado em uma escala logarítmica. Dessa forma, um pequeno desvio que se manifesta na extremidade direita do gráfico (próximo à escala 10^5) representa milhares de unidades de fluorescência.

Essa forte resposta ao LPS, vista apenas nas células PM-1, poderia ser explicada pela sua alta expressão de TLR4. TLR4 é, até o momento, o principal receptor de LPS presente na superfície de várias células, principalmente macrófagos. As células PM-1 parecem representar as células peritoneais com a

maior expressão de TLR4, já que o nível de expressão desta molécula foi muito baixo ou não-detectável na maioria dos linfócitos, incluindo linfócitos B-1. Já as células PM-2 expressam pouco ou nenhum TLR4 na sua superfície (Fig. 2B).

Como discutido anteriormente, os macrófagos PM-1 podem, logo nas primeiras duas horas, matar mais de 90% das bactérias fagocitadas. No entanto, a produção de NO, um potente microbicida, ocorre apenas 24h após o estímulo *in vitro*. Estes dados sugerem que o mecanismo de *killing* dos macrófagos PM-1, visto no nosso modelo experimental, deve ser independente da produção de NO.

Diferentemente das células PM-1, as células PM-2 expressam altos níveis de MHC-II de superfície. Em consonância com os dados de *killing* citados acima, parece que as células PM-2 fagocitam os microorganismos e os mantêm em seu citoplasma por um período mais longo e podem, diferentemente de células PM-1, apresentar antígenos para células T via seu MHC de classe II. Mesmo após infecção *in vivo* com bactérias, as células PM-1 que restaram no peritônio não foram capazes de aumentar a expressão de MHC-II na sua superfície. Já as células PM-2 mantiveram sua alta expressão e passaram a expressar CD62L tão logo fagocitavam uma bactéria. Esse aumento na expressão de CD62L sugere que as células PM-2 podem migrar do peritônio para os órgãos linfóides secundários, como os linfonodos. Nos linfonodos, as PM-2 podem atuar como células apresentadoras de antígenos muito eficientes já que expressam altas concentrações da molécula MHC-II.

Em suma, podemos sugerir, embora ainda de forma reducionista, que o peritônio abriga duas população de macrófagos que possuem funções bem distintas e definidas. As células PM-1, que estão em abundância, seriam as células residentes microbicidas de resposta rápida e de capacidade de reconhecimento de LPS. Enquanto que as células PM-2 parecem atuar como sentinelas, as quais identificam qualquer organismo estranho e podem (aparentemente) processar e apresentar este antígeno às células T (via MHC-II) presentes no linfonodo mais próximo para iniciar a resposta adaptativa, caso necessária. Esta teoria, embora provável, ainda não foi provada nesta tese. Pretendemos continuar explorando estas duas subpopulações celulares para alcançarmos dados mais conclusivos.

Como mostrado na seção Resultados (Fig. 2A), as células PM-2 representam apenas 7%-10% do total de macrófagos que co-expressam F4/80 e CD11b no peritônio e este valor (absoluto e relativo) aumenta significativamente após infecção

(Fig. 5). Entretanto, estes dados foram obtidos de camundongos BALB/c mantidos no biotério da *Stanford University*. Quando este mesmo experimento foi repetido, agora com os animais criados e mantidos no biotério do Instituto de Química (IQ) e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da USP, foi observada maior concentração de células PM-2 (ou maior relação entre PM-2 e PM-1) nestes animais não estimulados. Consistente com estes dados, a análise das células de peritônio de animais BALB/c mantidos em Stanford, porém, apresentando sintomas de contaminação (surto de contaminação dos animais do biotério que ocorreu durante a etapa de pesquisa realizada nos EUA), mostrou que estes animais, assim como os BALB/c do biotério do IQ/FCF da USP, apresentavam alta concentração de células PM-2. Esta relação entre células PM-1 e PM-2 parece representar uma ótima ferramenta para triagem de camundongos contaminados. Resta, ainda, saber quais as contribuições de cada subtipo de macrófagos ou qual a cooperação entre estes dois subtipos perante situações de estímulos endógenos e exógenos.

O estudo sobre a biologia dos macrófagos requer o conhecimento da origem e da biologia dos monócitos circulantes, já que estes devem representar a fonte da maioria dos macrófagos residentes e inflamatórios. Alguns estudos, publicados recentemente, identificaram a existência de dois subtipos de monócitos circulantes que apresentam fenótipos e propriedades de migração muito distintos^{18,19}. Por exemplo, a expressão (ou ausência) de Gr-1 (Ly-6C/Ly-6G) e de receptores de quimiocinas, como CX₃CR1 e CCR2, na superfície dos monócitos, pode diferenciá-los em dois subtipos: os monócitos de vida curta, os quais migram rapidamente para os locais de inflamação, co-expressam Gr-1⁺, CX₃CR1^{low} e CCR2⁺; e os monócitos que representam os progenitores dos macrófagos residentes, migrando constantemente para tecidos não inflamados, expressam Gr-1⁻, CX₃CR1^{high} e CCR2⁻^{18,19}. Estes dois subtipos de células migram de forma diferente para diversos tecidos e podem dar origem às células dendríticas e aos macrófagos. Estes dados, como sugeriram os autores, abrem novos caminhos e novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para tratar de doenças inflamatórias.

Outro trabalho publicado em 2007, por um grupo francês, descreve a cooperação entre monócitos e macrófagos, que juntos favorecem a cicatrização do músculo esquelético injuriado e iniciam o processo de miogênese para reparar o tecido danificado¹²⁵. Estes autores descreveram os monócitos como células que expressam baixas concentrações de F4/80 (F4/80^{low}), enquanto que os macrófagos

apresentam F4/80^{high}. Num modelo de injúria de músculo esquelético, apenas os monócitos F4/80^{low} são recrutados para o local da lesão, realizando funções pró-inflamatórias além da intensa atividade fagocítica. Numa fase mais tardia, estes próprios monócitos transformaram-se em macrófagos (F4/80^{high}), os quais realizaram funções opostas, secretando citocinas anti-inflamatórias e iniciando o processo de reparação e regeneração através da indução da miogênese¹²⁵. Estes dados mostram que existe uma tarefa a ser compartilhada entre macrófagos e monócitos, ambos essenciais para o sucesso da inflamação, que possui como resultado mais essencial a reparação tecidual e a retomada da homeostasia.

Realizando uma analogia direta, torna-se quase irresistível nomear as células PM-2 de monócitos e PM-1 de macrófagos. Entretanto, existem fatores que, se devidamente considerados, não nos permitem tal rotulação: Os monócitos de sangue periférico de camundongos expressam níveis detectáveis e variados da molécula Ly-6C (ou também de Gr-1/Ly-6G) e expressam pouco ou nenhum MHC-II na sua superfície. Como mostrado neste tese (Fig. 3), as células PM-2, diferentemente dos monócitos já descritos, não expressam Ly-6C nem Gr-1, além de expressarem altos níveis de MHC-II. Mais ainda, parte destas células expressam o marcador universal de células dendríticas CD11c. Ou seja, um terço das células PM-2 devem representar células dendríticas e o restante não apresenta o fenótipo descrito para monócitos e permanece apenas como macrófagos PM-2, já que se espraíam em cultura, fagocitam e expressam todos os marcadores de um macrófago convencional. Resta-nos saber se as células PM-2 CD11c⁻ são as células progenitoras das células PM-2 CD11c⁺. Todos esses dados nos sugeriram nomear estas células apenas como “células mielóides de peritônio” (*Peritoneal Myeloid cells* – PM), ao invés de nos precipitarmos em generalizar utilizando o termo macrófagos.

A fim de identificar os subtipos de células mielóides presentes no sangue periférico de camundongos, utilizamos os mesmos 11 marcadores que foram utilizados para identificar PM-1 e PM-2 no peritônio. Os resultados desta análise mostraram, claramente, que não existe nenhuma célula no sangue de camundongos BALB/c que se assemelham ao fenótipo de células PM-1 e PM2. Este resultado corrobora o argumento de que as células PM-2 não sejam simplesmente monócitos periféricos recém-migrados. Certamente, estes dados não descartam a possibilidade de existir, no sangue periférico, células progenitoras de PM-2. No entanto, caso isso

ocorra, este monócito necessita, obrigatoriamente, maturar-se e expressar um fenótipo diferente de monócitos tão logo emigre para o peritônio.

Outra possível especulação seria a possível diferenciação de células PM-2 em células PM-1 e vice-versa. Para elucidar essa questão, realizamos um ensaio preliminar de transferência, *in vivo*, de células PM-1 e PM-2 purificadas por FACS e marcadas com CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*, um corante celular fluorescente de cor verde). Este experimento mostrou que as células PM-1 não são capazes de se transformar em células PM-2, mesmo após estímulo com LPS, o qual favorece o desaparecimento de células PM-1 e um aumento de células PM-2. Certamente, o aumento de células PM-2, visto no peritônio após estímulo inflamatório, não se deve às células PM-1, ou seja, as células PM-1 não são capazes de se diferenciar em células PM-2, mesmo depois de horas ou dias de transferência adotiva *in vivo*. Infelizmente, o mesmo ensaio com as células PM-2 não funcionou. As células PM-2 simplesmente desapareceram do peritônio em menos de 24h após a transferência *in vivo* para camundongos recipientes. Estes experimentos precisam ser repetidos para esclarecer tal fato e, finalmente, mostrar se as células PM-2 podem transformar-se em células PM-1 *in vivo*.

Em suma, pode-se afirmar que as células PM-2 co-habitam o peritônio com as células PM-1 e, independente da sua caracterização como monócitos ou macrófagos, a demonstração de que as células PM-2 possuem morfologia, fenótipo e função que as distingue das células PM-1 já é suficiente para reconhecer estas duas células como entidades independentes. Ambas, PM-1 e PM-2, co-existem no peritônio, realizando funções, provavelmente, distintas e, por isso, devem ser estudadas como duas populações de fagócitos que respondem de forma diferente mediante estímulo.

Nossa proposta de dividir os macrófagos em dois subgrupos pode fazer surgir uma, aparentemente lógica, associação das células PM-1 e PM-2 aos já descritos macrófagos M1 e M2. A subdivisão M1/M2 foi uma analogia direta aos previamente descritos linfócitos Th(helper)1 e Th2¹²⁶. Charles D. Mills (*University of Minnesota/EUA*) e colaboradores observaram que os macrófagos de camundongos aparentemente predispostos a desenvolver linfócitos do tipo Th1 (C57BL/6 e B10D2) possuíam um padrão de resposta ao estímulo diferente de “camundongos Th2” (BALB/c e DBA/2). Os macrófagos de “camundongos Th1” secretavam mais NO, enquanto que macrófagos de “camundongos Th2” secretavam mais TGF- β . Dessa

forma, Mills e colaboradores propuseram nomear estes macrófagos de M1 (para “camundongos Th1”) e M2 (para “camundongos Th2”)¹²⁶. Entretanto, pouco tempo depois, outros grupos de pesquisadores observaram que o fenótipo de macrófago M1 ou M2 poderia ser induzido, *in vitro*, mediante estímulo. Aparentemente, um micro-ambiente rico em LPS ou IFN- γ favorece o desenvolvimento de um macrófago M1 e, por outro lado, citocinas IL-4 e IL-13 induziriam um macrófago M2. Os macrófagos M1 foram também considerados pro-inflamatórios (com secreção de NO, espécies reativas de oxigênio e citocinas IL-12, IL-23, IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e os macrófagos M2 foram considerados importantes na etapa de reparação tecidual e antiinflamatória (secreção maior de IL-10 e TGF- β)¹²⁷⁻¹²⁹. Estes resultados, em certos aspectos, contrariaram a proposta inicial de Mills e colaboradores, os quais acreditavam em uma possível preponderância genética que determinaria o fenótipo M1 e M2.

Entretanto, parece que a comunidade científica percebeu que nomear os macrófagos como M1 e M2 seria uma simplificação desnecessária, capaz de gerar paradoxos e confundir o entendimento da já complexa resposta imune. Em suma, embora a descrição de macrófagos M1 e M2 seja legítima, ela não compartilha nenhuma das características atribuídas aos macrófagos PM-1 e PM-2 propostos nesta tese. Os macrófagos M1/M2 representam apenas um estado celular, uma condição decorrente de determinado estímulo. Já os macrófagos PM-1 e PM-2 são células distintas que co-habitam o peritônio de ambos os camundongos BALB/c e C57BL/6 (dados não mostrados) e, principalmente, respondem de forma diferente ao mesmo estímulo (neste caso: LPS, bactérias vivas ou mortas e *zymosan*).

Além dos macrófagos, encontramos um grande número de granulócitos no peritônio, principalmente eosinófilos. Estas células representam 5%-10% (valores relativamente constante) do total de células do peritônio de BALB/c não imunizado. Da mesma forma que ocorre com as células PM-2, após estímulo exógeno, o número (absoluto e relativo) de eosinófilos aumenta muito no peritônio e, portanto, estas células também podem representar marcadores de uma eventual infecção nos camundongos. Curiosamente, os eosinófilos também expressam baixos níveis de CD11b e F4/80, no entanto, diferente das células PM-2, não expressam níveis detectáveis de MHC-II.

Entretanto, Bogdan e colaboradores também identificaram, no peritônio, uma população que apresenta as mesmas características das células descritas neste

trabalho, ou seja, pequenas e muito granulosas. De acordo com suas análises, Bogdan classificou estas células como linfócitos NK, já que, de fato, expressavam níveis detectáveis de DX5¹². Em consonância com os dados apresentados neste trabalho, Bogdan também mostrou que estas populações peritoneais co-expressavam CD11b e F4/80 e, como esperado, não apresentavam níveis detectáveis de MHC-II¹². No entanto, alguns trabalhos^{120,121}, publicados pelo grupo do professor Siamon Gordon, mostram que as células que apresentam o fenótipo CD11b⁺, F4/80^{low}, SSc^{high} são, de fato, eosinófilos peritoneais. A fim de elucidar estes dados, nós realizamos uma nova citometria e confirmamos que estas células, as quais chamamos aqui de eosinófilos, de fato, expressam níveis detectáveis (porém baixos) da molécula DX5. Embora este dado esteja em consonância com os dados de Bogdan e colaboradores, eles não são suficientes para caracterizar esta população como linfócito NK, já que o marcador DX5 pode também ser expresso em outras populações celulares. Em vista deste dilema, resta-nos ainda realizar uma análise mais criteriosa desta população, como, por exemplo, a sua separação por FACS e sua conseqüente coloração específica e análise por microscopia.

Em suma, estes dados alertam para a necessidade da utilização de maior variedade de marcadores de superfície para isolar ou identificar células peritoneais, já que, como mostrado aqui, CD11b e F4/80 podem ser expressos em diversos subtipos celulares presentes na cavidade peritoneal.

Um dos protocolos mais utilizados atualmente para obtenção de macrófagos peritoneais é a injeção (intraperitoneal) de meio de tioglicolato (aproximadamente 1mL, 4%). Após quatro dias de inoculação, obtém-se as células peritoneais, considerando-se que mais de 90% sejam macrófagos recém-migrados. A fim de analisar os subtipos de macrófagos presentes no peritônio estimulado com tioglicolato reproduzimos este protocolo e, diferente do que se acreditava, menos da metade das células peritoneais representava macrófagos. Surpreendentemente, a maior parte destes macrófagos possuía fenótipo muito semelhante ao PM-2. Mais ainda, quase um terço das células do peritônio eram tipicamente eosinófilos (FSc^{low}, SSc^{high}, CD11b⁺ e F4/80^{low}). Dessa forma, poderíamos concluir que a maior parte dos resultados publicados sobre macrófagos estimulados com tioglicolato deve representar a resposta mista de eosinófilos e macrófagos PM-2.

Outra observação, surpreendente, foi a ausência de eosinófilos em camundongos F1 gerados a partir do cruzamento de camundongos BALB/c e CB.17.

Estes camundongos apresentam peritônio normal, muito semelhante (em fenótipo e porcentagem de células) ao de camundongos BALB/c, com exceção das células FSc^{low}, SSc^{high}, CD11b⁺ e F4/80^{low} (eosinófilos), as quais parecem estar completamente ausentes. Este fenômeno sugere que a geração ou desenvolvimento de eosinófilos (ou, de acordo com Bogdan, células NK) é dependente das alterações gênicas associadas aos haplótipos “a” e “b” da família de imunoglobulinas dos cromossomos dos camundongos BALB/c e CB.17, respectivamente.

A estratégia de *gating* para identificação destas células FSc^{low} e SSc^{high}, no gráfico de FACS, pode variar de acordo com o instrumento utilizado para coleta de dados. Por exemplo, utilizando um instrumento como o FACSCalibur (Becton & Dickinson, EUA) pode-se identificar estas células apenas com os seus parâmetros de *scatter* (FSc^{low} e SSc^{high}). Já o instrumento digital Aria (Becton & Dickinson, EUA) possui uma aparelhagem eletrônica, *lasers* e detectores de *scatter* que torna mais difícil a distinção entre células SSc^{low} e SSc^{high}. Dessa forma, dependendo do aparelho de FACS disponível, deve-se realizar a análise destas células utilizando, além dos parâmetros de *scatter*, marcadores fenotípicos apropriados.

Ainda, a leitura e *display* de *scatter* (FSc e SSc) de FACS pode ser analisada em escala linear ou logarítmica. Neste trabalho, todas as leituras de parâmetro de SSc foram coletadas em escala logarítmica e as de FSc em escala linear. Esta forma de *display* mostrou-se muito mais eficiente do que utilizar escala linear em ambos FSc e SSc, já que as diversas populações celulares tornam-se mais evidentes e distinguíveis entre si.

Em suma, estes achados a respeito dos granulócitos mantêm-se inexplorados e necessitam de uma investigação detalhada a respeito da sua origem, fenótipo e função.

5.2 Doublets

Via de regra, a identificação de células B-1 por FACS sempre foi realizada pela análise das células presentes entre a população de linfócitos (“janela dos linfócitos”) do peritônio, ou seja, FSc^{low} e SSc^{low}. Entretanto, realizando uma análise mais criteriosa na “janela dos leucócitos FSc^{high}” do peritônio, na qual encontra-se essencialmente macrófagos, pôde-se observar que mais de um terço destas células FSc^{high} e SSc^{high} expressava marcadores de células B, como CD19 e IgM (Fig.1C). Através da análise por microscopia confocal, foi mostrado que estas células

representam duas células B-1 aderidas entre si. Estes dados, certamente, induziram a rediscussão acerca da biologia de células B-1 peritoneais, já que acreditava-se que as células B-1 encontradas nesta região (*gate*) dos macrófagos representavam linfócitos B-1 de tamanho maior que o convencional. Embora deva haver, de fato, linfócitos B-1 de tamanho variável (grandes e pequenas), esta possível diferença de tamanho ainda manteria estas células dentro da “janela dos linfócitos” (FSc^{low}, SSc^{low}). Dessa forma, todas as células com fenótipo de B-1 e presentes na “janela dos leucócitos FSc^{high}” representam duplas ou *doublets* de B-1.

Em primeira análise, a existência de mais de um terço de *doublets* de B-1 no peritônio dificulta muito a real contagem do valor absoluto de células B-1 que habitam o peritônio. Considerando a grande porcentagem de *doublets* de B-1 (34% do total da “janela dos leucócitos FSc^{high}”) encontrada no peritônio, o número absoluto de células B-1 (contadas individualmente) deve, de fato, ser o dobro do número que era considerado até então. Vale lembrar que cada evento (*dot*) único de *doublet* computado pelo FACS representa duas células (B-1), ou seja, dois eventos. Assim sendo, em números absolutos de células (independente se estiverem juntas, em forma de *doublets*, ou apenas *singlets*), aproximadamente 50% dos leucócitos FSc^{high} e quase 70% dos linfócitos representam linfócitos B-1. Considerando um peritônio com 5×10^6 células totais, aproximadamente, 3×10^6 destas células representariam linfócitos B-1, dos quais $1,3 \times 10^6$ (quase a metade do total de B-1) encontrar-se-iam na “janela dos leucócitos FSc^{high}” em forma de *doublets* (B-1+B-1) e, por isso, não seriam considerados nas contagens usuais de células B-1 peritoneais. Os valores, citados acima, foram calculados com base nas porcentagens dos *gates* (janelas) seqüenciais mostrados na Fig.1, que indicam os subtipos de células peritoneais.

As células B-1 CD11b⁺ parecem ser necessárias para iniciar ou manter a formação de *doublets*, já que todas as células *doublets* detectadas expressam CD11b. De acordo com estes dados, observou-se que a formação de *doublets* não ocorre ou, pelo menos, é muito afetada, nas diversas situações nas quais as células B-1 CD11b⁺ estão ausentes, como nos recipientes de células B-1 CD11b⁻ (experimentos de transferência de células Fig. 14A, gráficos de *scatter*), no baço de animais não estimulados (dado não mostrado) e na fase neonatal, durante a ontogenia de células B-1, quando as células CD11b⁺ ainda não surgiram no peritônio. Ainda não está claro se apenas uma ou ambas as células B-1 devem

expressar CD11b para iniciar a formação de *doublets*, no entanto, está claro que pelo menos uma delas deve, necessariamente, expressar esta integrina.

A função destas células *doublets* também não está clara até o momento. No entanto, a sua presença ubíqua e sua frequência quase constante em todas as cepas de camundongos (de diversas idades) testadas, sugere que estas células representam um importante componente do sistema imune e, mais ainda, reforça a observação de que a expressão de CD11b deve marcar um subtipo funcional de células B-1 do peritônio.

Inevitavelmente, a observação de dois linfócitos B-1 aderidos entre si logo sugere a existência de uma possível sinapse imunológica de células B. Dados recentes, obtidos em colaboração com o laboratório dos Drs. Herzenberg, mostram, por meio de ensaios de microscopia eletrônica, que, durante a aderência, uma ou ambas as células envolvidas na formação de *doublets* reorganizam suas mitocôndrias, deixando-as próximas à região de contato entre as células. Este fenômeno sugere a existência de uma comunicação (sinapse), ou troca de informação, entre as duas células B-1 (Ghosn, E.E.B.; Fukuhara, T & Herzenberg, L.A., manuscrito em preparação). Estes dados também abrem novos caminhos para o estudo da sinapse imunológica, que até o momento é representada pela interação entre uma APC e uma célula T. Essa sinapse T-APC resulta na ativação, proliferação e diferenciação de células T, um fenômeno fundamental que inicia e determina o tipo de resposta adaptativa.

Estudos recentes mostram que o processo de captura de antígenos por células B é um fenômeno dinâmico e muito mais amplo do que previamente sugerido. Na realidade, sabe-se que os antígenos solúveis, sejam eles de origem endógena ou exógena, ligam-se de forma específica, ou melhor, reconhecem os receptores de células B (BCR), os quais representam anticorpos de superfície celular. Após reconhecimento, diversos eventos (cascatas de sinalização intracelular) favorecem a internalização e o processamento de determinado antígeno, que, em seguida, é expresso, ou apresentado, através da molécula de MHC-II para células T. Este mecanismo de apresentação de antígeno também representa uma sinapse imunológica, que, neste caso, não apenas ativa a célula T, mas, também, auxilia os linfócitos B a transformarem-se em células secretoras de anticorpos.

Recentemente, foi descoberto que os linfócitos B são capazes de espriar e estender sua membrana citoplasmática na busca por antígenos^{117,118,130-134}. Esse processo parece ocorrer, constantemente, *in vivo*, quando as células B no baço rastreiam a superfície de células dendríticas foliculares (FDC) na busca por antígenos¹³⁴. Essa alteração do esqueleto citoplasmático ocorre para facilitar a célula B, ou os seus BCR, a encontrar antígenos escassos e esse processo resulta numa sinapse imunológica quando as células B encontram antígenos expostos na superfície de outras células, como, por exemplo, as FDC. Essa sinapse entre B-APC (muito semelhante à sinapse T-APC) facilita o maior contato dos BCR da célula B com os antígenos expostos na APC. Esse processo é dependente de integrinas presentes na célula B como, por exemplo, LFA-1 (*lymphocyte function associated antigen-1*), que, por sua vez, ligam-se às moléculas presentes nas APC, como ICAM^{133,135}. Essa interação de integrinas (LFA-1-ICAM) favorece uma estabilidade para a sinapse, permitindo maior tempo de contato e, conseqüentemente, maior ativação de células B por intermédio da sinalização desencadeada pelo BCR^{133,135}.

Essa ligação inicial do BCR com os antígenos da APC inicia uma cascata de ativação na célula B, que aumenta sua capacidade de espriamento mediada pelas actinas citoplasmáticas (F-actinas), favorecendo o contato de mais BCR com os antígenos presentes na superfície da APC. Este *cluster* que forma da interação entre BCR-antígeno é chamado de *central supramolecular activation cluster* (cSMAC)¹¹². A região do cSMAC é cercada por um anel de integrinas chamado de *peripheral SMAC* (pSMAC), responsável, como já discutido, pela estabilidade e intensidade desta sinapse¹¹². Além de estabilizarem a sinapse, estas integrinas são essenciais para aumentar a área de contato entre os BCR e a APC. Este fenômeno permite a ativação de células B mesmo com baixas concentrações de antígenos presentes na superfície das APC, ou seja, as integrinas diminuem o *threshold* de antígenos necessário para desencadear a cascata de ativação da célula B¹³⁵.

Trabalhos mais recentes identificaram os eventos moleculares envolvidos na sinapse imunológica de células B com APC. Kevin B.L. Lin (*University of British Columbia/Canadá*) e colaboradores ganharam a capa da revista *Immunity*, de janeiro de 2008, ao mostrarem que algumas GTPases (*guanosine triphosphatase*) da família Rap (pequenas proteínas pertencentes à superfamília do oncogene *ras*) são essenciais para iniciarem o espriamento e a sinapse imunológica das célula B com células APC¹¹². Na mesma edição da revista *Immunity*, outros autores estudaram as

vias de sinalização intracelular responsáveis pela ativação destas GTPases. Eloisa Arana (*London Research Institute/Reino Unido*) e colaboradores concluíram que a ativação das tirosinas-quinases da família Src (sigla para sarcoma), tais como, PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*), Rac (*ras-related C3 botulinum toxin substrate*), Vav1 e Vav2 (proteínas pertencentes à família de oncogenes *Vav*) são fundamentais para ativar a GTPase Rap e favorecer a formação do pSMAC, permitindo uma sinapse eficiente entre as células B e as APC¹³⁶.

Em uma analogia direta com os dados obtidos neste trabalho, parece razoável considerar os *doublets* de B-1 como uma possível sinapse entre uma célula B e uma APC. Sabe-se que os linfócitos B também possuem ótima capacidade de apresentar antígenos e, por isso, são considerados APC. Os linfócitos B-1 também expressam ambos LFA-1 e ICAM (dados pessoais não publicados), além disso, como mostrado neste trabalho, os linfócitos B-1, envolvidos na formação de *doublets*, expressam CD11b, uma outra integrina igualmente capaz de ligar-se às ICAM das APC. Estes dados contribuem para a especulação de que os *doublets* encontrados na cavidade peritoneal de camundongos podem, de fato, representar uma sinapse imunológica fundamental para manter a fisiologia das células do peritônio. Como as células *doublets* também são encontradas em camundongos não estimulados, pode-se sugerir que esta constante sinapse entre células B-1 representa um evento fisiológico necessário para o constante reconhecimento de antígenos (provavelmente endógenos) e ativação de células B-1. Finalmente, a expressão de Mac-1 (CD11b) na célula B-1 pode ser um mecanismo fundamental para facilitar a sinapse imunológica, por meio da formação de pSMAC que resulta da ligação de integrinas (Mac-1 ou LFA-1) com ICAM, também presentes na superfície das células B-1. Os estudos para a confirmação de sinapse imunológica entre células B-1 já foram iniciados em colaboração com Dr. Takeshi Fukuhara (*Stanford University/EUA*) e terão continuidade durante um eventual programa de pós-doutorado em Stanford (manuscrito em preparação).

Além da sinapse entre duas células B, também observou-se que os linfócitos B-1 formam *doublets* com macrófagos peritoneais. Mais especificamente, um terço (~30%) das células aqui chamadas de PM-2 está aderido a um linfócito B-1. Entre os macrófagos PM-1, apenas 5% do total destas células ligam-se às células B-1. Entretanto, como descrito anteriormente, em valores absolutos, a quantidade de *doublets* de B-1 com PM-1 ou PM-2 é muito semelhante, já que existe muito mais

células PM-1 no peritônio. Os resultados obtidos pela análise de *doublets* no peritônio, bem como a discussão sobre a necessidade de se rever os métodos de obtenção de macrófagos peritoneais (por aderência), foram apresentados, em forma de pôster, no 13th *International Congress of Immunology* (Rio de Janeiro, 2007), o qual encontra-se incorporado no final deste trabalho, em Apêndice III.

A interação entre uma célula B-1 e um macrófago é um fenômeno que se mostra coerente com a literatura, já que, recentemente, foi mostrado que células B fazem sinapse com APC a fim de rastrear e reconhecer antígenos dispostos na superfície dos fagócitos (discutido acima). Em primeira análise, os dados descritos neste trabalho oferecem novos caminhos para o estudo do fenômeno de sinapse imunológica entre células B e células apresentadoras de antígeno. Em uma análise mais ampla e descompromissada (e, portanto, especulativa), pode-se sugerir que estes dados abrirão novos caminhos para a compreensão do funcionamento do sistema imune fisiológico, que, aparentemente, deve representar um sistema de auto-reconhecimento (uma visão contrária à teoria de “reconhecimento e resposta contra o não-próprio”), já que os *doublets* de B-1 existem em abundância mesmo em camundongos não estimulados com antígenos exógenos.

Durante o programa de doutorado com estágio no exterior (PDEE-CAPES) realizado em Stanford nos EUA, foi tema central de pesquisa a identificação e caracterização de um subtipo de linfócito B-1 capaz de transformar-se em fagócito mononuclear. Esse projeto iniciou-se no Brasil, com os trabalhos do Dr. Sandro R. de Almeida, como já discutido na seção Introdução. No decorrer das análises de células peritoneais, foi claramente identificada uma população, sempre constante em frequência, de células duplamente positivas para marcadores de macrófagos e linfócitos B-1 (ex.: co-expressão de F4/80^{low}, CD11b^{int}, CD19^{high} e IgM^{high}). Estes dados inéditos logo permitiram sugerir que estas células poderiam representar as tão procuradas *lymphophages* (nome sugerido para estas células B-1 fagocíticas, como descrito na seção Introdução). Entretanto, durante análise microscópica das supostas *lymphophages*, observou-se que as tais se tratavam de células B-1 aderidas aos macrófagos. Mais especificamente, estas células foram caracterizadas como *doublets* de B-1 e PM-2. Naquele momento, não se tinha conhecimento sobre a existência de células PM-2 e acreditava-se que todos os macrófagos peritoneais representassem PM-1, ou seja, F4/80^{high} e CD11b^{high}. Como as células PM-2 apresentam um fenótipo diferente de PM-1, a formação de *doublets* de B-1 e PM-2

resultou num fenótipo (na análise de FACS) inédito e desconhecido até então, o que favoreceu a interpretação equivocada de que essas células (*doublets*) poderiam representar *lymphophages*.

Ainda na tentativa de identificar possíveis linfócitos B-1 fagocíticos, foram realizados ensaios de fagocitose *in vivo* a fim de descrever quais das células peritoneais são as responsáveis por fagocitar partículas injetadas diretamente no peritônio. Observou-se que os linfócitos B-1 peritoneais, sejam eles *doublets* ou *singlets*, não foram capazes de fagocitar bactérias (vivas ou mortas) durante as primeiras 24h de análise. Em todos os experimentos, pequena população de linfócitos B-1 mostrou-se positiva para gfp, indicando possível fagocitose de bactérias gfp⁺. No entanto, após ensaio de microscopia confocal para comprovar tal fenômeno, observou-se que as bactérias estavam apenas aderidas à superfície celular de B-1, gerando esse resultado falso positivo na análise por FACS. Respeitando as possíveis limitações inerentes a esse modelo experimental, os dados obtidos sugerem a ausência de células B fagocíticas funcionais *in vivo*.

Embora ainda tenham sido identificados subtipos de células B-1 capazes de se transformar em fagócitos mononucleares *in vivo*, alguns trabalhos recentes convidam a repensar este fenômeno e a considerar possível a existência de *lymphophages*. O mesmo trabalho que descreveu o processo de espraiamento e sinapse de célula B, também demonstrou que estas células B, tanto da linhagem A20 como linfócitos B esplênicos, são capazes não apenas de espraiar-se em lâmina contendo anti-BCR (anti-IgM) ou anti-integrinas (anti-LFA-1) mas, também, que esse processo é seguido de uma internalização de partículas não solúveis¹¹². Neste modelo, os autores utilizaram estruturas esféricas como *beads* opsonizados com anticorpos e mostraram, claramente, que as células B realizaram a internalização destes *beads* num processo dependente da mesma via de ativação da sinapse, ou seja, através de GTPase Rap1¹¹². Embora os autores tenham evitado utilizar o termo fagocitose, sabe-se que o processo de internalização de partículas grandes não solúveis pode ser (ou deve ser) considerado fagocitose.

Outro trabalho, de um grupo do Japão, mostrou que algumas células B são capazes de “internalizar” bactérias opsonizadas por meio de um receptor de anticorpos (receptor Fc μ , ou seja, receptor da região Fc de IgM) que era desconhecido até então – e que foi descrito e caracterizado pelos mesmos autores deste trabalho¹³⁷. Ainda, estudos que bloqueiam condicionalmente fatores de

transcrição, como Pax-5, essencial para manter a identidade de células B, mostram que células B diferenciadas são capazes de se reprogramarem e adquirirem fenótipo e função de uma outra linhagem hematopoiética¹¹³. Enfim, não está claro se, entre os pesquisadores de células B, existe uma “saga” consciente em busca dos *lymphophages*, mas, certamente, as novas descobertas sobre a biologia de células B nos conduz cada vez mais próximos de fenômenos que, surgindo ao acaso, parecem confirmar finalmente a existência de um novo subtipo celular que iria compor a já complexa população de células do sistema mononuclear fagocítico: os *lymphophages*.

5.3 Linfócitos

Dentre a população de linfócitos (47%) do peritônio, aproximadamente, 70% são células B-1 (B-1a=50% e B-1b=20%), 12% são B-2 e B *switched* e 8% são linfócitos T. Embora muito se saiba a respeito do repertório e função dos linfócitos B-1, nada se sabe sobre os subtipos de linfócitos T e B-2 que se abrigam no peritônio. Existe, ainda, na “janela dos linfócitos”, uma diversidade celular que não foi possível de ser identificada neste trabalho. Estas células apresentam níveis variáveis de expressão de MHC-II e CD11b (Fig.1B) e não expressam nenhum marcador utilizado aqui para identificar células B e T. Um trabalho realizado por Bogdan e colaboradores, que descreve populações da cavidade peritoneal, mostrou que, aproximadamente, 15% da população tipicamente encontrada na “janela dos linfócitos” co-expressam DX5 e NK1.1, sendo identificadas como linfócitos NK¹² (ou iNKT, descritos na seção Introdução). Estes dados sugerem que parte das células linfóides, não identificadas neste trabalho (Fig.1B), possam, também, representar células NK (ou iNKT).

Um estudo realizado pela Dra. Yang Yang (*Research Associate* do laboratório dos Drs. Herzenberg) mostrou que dentre o *pool* de linfócitos do peritônio, existe uma pequena fração de aproximadamente 3% de linfócitos iNKT. Estes resultados foram obtidos através da utilização de tetrâmeros de moléculas CD1d ligadas a α -GalCer (*α -Galactosyl Ceramide*) que são reconhecidos pelo receptor $\alpha\beta$ invariável destas células iNKT (dados não publicados). Como controle, Yang utilizou camundongos CD1^{-/-} que são deficientes de células NKT. Dessa forma, poder-se-ia inferir, a partir destes dados, que parte dos linfócitos peritoneais não identificados neste trabalho deve representar linfócitos iNKT (Fig.1B).

Ainda sobre os linfócitos peritoneais, Yang realizou um experimento utilizando LPS de bactérias *Francisella tularensis*, bactérias patogênicas responsáveis pela doença chamada tularemia. Diferente do LPS de *Salmonella typhi*, LPS de *F. tularensis* representa pouca endotoxicidade e não ativa o receptor TLR4. Este LPS foi injetado em camundongos BALB/c por via i.v. e em poucas horas pôde-se observar uma resposta antígeno-específica (aparentemente monoclonal) de células B-1 anti-LPS de *F. tularensis*. Estas células B-1 migraram para o baço e transformaram-se em plasmócitos. No entanto, numa fase tardia (~15 dias) após imunização, observou-se no peritônio a proliferação e o acúmulo de células B-1b antígeno-específicas (anti-LPS) e duradouras. Quase a metade destas células B-1b representava células de memória e rearranjava sua classe de imunoglobulina para IgG3 e IgG1. Baseada nestes dados e também na análise de camundongos *naïve*, Yang sugere que as células que rearranjam a classe de imunoglobulina (*switching*) no peritônio devem pertencer aos linfócitos B-1, especialmente, B-1b (dados não publicados, comunicação pessoal). Condizentes com estes dados, alguns trabalhos (descritos na seção Introdução) também demonstram linfócitos B-1b de memória, capazes de gerar proteção de longo prazo por meio de secreção de anticorpos antígeno-específicos durante infecção por bactérias, como *Borrelia hermsii*¹⁰⁰ e *Streptococcus pneumoniae*¹⁰¹.

Linfócitos B-1 peritoneais são, geralmente, conhecidos pela sua expressão da molécula CD11b, a qual é co-expressa com CD18 para formar a integrina Mac-1 que age como um receptor de complemento e uma molécula de adesão. Entretanto, embora esteja sugerido na literatura que todas as células B-1 expressam CD11b, os estudos, apresentados neste trabalho, mostram que metade desses linfócitos, em ambos os compartimentos de B-1a e B-1b, não expressa esse receptor de superfície. Quanto aos seus fenótipos, as células B-1 CD11b⁺ são maiores, mais granulosas e expressam mais IgM e menos IgD de superfície quando comparadas com as B-1 CD11b⁻. E, ainda, as células B-1 CD11b⁺ iniciam a formação de *doublets* (ou seja, uma forte e estável aderência entre duas células B-1), presentes em grandes concentrações no peritônio de camundongos adultos. Curiosamente, as células B-1 CD11b⁺, embora auto-renováveis, possuem menor capacidade de reconstituição: quando separadas e transferidas para animais congênicos, estas células reconstituem somente seu próprio compartimento e não reconstituem níveis detectáveis de células CD11b⁻. Em contraste, as células B-1 CD11b⁻, transferidas

nas mesmas condições, reconstituem, eficientemente, todos os componentes dos linfócitos B-1 peritoneais em proporções adequadas. Durante a ontogenia, estas células B-1 CD11b⁻ surgem no peritônio antes das células CD11b⁺. Entretanto, existe clara diferença de fenótipo entre essas células B-1 neonatais (IgM^{high}, CD5^{high}) e adultas (IgM^{int}, CD5^{int}).

Neste trabalho, foi demonstrado que as células B-1 CD11b⁻ dão origem às células B-1 CD11b⁺. Entretanto, considerando os limites deste estudo, não se pode descartar a hipótese das células B-1 CD11b⁺ também darem origem às células B-1 CD11b⁻, mediante estímulo ou em períodos superiores aos analisados neste trabalho. Todavia, os resultados mostram, claramente, que as células B-1 CD11b⁻ possuem capacidade muito maior de reconstituição dos subtipos de B-1 peritoneais do que as células B-1 CD11b⁺.

O desenvolvimento de células B-1 CD11b⁻ e CD11b⁺ ocorre para ambos os subtipos, já conhecidos, de B-1: B-1a e B-1b. Dessa forma, as células CD11b⁻ e CD11b⁺ estão representadas em igual freqüência, em ambas as populações B-1a e B-1b. Recentemente, Thomas Rothstein (*Harvard University/EUA*) e colaboradores reconheceram a existência de células B-1 CD11b⁻ e logo sugeriram que estes linfócitos representariam um novo subtipo de B-1, resolvendo nomeá-las de B-1c¹³⁸. Entretanto, a existência de células CD11b⁻ e CD11b⁺ em ambos os compartimentos de B-1a e B-1b, e a evidência de um estágio seqüencial de desenvolvimento de células CD11b⁻ para CD11b⁺, atestam, fortemente, contra a designação de células CD11b⁻ como um novo subtipo (B-1c) de células B-1, em conjunto com as já existentes B-1a e B-1b. Em contraste, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as células B-1 CD11b⁻ e CD11b⁺ representam subdivisões funcionais e de desenvolvimento, que existem dentro dos compartimentos de B-1a e B-1b.

Por enquanto, talvez seja mais apropriado referir-se aos subtipos de CD11b apenas como células B-1 CD11b⁻ ou B-1 CD11b⁺, já que a molécula CD11b representa, no momento, o melhor marcador para identificar estes dois subtipos de B-1. Como mostrado na Tabela 1, outros fenótipos (marcadores) capazes de diferenciar entre estes dois subtipos de células B-1 já foram identificados, entretanto, outros marcadores podem surgir e, eventualmente, mostrarem-se, funcionalmente e fenotipicamente, mais relevantes para identificar e classificar estes novos subtipos celulares. Dessa forma, parece mais prudente esperar antes de, definitivamente, nomear e classificar estas células. Os dados apresentados neste trabalho, relativos

a expressão de CD11b nos subtipos de células B-1, foram publicados recentemente, em colaboração com o grupo da Dra. Herzenberg, na revista *PNAS*, e estão incorporados no final deste trabalho, em Apêndice I.

As funções que distinguem as células B-1 CD11b⁻ das células CD11b⁺ estão, ainda, por serem determinadas. No entanto, foi demonstrado, recentemente, que LPS intravenoso é capaz de induzir a migração de células B-1 do peritônio para o baço. Estas células, recém-migradas, expressam CD11b nos mesmos níveis detectados nas células B-1 que estão no peritônio¹⁴. Logo que estas células B-1 CD11b⁺ entram no baço, perdem gradativamente sua expressão de CD11b até tornarem-se fenotipicamente semelhante às células B-1 esplênicas, ou seja, CD11b⁻. Algumas dessas células imigrantes (~30%) iniciam o processo de divisão celular e, eventualmente, adquirem alta expressão de CD138 e *B-lymphocyte-induced maturation protein 1* (Blimp-1, fator de transcrição envolvido na diferenciação para plasmócitos), resultando em células secretoras de anticorpos naturais. Diferentemente das células B-1 residentes no baço, as quais transformam-se em plasmócitos logo nas primeiras horas após o estímulo, as células B-1 que migraram do peritônio para o baço precisam antes iniciar o processo de proliferação celular para depois transformarem-se em plasmócitos¹⁴. Esse processo leva, em média, 3 dias e, portanto, a rápida secreção de anticorpos, vista logo nas primeiras horas após o estímulo, deve-se, principalmente, aos plasmócitos de B-1a residentes no baço ou vindos de outro lugar diferente do peritônio.

As células que não desenvolvem-se em plasmócitos, também perdem CD11b e entram para o *pool* de células B-1 residentes do baço. É possível, portanto, que estas células B-1 CD11b⁻ do baço retornem para o peritônio e juntem-se ao *pool* de células CD11b⁻ do peritônio. Eventualmente, estas células poderiam reiniciar sua expressão de CD11b e juntarem-se, agora, ao *pool* de células B-1 CD11b⁺ do peritônio, que, por sua vez, podem voltar ao baço para reiniciar o ciclo. Embora as células B-1 sejam auto-renováveis durante a vida adulta do camundongo, raramente este processo de divisão celular ocorre no peritônio. Como as células B-1 do peritônio podem se dividir no baço, este ciclo de migração do peritônio para o baço e de volta para o peritônio deve ser central para a contínua capacidade de auto-renovação destas células B-1 na fase adulta do camundongo. Estes estudos, realizados em colaboração com Yang Yang, foram publicados em 2007 pela revista *PNAS* e encontram-se incorporados no final deste trabalho, em Apêndice II.

Não é surpreendente o fato de que as células B-1 CD11b⁺ sejam capazes de migrar para o baço de forma mais eficiente que as células CD11b⁻. Como já discutido nesta seção, CD11b representa uma cadeia α , que associada à cadeia β (CD18), forma a integrina Mac-1/CR3. Além do seu papel como receptor de complemento, Mac-1 também representa uma importante molécula de adesão. Mac-1 liga-se, preferencialmente, às moléculas de adesão intercelular (ICAM) e, conseqüentemente, está envolvida no processo de migração celular. Portanto, a diferenciação de células CD11b⁻ para células CD11b⁺ deve representar um momento de preparação de uma população celular que estará pronta para migrar para o baço, e outros locais de secreção de anticorpos naturais, em resposta aos estímulos apropriados.

Mediante estímulo inflamatório, como, por exemplo, injeção de 15ug de LPS por via i.v., as células do peritônio são rapidamente atingidas e respondem em poucos minutos. Já na primeira hora, as células B-2 desaparecem do peritônio e essa (quase) ausência de B-2, em poucos minutos, parece representar a sua grande sensibilidade ao estímulo inflamatório, já que aumenta o número de células mortas, no peritônio, durante este período inicial. Logo em seguida, desaparecem, também, alguns macrófagos e células T. No entanto, não se sabe se o LPS atinge especificamente as células PM-1, PM-2 ou ambas. Apenas após 4h de estímulo *in vivo* é que os linfócitos B-1 começam a desaparecer e este processo deve estar relacionado com a sua migração para outros órgãos, já que, concomitantemente, aumenta o número absoluto de células B-1 no baço. Em um estudo de *follow-up* após estímulo, observou-se que o número de células B-1 no peritônio começa a retornar ao seu valor inicial (camundongo não estimulado) apenas dois dias após estímulo, quando o peritônio parece recuperar todos os seus compartimentos celulares, em número e freqüência. Entretanto, ainda não se sabe o que ocorre com ambos os subtipos (CD11b⁻ e CD11b⁺) de células B-1 após estímulo *in vivo* com LPS. Estes dados, ainda não publicados, representam o resumo de um estudo paralelo a este trabalho apresentado aqui, que foi iniciado no laboratório dos Drs. Herzenberg, a fim de compreender a dinâmica das células peritoneais após estímulo inflamatório induzido, *in vivo*, por meio de injeção i.v. de LPS.

Em suma, podemos sugerir que, após estímulo inflamatório, as células B-1 CD11b⁺ migram do peritônio para o baço, onde perdem a expressão de CD11b,

iniciam o processo de divisão celular e começam a expressar CD138 para, finalmente, transformarem-se em células secretoras de anticorpos (plasmócitos).

Curiosamente, no peritônio, linfócitos B-1 não são capazes de expressar CD138 e de se transformar em plasmócitos convencionais. Nesta tese, mostramos que, diferentemente de células PM-2, as células PM-1 são as responsáveis por esta inibição da formação de plasmócitos. Ensaio *in vitro* mostraram que linfócitos B-1 peritoneais são capazes de se transformar em plasmócitos apenas na ausência de macrófagos PM-1, ou seja, quando as células B-1 do peritônio são separadas por FACS e cultivadas na presença de LPS. A adição de macrófagos PM-1 na cultura de linfócitos B-1 inibe completamente a expressão de CD138.

Entretanto, ainda não é possível afirmar se as células PM-1 inibem o processo de diferenciação de células B-1 em plasmócitos ou se as células PM-1 inibem apenas a proliferação de células B-1 e conseqüentemente a formação de plasmócitos. Vale ressaltar que, diferentemente do que era esperado, os macrófagos PM-1 quando colocados em cultura, na presença de LPS, são capazes de se proliferar intensamente resultando numa progênie com fenótipo idêntico à progenitora PM-1. Esta capacidade de proliferação de PM-1 parece sobrepor a capacidade de proliferação de células B-1 *in vitro*, resultando na expansão de PM-1 e inibição de B-1.

Um dos possíveis mecanismos de inibição da formação de plasmócitos por células PM-1 poderia ser a produção de NO. Como mostrado nesta tese, as células PM-1 são capazes de produzir doses altas de NO. Os mecanismos de ação de NO podem ser muito antagônicos já que depende muito da sua concentração no micro-ambiente e também da concentração de outras moléculas, principalmente de espécies reativas de oxigênio. De forma geral, e simplificada, NO em altas concentrações pode agir de forma tóxica nas células imunes. Estas hipóteses serão testadas e fazem parte de um novo projeto que será desenvolvido durante o meu treinamento de pós-doutorado. Em suma, estes dados sugerem que a migração de linfócitos B-1 do peritônio para o baço (mediante estímulo inflamatório) possa indicar uma necessidade de B-1 de se afastar de células PM-1 e encontrar, no baço, um micro-ambiente favorável para o desenvolvimento de plasmócitos e secreção de anticorpos naturais.

Sabe-se que as células B-1 são responsáveis pela produção de anticorpos naturais e que uma parte deste repertório representa auto-anticorpos. Dessa forma,

a produção de auto-anticorpos por células B-1 pode estar relacionada ao desencadeamento de doenças auto-imunes. Em consonância com esta observação, vários trabalhos já relacionaram a produção de auto-anticorpos por linfócitos B-1 e o desenvolvimento de doenças auto-imunes. Por exemplo, a produção descontrolada de anticorpos anti-dupla fita de DNA por células B-1 pode favorecer o desenvolvimento de Lupus Eritematoso Sistêmico (LES). Esse perfil de anticorpos é visto nos camundongos F1(NZBxNZW), os quais representam um modelo experimental para o estudo de LES.

De acordo com os dados apresentados nesta tese, os macrófagos PM-1 parecem controlar o processo de desenvolvimento de células B-1 em plasmócitos. Dessa forma, resta-nos saber se nestes animais F1(NZBxNZW) existe alguma deficiência no *pool* de células PM-1. Tal deficiência poderia estar contribuindo para desregular o controle de desenvolvimento de plasmócitos *in vivo*. Por exemplo, a ausência de células PM-1 poderia induzir a proliferação descontrolada de células B-1 secretoras de auto-anticorpos (plasmócitos). Esta hipótese também será testada nos experimentos futuros.

Um estudo publicado recentemente mostrou que a expressão de CD11b nas células apresentadoras de antígenos (APC) facilita a indução de tolerância periférica e geração de linfócitos T reguladores (T_{reg})¹³⁹. Utilizando camundongos *knockout* de CD11b (que resulta numa normal maturação de APC), os autores mostraram que as APC CD11b^{-/-} (obtidas por aderência de células totais do baço) secretam mais IL-6 e induzem a diferenciação de células T em células Th17 (T *helper* 17, secretoras de citocinas pró-inflamatórias como IL-17), dificultando a indução de células T_{reg} . Em suma, os autores concluíram que a molécula CD11b facilita a indução de tolerância (oral) periférica através da sua capacidade de suprimir a diferenciação de células T em células Th17¹³⁹.

Considerando que um linfócito B-1, assim como toda célula B, pode agir como uma APC, poder-se-ia especular que o subtipo de B-1, que expressa CD11b, pode representar, de fato, um subtipo funcional de célula B, responsável pela indução de uma determinada resposta imune adaptativa. Em consonância com esta especulação, Rothstein e colaboradores mostraram que as células B-1 e B-2 induzem a proliferação e diferenciação de diferentes subtipos de células T¹⁴⁰. As células B-1, quando apresentam antígenos para células T, parecem induzir, preferencialmente, uma proliferação e diferenciação de células Th17. Em contraste,

as células B-2 induzem a diferenciação de células T_{reg} . Todavia, os autores mostraram que o simples bloqueio da molécula CD86 em células B-1 é suficiente para que estas células comecem a induzir a proliferação e diferenciação de células T_{reg} ¹⁴⁰. Como mostrado neste trabalho, os linfócitos B-1 representam uma população muito heterogênea e, portanto, resta saber o real potencial dos diversos subtipos de células B-1, como, por exemplo, B-1a $CD11b^-$, B-1a $CD11b^+$, B-1b $CD11b^-$ e B-1b $CD11b^+$, em induzir a diferenciação de determinados subtipos de células T.

Finalmente, os dados mostrados neste trabalho expõem e desmistificam a cavidade peritoneal de camundongos, revelando novos subtipos e funções celulares e introduzindo novas metodologias de análise, as quais podem gerar outras perspectivas para a observação e compreensão do funcionamento das células do sistema imune. Ainda, o conhecimento sobre a comunicação que existe entre as células do peritônio e outros diversos compartimentos que abrigam as células imunes torna-se fundamental para se compreender os processos que regem o comportamento do sistema imune na fisiologia e nas doenças inflamatórias e auto-imunes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moore P. Embriologia Básica: Elsevier; 2004.
2. Steinman RM, Moberg CL. Zanvil Alexander Cohn 1926-1993. J Exp Med. 1994;179:1-30.
3. 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. 1962;35:12-28.
4. Cohn ZA, Benson B. The Differentiation of Mononuclear Phagocytes. Morphology, Cytochemistry, and Biochemistry. J Exp Med. 1965;121:153-170.
5. Cohn ZA, Fedorko ME, Hirsch JG. The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes. V. The formation of macrophage lysosomes. J Exp Med. 1966;123:757-766.
6. Cohn ZA, Hirsch JG, Fedorko ME. The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes. IV. The ultrastructure of macrophage differentiation in the peritoneal cavity and in culture. J Exp Med. 1966;123:747-756.
7. Hayakawa K, Hardy RR, Parks DR, Herzenberg LA. The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodefective, and autoimmune mice. J Exp Med. 1983;157:202-218.
8. Hardy RR, Hayakawa K, Haaijman J, Herzenberg LA. B-cell subpopulations identified by two-colour fluorescence analysis. Nature. 1982;297:589-591.
9. Herzenberg LA, Stall AM, Lalor PA, et al. The Ly-1 B cell lineage. Immunol Rev. 1986;93:81-102.
10. Marcos MA, Huetz F, Pereira P, Andreu JL, Martinez AC, Coutinho A. Further evidence for coelomic-associated B lymphocytes. Eur J Immunol. 1989;19:2031-2035.
11. Herzenberg LA, Tung J, Moore WA, Herzenberg LA, Parks DR. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. Nat Immunol. 2006;7:681-685.

12. 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;105:1319-1328.
13. Bogdan C, Schleicher U. Production of interferon-gamma by myeloid cells--fact or fancy? *Trends Immunol*. 2006;27:282-290.
14. Yang Y, Tung JW, Ghosn EE, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Division and differentiation of natural antibody-producing cells in mouse spleen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:4542-4546.
15. Mechnikov, Il. Immunity in infective diseases. By Il'ia Il'ich Mechnikov, 1905. *Rev Infect Dis*. 1988;10:223-227.
16. van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med*. 1968;128:415-435.
17. Wiktor-Jedrzejczak W, Gordon S. Cytokine regulation of the macrophage (M phi) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse. *Physiol Rev*. 1996;76:927-947.
18. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19:71-82.
19. Auffray C, Fogg D, Garfa M, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*. 2007;317:666-670.
20. Bordet J. Sur l'agglutination et la dissolution des globules rouges par la serum d'animaux injectés de sang defibriné. *Ann Inst Pasteur*. 1898;12:688-695.
21. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007;449:819-826.
22. Kabelitz D, Medzhitov R. Innate immunity--cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. *Curr Opin Immunol*. 2007;19:1-3.
23. Kuhn TS. *The Structure of Scientific Revolutions* (ed 1st.). Chicago: Univ. of Chicago Pr.; 1962.

24. Burnet FM. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA Cancer J Clin.* 1976;26:119-121.
25. Burnet FM. *The Clonal Selection Theory of Immunity* (ed 1st.). Nashville/London: The Vanderbilt and Cambridge University Presses; 1959.
26. Burnet FM. Immunological recognition of self. *Science.* 1961;133:307-311.
27. Tauber AI, Podolsky SH. Frank Macfarlane Burnet and the immune self. *J Hist Biol.* 1994;27:531-573.
28. 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;137:1142-1162.
29. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1989;54 Pt 1:1-13.
30. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216.
31. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:991-1045.
32. Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:469-478.
33. Brown GD, Gordon S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature.* 2001;413:36-37.
34. Herre J, Willment JA, Gordon S, Brown GD. The role of Dectin-1 in antifungal immunity. *Crit Rev Immunol.* 2004;24:193-203.
35. Mukhopadhyay S, Herre J, Brown GD, Gordon S. The potential for Toll-like receptors to collaborate with other innate immune receptors. *Immunology.* 2004;112:521-530.
36. Rosenstiel P, Jacobs G, Till A, Schreiber S. NOD-like receptors: Ancient sentinels of the innate immune system. *Cell Mol Life Sci.* 2008.

37. Martinon F, Gaide O, Petrilli V, Mayor A, Tschopp J. NALP inflammasomes: a central role in innate immunity. *Semin Immunopathol.* 2007;29:213-229.
38. Takeuchi O, Akira S. Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol Rev.* 2007;220:214-224.
39. Austyn JM, Gordon S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol.* 1981;11:805-815.
40. Hirsch S, Austyn JM, Gordon S. Expression of the macrophage-specific antigen F4/80 during differentiation of mouse bone marrow cells in culture. *J Exp Med.* 1981;154:713-725.
41. Lin HH, Faunce DE, Stacey M, et al. The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *J Exp Med.* 2005;201:1615-1625.
42. Boumsell L, Bernard A, Lepage V, Degos L, Lemerle J, Dausset J. Some chronic lymphocytic leukemia cells bearing surface immunoglobulins share determinants with T cells. *Eur J Immunol.* 1978;8:900-904.
43. Caligaris-Cappio F, Gobbi M, Bofill M, Janossy G. Infrequent normal B lymphocytes express features of B-chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med.* 1982;155:623-628.
44. Hardy RR, Hayakawa K, Haaijman J, Herzenberg LA. B-cell subpopulations identifiable by two-color fluorescence analysis using a dual-laser FACS. *Ann N Y Acad Sci.* 1982;399:112-121.
45. Hardy RR, Hayakawa K, Herzenberg LA, Morse HC, 3rd, Davidson WF, Herzenberg LA. Ly-1 as a differentiation antigen on normal and neoplastic B cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1984;113:231-236.
46. Hayakawa K, Hardy RR, Honda M, Herzenberg LA, Steinberg AD, Herzenberg LA. Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81:2494-2498.
47. Hardy RR. B-1 B cells: development, selection, natural autoantibody and leukemia. *Curr Opin Immunol.* 2006;18:547-555.
48. Hardy RR, Hayakawa K. Development and physiology of Ly-1 B and its human homolog, Leu-1 B. *Immunol Rev.* 1986;93:53-79.

49. Donze HH, Lue C, Julian BA, Kutteh WH, Kantele A, Mestecky J. Human peritoneal B-1 cells and the influence of continuous ambulatory peritoneal dialysis on peritoneal and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) composition and immunoglobulin levels. *Clin Exp Immunol.* 1997;109:356-361.

50. Hardy RR. Development of murine B cell subpopulations. *Semin Immunol.* 1990;2:197-206.

51. Hardy RR, Carmack CE, Li YS, Hayakawa K. Distinctive developmental origins and specificities of murine CD5+ B cells. *Immunol Rev.* 1994;137:91-118.

52. Hardy RR, Hayakawa K. CD5 B cells, a fetal B cell lineage. *Adv Immunol.* 1994;55:297-339.

53. Hardy RR. B-1 B cell development. *J Immunol.* 2006;177:2749-2754.

54. Kantor AB, Stall AM, Adams S, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Adoptive transfer of murine B-cell lineages. *Ann N Y Acad Sci.* 1992;651:168-169.

55. Kantor AB, Stall AM, Adams S, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:3320-3324.

56. Kantor AB, Herzenberg LA. Origin of murine B cell lineages. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:501-538.

57. Herzenberg LA. B-1 cells: the lineage question revisited. *Immunol Rev.* 2000;175:9-22.

58. Tung JW, Herzenberg LA. Unraveling B-1 progenitors. *Curr Opin Immunol.* 2007;19:150-155.

59. Kantor AB, Stall AM, Adams S, Watanabe K, Herzenberg LA. De novo development and self-replenishment of B cells. *Int Immunol.* 1995;7:55-68.

60. Lalor PA, Herzenberg LA, Adams S, Stall AM. Feedback regulation of murine Ly-1 B cell development. *Eur J Immunol.* 1989;19:507-513.

61. Casola S. Control of peripheral B-cell development. *Curr Opin Immunol.* 2007;19:143-149.

62. Lopes-Carvalho T, Foote J, Kearney JF. Marginal zone B cells in lymphocyte activation and regulation. *Curr Opin Immunol.* 2005;17:244-250.
63. Wortis HH, Teutsch M, Higer M, Zheng J, Parker DC. B-cell activation by crosslinking of surface IgM or ligation of CD40 involves alternative signal pathways and results in different B-cell phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:3348-3352.
64. Teutsch M, Higer M, Wang D, Wortis HW. Induction of CD5 on B and T cells is suppressed by cyclosporin A, FK-520 and rapamycin. *Int Immunol.* 1995;7:381-392.
65. Haughton G, Arnold LW, Whitmore AC, Clarke SH. B-1 cells are made, not born. *Immunol Today.* 1993;14:84-87; discussion 87-91.
66. Lam KP, Rajewsky K. Rapid elimination of mature autoreactive B cells demonstrated by Cre-induced change in B cell antigen receptor specificity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:13171-13175.
67. Lam KP, Rajewsky K. B cell antigen receptor specificity and surface density together determine B-1 versus B-2 cell development. *J Exp Med.* 1999;190:471-477.
68. Hayakawa K, Asano M, Shinton SA, et al. Positive selection of natural autoreactive B cells. *Science.* 1999;285:113-116.
69. Guo S, Ferl GZ, Deora R, et al. A phosphorylation site in Bruton's tyrosine kinase selectively regulates B cell calcium signaling efficiency by altering phospholipase C-gamma activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:14180-14185.
70. Contreras CM, Halcomb KE, Randle L, et al. Btk regulates multiple stages in the development and survival of B-1 cells. *Mol Immunol.* 2007;44:2719-2728.
71. Herzenberg LA, Kantor AB, Herzenberg LA. Layered evolution in the immune system. A model for the ontogeny and development of multiple lymphocyte lineages. *Ann N Y Acad Sci.* 1992;651:1-9.
72. Stall AM, Adams S, Herzenberg LA, Kantor AB. Characteristics and development of the murine B-1b (Ly-1 B sister) cell population. *Ann N Y Acad Sci.* 1992;651:33-43.
73. Montecino-Rodriguez E, Leathers H, Dorshkind K. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat Immunol.* 2006;7:293-301.

74. Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. New perspectives in B-1 B cell development and function. *Trends Immunol.* 2006;27:428-433.
75. Herzenberg LA, Tung JW. B cell lineages: documented at last! *Nat Immunol.* 2006;7:225-226.
76. Tung JW, Mrazek MD, Yang Y, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Phenotypically distinct B cell development pathways map to the three B cell lineages in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:6293-6298.
77. Godin I, Dieterlen-Lievre F, Cumano A. Emergence of multipotent hemopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:773-777.
78. Melchers F. Murine embryonic B lymphocyte development in the placenta. *Nature.* 1979;277:219-221.
79. Fagarasan S, Shinkura R, Kamata T, Nogaki F, Ikuta K, Honjo T. Mechanism of B1 cell differentiation and migration in GALT. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000;252:221-229.
80. Fagarasan S. Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;308:137-153.
81. Fagarasan S, Kinoshita K, Muramatsu M, Ikuta K, Honjo T. In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria. *Nature.* 2001;413:639-643.
82. Suzuki K, Meek B, Doi Y, Honjo T, Fagarasan S. Two distinctive pathways for recruitment of naive and primed IgM⁺ B cells to the gut lamina propria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:2482-2486.
83. Andrade L, Huetz F, Poncet P, Thomas-Vaslin V, Goodhardt M, Coutinho A. Biased VH gene expression in murine CD5 B cells results from age-dependent cellular selection. *Eur J Immunol.* 1991;21:2017-2023.
84. Kantor AB, Merrill CE, Herzenberg LA, Hillson JL. An unbiased analysis of V(H)-D-J(H) sequences from B-1a, B-1b, and conventional B cells. *J Immunol.* 1997;158:1175-1186.

85. Chumley MJ, Dal Porto JM, Kawaguchi S, Cambier JC, Nemazee D, Hardy RR. A VH11V kappa 9 B cell antigen receptor drives generation of CD5+ B cells both in vivo and in vitro. *J Immunol.* 2000;164:4586-4593.
86. Poncet P, Huetz F, Marcos MA, Andrade L. All VH11 genes expressed in peritoneal lymphocytes encode anti-bromelain-treated mouse red blood cell autoantibodies but other VH gene families contribute to this specificity. *Eur J Immunol.* 1990;20:1583-1589.
87. Huetz F, Sciard-Larsson EL, Pereira P, Portnoi D, Coutinho A. T cell dependence of the "natural" autoreactive B cell activation in the spleen of normal mice. *Eur J Immunol.* 1988;18:1615-1622.
88. Huetz F, Poncet P. Immunocompetence of peritoneal B cells. *Res Immunol.* 1989;140:75-87.
89. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:230-242.
90. Martin F, Kearney JF. B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr Opin Immunol.* 2001;13:195-201.
91. Amaral JF, Foschetti DA, Assis FA, Menezes JS, Vaz NM, Faria AM. Immunoglobulin production is impaired in protein-deprived mice and can be restored by dietary protein supplementation. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39:1581-1586.
92. O'Garra A, Chang R, Go N, Hastings R, Haughton G, Howard M. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur J Immunol.* 1992;22:711-717.
93. Szczepanik M, Akahira-Azuma M, Bryniarski K, et al. B-1 B cells mediate required early T cell recruitment to elicit protein-induced delayed-type hypersensitivity. *J Immunol.* 2003;171:6225-6235.
94. Askenase PW. Yes T cells, but three different T cells (alphabeta, gammadelta and NK T cells), and also B-1 cells mediate contact sensitivity. *Clin Exp Immunol.* 2001;125:345-350.
95. Tsuji RF, Szczepanik M, Kawikova I, et al. B cell-dependent T cell responses: IgM antibodies are required to elicit contact sensitivity. *J Exp Med.* 2002;196:1277-1290.

96. Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, et al. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science*. 1999;286:2156-2159.
97. Baumgarth N, Chen J, Herman OC, Jager GC, Herzenberg LA. The role of B-1 and B-2 cells in immune protection from influenza virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000;252:163-169.
98. Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown LE, Herzenberg LA, Chen J. B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *J Exp Med*. 2000;192:271-280.
99. Chen M, Mun HS, Piao LX, et al. Induction of protective immunity by primed B-1 cells in *Toxoplasma gondii*-infected B cell-deficient mice. *Microbiol Immunol*. 2003;47:997-1003.
100. Alugupalli KR, Leong JM, Woodland RT, Muramatsu M, Honjo T, Gerstein RM. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity*. 2004;21:379-390.
101. Haas KM, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity*. 2005;23:7-18.
102. Dawe CJ, Potter M, Leighton J. Progressions of a reticulum-cell sarcoma of the mouse in vivo and in vitro. *J Natl Cancer Inst*. 1958;21:753-781.
103. Bauer SR, Holmes KL, Morse HC, 3rd, Potter M. Clonal relationship of the lymphoblastic cell line P388 to the macrophage cell line P388D1 as evidenced by immunoglobulin gene rearrangements and expression of cell surface antigens. *J Immunol*. 1986;136:4695-4699.
104. Cumano A, Paige CJ, Iscove NN, Brady G. Bipotential precursors of B cells and macrophages in murine fetal liver. *Nature*. 1992;356:612-615.
105. Montecino-Rodriguez E, Leathers H, Dorshkind K. Bipotential B-macrophage progenitors are present in adult bone marrow. *Nat Immunol*. 2001;2:83-88.
106. Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. Identification of B/macrophage progenitors in adult bone marrow. *Semin Immunol*. 2002;14:371-376.

107. Borrello MA, Phipps RP. Fibroblasts support outgrowth of splenocytes simultaneously expressing B lymphocyte and macrophage characteristics. *J Immunol.* 1995;155:4155-4161.
108. Borrello MA, Phipps RP. The B/macrophage cell: an elusive link between CD5+ B lymphocytes and macrophages. *Immunol Today.* 1996;17:471-475.
109. Borrello MA, Phipps RP. Fibroblast-secreted macrophage colony-stimulating factor is responsible for generation of biphenotypic B/macrophage cells from a subset of mouse B lymphocytes. *J Immunol.* 1999;163:3605-3611.
110. Borrello MA, Palis J, Phipps RP. The relationship of CD5+ B lymphocytes to macrophages: insights from normal biphenotypic B/macrophage cells. *Int Rev Immunol.* 2001;20:137-155.
111. Almeida SR, Aroeira LS, Frymuller E, et al. Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. *Int Immunol.* 2001;13:1193-1201.
112. Lin KB, Freeman SA, Zabetian S, et al. The rap GTPases regulate B cell morphology, immune-synapse formation, and signaling by particulate B cell receptor ligands. *Immunity.* 2008;28:75-87.
113. Cobaleda C, Jochum W, Busslinger M. Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature.* 2007;449:473-477.
114. Schebesta A, McManus S, Salvagiotto G, Delogu A, Busslinger GA, Busslinger M. Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function. *Immunity.* 2007;27:49-63.
115. Lin KI, Angelin-Duclos C, Kuo TC, Calame K. Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol Cell Biol.* 2002;22:4771-4780.
116. Meech R, Kallunki P, Edelman GM, Jones FS. A binding site for homeodomain and Pax proteins is necessary for L1 cell adhesion molecule gene expression by Pax-6 and bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:2420-2425.
117. Carrasco YR, Batista FD. B cell recognition of membrane-bound antigen: an exquisite way of sensing ligands. *Curr Opin Immunol.* 2006;18:286-291.

118. Fleire SJ, Goldman JP, Carrasco YR, Weber M, Bray D, Batista FD. B cell ligand discrimination through a spreading and contraction response. *Science*. 2006;312:738-741.
119. Roederer M. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry*. 2001;45:194-205.
120. 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;33:2090-2097.
121. Taylor PR, Reid DM, Heinsbroek SE, Brown GD, Gordon S, Wong SY. Dectin-2 is predominantly myeloid restricted and exhibits unique activation-dependent expression on maturing inflammatory monocytes elicited in vivo. *Eur J Immunol*. 2005;35:2163-2174.
122. Genestier L, Taillardet M, Mondiere P, Gheit H, Bella C, Defrance T. TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J Immunol*. 2007;178:7779-7786.
123. Gururajan M, Jacob J, Pulendran B. Toll-like receptor expression and responsiveness of distinct murine splenic and mucosal B-cell subsets. *PLoS ONE*. 2007;2:e863.
124. Ogata H, Su I, Miyake K, et al. The toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells. *J Exp Med*. 2000;192:23-29.
125. Arnold L, Henry A, Poron F, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med*. 2007;204:1057-1069.
126. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000;164:6166-6173.
127. 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;71:271-278.
128. Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity*. 2005;23:344-346.

129. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002;23:549-555.
130. Allen CD, Okada T, Tang HL, Cyster JG. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science.* 2007;315:528-531.
131. Bajenoff M, Egen JG, Koo LY, et al. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity.* 2006;25:989-1001.
132. Hauser AE, Junt T, Mempel TR, et al. Definition of germinal-center B cell migration in vivo reveals predominant intrazonal circulation patterns. *Immunity.* 2007;26:655-667.
133. Carrasco YR, Batista FD. B-cell activation by membrane-bound antigens is facilitated by the interaction of VLA-4 with VCAM-1. *Embo J.* 2006;25:889-899.
134. Huang NN, Han SB, Hwang IY, Kehrl JH. B cells productively engage soluble antigen-pulsed dendritic cells: visualization of live-cell dynamics of B cell-dendritic cell interactions. *J Immunol.* 2005;175:7125-7134.
135. Batista FD, Arana E, Barral P, et al. The role of integrins and coreceptors in refining thresholds for B-cell responses. *Immunol Rev.* 2007;218:197-213.
136. Arana E, Vehlow A, Harwood NE, et al. Activation of the small GTPase Rac2 via the B cell receptor regulates B cell adhesion and immunological-synapse formation. *Immunity.* 2008;28:88-99.
137. Shibuya A, Sakamoto N, Shimizu Y, et al. Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nat Immunol.* 2000;1:441-446.
138. Hastings WD, Gurdak SM, Tumang JR, Rothstein TL. CD5+/Mac-1- peritoneal B cells: a novel B cell subset that exhibits characteristics of B-1 cells. *Immunol Lett.* 2006;105:90-96.
139. Ehrchiou D, Xiong Y, Xu G, Chen W, Shi Y, Zhang L. CD11b facilitates the development of peripheral tolerance by suppressing Th17 differentiation. *J Exp Med.* 2007;204:1519-1524.
140. Zhong X, Gao W, Degauque N, et al. Reciprocal generation of Th1/Th17 and T(reg) cells by B1 and B2 B cells. *Eur J Immunol.* 2007;37:2400-2404.

7. APÊNDICE

I. Eliver Eid Bou Ghosn, Yang Yang, James Tung, Leonard A. Herzenberg, and Leonore A. Herzenberg. "CD11b expression distinguishes sequential stages of peritoneal B-1 development". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.105(13), p.5195-5200, 2008.

II. Yang Yang, James Tung, Eliver Eid Bou Ghosn, Leonard A. Herzenberg and Leonore A. Herzenberg. "Division and differentiation of natural antibody-producing cells in mouse spleen". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.14(11), p.4542-4546, 2007.

III. Eliver Eid Bou Ghosn, James Tung, Yang Yang, Gregori Govoni, Sandro Rogério de Almeida, Leonard A. Herzenberg & Leonore A. Herzenberg. "Macrophages and Monocytes exist as *doublets* with B-1 cells in the mouse peritoneal cavity (PerC): a need to revisit the currently used PerC adherent cell protocol for macrophages purification". Pôster (resumo) apresentado no 13th *International Congress of Immunology*, Rio de Janeiro, agosto de 2007.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

Ofício CEEA nº 53/2007

CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto “**Caracterização fenotípica, morfológica e funcional de sub-populações da cavidade peritoneal de camundongos: participação de células do peritônio na criptococose experimental**” (Protocolo CEEA nº159), sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Eliver Eid Bou Ghosn** sob a orientação do Prof(a). Sandro Rogério de Almeida, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 12/11/2007.*

São Paulo, 13 de novembro de 2007.


Prof.ª Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA