

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Eferocitose na presença de PAMP estimula ativação de macrófagos de perfil misto M1/M2

Aluna: Ana Carolina Guerta Salina

Orientadora: Prof(a). Dr(a) Alexandra Ivo de Medeiros

Araraquara

Ano 2015

Eferocitose na presença de PAMP estimula ativação de macrófagos de perfil misto M1/M2

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologias aplicadas à farmácia, área de concentração: Imunologia, para a obtenção do título de Mestre em biociências e biotecnologias aplicadas à farmácia.

Orientanda: Ana Carolina Guerta Salina

Orientadora: Prof(a). Dr(a) Alexandra Ivo de Medeiros

Araraquara

Ano 2015

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNESP – Campus de Araraquara

Salina, Ana Carolina Guerta

S165e Eferocitose na presença de PAMP estimula ativação de macrófagos de perfil misto M1/M2 / Ana Carolina Guerta Salina – Araraquara, 2015
96 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Orientador: Alexandra Ivo de Medeiros

*Aos meus pais, Maria e Fernando, por acreditarem
e investirem em minha formação.
Essa vitória é mérito de vocês!*

AGRADECIMENTO

À Deus, por ter colocado em meu caminho tantas pessoas boas.

Aos meus pais, pela educação, amor, carinho, apoio e, principalmente, confiança em todos esses longos anos de estudo.

À minha irmã Maria, que mesmo de longe torceu pelo meu sucesso.

Ao Tiago, pela paciência e compreensão nos momentos de desespero e angústias.

À professora Alexandra pela oportunidade acadêmica e por acreditar no meu potencial profissional e pessoal.

À Bruna, pelas horas divididas durante os experimentos quase intermináveis.

Aos colegas de laboratório, pelo convívio e ajuda em todos os momentos: Amanda, Fernanda, Victória, Felipe, Naiara, Bruna, Letícia, Júlia, Allan, Flávio e Valéria.

À FCF-UNESP, FAPESP, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro e institucional para a realização desse trabalho.

Sumário

1. Introdução	1
1.1 O Impacto de Células Apoptóticas em doenças pulmonares	1
1.2. Envolvimento de PGE ₂ no aumento da susceptibilidade a infecções.....	4
1.3. Polarização de Macrófagos	7
2. Objetivos	10
2.1. Objetivo geral	10
2.2. Objetivo específico	11
3. Delineamento experimental.....	12
4. Materiais e Métodos	14
4.1. Animais.....	14
4.2. Cultivo de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	14
4.3. Índice de fagocitose de neutrófilos	15
4.4. Geração das células apoptóticas	15
4.5. Confirmação do índice de apoptose celular	15
4.6. Determinação do índice de fagocitose de células apoptóticas.....	16
4.7. Obtenção de macrófagos M0	16
4.8. Geração de macrófagos M1/M2 em condições polarizantes.....	16
4.9. Perfil de diferenciação de Macrófagos na presença de diferentes fontes de células apoptóticas.....	17
4.10. Análise da expressão de marcadores de superfície por citometria de fluxo.....	18
4.11. Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	18
4.12. Quantificação de Nitrito	18
4.13. Análise relativa dos níveis de mRNA por PCR em tempo real (RT-qPCR)	19
4.14. Avaliação da atividade fagocítica e microbicida	19
4.15. Avaliação do papel supressor dos diferentes tipos de células apoptóticas <i>in vivo</i>	20
4.16. Análise estatística	21
5. Resultados e Discussão.....	21
5.1. Índice de fagocitose de <i>S. pneumoniae</i> por neutrófilos.....	21
5.2. Determinação da porcentagem de neutrófilos apoptóticos infectados e estéreis.....	24
5.3. Índice de fagocitose de células apoptóticas por macrófagos M0	27
5.4. Efeito da fagocitose de células apoptóticas por macrófagos M0 na polarização de macrófagos M1/M2.....	30
5.4.1. Análise fenotípica do perfil de macrófagos M1/M2 por citometria de fluxo.....	30

5.4.2. Análise fenotípica do perfil de macrófagos M1/M2 por RT-qPCR	34
5.4.3. Análise fenotípica do perfil de macrófagos M1/M2 pela síntese de mediadores solúveis.	38
5.5. Influência da PGE ₂ na polarização de macrófagos M1/M2.	46
5.6. Envolvimento dos mediadores solúveis produzidos durante a fagocitose de diferentes fontes de células apoptóticas por macrófagos M0 na polarização em macrófagos M1/M2.....	60
5.7. Determinação da atividade fagocítica e microbicida de macrófagos M0 após a fagocitose de diferentes fontes de células apoptóticas	62
6. Conclusões.....	69
7. Bibliografia.....	70
Anexo I	78
Anexo II	79
Anexo III	80
Anexo IV.....	81

Lista de Figuras

Figura 1. Etapas para a remoção de células apoptóticas.....	1
Figura 2. Fagocitose de neutrófilos apoptóticos por células dendríticas.	4
Figura 3. Efeito de PGE ₂ pela interação com receptores EP.....	6
Figura 4. Hipótese de estudo.	10
Figura 5. Delineamento experimental 1 – <i>In vitro</i>	12
Figura 6. Delineamento experimental 2 – <i>In vivo</i>	13
Figura 7. Índice de fagocitose de <i>S. pneumoniae</i> ^{FITC} por neutrófilos de ratos.....	23
Figura 8. Porcentagem de neutrófilos apoptóticos utilizando diferentes intensidades de radiação U.V.	25
Figura 9. Determinação da porcentagem de fagocitose de células apoptóticas por macrófagos.....	28
Figura 10. Polarização de macrófagos em M1/M2 pela fagocitose de AC e AC- <i>Sp</i> ..	32
Figura 11. Determinação da expressão de genes associados ao fenótipo M1/M2 em macrófagos M0 após a fagocitose de AC e AC- <i>Sp</i>	36
Figura 12. Perfil de citocinas relacionados ao fenótipo M1/M2 durante a fagocitose de células apoptóticas estéreis e infectados com <i>Sp</i> por macrófagos M0.	40
Figura 13. Perfil de citocinas relacionados aos fenótipos de macrófagos M1/M2 produzidos por macrófagos M0 na presença de diferentes fontes de células apoptóticas.....	41
Figura 14. Avaliação da liberação de PGE ₂ por macrófagos na presença de células apoptóticas.....	43
Figura 15. Quantificação de óxido nítrico produzido por macrófagos M0 cultivados na presença de diferentes fontes de células apoptóticas.....	45
Figura 16. Influência da PGE ₂ na polarização de macrófagos M0.	47
Figura 17. Influência da PGE ₂ na produção de citocinas.	49
Figura 18. Quantificação de NO produzido por macrófagos M0 na presença de PGE ₂	50
Figura 19. Efeito da inibição de PGE ₂ em macrófagos M0 após a fagocitose de diferentes fontes de células apoptóticas	53
Figura 20. Influência de inibidores de COX na produção de citocinas.	56
Figura 21. Quantificação de óxido nítrico produzido macrófagos M0 na presença de inibidores não seletivos de COX.	57
Figura 22. Quantificação de PGE ₂ produzida por macrófagos M0 na presença de inibidores não seletivos de COX.	59
Figura 23. Importância do contato célula-célula para a polarização de macrófagos.	61
Figura 24. Avaliação da capacidade fagocítica por macrófagos M0 na presença de diferentes tipos de células apoptóticas e em condições polarizantes.	65

Figura 25. Avaliação da atividade microbicida por macrófagos M0 na presença de diferentes tipos de células apoptóticas e em condições polarizantes.	66
Figura 26. A instilação de AC e AC- <i>Sp</i> promove diferentes respostas quanto a capacidade microbicida <i>in vivo</i>	68
Figura 27. Padronização da curva de crescimento de <i>S. pneumoniae</i> (ATCC 49619).	78
Figura 28. Morfologia de macrófagos ao final de 7 dias de cultura na presença de M-CSF.	79
Figura 29. Morfologia de macrófagos M1 e macrófagos M2.	79
Figura 30. Fenotipagem das sub-populações de macrófagos M1/M2 diferenciadas a partir de M0.	80
Figura 31. Análise de RT-qPCR de macrófagos M1/M2 diferenciados a partir de M0.	81

Índice de Abreviaturas

AA – Ácido Araquidônico

AC – *Apoptotic cells* (Células Apoptóticas)

AC-*Sp* – Célula Apoptótica infectada com *Streptococcus pneumoniae*

AP-1 - *Activator protein 1*

Arg 1 - Arginase 1

cAMP - Adenosina Monofosfato Cíclico

C/EBP β - *CCAAT-enhancer-binding proteins*

CCR7 – *C-C Chemokine Receptor Type 7*

CD - Célula Dendrítica

COX - Ciclooxigenase

cPLA2 - Fosfolipases A2 Citosólica

DAMPs – *Damage Associated Molecular Pattern Molecules*

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

E.coli - *Escherichia coli*

EP –*Prostaglandin E Receptors*

FSC –*Forward Scatter*

GM-CSF –*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*

HIV - *Human Immunodeficiency Virus*

Ibrup - Ibuprofeno

IFN- γ – *Interferon Gamma*

IL – Interleucina

Indo – Indometacina

iNOS - *Inducible nitric oxide synthase*

I.p. – Intraperitoneal

IRFs - *Interferon regulatory factors*

LPS – Lipopolissacarídeo

M-CSF – *Macrophage Colony-Stimulating Factor*

MA - Macrófago Alveolar

MARCO -*Macrophage receptor with collagenous structure*

MIF - Mediana da intensidade de fluorescência

M. leprae - *Mycobacterium leprae*

mJ - miliJoule

NEED - Naftiletlenodiamino Dihidroclorídrico

NF-kB - *Factor nuclear kappa B*

NO - *Nitric oxide*

NOD – *NOD Like Receptor*

PAF – Platelet-activating Factor

PAMPs - *Pathogen Associated Molecular Patterns*

PBS – Tampão fosfato salino

PC - Fosfatidilcolina

PE – Fosfatidiletanolamina

PG - Prostaglandinas

PGD₂ – Prostaglandina D₂

PGE₂ – Prostaglandina E₂

PGF₂ – Prostaglandina F₂

PGH₂ – Prostaglandina H₂

PGI₂ – Prostaglandina I₂

PS - Fosfatidilserina

RLR - *RIG-I-Like Receptors*

SBF – Soro Bovino Fetal

SOCS 2 - *Suppressor of cytokine signaling-2*

SOCS 3 - *Suppressor of cytokine signaling-3*

Sp - *Streptococcus pneumoniae*

SSC – *Side Scatter*

T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*

TGF- β - *Transforming Growth Factor Beta*

TLR – *Toll Like Receptor*

Th17 – *Linfócito T helper 17*

TNF- α – *Tumor Necrosis Factor - Alfa*

Treg – *Linfócito T regulador*

TSB – *Tryptic soy broth*

TxA2 - *Tromboxano A2*

UFC - *Unidades Formadoras de Colônias*

U.V. – *Ultravioleta*

Resumo

A fagocitose de células apoptóticas é um processo dinâmico importante para a homeostase dos tecidos após injúria. Os macrófagos além de atuarem na remoção de células apoptóticas, também colaboram na defesa contra microrganismos. Existem ao menos duas populações de macrófagos classificadas como macrófagos M1 (pró-inflamatórios) e macrófagos M2 (anti-inflamatórios). Estes leucócitos diferem quanto ao fenótipo e funções efetoras dependendo, primordialmente, do microambiente e dos microrganismos com que interagem no tecido. Em uma situação de injúria pulmonar estéril (inalação de agentes tóxicos), há acúmulo de células apoptóticas sem a presença de agente microbiano. Por outro lado, durante uma infecção pulmonar bacteriana, ocorre intensa migração de células para o local da infecção na tentativa de conter a proliferação bacteriana, resultando em intenso acúmulo de células apoptóticas infectadas neste tecido. Portanto, nesse trabalho foi avaliado, *in vitro* e *in vivo*, o efeito da fagocitose de células apoptóticas infectadas (AC-*Sp*) ou estéreis (AC) na polarização de macrófagos M1/M2, bem como suas funções efetoras, e o efeito da PGE₂ nesse contexto de eferocitose. Macrófagos M0 co-cultivados com AC ou AC-*Sp* apresentam um fenótipo intermediário entre M1 e M2, com secreção de altos níveis de IL-6, TNF- α , PGE₂, TGF- β e NO e a expressão de genes relacionados ao perfil M1, iNOS, e ao perfil M2, Arginase 1. Além disso, macrófagos M0 cultivados com AC ou AC-*Sp*, apresentam supressão da função microbicida quando desafiados com *S. pneumoniae*. A presença de PGE₂ dirige a polarização de macrófagos M0 a um perfil M2 e a presença de inibidores de COX promove a reversão do fenótipo de polarização destes macrófagos. Os resultados *in vivo* demonstram que a instilação de AC ou AC-*Sp* promove distintos microambientes no pulmão destes animais, que influenciam na resolução da infecção. Dessa forma, o conjunto de resultados obtidos sugere que a presença de AC e AC-*Sp* promove, *in vitro*, um perfil misto de polarização de macrófagos M1/M2, com inibição da função efetora destas células. Por outro lado, os resultados *in vivo* sugerem um efeito supressor de AC nas atividades microbicidas contra *S. pneumoniae*, enquanto AC-*Sp* foram mais eficientes na resolução da infecção.

Palavras-chave: Macrófagos M1/M2, células apoptóticas, citocinas, prostaglandina E₂, *Streptococcus pneumoniae*.

Abstract

The phagocytosis of apoptotic cells is dynamic and crucial for homeostasis after injury. Macrophages act on the clearance of apoptotic cells and collaborate with defense against microorganisms. There are at least two distinct macrophage populations classified as M1 macrophages (pro-inflammatory) and M2 macrophages (anti-inflammatory). Both cells differ on the state of polarization and effectors function depending primarily on the microenvironment and microorganisms that interact into the tissue. In a situation of sterile lung injury (inhalation of toxic agents), there are accumulation of apoptotic cells without the presence of pathogen. On the other hand, during a bacterial pulmonary infection there is intense cell migration to the infection site in an attempt to impair bacterial growth, resulting in a large accumulation of infected-apoptotic cells in the tissue. Therefore, this study has evaluated *in vitro* and *in vivo*, the effect of the phagocytosis of infected-apoptotic cells (AC-*Sp*) or sterile cells (AC) on the polarization of M1/M2 macrophages, as well as in their effector functions and the effect of PGE₂ in the context of efferocytosis. M0 macrophages co-cultured with AC or AC-*Sp* show an intermediate phenotype between M1 and M2 with high secretion levels of IL-6, TNF- α , PGE₂, NO and TGF- β , and gene expression profile related to M1, iNOS, and M2, arginase 1. Furthermore, M0 macrophages cultured with AC or AC-*Sp* show strong suppression of the macrophage microbicidal function when challenged with *S. pneumoniae*. The presence of PGE₂ drives the polarization of M0 macrophages to a M2 profile, and in the presence of COX inhibitors, it reverses the polarization of this macrophage phenotype. The *in vivo* results demonstrate that the instillation of AC or AC-*Sp* promotes distinct microenvironments in the lungs of these animals, which influence the resolution of the infection. All these results suggest that the presence of AC or AC-*Sp* promotes, *in vitro*, a mixed profile of macrophage polarization M1/M2 in addition to the inhibition of effector functions against *S. pneumoniae*. Moreover, the results suggest *in vivo* suppressive effect on AC microbicidal activity against *S. pneumoniae*, while AC-*Sp* was more effective in resolving the infection. **Keywords:** M1/M2 Macrophages, apoptotic cells, cytokines, prostaglandin E₂, *Streptococcus pneumoniae*.

1. Introdução

1.1 O Impacto de Células Apoptóticas em doenças pulmonares

A morte celular programada, denominada apoptose, é um processo fisiológico envolvido no desenvolvimento, remodelamento e renovação tecidual homeostática. Um dos primeiros eventos decorrentes do processo apoptótico é a perda da assimetria, que resulta na exposição de fosfolipídios da membrana plasmática, como a fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilcolina (PC) (Roos, Xu *et al.* 2004). Além disso, as células apoptóticas passam a secretar quimiocinas que são sinais precoces de morte, etapa esta também denominada de sinais “Find me”, resultando no recrutamento de macrófagos. Na presença deste microambiente, os macrófagos aumentam a expressão de moléculas de superfície e receptores responsáveis pela interação (sinais denominados “Catch me”) e remoção destas células apoptóticas (sinais de “Eat me”) (Figura 1).

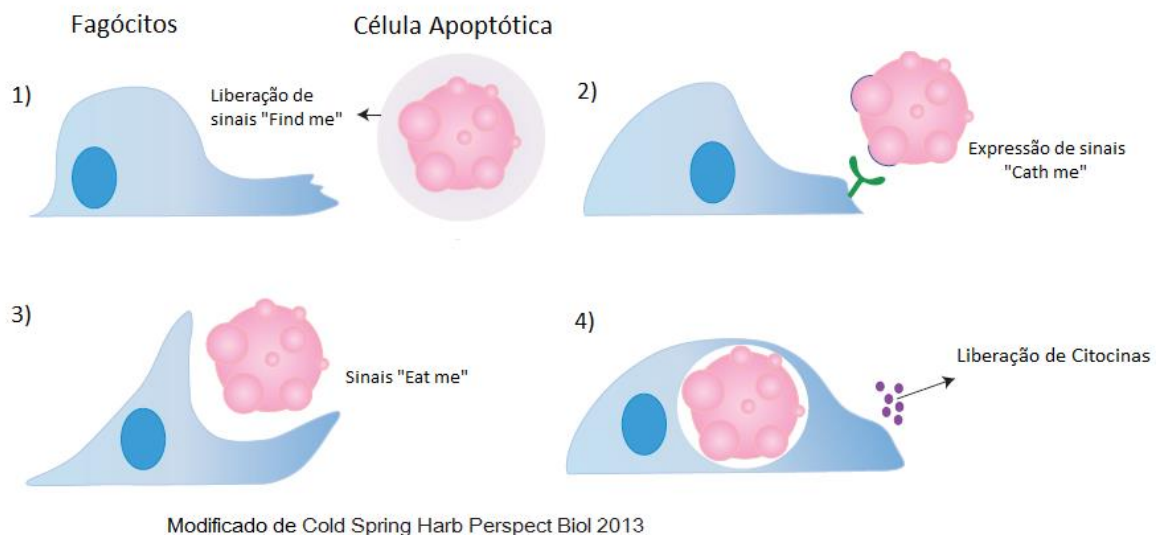


Figura 1. Etapas para a remoção de células apoptóticas. Liberação de sinais “Find me”, “Catch me”, “Eat me” e citocinas.

A fagocitose de células e corpos apoptóticos por fagócitos, também denominada eferocitose, representa um mecanismo pelo qual se previne a exposição de componentes intracelulares, DAMPs (*Damage Associated Molecular*

Pattern Molecules), visando manter a homeostase e resolução de processos inflamatórios nos tecido (Donnelly and Barnes 2012; Inoue, Ishibashi et al. 2012), além de prevenir a ativação de clones autorreativos e o desencadeamento de doenças autoimunes (Korns D. et al., 2011). Portanto, a eficiente remoção de células apoptóticas por fagócitos em condição estéril impediria a injúria tecidual resultante da evolução destas células para estado de necrose celular, que culminaria no extravasamento de DAMPs.

Algumas doenças inflamatórias crônicas, como Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), ou a inalação de fumaça de cigarro e inalação de gases tóxicos resulta em grande acúmulo de células epiteliais e de neutrófilos apoptóticos no pulmão de pacientes (Kunihiko Hiraiwa and Stephan F. van Eeden, 2013; Zhi-Hui He et al, 2015). Entretanto, por estas células estarem inseridas em um contexto de ausência de infecção, são denominadas células apoptóticas estéreis, ou seja, não há a presença de patógenos ou fragmentos destes no interior destas células.

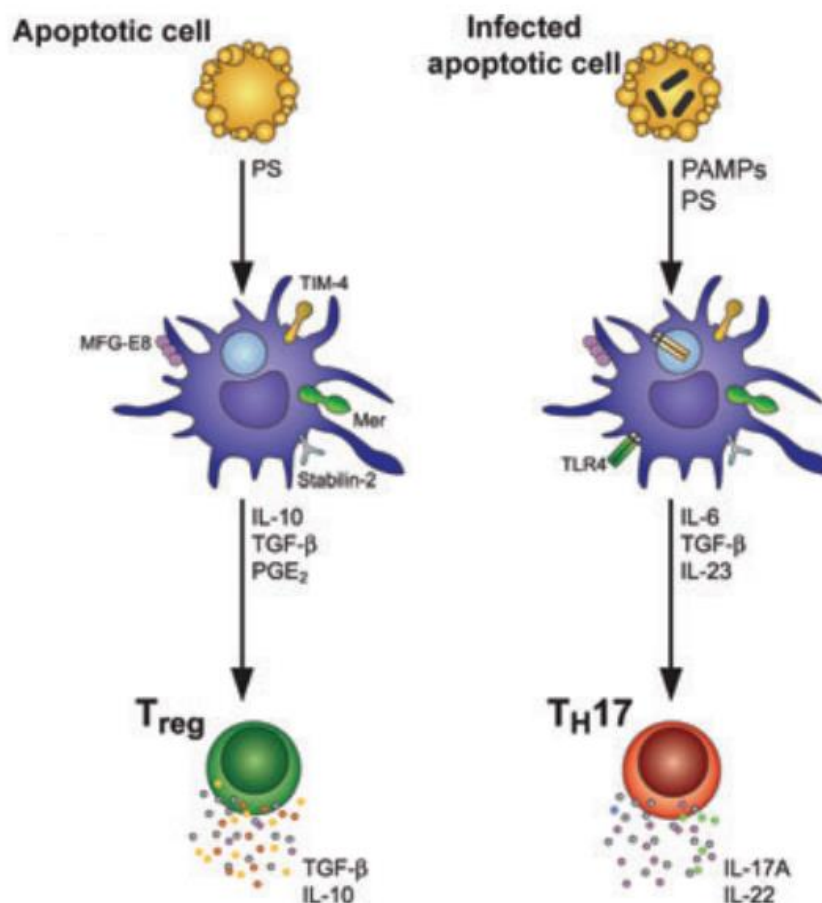
No ambiente pulmonar, tanto as células apoptóticas estéreis como as células apoptóticas infectadas são removidas principalmente por fagócitos, como macrófagos e células dendríticas (CD). Sabe-se que a fagocitose de células apoptóticas estéreis resulta na produção de mediadores anti-inflamatórios, tais como TGF- β (*Transforming Growth Factor Beta*), interleucina (IL)-10, prostaglandina E₂ (PGE₂) e fator ativador plaquetário (PAF) assim como a inibição de componentes da resposta inflamatória, como IL-1 β , IL-8, GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*), TNF- α (*Tumor Necrosis Factor Alfa*), bem como leucotrieno C4 e tromboxano B2 (Fadok, Bratton et al. 1998; Kim, Chung et al. 2005; Chung, Kim et al. 2006; Medeiros, Al., et al. 2009).

O impacto da imunossupressão induzida pela fagocitose de células apoptóticas tem sido demonstrado em diferentes modelos de infecções e processos inflamatórios crônicos. No modelo de infecção por *Trypanosoma cruzi*, foi demonstrada previamente a presença de grande número de linfócitos apoptóticos durante o curso da infecção. Este mesmo grupo de pesquisa demonstrou que a interação de linfócitos T apoptóticos com macrófagos infectados promovia o crescimento do parasita de forma dependente de PGE₂, TGF- β e síntese de poliaminas. Uma única injeção de células apoptóticas em camundongos previamente

infectados com *T. cruzi* foi capaz de aumentar drasticamente a parasitemia nesses animais. Portanto, o acúmulo de células apoptóticas no pulmão, na ausência de infecção, resulta em uma inflamação estéril e na imunossupressão do microambiente pulmonar mediante a fagocitose destas células apoptóticas (Lopes, da Veiga et al. 1995).

As infecções do trato respiratório inferior lideram entre as principais causas de morte por infecções no mundo, principalmente aquelas causadas por bactérias Gram-positivas, como pneumonia por *S. pneumoniae* (Paterson e Orihuela, 2011). Os macrófagos alveolares (MA) são conhecidos como a primeira linha de defesa contra microrganismos no pulmão. Durante o processo infeccioso, tanto os monócitos quanto os neutrófilos, que migram para o espaço bronco-alveolar, fagocitam os microrganismos e, após exercerem suas funções efetoras, podem morrer por apoptose tanto por exaustão (por excesso de ativação) quanto em uma fase final da infecção, como resolução do processo infeccioso.

Dessa forma, diferente da condição estéril, na presença de agente infeccioso, as células apoptóticas possuem em seu interior o microrganismo. Recentemente, foi demonstrado que a fagocitose de neutrófilos apoptóticos infectados com *Citrobacter rodentium* promoveu a síntese de IL-23, TGF- β e IL-6 por CD. A presença deste microambiente inflamatório favoreceu a diferenciação de células T CD4 “naive” em células Th17 (Brereton C.F, Blander JM, 2010) (Figura 2). A importância da interação dos PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) aos receptores TLRs (*Toll Like Receptor*) na geração dos fatores solúveis foi comprovada utilizando CD isoladas de animais deficientes de Tlr4^{-/-} ou de Myd88^{-/-} e Trif^{-/-}, visto que a ausência destas moléculas desencadeou o desenvolvimento de células Treg (Linfócitos T reguladores) (Figura 2).



Modificado: Ann N Y Acad Sci. 2010 Oct;1209:56-67

Figura 2. Fagocitose de neutrófilos apoptóticos por células dendríticas. A fagocitose de neutrófilos infectados promove a liberação de citocinas como IL-6, IL-23 e TGF- β .

1.2. Envolvimento de PGE₂ no aumento da susceptibilidade a infecções.

As prostaglandinas (PG) são mediadores lipídicos oriundas do ácido araquidônico liberado de fosfolípidos de membranas pelas fosfolipases (cPLA₂) (Burke and Dennis 2009). O ácido araquidônico (AA) pode ser metabolizado pelas enzimas ciclooxigenase 1 (COX-1) (enzima constitutiva) e/ou ciclooxigenase 2 (COX-2) (enzima induzida). A metabolização do AA pelas COX resulta na geração de uma PGG₂ intermediária e instável, que é rapidamente metabolizada a PGH₂. Esse metabólito pode sofrer a ação de diferentes sintases, dependendo do tecido ou da célula, resultando na formação de PGI₂, PGF₂, PGD₂, PGE₂ ou tromboxanos A₂ (TxA₂). Estes prostanóides são, então, liberados pelas células através de moléculas transportadoras de membrana e, devido a meia vida curta, logo exercem suas funções efectoras de maneira autócrina e/ou parácrina.

Dentre as PGs, a PGE₂ gerada a partir da ação de PGE₂ sintase em PGH₂ é um dos mediadores mais abundantes produzidos nos diferentes tecidos e um dos principais mediadores lipídicos sintetizados por macrófagos e outros diferentes tipos celulares (Brock, McNish et al. 2003).

Além da atividade edematogênica das PGs, a PGE₂ pode modular a síntese de diferentes citocinas e quimiocinas (Gualde and Harizi 2004; Sugimoto, Fukada et al. 2005).

Apesar da vasta literatura correlacionando PGE₂ como importante mediador nos processos inflamatórios agudos e crônicos, o potencial anti-inflamatório deste prostanóide vem sendo descrito em diferentes modelos experimentais (Tilley, Coffman et al. 2001; Serezani, Kane et al. 2012). PGE₂ inibe a migração de leucócitos (Armstrong 1995), geração de O₂⁻ (ânion superóxido) (McLeish, Stelzer et al. 1987; Aronoff, Canetti et al. 2005), síntese de leucotrienos (Christman, Christman et al. 1993; Aronoff, Canetti et al. 2005) e de citocinas, entre elas IL-12, IFN- γ (*Interferon Gamma*) (Betz and Fox 1991) e TNF- α (Kunkel, Spengler et al. 1988; Aronoff, Canetti et al. 2005). Além disso, a PGE₂ liberada durante a fagocitose via receptor Fc promove aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (Breyer, Bagdassarian et al. 2001; Nataraj, Thomas et al. 2001; Aronoff, Canetti et al. 2004; Aronoff, Canetti et al. 2005).

Estes efeitos antagônicos de PGE₂ estão diretamente relacionados aos receptores na superfície celular com os quais esse mediador é capaz de interagir. São conhecidas quatro classes de receptores EP (*Prostaglandin E Receptors*), os quais são acoplados à proteína G (Figura 3). EP1 é acoplado à G_q, que resulta no aumento de Ca²⁺ intracelular. EP3 é acoplado à G_i, cuja ativação leva à diminuição de cAMP (Adenosina Monofosfato Cíclico). EP2 e EP4 são acoplados à G_s, resultando no aumento de cAMP intracelular. Trabalhos na literatura têm demonstrado que o caráter supressor da PGE₂ deve-se ao aumento da cAMP, como resultado da interação com os receptores EP2 e/ou EP4 (Breyer, Bagdassarian et al. 2001; Nataraj, Thomas et al. 2001; Aronoff, Canetti et al. 2004; Aronoff, Canetti et al. 2005).

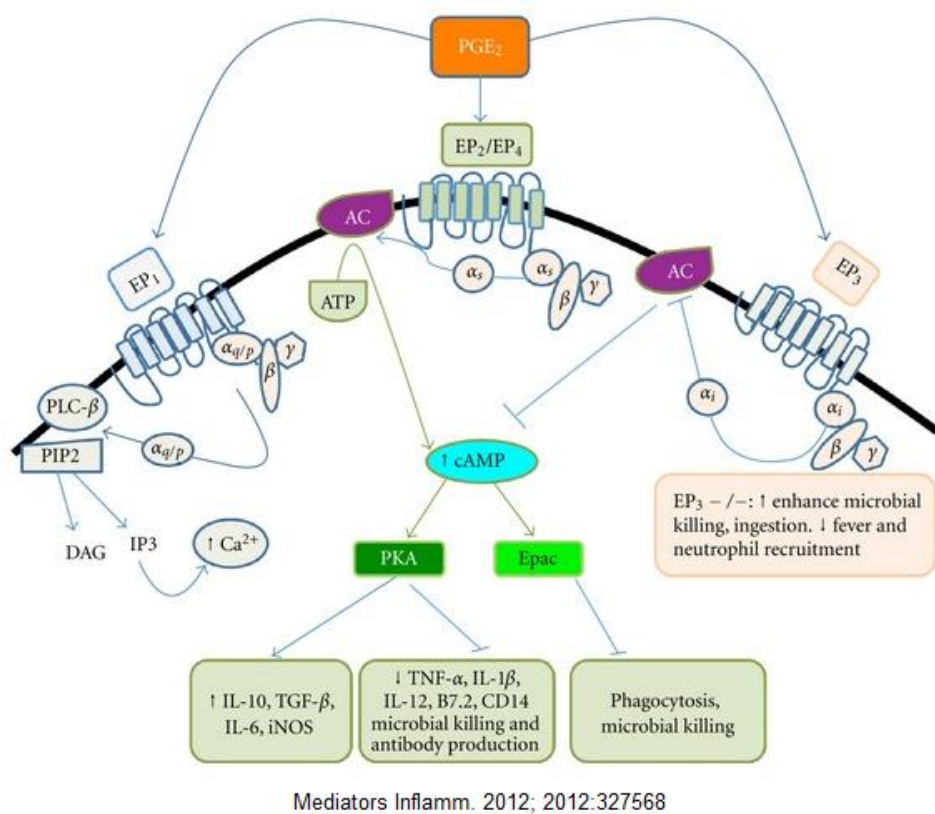


Figura 3. Efeito de PGE₂ pela interação com receptores EP - EP1, EP2, EP3 e EP4 nas funções efetoras de macrófagos.

A produção exacerbada de PGE₂ está associada ao aumento da susceptibilidade às infecções bacterianas em indivíduos infectados por HIV (Azzam, Kedzierska et al., 2006), desnutridos (Redmond, S et al., 1991), ou submetidos a transplante de órgãos (Ballinger, Aronoff et al., 2006). PGE₂ inibe diretamente e indiretamente aspectos funcionais de macrófagos e neutrófilos, como por exemplo, produção H₂O₂ (Água Oxigenada) (Bourdonnay, Serezani et al., 2012) suprimindo, portanto, os mecanismos de defesa antimicrobiana no microambiente pulmonar (Greenberger, Strieter et al., 1995). A administração de inibidores de COX em modelos animais de infecção por *Pseudomonas aeruginosa* resultou na diminuição da carga bacteriana e aumento da sobrevivência destes animais (Campanile, G. et al., 1993). O aumento da produção de PGE₂ na tuberculose pulmonar (Rangel M, et al., 2002), assim como o aumento da expressão de COX-2 em células epiteliais e macrófagos alveolares são descritos em modelos de pneumonia em primatas não humanos (Khan, Stanfield et al., 2000). Além disso, PGE₂ endógena e exógena

suprimem a capacidade microbicida de macrófagos alveolares infectados com *Klebsiella pneumoniae* opsonizada com IgG (Aronoff, Canetti et al. 2004).

Atualmente já se tem descrito que a produção de PGE₂ e outros mediadores lipídicos interferem na ativação de algumas células, como os macrófagos (Dennis et al., 2010).

1.3. Polarização de Macrófagos

Macrófagos são células residentes presentes nos diferentes tecidos e atuam como a primeira linha de defesa contra microrganismos. Juntamente com neutrófilos e CD, desempenham um papel chave no controle e resolução da infecção. Os macrófagos são as principais células envolvidas na fagocitose de células apoptóticas infectadas ou estéreis nos diferentes tecidos tendo, portanto, uma função imprescindível na manutenção da homeostase tecidual.

Macrófagos são células que possuem alto grau de plasticidade. Atualmente, são descritas ao menos duas populações de macrófagos que diferem quanto ao estado de polarização e função imunológica dependente do microambiente (Torroella-Kouri, Silvera et al. 2009; Arango Duque G, Descoteaux A., 2014) e da interação patógeno-células do hospedeiro (Sica, Schioppa et al. 2006).

A ativação de macrófagos pela via clássica desencadeia o desenvolvimento de macrófagos tipo I (M1), que se polarizam em resposta a estímulos patogênicos, sinais endógenos de perigo, presença de citocinas, como IFN- γ e TNF- α (Vega M.A. e Corbí A.L., 2006) ou LPS (Lipopolissacarídeo). Sua polarização é decorrente da ativação de receptores como TLR, RLR (*RIG-I-Like Receptors*) e NOD-like (*NOD Like Receptor*), que culminam na ativação de fatores de transcrição como NF- κ B (*factor nuclear kappa B*), AP-1 (*activator protein 1*), C/EBP β (*CCAAT-enhancer-binding proteins*), PU.1 (*Transcription factor PU.1*) e IRFs (*interferon regulatory factors*) (Takeuch e Akira, 2011). Estas células possuem alta capacidade de secretar citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α (Sica, Schioppa et al. 2006), IL-12 (Torroella-Kouri, Silvera et al. 2009), IL-23, IL-1 β e IL-6. Ademais, macrófagos M1 produzem altas concentrações de óxido nítrico e reativos de oxigênio (Sica, Schioppa et al. 2006), e, portanto, são descritos por possuírem excelente atividade

microbicida (Cassetta, Cassol et al., 2011; Biswas SK, Mantovani A., 2012; Arango Duque G, Descoteaux A., 2014) e tumoricida (Mantovani, A. et al., 2005; Murray PJ, et al., 2011; Biswas SK, Mantovani A., 2012; Arango Duque G, Descoteaux A., 2014). Dentre os principais marcadores envolvidos na fenotipagem de macrófagos M1 destacam-se: iNOS (*inducible nitric oxide synthase*), TLR (2/4), CD16, ferritina, SOCS 3 (*Suppressor of cytokine signaling-3*), CD80, MARCO (*macrophage receptor with collagenous structure*), entre outros (Vega et al, 2006; Murray PJ, et al., 2011; Biswas SK, Mantovani A, 2012; Wilson HM, 2014; Herd HL, et al., 2015).

A ativação de macrófagos pela via alternativa promove a polarização de macrófagos tipo 2 (M2). Os macrófagos M2 são células heterogêneas com perfil anti-inflamatório, que exibem funções imunossupressoras como, por exemplo, a inibição da proliferação de linfócitos T. Por outro lado, apresentam alta capacidade de proliferação e remodelação tecidual, promovendo melhor cicatrização de lesões devido ao metabolismo da arginase, que desencadeia a produção de poliaminas e prolinas que atuam neste contexto (Hesse et al, 2001). Macrófagos M2 também estão relacionados com a eliminação de parasitas extracelulares, como *Ascaris lumbricoides*, *Heligmosomoides polygyrus* e *Trichuris trichiura* (Robert et al, 2006) e, diferentemente dos macrófagos M1, estão associados a progressão de tumores (Mantovani et al., 2005; Martinez et al., 2009). Macrófagos M2 podem ainda ser subdivididos em 3 subtipos: M2a, induzido pelas citocinas IL-4 e IL-13, M2b, diferenciados pela interação com complexos imunes na presença de ligantes de TLR, e M2c, diferenciados na presença de estímulos anti-inflamatórios, como glucocorticóides, IL-10, TGF- β (Cassetta, Cassol et al. 2011) e PGE₂ (Rogers and Holen 2011). A ativação do fenótipo M2 está relacionada, entre outros fatores, com a ativação de PPAR- γ via STAT6 (Welch et al., 2003; Berry et al., 2007; Szanto et al., 2010). Moléculas como Arginase 1, Ym (1/2), Fizz (1/2), CD206, receptor de Folato, SOCS 2 (*SOCS 3 (Suppressor of cytokine signaling-2)*), Dectina-1, são marcadores para essas subpopulações (Vega et al, 2006; Raes et al., 2002, 2005; Biswas SK, Mantovani A., 2012; Wilson HM., 2014; Herd HL, et al., 2015).

Existem ainda outras classificações que tentam definir macrófagos M1 e M2 baseadas em parâmetros como o metabolismo da Arginase 1 e a escolha do fator de diferenciação (M-CFS e GM-CSF) utilizado para a obtenção destes macrófagos (Mills, C. D. 2012). Além disso, já se tem descrito que algumas moléculas podem

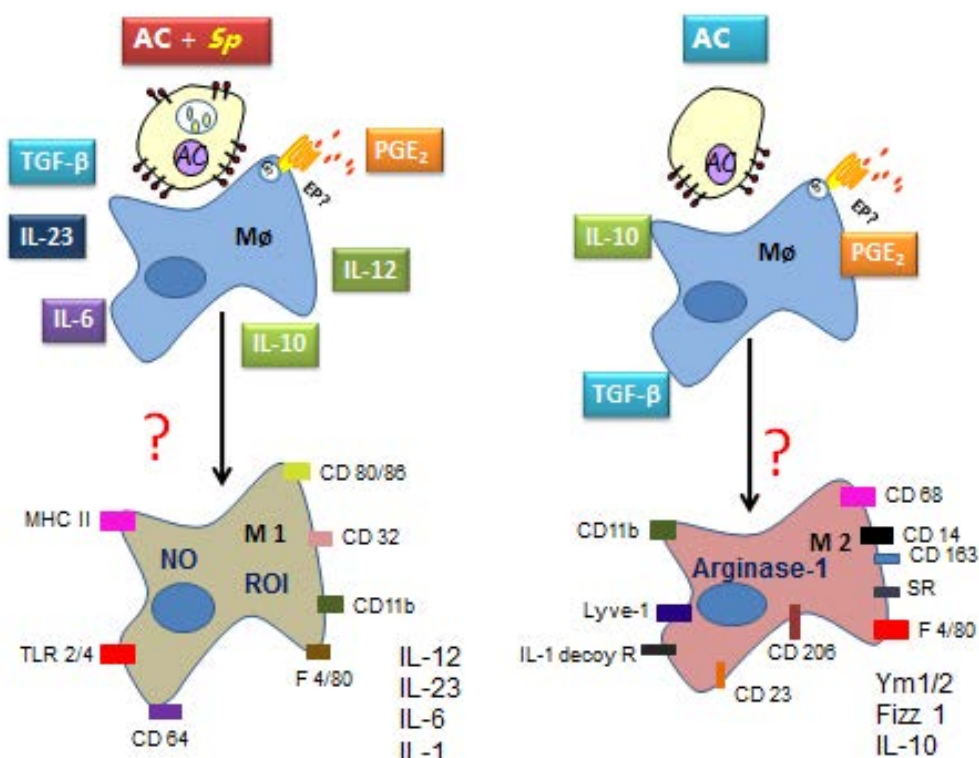
interferir na polarização de macrófagos, como os diferentes componentes do sistema complemento, C3a e C5a para macrófagos M1 e C3b e C1q (Bohlsón, S.S., 2014) bem como microRNAs, como o microRNA 21, para o perfil M2 (Wang Z., et al 2015).

Até o momento, pouco se sabe sobre o efeito da eferocitose na diferenciação de subpopulações de macrófagos M1/M2. Tanto macrófagos peritoneais obtidos a partir da inoculação com tioglicolato quanto macrófagos da linhagem RAW 264.7, quando incubados na presença de linfócitos T apoptóticos, apresentam menor expressão de iNOS e TNF- α e aumento da expressão de Arginase-1 (Freire-De-Lima et al, 2006). Além disso, a fagocitose de células apoptóticas por células epiteliais e macrófagos peritoneais não estimulados promove a liberação de fator de crescimento angiogênico (Golpon et al.,2004), bem como de citocinas como IL-4, IL-13, IL-10 (Martinez et al., 2009) e TGF- β (Freire-De-Lima et al, 2006). Portanto, a fagocitose de células apoptóticas estéreis por macrófagos, oriundos do peritônio primado com tioglicolato, parecem polarizar estas células para um perfil M2 (Ariel, A., Serhan, C.N., 2012).

Desta forma, o microambiente pulmonar pode ser acometido por um intenso acúmulo de diferentes padrões de células apoptóticas: células apoptóticas estéreis (ACs) e células apoptóticas infectadas (ACs-*Sp*). Em situação de injúria pulmonar estéril causada, por exemplo, pela inalação de agentes tóxicos, há um intenso acúmulo de células apoptóticas sem a presença de microrganismos patogênicos. Por outro lado, durante um processo infeccioso pulmonar há intenso recrutamento de neutrófilos e monócitos, que migram para o local da infecção na tentativa de conter a infecção pela fagocitose e destruição de microrganismos. Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a fagocitose de AC-*Sp* e AC por MAs (macrófagos alveolares) induz a produção de diferentes concentrações de PGE₂. Na presença de AC-*Sp*, MAs produzem altos níveis de PGE₂, enquanto que na presença de ACs, estes fagócitos produzem níveis menores de PGE₂ (dados ainda não publicados). Sabe-se que além de PGE₂, a fagocitose de AC-*Sp* e AC pode desencadear a síntese de diferentes citocinas pró- e anti-inflamatórias, respectivamente, por macrófagos. *Dessa forma, a nossa hipótese de estudo fundamenta-se em que a fagocitose de AC-*Sp* ou AC por macrófagos poderia desencadear a produção de diferentes citocinas e concentrações de PGE₂ que poderiam ser críticos para o*

processo de polarização de macrófagos: M1 (pró-inflamatórios) e M2 (anti-inflamatórios) (Figura 4).

Figura 4. Hipótese de estudo.



A fagocitose das diferentes fontes de células apoptóticas desencadearia diferentes microambientes que levariam a polarização diferenciada de macrófagos M0. Assim, a fagocitose de células apoptóticas infectadas com *S. pneumoniae* promoveria a liberação de citocinas pró-inflamatórias que desencadearia a polarização de macrófagos M0 em um fenótipo M1. Por outro lado, a fagocitose de células apoptóticas estéreis promoveria a liberação de citocinas anti-inflamatórias que dirigiria a polarização de macrófagos M0 a macrófagos M2.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi determinar o efeito da fagocitose de células apoptóticas infectadas ou estéreis na polarização de macrófagos M0, assim como a

participação de PGE₂, *in vivo*, nesse processo e determinar o efeito causado pela instilação das diferentes células apoptóticas *in vivo*.

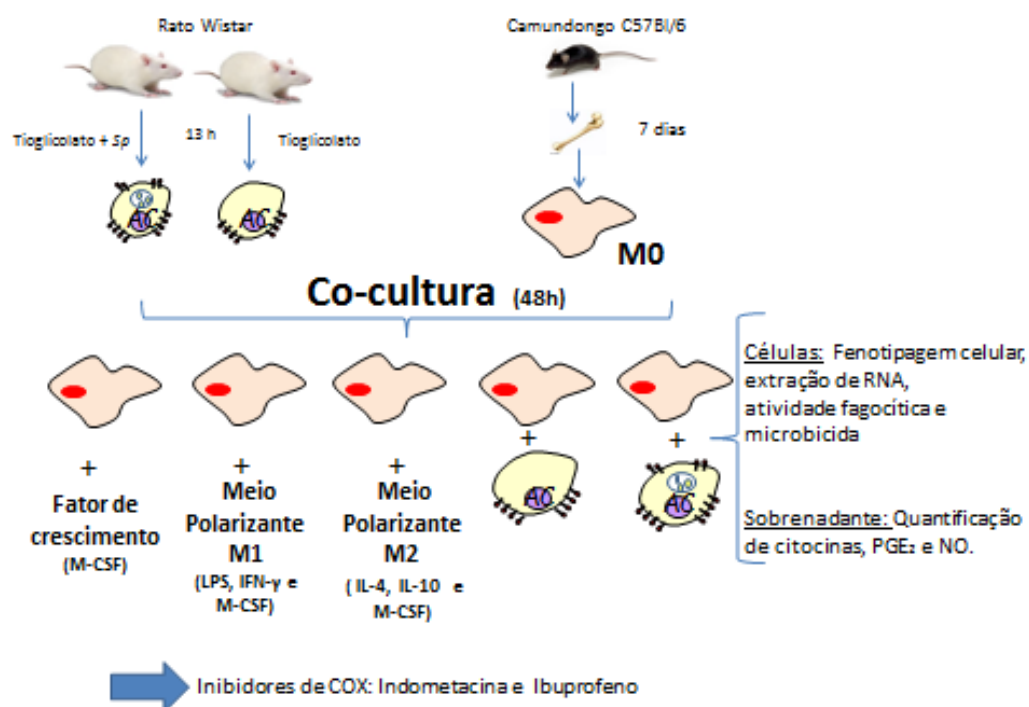
2.2. Objetivo específico

Os objetivos específicos desse trabalho foram avaliar:

- ❖ O efeito da fagocitose de células apoptóticas infectadas ou estéreis na polarização de macrófagos M0, *in vitro*;
- ❖ O perfil de citocinas e óxido nítrico produzidos durante a fagocitose das diferentes fontes de ACs, *in vitro*;
- ❖ O envolvimento da PGE₂ no processo de polarização de macrófagos M0, *in vitro*;
- ❖ A atividade fagocítica e microbicida de macrófagos diferenciados pela fagocitose de diferentes fontes de células apoptóticas, *in vitro*;
- ❖ O impacto de células apoptóticas infectadas ou estéreis, *in vivo*, na susceptibilidade à infecção pulmonar por *S. pneumoniae*

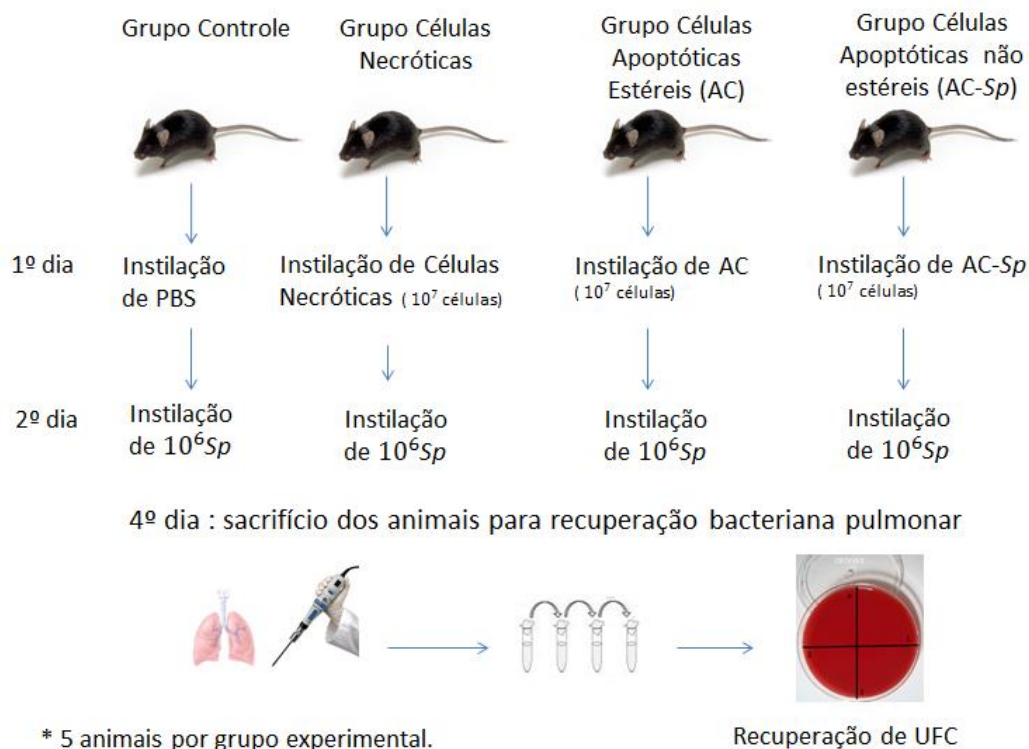
3. Delineamento experimental

Figura 5. Delineamento experimental 1 – *In vitro*



Células da medula óssea de camundongos diferenciadas em macrófagos M0 por 7 dias. No 7º dia de cultura, essas células foram divididas em 5 grupos: **M0** – Macrófagos M0 na presença do fator de crescimento M-CSF; **M1** – Condição polarizante para M1 (LPS e IFN- γ); **M2** - Condição polarizante para M2 (IL-4, IL-10 e M-CSF), **M0+AC** – Macrófagos M0 na presença de AC; **M0+AC-Sp** – Macrófagos M0 na presença de AC-Sp. Após 48h de co-cultura, os macrófagos foram avaliados em relação ao fenótipo M1/M2 utilizando marcadores de superfície celular e avaliação dos mediadores solúveis produzidos por macrófagos durante o processo de diferenciação. Além disso, as funções efetoras destes macrófagos, atividade fagocítica e microbicida, foram avaliadas após o processo de diferenciação de macrófagos M0 na presença de células apoptóticas.

Figura 6. Delineamento experimental 2 – *In vivo*



Fêmeas C57BL/6 foram divididas em 4 grupos experimentais. **Grupo Controle:** animais controles receberam PBS no primeiro dia de experimentação. **Grupo Células Necróticas:** animais que receberam 10^7 células necróticas no primeiro dia. **Grupo AC estéreis:** animais que receberam 10^7 AC no primeiro dia. **Grupo AC não estéreis (Sp):** animais que receberam 10^7 AC-Sp no primeiro dia. No segundo dia de experimento, todos os animais receberam através de instilação 10^6 bactérias. Após 48h da instilação do inóculo de *S. pneumoniae*, os animais foram eutanasiados e tiveram o pulmão removido. O órgão foi triturado e amostras das diferentes diluições do homogeneizado foram distribuídas em placas de ágar sangue para recuperação de UFC de Sp. Após 24h, as placas de ágar foram analisadas quanto à presença do halo de hemólise e as unidades formadoras de colônias (UFC) foram determinadas.

4. Materiais e Métodos

4.1. Animais

Camundongos C57BL/6, fêmeas, com 6 a 14 semanas de idade, foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica - CEMIB/UNICAMP. Ratos Wistar, machos, com idade entre 6 e 14 semanas de idade, foram obtidos do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP/Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em estantes ventiladas, em micro isoladores, com temperatura, umidade, fluxo de ar e ciclo de luz claro/escuro controlados e livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Araraquara. Protocolos CEUA/FCF/CAr nº 37/2014 e nº 36/2014.

4.2. Cultivo de *Streptococcus pneumoniae*

Para que fosse possível a utilização do *Streptococcus pneumoniae* (Cepa ATCC 49619) (*Sp*) durante todo o trabalho, foi feita a padronização da curva de crescimento bacteriano. Para isso, alíquotas contendo 10^9 bactérias em 1 mL de tryptic soy broth (Difco, Detroit, MI) (TSB) + 10% glicerol, conservadas em freezer - 80°C foram incubadas em 10 mL de meio TSB, sob agitação e à temperatura de 37°C por 4h.

A cada hora, duas alíquotas de 200µL foram retiradas, uma foi utilizada para a leitura da densidade óptica ($\lambda=600$ nm), e outra para a confirmação do crescimento bacteriano em ágar sangue através da contagem de UFC.

Com a curva de crescimento, definiu-se que cada 1mL da suspensão de TSB + *Sp* em uma D.O. de aproximadamente 0,4 contém cerca de 10^9 bactérias. O cultivo e crescimento de *Sp* é um procedimento padronizado em nosso grupo de pesquisa. Entretanto, a cada experimento, a curva é repetida para confirmação do inóculo (Anexo I).

4.3. Índice de fagocitose de neutrófilos

Como fonte de células apoptóticas infectadas, foram utilizados neutrófilos obtidos do exsudato peritoneal de ratos infectados com uma suspensão de tioglicolato + 10^7 *Sp*. Inicialmente, para comprovar que esses neutrófilos continham *Sp* em seu interior, utilizamos *S. pneumoniae* conjugadas com FITC (Sp^{FITC}) como descrito por Sahlin, S. et al (1982). 10^7 Sp^{FITC} foram injetadas no peritônio do animal e após 13h, o índice de fagocitose dos neutrófilos infectados com Sp^{FITC} foi determinado. Os neutrófilos obtidos do exsudado peritoneal de animais não infectados foram utilizados como controle. As células obtidas foram processadas e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados são expressos por SSC (*Side Scatter*), complexidade celular, versus Sp^{FITC} .

4.4. Geração das células apoptóticas

Célula Apoptótica Infectada (AC-*Sp*): Como fonte de células apoptóticas infectadas (AC-*Sp*), 1×10^7 *Sp* foram ressuspensas em 3 mL de tioglicolato e inoculadas pela via intraperitoneal (i.p.) em ratos Wistar. A carga bacteriana do inóculo foi confirmada a cada experimento pela recuperação de UFC em ágar sangue. Após 13h de inoculação, os neutrófilos oriundos da lavagem da cavidade peritoneal foram submetidos ao protocolo de indução apoptose por radiação U.V. (1mJ), seguida de incubação por 4h conforme descrito previamente por Torchinsky *et al.* (2009).

Célula apoptótica estéril (AC): Como fonte de células apoptóticas estéreis (AC), foram utilizados neutrófilos oriundos da inoculação i.p. de 3 mL de tioglicolato. Após 13h de inoculação, os neutrófilos foram submetidos ao mesmo protocolo de indução apoptose por radiação UV (1mJ), seguida de incubação por 4h conforme descrito previamente por Torchinsky *et al.* (2009).

4.5. Confirmação do índice de apoptose celular

Uma vez obtidas as AC e AC-*Sp*, segundo procedimentos descritos acima, a apoptose celular foi determinada a partir da marcação de Anexina V e 7-AAD e análise por citometria de fluxo (BD FACSCanto™). Células marcadas apenas com

Anexina V são células em apoptose precoce, células duplamente marcadas são células em apoptose tardia, células marcadas apenas com 7-AAD são células necróticas, e as células duplo negativas, células viáveis.

4.6. Determinação do índice de fagocitose de células apoptóticas.

As AC e AC-*Sp* obtidas a partir dos protocolos descritos no tópico 4.4., foram conjugadas com CFSE (CellTrace™ CFSE, Life Technologies), segundo protocolo descrito pelo fabricante. Em seguida, essas células foram co-cultivadas com macrófagos M0 (descrito no tópico 4.7.), seguindo a proporção de 1:3 (1 M0: 3 AC ou AC-*Sp*) por 6h, 24h e 48h. Após cada um desses períodos, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo (BD FACSCanto™) para determinação do índice de fagocitose de cada um dos tipos de células apoptóticas.

4.7. Obtenção de macrófagos M0

Células da medula óssea obtidas de fêmures e tíbias de animais C57BL/6 foram lavadas, submetidas à centrifugação, e a contagem estimada de 10^7 células foram cultivadas em placas de petri contendo DMEM (10% de SBF e gentamicina + piruvato + aminoácidos não essenciais) na presença de 20 ng/mL de M-CSF (Recombinant Murine M-CSF, Peprotech). Após 2 dias, 10 mL de DMEM contendo 20 ng/mL de M-CSF foram acrescentados à cultura. No 5º dia, foram retirados 10 mL do meio de cultura e adicionados outros 10 mL de meio novo contendo 20 ng/mL de M-CSF. Ao final de 7 dias, período necessário para as células indiferenciadas da medula óssea se diferenciarem em macrófagos M0, o fenótipo de macrófagos M0 foi avaliado por citometria de fluxo (Figura 30). Durante os experimentos, a mesma quantidade de células, 10^7 /placas de petri, foi adicionada em todas as placas, visto que Chan Mi Lee et al. (2013) demonstraram que a quantidade de células da medula óssea incubadas por cm^2 pode influenciar no fenótipo da célula polarizada (Anexo II/ Anexo III).

4.8. Geração de macrófagos M1/M2 em condições polarizantes

Após 7 dias de diferenciação, 3×10^6 células/orifício foram re-incubadas por subsequentes 48h na presença das condições polarizantes, promovendo a

diferenciação de macrófagos M0 em suas subpopulações M1/M2.

Macrófagos M1: 500 ng/mL de LPS + 200 ng/mL de IFN-gama + 50 ng/mL de M-CSF.

Macrófagos M2: 30 ng/mL de IL-4 + 30 ng/mL de IL-10 + 50 ng/mL de M-CSF (Anexo II/ Anexo III).

Além da caracterização morfológica (Figura 28 e Figura 29), estes macrófagos foram avaliados fenotipicamente por citometria de fluxo (Figura 30). Para tanto, utilizamos os marcadores anti-F4/80 e anti-CCR7 para identificação de macrófagos com fenótipo M1 e anti-F4/80 e anti-CD206 (receptor de manose), marcadores predominantes em macrófagos com fenótipo M2.

As análises por citometria foram realizadas a partir da seleção das células de acordo com a complexidade celular (SSC – *Side Scatter*), versus tamanho celular (FSC – *Forward Scatter*), seguido da exclusão de “doublets”. Em seguida, analisamos a população através de SSC versus FITC, uma vez que o anticorpo anti-F4/80 estava conjugado a este fluorocromo. Dessa forma, foi possível selecionar apenas as células que eram macrófagos. Feito isso, analisamos para as marcações CCR7 e CD206.

4.9. Perfil de diferenciação de Macrófagos na presença de diferentes fontes de células apoptóticas

Para avaliar a capacidade de células apoptóticas infectadas e estéreis em promover a diferenciação de macrófagos M1 e M2, o seguinte protocolo experimental foi realizado:

Grupo M0+AC: macrófagos M0 incubados na presença de AC na proporção de 3:1 (3 AC: 1 M0).

Grupo M0+AC-Sp: macrófagos M0 incubados na presença de AC-Sp na proporção de 3:1 (3 AC-Sp: 1 M0).

Vale ressaltar que a escolha desta proporção foi embasada na literatura. Medeiros, Al. et al. (2009) demonstraram que esta proporção é capaz de suprimir tanto a atividade fagocítica via receptor Fc quanto induzir altos níveis de PGE₂. As diferentes condições experimentais foram posteriormente incubadas por 48h para

avaliação da polarização desses macrófagos M0.

4.10. Análise da expressão de marcadores de superfície por citometria de fluxo

As análises por citometria de fluxo foram realizadas utilizando 3 marcadores de superfície: anti-F4/80 conjugado ao fluorocromo FITC (BDPharmingen™), anti-CCR7 conjugado ao fluorocromo Alexa Fluor 647 (BDPharmingen™) e anti-CD206 conjugado ao fluorocromo PE (BioLegend®). Os anticorpos anti-F4/80 se ligam a todos os macrófagos. O marcador para macrófagos M1 é o CCR7, que é receptor de imiocinas tipo 7, e o marcador CD206, receptor de manose, é utilizado para selecionar os macrófagos M2.

4.11. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Os sobrenadantes das culturas foram avaliados quanto a presença das citocinas TNF- α (limite de detecção de 500 pg/mL a 7,8 pg/mL), IL-12 (limite de detecção de 4000 pg/mL a 62,5 pg/mL), IL-1 β (limite de detecção de 2000 pg/mL a 31,3 pg/mL), IL-6 (limite de detecção de 1000 pg/mL a 15,6 pg/mL), IL-10 (limite de detecção de 2000 pg/mL a 31,3 pg/mL), TGF- β (limite de detecção de 1600 pg/mL a 12,5 pg/mL), (BDPharmingen™ ou R&D System), e PGE₂ (limite de detecção de 1000 pg/mL a 7,8 pg/mL), (PGE₂ EIA Kit, CaymanChemicals – 514010). A quantificação foi realizada de acordo com os protocolos dos respectivos fabricantes. Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.12. Quantificação de Nitrito

O óxido nítrico foi quantificado indiretamente pela produção de NO₂⁻ a partir da reação de Griess (solução estoque de NEED a 0,1% e sulfanilamida a 1% em H₃PO₄ 5%) no sobrenadante de cultura celular. Utilizando a curva de concentração padrão (200 - 6,25 μ M), determinaram-se as concentrações de nitrito presentes em cada uma das amostras. Os resultados são expressos em μ M de nitrito (Griess P.,1879).

4.13. Análise relativa dos níveis de mRNA por PCR em tempo real (RT-qPCR)

As reações quantitativas de PCR foram realizadas utilizando-se o agente intercalante Sybr Green (Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, Foster City, CA) no equipamento Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System. Todas as reações foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante, sempre em triplicatas experimentais. Os dados obtidos foram analisados baseando-se no método de $\Delta\Delta CT$ (Livak e Schmittgen, 2001), utilizando a média geométrica do gene de referência Gapdh como controle endógeno.

Gene	Classe	Oligonucleotídeo F (5'-3')	Oligonucleotídeo R (5'-3')
Gapdh	Controle endógeno	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	ACACATTGGGGGTAGGAACA
iNOs	Alvo	TTTGCTTCCATGCTAATGCGAAAG	GCTCTGTTGAGGTCTAAAGGCTCCG
Arg 1	Alvo	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG	AGGAGCTGCTATTAGGGACATC
CCR7	Alvo	TTCCAGCTGCCCTACAATGG	GAAGTTGGCCACCGTCTGAG
CD206	Alvo	CCACAGCATTGAGGAGTTTG	ACAGCTCATCATTTGGCTCA
IL-12	Alvo	GGAAGCAACGGCAGCAGAATA	AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG
IL-10	Alvo	CCCTTTGCTATGGTGTCTTTTC	GATCTCCCTGGTTTCTCTTCCC

4.14. Avaliação da atividade fagocítica e microbicida

Macrófagos obtidos a partir das diferentes condições experimentais, como descrito previamente, foram distribuídos em duas placas de 96 poços (10^5 células/orifício). Para o ensaio de fagocitose, os macrófagos de ambas as placas foram desafiados com *Sp* na proporção de 1: 50 (1 macrófago: 50 bactérias) por 3h. Após esse período, as mesmas foram lavadas por duas vezes com meio de cultura (DMEM incompleto, sem SBF e antibiótico) para remoção de bactérias não

fagocitadas. Uma das placas foi utilizada para a determinação do número de bactérias fagocitadas. Para tanto, os macrófagos foram incubados com 200 µL de TBS + 0,5 % saponina gelada para rompimento da membrana das células. Em seguida, foi feita uma diluição seriada na base dez com o lisado celular para recuperação de UFC de *Sp* em placas de ágar sangue. As placas de ágar sangue foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 24h, e, após esse período, a contagem de UFC foi realizada. A outra placa de 96 poços foi reincubada por 4h em estufa de CO₂ a 37°C para avaliação da atividade microbica. Após este período, o mesmo procedimento de lise celular foi realizado para recuperação de UFC. Os cálculos de porcentagem de sobrevivência obedecem a relação matemática abaixo (Medeiros, A I et al., 2009).

$$\text{Atividade microbica} = \frac{\text{UFC (Ensaio de atividade microbica)} \times 100}{\text{UFC (Ensaio de fagocitose)}}$$

Assim, a quantidade de UFC obtidas a partir do ensaio de fagocitose, em cada uma das condições, foi considerado 100%, e a quantidade de UFC obtidas a partir do ensaio de atividade microbica, em cada uma das condições, foi considerado a porcentagem de sobrevivência de *Sp* para as diferentes condições experimentais. Valores abaixo da linha vermelha indicam que a condição testada apresentou atividade microbica e valores acima da linha indicam que os macrófagos testados não foram capazes de eliminar as bactérias fagocitadas. Os resultados foram expressos em porcentagem de sobrevivência de *Sp*.

4.15. Avaliação do papel supressor dos diferentes tipos de células apoptóticas

in vivo

Camundongos C57BL/6, fêmeas, com 6 a 14 semanas de idade foram separados em 4 grupos experimentais, cada um dos grupos contendo cinco animais. No primeiro dia de experimento, os animais de cada grupo receberam: PBS, ou 10⁷ células necróticas, ou 10⁷ AC, ou 10⁷ AC-*Sp*, dependendo do grupo que cada animal pertencia. Após 24h de instilação (2º dia de experimentação), todos os grupos receberam 10⁶ de *Sp* pela via intranasal.

No 4º dia após o início do experimento, todos os animais foram eutanaziados em câmara de CO₂, e o pulmão de cada um dos animais foi coletado e homogeneizado em 500 µL de PBS (Homogeneizador T10 Basic Ultra Turrax). A suspensão foi diluída em diferentes concentrações e distribuída em placas de ágar sangue, possibilitando assim, a recuperação de UFC de *Sp*.

Grupo Controle: 1º dia: instilação de 30 µL de PBS. 2º dia: instilação da suspensão contendo 10⁶ de *Sp* em 30 µL.

Grupo Células Necróticas: 1º dia: instilação de 10⁷ células necróticas em 30 µL. 2º dia: instilação de suspensão contendo 10⁶ de *Sp* em 30 µL.

Grupo Células Apoptóticas estéreis: 1º dia: instilação de 10⁷ AC em 30 µL. 2º dia: instilação de suspensão contendo 10⁶ de *Sp* em 30 µL.

Grupo Células Apoptóticas infectadas com *Sp*: 1º dia: instilação de 10⁷ AC-*Sp* em 30 µL. 2º dia: instilação de suspensão contendo 10⁶ de *Sp* em 30 µL.

4.16. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± SEM e foram analisados utilizando o programa estatístico Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Para as comparações entre dois grupos experimentais foram utilizados o teste de Student's t e para as comparações entre três ou mais grupos experimentais foi aplicada a análise de variância ANOVA seguido de teste de comparação múltipla Dunnett ou Bonferroni. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas se $p \leq 0,05$. Todos os experimentos foram realizados ao menos três vezes em diferentes períodos.

5. Resultados e Discussão

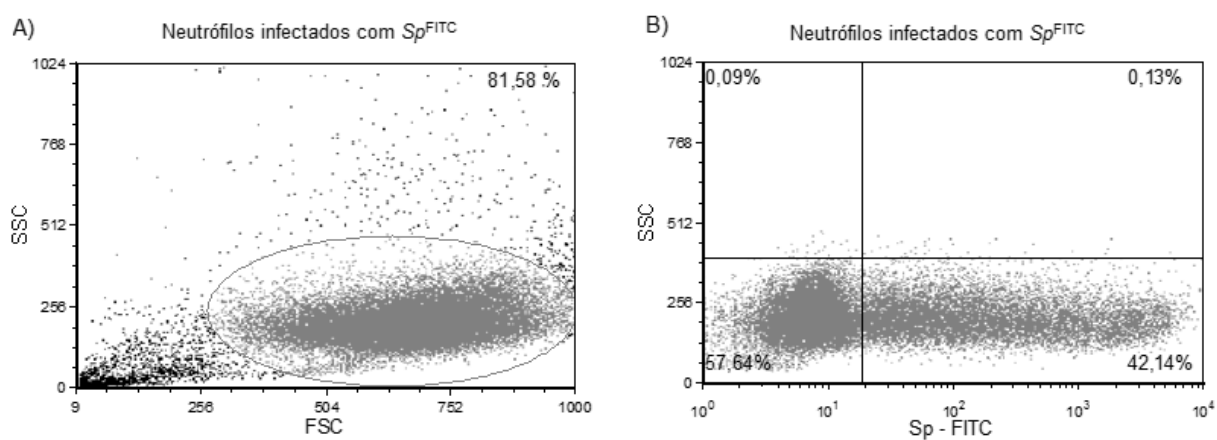
5.1. Índice de fagocitose de *S. pneumoniae* por neutrófilos

Como fontes de células apoptóticas infectadas ou estéreis foram utilizados neutrófilos oriundos do exsudato peritoneal de ratos. Dessa forma, para avaliar o índice de fagocitose de *S. pneumoniae* por neutrófilos, as bactérias foram conjugas

com FITC (Sp^{FITC}) e a porcentagem de neutrófilos positivos para FITC foi determinada.

Inicialmente, as células foram analisadas utilizando dois parâmetros, complexidade celular e tamanho celular, e determinou-se que aproximadamente 82% das células analisadas eram neutrófilos. Uma vez selecionada a população de neutrófilos, constatou-se que aproximadamente 42% dessas células eram positivas para FITC, ou seja, estavam infectadas com Sp^{FITC} . Na tentativa de otimizar esse índice de fagocitose de *S. pneumoniae*, foram administrados, nos animais, inóculos maiores de bactéria (10^8 e 10^9 Sp^{FITC}). Entretanto, em ambas as condições, os animais inoculados morreram antes das 13h necessárias para o protocolo experimental.

Figura 7. Índice de fagocitose de *S. pneumoniae*^{FITC} por neutrófilos de ratos.



Porcentagem de neutrófilos positivos para *Sp*^{FITC}. Os ratos foram infectados com *Sp*^{FITC} e, após 13h, o exsudato peritoneal foi coletado. A porcentagem de neutrófilos positivos para *Sp*^{FITC} foi determinada por citometria de fluxo, as análises foram realizadas utilizando FCS Express 4 Flow Software. A) Análise de complexidade celular (SSC) *versus* tamanho celular (FSC). B) Análise de complexidade celular *versus* marcação para FITC (*Sp*^{FITC}). Resultado representativo de 2 experimentos individuais.

5.2. Determinação da porcentagem de neutrófilos apoptóticos infectados e estéreis.

Os neutrófilos obtidos a partir do exsudato peritoneal de ratos infectados com uma suspensão de *Sp* diluído em tioglicolato (AC-*Sp*) ou injetados apenas com tioglicolato (AC) foram submetidos a diferentes intensidades de radiação ultravioleta para indução de apoptose celular. A porcentagem de célula apoptóticas foi determinada através da marcação por Anexina V/7AAD (Figura 8).

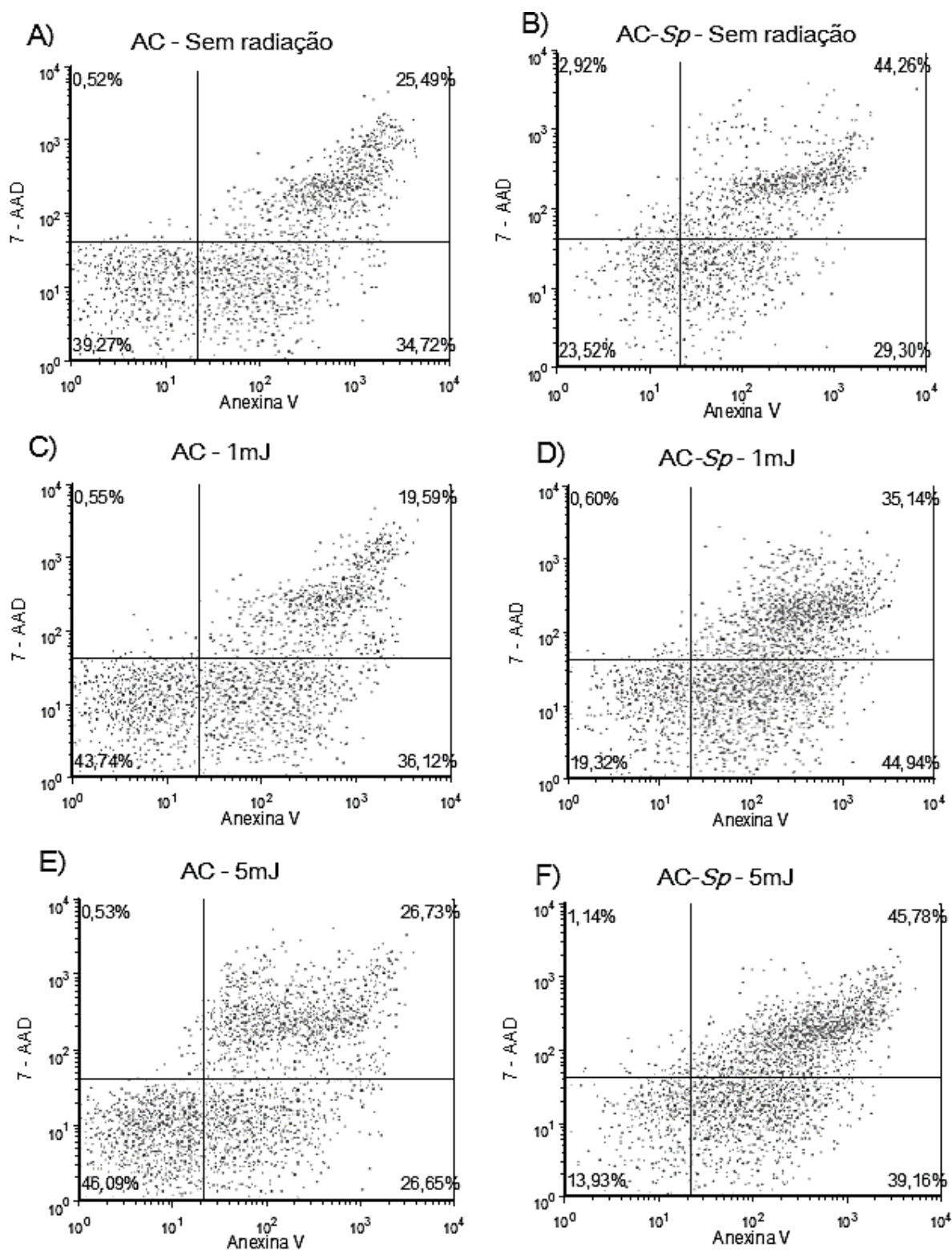
Os neutrófilos estéreis (não infectados) e sem exposição à radiação ultravioleta apresentaram 34,72% em apoptose precoce (Anexina V⁺/7AAD⁻), 25,49% em apoptose tardia (Anexina V⁺/7AAD⁺) e 0,52% em necrose (Anexina V⁻/7AAD⁺). Por outro lado, os neutrófilos infectados e sem exposição à radiação ultravioleta, apresentaram 29,30% Anexina V⁺/7AAD⁻, 44,26% Anexina V⁺/7AAD⁺ e 2,92% Anexina V⁻/7AAD⁺.

Utilizando 1mJ de radiação, foi obtido 0,6% de células Anexina V⁻/7AAD⁺, 15,08% Anexina V⁺/7AAD⁺ e 36,24% de células Anexina V⁺/7AAD⁻, quando avaliados neutrófilos não infectados e por fim, 0,6% Anexina V⁻/7AAD⁺, 34,1% Anexina V⁺/7AAD⁺ e 45,47% Anexina V⁺/7AAD⁻ quando avaliados neutrófilos previamente infectados com *Sp*.

A exposição de AC e AC-*Sp* à intensidade 5mJ resultou em 26,65% e 39,16% de neutrófilos Anexina V⁺/7AAD⁻, respectivamente; 26,73% e 45,78% Anexina V⁺/7AAD⁺, respectivamente, e 0,6% de células Anexina V⁻/7AAD⁺ em ambos os grupos.

Além disso, a utilização da radiação UV permite a sincronização da morte das células que passaram pelo procedimento de exposição a esse tipo de luz (Downes C S, et al 1979). A partir dos resultados obtidos, a intensidade da radiação UV escolhida para os subsequentes protocolos de indução de apoptose de neutrófilos, tanto infectados quanto não infectados, foi a intensidade de 1mJ, condição esta que apresentou as maiores porcentagens de células em apoptose (precoce e tardia), e uma baixa porcentagem de células necróticas, tal como Laurent E. et al (2003).

Figura 8. Porcentagem de neutrófilos apoptóticos utilizando diferentes intensidades de radiação U.V.



Neutrófilos infectados com *Sp* ou estéreis obtidos a partir de exsudato peritoneal foram expostos a diferentes intensidades de radiação UV e incubados a 37°C por subsequentes

4h. Após esse período, o índice de apoptose foi avaliado por citometria de fluxo através da marcação por Anexina V/7AAD. A) Neutrófilo não infectado e não exposto à radiação. B) Neutrófilo infectado com *Sp* e não exposto a radiação. C) Neutrófilo não infectado e exposto a 1mJ de radiação. D) Neutrófilo infectado com *Sp* e exposto a 1mJ de radiação. E) Neutrófilo não infectado e exposto a 5mJ de radiação. F) Neutrófilo infectado com *Sp* e exposto a 5mJ de radiação. Neutrófilo não infectado e exposto a 5mJ de radiação. As análises foram realizadas utilizando FCS Express 4 Flow Software. Experimento representativo de 3 experimentos realizados individualmente.

5.3. Índice de fagocitose de células apoptóticas por macrófagos M0

As células AC-*Sp* ou AC obtidas a partir de neutrófilos infectados ou estéreis foram irradiadas com 1mJ de radiação U.V. e, em seguida, incorporadas com CFSE. Macrófagos M0 foram co-cultivados na presença de AC-*Sp* ou AC na proporção de 3:1 (3 ACs ou AC-*Sp*:1 M0), por diferentes períodos: 6h, 24h e 48h.

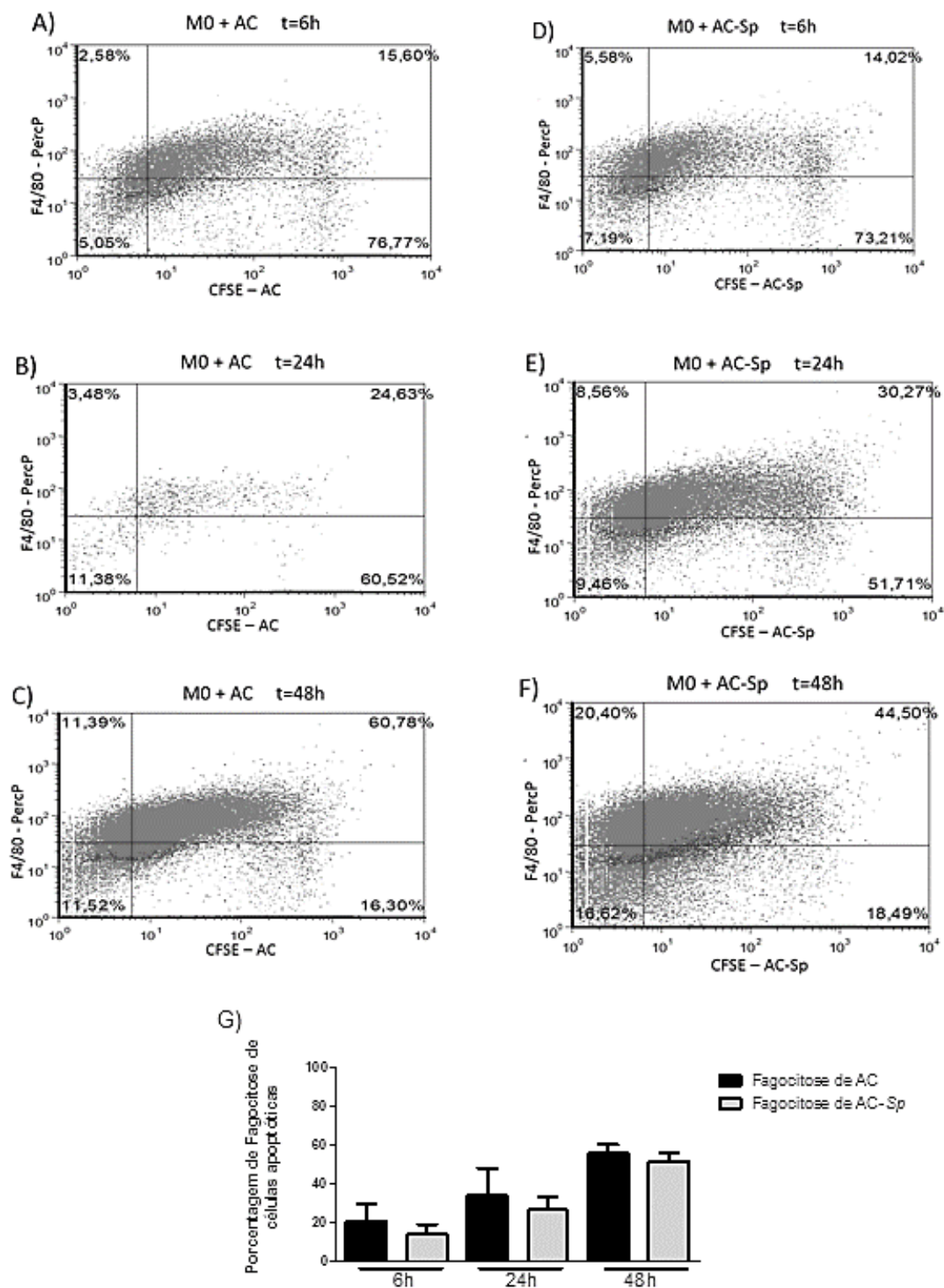
Após cada um desses períodos, as células foram coletadas e marcadas com o anticorpo anti-F4/80, marcador específico de macrófagos, e a porcentagem de células positivas para CFSE foi determinada por citometria de fluxo. (Figura 9).

Após 6h de co-cultura de M0 na presença de AC estéreis ou ACs-*Sp*, foi observado que 15,60% e 14,02% de M0, respectivamente, eram positivos para CFSE. No período de 24h, a fagocitose de AC e ACs-*Sp* por M0 foi positiva para CFSE na porcentagem de 24,63 e 30,27, respectivamente. E após 48h de co-cultura, foi obtido 60,78% de fagocitose de ACs e 44,50% de fagocitose de AC-*Sp* por M0. A figura 9G representa a somatória das porcentagens de três experimentos individuais.

O período de 72h foi também avaliado, entretanto, foi observado morte celular intensa (dados não mostrados), o que inviabilizou a análise neste tempo de incubação.

A partir dos resultados obtidos, foi estipulado o tempo de 48h como o período da co-cultura de macrófagos M0, tanto com AC quanto para AC-*Sp*, uma vez que nessas condições observou-se a melhor porcentagem de fagocitose dos diferentes tipos de células apoptóticas.

Figura 9. Determinação da porcentagem de fagocitose de células apoptóticas por macrófagos.



As AC e AC-Sp obtidas a partir da exposição à radiação U.V. de neutrófilos infectados ou não infectados com *Sp* foram conjugadas com CFSE e incubadas por

diferentes períodos com macrófagos M0. Após a incubação, as células foram marcadas com anticorpo anti-F4/80 PercP e adquiridas por citometria de fluxo. O resultado apresentado é referente a um experimento representativo de três experimentos individuais. A) M0 incubados com AC por 6h. B) M0 incubados com AC por 24h. C) M0 incubados com AC por 48h. D) M0 incubados com AC-*Sp* por 6h. E) M0 incubados com AC-*Sp* por 24h. F) M0 incubados com AC-*Sp* por 48h. G) Gráfico ilustrativo da porcentagem de fagocitose das diferentes fontes de células apoptóticas, AC ou AC-*Sp*, de três experimentos independentes. As análises foram realizadas utilizando FCS Express 4 Flow Software.

5.4. Efeito da fagocitose de células apoptóticas por macrófagos M0 na polarização de macrófagos M1/M2

5.4.1. Análise fenotípica do perfil de macrófagos M1/M2 por citometria de fluxo.

Sabe-se que a fagocitose dos diferentes tipos de AC, AC ou AC-*Sp*, por macrófagos ou CD promove a síntese de diferentes citocinas e mediadores lipídicos. A fagocitose de AC por macrófagos alveolares e peritoneais resulta na produção de mediadores anti-inflamatórios, tais como TGF- β , IL-10, PGE₂, assim como promove a inibição de componentes da resposta inflamatória como IL-1 β , IL-8, GM-CSF, TNF- α , bem como leucotrieno C4 e tromboxano B2 (Fadok, Bratton et al. 1998; Kim, Chung et al. 2005; Chung, Kim et al. 2006; Medeiros AI, 2009). Por outro lado, a fagocitose de células apoptóticas infectadas com *E. coli* por CD promove a síntese de IL-23, TGF- β e IL-6 (Torchinsky, Garaude et al. 2010).

Desta forma, sabendo que o microambiente gerado no local da injúria poderia influenciar na polarização de macrófagos no tecido, a próxima etapa foi investigar se a fagocitose destas diferentes fontes de células apoptóticas (na ausência ou presença do patógeno) poderia resultar na polarização de macrófagos do fenótipo M1 ou M2.

Macrófagos M0, na presença de ACs, passam a expressar maiores porcentagens do receptor CCR7 (3,66%) e do receptor CD206 (0,93%) quando comparados aos macrófagos M0, CCR7 (0,06%) e CD206 (0,11%), enquanto macrófagos M0 incubados na presença de AC-*Sp* apresentaram uma maior expressão de CCR7 (5,0%) e uma menor porcentagem de células positivas para CD206 (0,24%) (Figura 10).

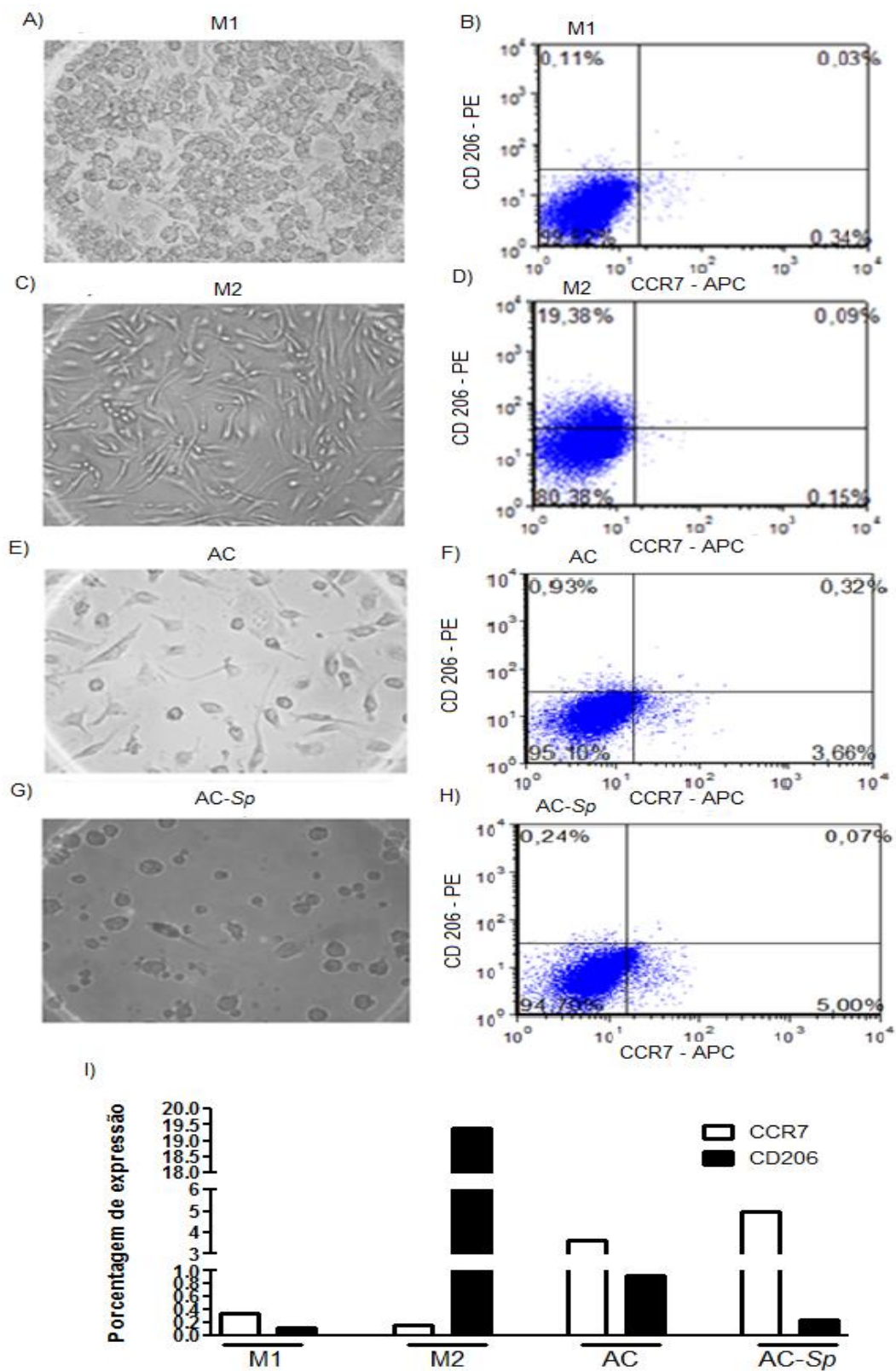
Os gráficos da figura 10C1 e 10C2 representam a somatória das porcentagens da expressão de CCR7 e CD206 de diferentes experimentos realizados individualmente. Embora as diferentes fontes de células apoptóticas levem a um perfil mais próximo a M1, o grau de ativação dessas células é diferente. A fagocitose de AC-*Sp* promoveu maior expressão da molécula de CCR7 quando comparado à fagocitose de AC por M0.

Esses resultados são contrários aos descritos previamente na literatura quanto à expressão de receptores CCR7/CD206, em culturas utilizando linhagens celulares ou outras fontes primárias de macrófagos na presença de células apoptóticas. Freire-De-Lima et al (2006) demonstraram que a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos peritoneais, primados com tioglicolato, e macrófagos RAW 264.7 promove a polarização destes macrófagos para um fenótipo M2. Entretanto, nada se tem descrito para macrófagos M0 diferenciados a partir de medula óssea de camundongos C57BL/6 na presença de células apoptóticas estéreis ou infectadas com *Sp*. Uma das explicações que justificaria as diferenças obtidas quanto ao perfil de polarização de macrófagos na presença de AC seria primordialmente a origem dos macrófagos.

Atualmente já é descrito que há vários tipos de macrófagos distribuídos por todo o nosso organismo e cada um deles possui funções, receptores e produção de mediadores solúveis característicos do tecido de origem (Murray, P.J et al., 2011). Células Raw 264.7, por exemplo, são células extremamente sensíveis a agonistas de TLR e LPS e possuem alta expressão de receptores scavenger A (Bowdish, D. (2013). Por outro lado, macrófagos derivados de medula óssea e macrófagos primados com tioglicolato apresentam as moléculas F4/80^{high}, CD11b^{high}, e CD68⁺, enquanto macrófagos alveolares apresentam F4/80^{low}, CD11b^{low}, and CD68⁺ (Zhang X, et al., 2008).

Além disso, recentemente foi publicado um artigo que descreve diferentes fatores, intrínsecos aos diferentes protocolos experimentais, que poderiam influenciar o perfil de polarização de macrófagos, ou seja, o tecido de origem dos macrófagos, linhagem do animal ou local de extração das células no mesmo animal, condições aplicadas durante os experimentos de polarização, tipo de meio de cultura utilizado, qualidade da placa de cultura utilizada na diferenciação, assim como as concentrações dos fatores de diferenciação empregados nos experimentos podem influenciar os resultados do perfil fenotípico de polarização dos macrófagos (Murray, P.J et al., 2014).

Figura 10. Polarização de macrófagos em M1/M2 pela fagocitose de AC e AC-Sp.



Macrófagos M0, obtidos a partir da diferenciação de células da medula óssea por 7 dias, foram incubados por 48h na presença dos diferentes tipos de ACs ou dos diferentes meio

polarizante (M1 ou M2) e avaliados por citometria de fluxo quanto a expressão dos receptores CCR7 e CD206. A) Avaliação morfológica (aumento de 400x) de cultura de macrófagos M1. B) Análise por citometria de fluxo de macrófagos M1. C) Avaliação morfológica (aumento de 400x) de cultura de macrófagos M2. D) Análise por citometria de fluxo de macrófagos M2. E) Avaliação morfológica (aumento de 400x) de cultura de macrófagos M0 cultivados na presença de AC. F) Análise por citometria de fluxo de macrófagos M0 cultivados na presença de AC. G) Avaliação morfológica (aumento de 400x) de cultura de macrófagos M0 cultivados na presença de AC-*Sp*. H) Análise por citometria de fluxo de macrófagos M0 cultivados na presença de AC-*Sp*. I) Somatória das porcentagens de expressão da molécula de CCR7 e CD206 de 7 experimentos individuais

Assim, os resultados obtidos quanto à expressão de marcadores fenotípicos por citometria de fluxo sugerem que macrófagos M0, incubados na presença de AC ou AC-*Sp*, adquirem um fenótipo mais próximo ao de macrófagos M1, variando apenas no grau de ativação celular. Entretanto, tanto os controles experimentais (M0, M1 e M2) quanto os grupos experimentais (M0+AC e M0+AC-*Sp*) não apresentaram uma expressão robusta quanto à expressão das moléculas avaliadas, impossibilitando a definição exata dos nossos resultados.

Outras moléculas, como CD80 e MHC-II foram avaliadas, mas os resultados obtidos quanto à expressão diferenciada destes marcadores nas diferentes condições experimentais avaliadas foram ainda menos robustos. (dados não mostrados).

Dessa forma, para confirmar os dados obtidos pela citometria de fluxo, outras técnicas como RT-qPCR e quantificação de citocinas por ELISA foram utilizadas para melhor caracterizar a polarização de macrófagos M0 após a fagocitose de AC e AC-*Sp*.

5.4.2. Análise fenotípica do perfil de macrófagos M1/M2 por RT-qPCR

As análises de expressão mRNA para os genes correspondentes ao do receptor de CCR7, CD206, iNOS, Arginase 1, IL-10 e IL-12 foram feitas por qPCR. Os resultados obtidos demonstram que tanto a co-cultura de macrófagos M0 com AC ou AC-*Sp* desencadeiam a polarização de macrófagos com perfil fenotípico misto de M1/M2. A fagocitose destas diferentes fontes de células apoptóticas por macrófagos M0 resultam na expressão de altos níveis de Arginase 1, associado a um perfil de macrófagos M2. Quanto a expressão de iNOS, associado a um perfil de macrófagos M1, a fagocitose de AC por macrófagos M0 promove a expressão de aproximadamente 158,5 vezes mais iNOS nessas células quando comparado a macrófagos M0, e uma expressão de aproximadamente 182 vezes quando comparado à co-cultura de M0 com AC-*Sp* (Figura 11).

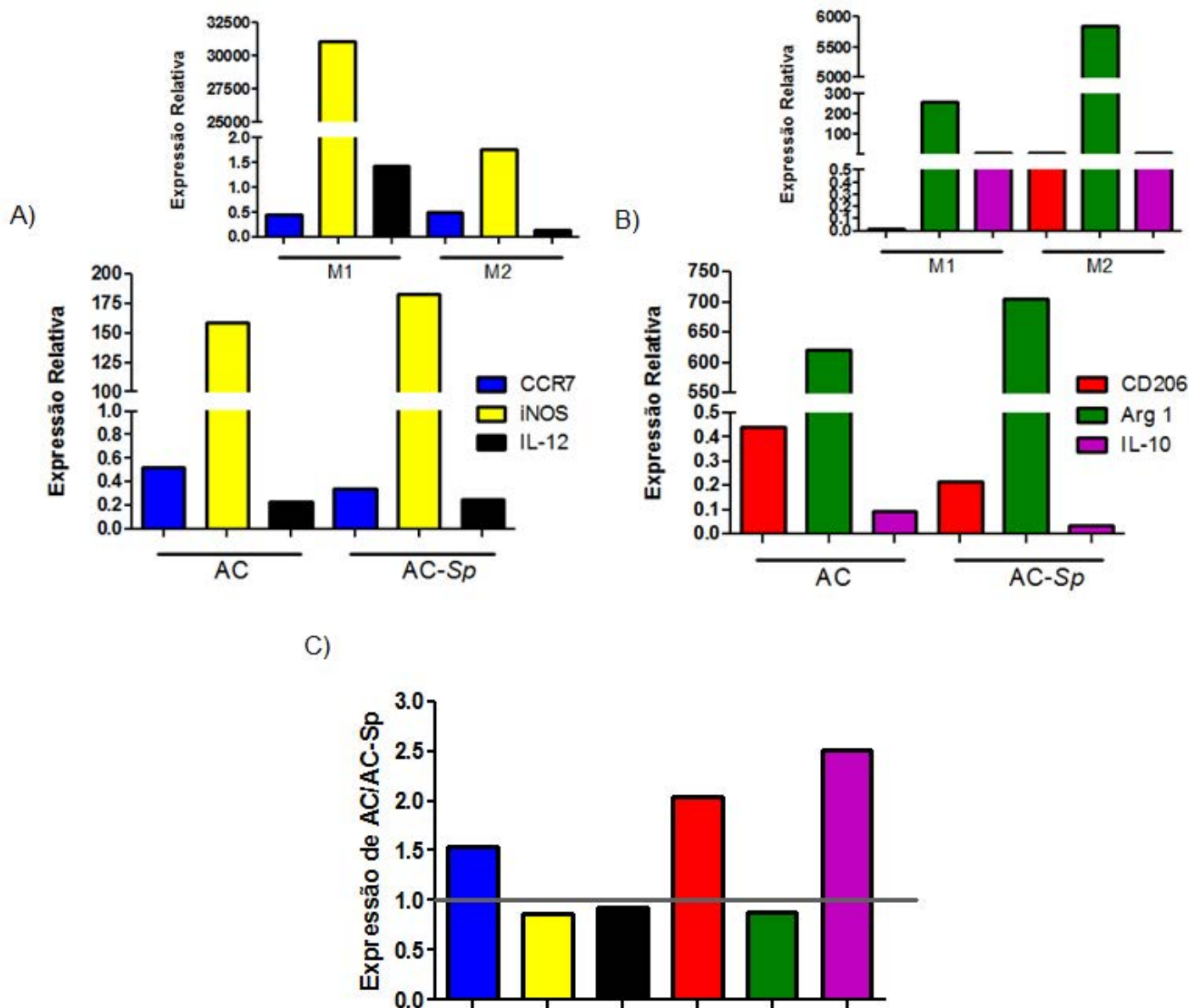
A expressão dos genes CCR7, CD206, IL-10 e IL-12 foram regulados negativamente após a fagocitose das diferentes fontes de células apoptóticas quando comparados com a expressão destes genes em macrófagos M0. Além disso,

a regulação desses genes é semelhante para macrófagos M0 incubados na presença de AC ou AC-*Sp*.

Em condições polarizantes para M1, a expressão de iNOS foi aproximadamente 30 mil vezes maior que a expressão desse mesmo marcador em macrófagos M0. Entretanto, os genes CCR7 e IL-12 apresentaram uma baixa modulação na expressão quanto iNOS, variando entre 0,5 e 1,5 vezes maior que a expressão por macrófagos M0, enquanto que CD206 possui expressão negativa em relação aos M0. Além disso, os macrófagos M1 também expressaram IL-10 aproximadamente 6 vezes maior que o controle M0 e Arginase 1 aproximadamente 256 vezes maior que macrófagos M0. Em condições polarizantes para M2, observa-se alta expressão de Arginase 1, aproximadamente 6 mil vezes a mais que os macrófagos M0. A expressão de CD206 e IL-10 em condições polarizantes para M2 estão cerca de 7 vezes aumentadas quando comparado a M0. Além disso, macrófagos M2 expressam baixos níveis dos genes CCR7 e IL-12.

Quando analisamos a razão entre a expressão dos genes estudados entre o grupo de macrófagos incubados com AC e macrófagos incubados com AC-*Sp* podemos perceber que, na presença de AC, os macrófagos M0 expressam maiores quantidades de CCR7, CD206 e IL-10. Quanto a expressão de iNOS, IL-12 e Arginase 1, tanto macrófagos incubados com AC quanto com AC-*Sp* expressam quantidades semelhantes desses genes, uma vez a razão entre eles se aproxima de 1 (linha cinza, Figura 11C).

Figura 11. Determinação da expressão de genes associados ao fenótipo M1/M2 em macrófagos M0 após a fagocitose de AC e AC-*Sp*.



Macrófagos M0, incubados por 48h na presença de AC ou AC-*Sp*, foram avaliados quanto a expressão dos genes para A) iNOS, IL-12 e CCR7 e B) Arginase 1, IL-10 e CD206. C) Razão da expressão dos genes entre macrófagos incubados com AC e macrófagos incubados com AC-*Sp*. Os resultados foram expressos utilizando a expressão gênica de macrófagos M0 como controle (1.0) Os resultados são referentes a um experimento individual.

Comparando os resultados de RT-qPCR com os de citometria de fluxo, podemos perceber que embora a literatura demonstre que o receptor CCR7 seja um marcador para o fenótipo M1 (Mantovani A et al. 2004; Benoit M., et al 2008), os macrófagos M0 diferenciados de medula óssea e cultivados em condições polarizantes para M1, diferentes do esperado e descrito na literatura, não apresentam uma alta expressão do gene que codifica CCR7. Esses resultados serão confirmados por qPCR.

5.4.3. Análise fenotípica do perfil de macrófagos M1/M2 pela síntese de mediadores solúveis.

Como já mencionado anteriormente, a fagocitose de diferentes fontes de células apoptóticas promove a liberação de perfis de citocinas e mediadores lipídicos distintos (Fadok, Bratton et al., 1998; Kim, Chung et al., 2005; Chung, Kim et al., 2006; Medeiros AI, et al., 2009; Torchinsky, Garaude et al., 2010). Além disso, os diferentes subtipos de macrófagos produzem distintos perfis de citocinas e mediadores lipídicos, ou seja, macrófagos M1 produzem citocinas pró-inflamatórias (Sica, Schioppa et al., 2006, Torroella-Kouri, Silvera et al., 2009), enquanto macrófagos M2 produzem citocinas anti-inflamatórias e PGE₂, (Cassetta, Cassol et al., 2011). Dessa forma, avaliamos os mediadores solúveis produzidos por macrófagos M0 na presença das diferentes fontes de células apoptóticas (Figura 12).

Macrófagos M0 foram tão eficientes quanto macrófagos M1 em produzir IL-12 quando comparado com todas as outras condições experimentais. Por outro lado, em condições polarizantes para M2 e na presença de AC foram produzidos baixos níveis de IL-12. Os níveis de IL-12 em macrófagos cultivados na presença de AC-*Sp* não foram detectados. Dessa forma, a liberação de IL-12 nas condições em co-cultura com AC e AC-*Sp* apresentam um perfil próximo ao M2.

Os macrófagos cultivados em condições polarizantes para M1 são os maiores produtores de IL-6, enquanto macrófagos cultivados em condições polarizantes para M2 expressam baixos níveis deste mediador. Diferente do esperado, macrófagos M0 incubados na presença de AC produzem maiores quantidades de IL-6 quando comparado à condição AC-*Sp*. Portanto, quanto a produção de IL-6, tanto a fagocitose de AC como de AC-*Sp* parecem promover um padrão mais associado a M1.

Os maiores níveis de TNF- α detectados no sobrenadante de cultura foram oriundos de macrófagos cultivados em condições polarizantes para M1. Assim como observado quanto à produção de IL-6, os níveis de TNF- α foram baixos na condição polarizante M2. Os macrófagos M0 incubados tanto na presença de AC como de

AC-*Sp* liberam altos níveis de TNF- α . No entanto, macrófagos M0 liberam níveis intermediários deste mediador. Analisando somente a liberação de TNF- α , nossos dados sugerem que tanto a presença de ACs como ACs-*Sp* tendem a um perfil de polarização M1.

A avaliação do sobrenadante de cultura celular para TGF- β demonstrou que os níveis deste mediador foram semelhantes em todas as condições experimentais avaliadas. Portanto, levando em consideração apenas este mediador, não é possível inferir nada a respeito da polarização das condições experimentais.

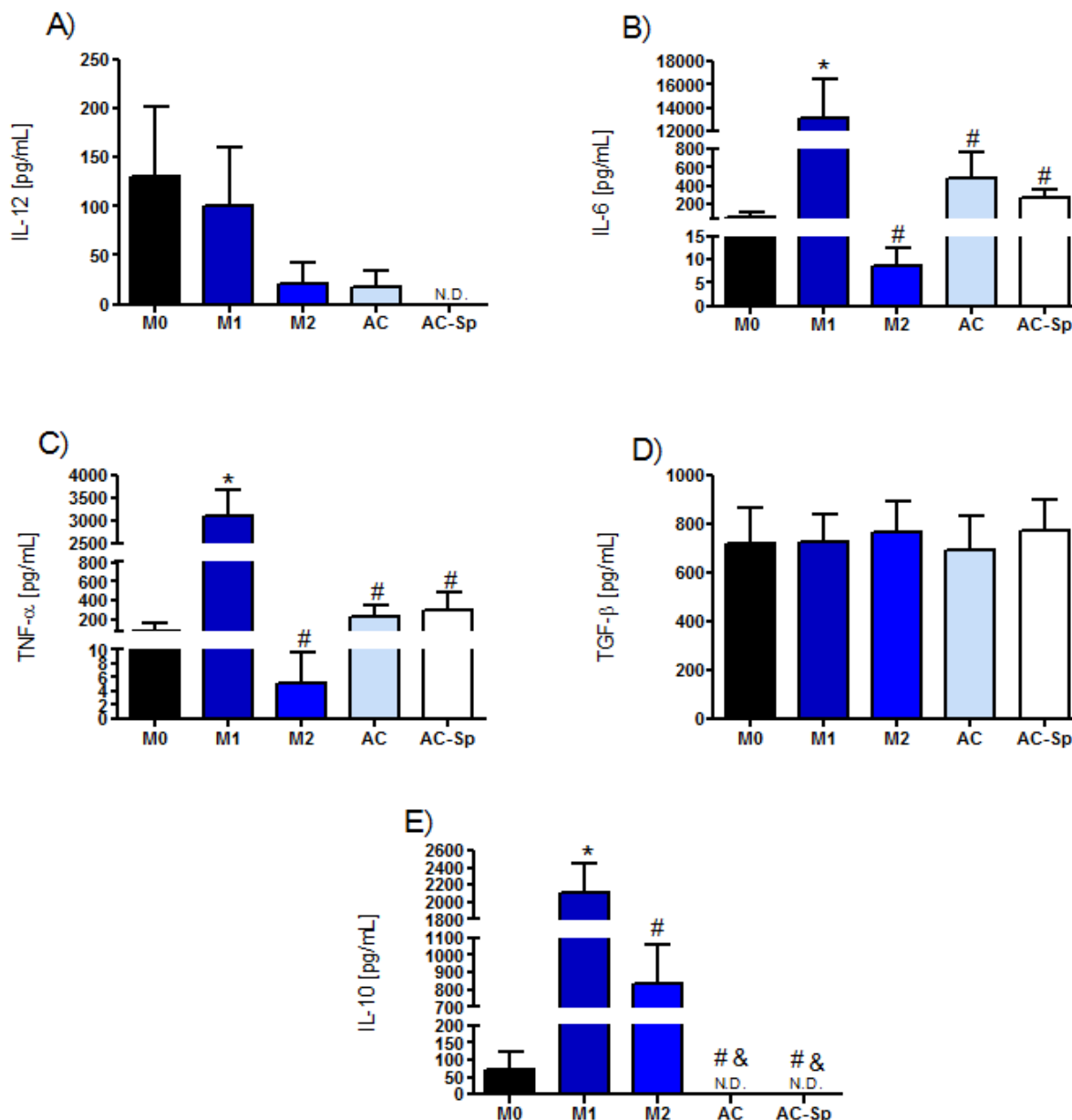
Por fim, diferente do esperado, a produção de IL-10 foi mais pronunciada em macrófagos cultivados em condições polarizantes para M1, seguido de condições polarizantes para macrófagos M2. No entanto, a incubação de macrófagos M0 na presença das diferentes fontes de células apoptóticas não foi capaz de induzir níveis significativos de IL-10.

A citocina IL-1 β foi indetectável nas diferentes condições experimentais (dados não mostrados).

Se avaliarmos o painel geral das proporções das citocinas produzidas nas diferentes condições experimentais, observa-se um perfil do fenótipo de M1/M2 mais consistente (Figura 13). Nos controles positivos, ou seja, em condições polarizantes para M1 e M2, observa-se claramente o perfil de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-12) e anti-inflamatórias (IL-10, TGF- β), respectivamente. No entanto, os dados obtidos sugerem que a fagocitose dos diferentes tipos de ACs, AC e AC-*Sp*, resulta em um perfil misto de polarização de macrófagos M1/M2.

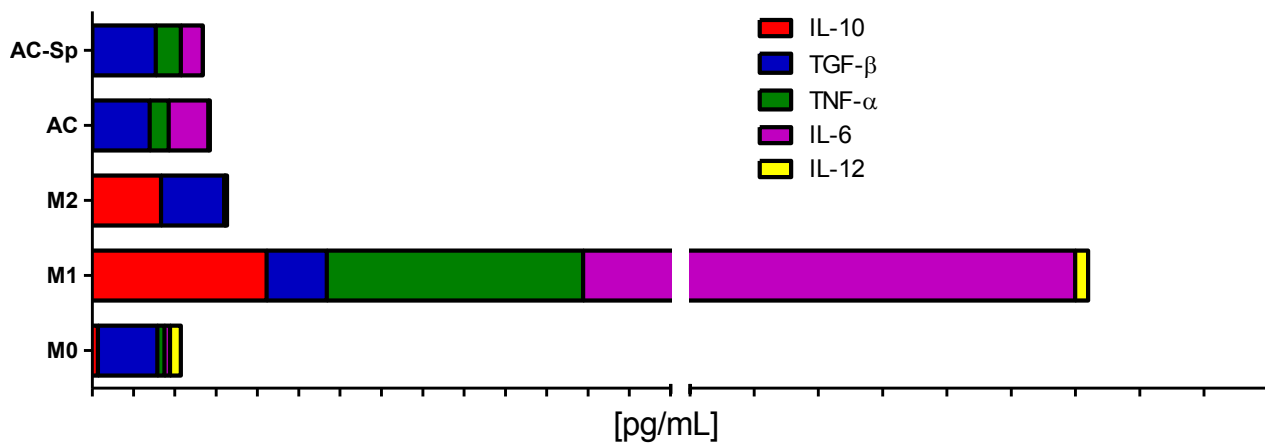
A literatura já descreve que células dendríticas que fagocitam células apoptóticas estéreis ou infectadas liberam no microambiente diferentes citocinas (Brereton C.F, Blander JM, 2010), entretanto, nada se tem descrito ainda para macrófagos M0 derivados de medula óssea produzindo diferentes microambientes frente às diferentes fontes de células apoptóticas.

Figura 12. Perfil de citocinas relacionados ao fenótipo M1/M2 durante a fagocitose de células apoptóticas estéreis e infectados com *Sp* por macrófagos M0.



Quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura celular de macrófagos M0 na presença de AC ou AC-*Sp*, assim como em condições polarizantes para macrófagos M1/M2. Resultados expressos em pg/mL. A) IL-12; B) IL-6; C) TNF-α; D) TGF-β; E) IL-10. Diferença estatisticamente significativa, $p < 0.05$, * vs M0, # vs M1 e & vs M2. Média da quantificação de 8 experimentos realizados individualmente.

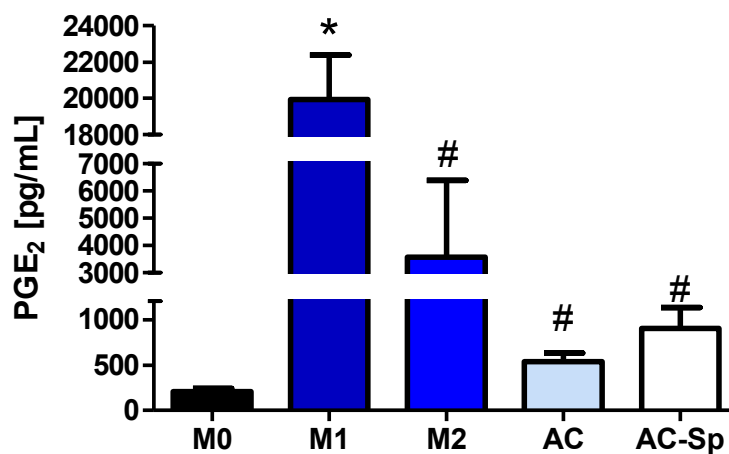
Figura 13. Perfil de citocinas relacionados aos fenótipos de macrófagos M1/M2 produzidos por macrófagos M0 na presença de diferentes fontes de células apoptóticas.



Tendência do perfil de citocinas produzidas nas diferentes condições experimentais.

Quanto à produção de PGE₂, tanto a fagocitose de AC-*Sp* quanto de AC por macrófagos M0 resultou na produção de níveis semelhantes deste mediador lipídico. Nas condições polarizantes (M1/M2), macrófagos M1 foram mais eficientes na produção de PGE₂ quando comparado as demais condições experimentais. Os macrófagos M0 produziram baixos níveis de PGE₂ quando comparado às condições polarizantes e na presença das diferentes células apoptóticas. Ou seja, os altos níveis de PGE₂ parecem estar mais associados a um perfil M1 de macrófagos. Dalli e Serhan (2012), já haviam demonstrado que macrófagos M1 são melhores produtores de PGE₂ que macrófagos polarizados para o perfil M2.

Figura 14. Avaliação da liberação de PGE₂ por macrófagos na presença de células apoptóticas.



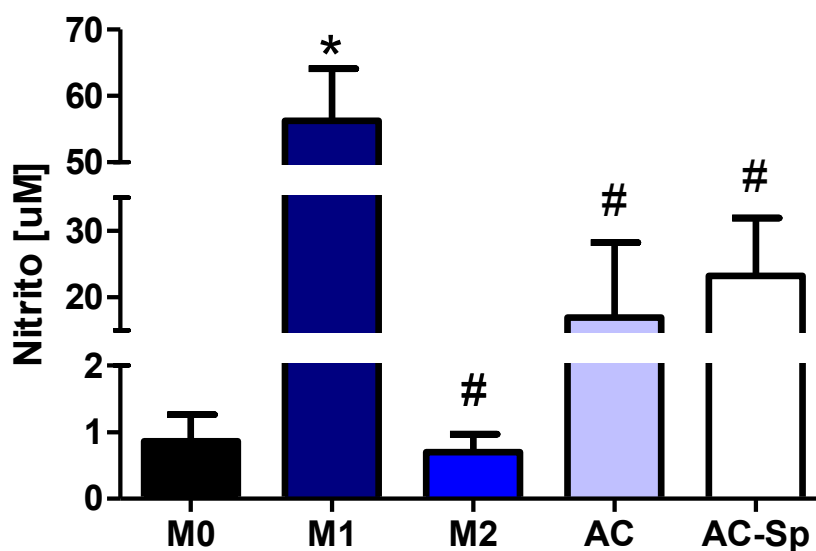
Quantificação de PGE₂, pelo método de ELISA, no sobrenadante de cultura celular de macrófagos M0 na presença de AC ou AC-Sp, assim como em condições polarizantes para macrófagos M1/M2. Resultados expresso em pg/mL. Diferença estatisticamente significativa, $p < 0.05$, * vs M0, # vs M1. Média da quantificação de 8 experimentos realizados individualmente.

O NO é um gás produzido pelas células do nosso organismo e está envolvido em muitos processos biológicos, como o controle da pressão sanguínea, agregação plaquetária e transmissão de sinais no sistema nervoso. Em células do sistema imune, o NO atua potencializando a atividade microbicida dos fagócitos, como os macrófagos, contra diferentes microrganismos (Durner et al, 1999).

Sabe-se que macrófagos M1 produzem altas concentrações de óxido nítrico e reativos de oxigênio (Sica, Schioppa et al. 2006) que justificam a excelente atividade microbicida dessas células (Cassetta, Cassol et al, 2011), enquanto macrófagos M2 possuem um alto metabolismo de arginase, responsável pela proliferação celular e remodelação tecidual (Hesse et al, 2001). Assim, foi avaliada a produção de óxido nítrico em macrófagos M0 cultivados na presença das diferentes fontes de células apoptóticas (Figura 15).

Como esperado, os macrófagos em condições polarizantes para M1 foram capazes de produzir níveis elevados de nitrito quando comparados aos macrófagos M0 e M2. No entanto, a fagocitose de AC ou AC-*Sp* por macrófagos M0 resultou na produção dos mesmos níveis de nitrito. Tanto a fagocitose de AC quanto AC-*Sp* induzem uma produção de NO semelhante às células polarizadas para o perfil M1.

Figura 15. Quantificação de óxido nítrico produzido por macrófagos M0 cultivados na presença de diferentes fontes de células apoptóticas.



Quantificação de NO a partir do sobrenadante de cultura celular das diferentes condições experimentais de macrófagos M0 incubados por 48h na presença de AC, AC-Sp e em condições polarizantes para M1 e M2. Estatística $p < 0.05$, * vs M0, # vs M1. Média da quantificação de 6 experimentos realizados individualmente.

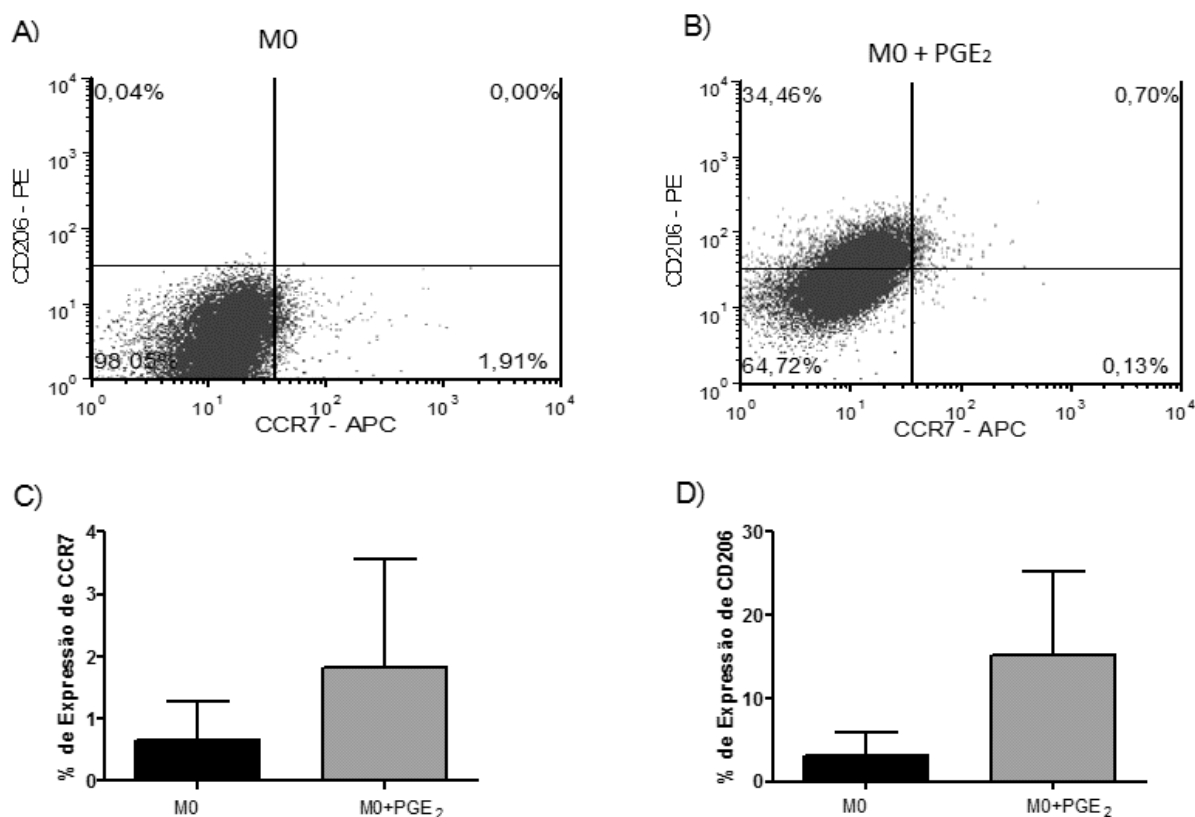
5.5. Influência da PGE₂ na polarização de macrófagos M1/M2.

Sabe-se que PGE₂ é capaz de modular as funções efetoras de macrófagos (Medeiros, Al., 2009; Dennis et al., 2010) e que a fagocitose de células apoptóticas promove a liberação de PGE₂ no microambiente (Fadok, V. A., et al. 1998; Medeiros, Al., 2009). Além disso, sabe-se que PGE₂ induz os macrófagos a produzirem altos níveis de IL-10 e IL-6 (Kim SH, et al. 2011; Mège JL, et al 2011), que induzem a polarização a macrófagos M2.

Para confirmar os dados da literatura, inicialmente, cultivamos macrófagos M0 na presença de PGE₂ (10µM) exógena, por 48h, para avaliar a influência deste mediador na polarização destes macrófagos. Os resultados obtidos corroboram com a literatura existente, uma vez que observamos um aumento de 861 vezes na expressão de CD206 e a diminuição de 14,7 vezes da expressão de CCR7 quando comparados com macrófagos M0 (0,04% para CD206 e 1,91% para CCR7), significando uma polarização para o fenótipo M2 (Figura 16).

A somatória das porcentagens da expressão de CCR7 e CD206 de três experimentos individuais confirmam esses resultados. Na presença de PGE₂, macrófagos M0 dirigem a sua polarização para o fenótipo M2.

Figura 16. Influência da PGE₂ na polarização de macrófagos M0.



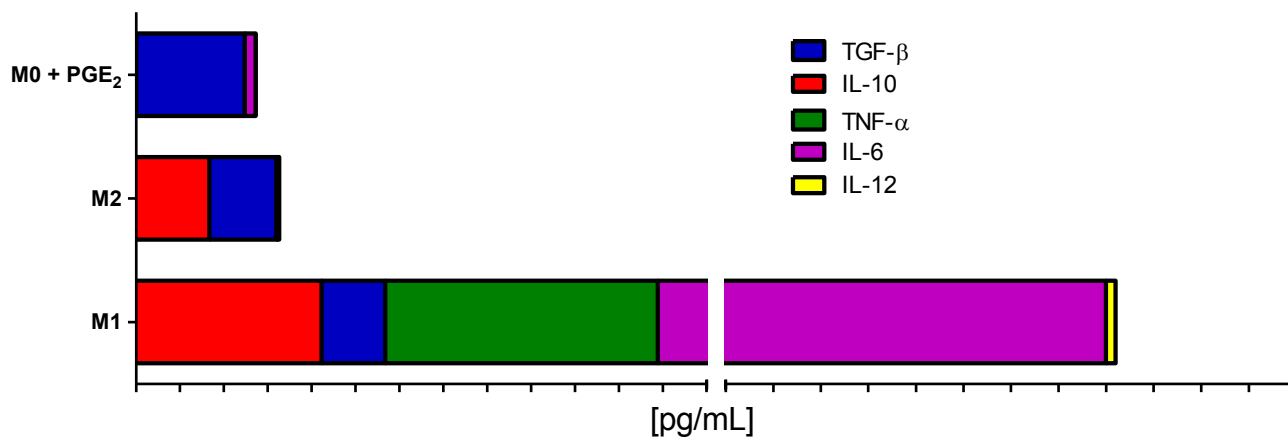
Macrófagos M0 obtidos a partir da diferenciação de células da medula óssea foram incubados por 48h na presença ou ausência de PGE₂ e, em seguida, avaliados por citometria de fluxo quanto a expressão dos receptores CCR7 e CD206. A) Macrófagos M0. B) Macrófagos M0 co-cultivados com 10 μ M de PGE₂. C) Somatória da porcentagem de expressão da molécula de CCR7 em 3 experimentos individuais. D) Somatória da porcentagem de expressão da molécula CD206 em 3 experimentos individuais.

Além das moléculas de superfície, também foi analisado se macrófagos M0, na presença de PGE₂, promoveriam um microambiente correspondente aos perfis de macrófagos M1 ou M2, com liberação diferenciada de citocinas, mediadores lipídicos e NO.

Macrófagos M0 incubados na presença de PGE₂ não produzem citocinas como TNF- α , IL-12, IL-10 e IL-1 β . Entretanto, produzem altos níveis de TGF- β e pequenos níveis de IL-6. Embora haja uma pequena produção de IL-6, a principal citocina liberada é o TGF- β , confirmando o perfil M2 adotado quando macrófagos M0 são incubados na presença de PGE₂ (Figura 17).

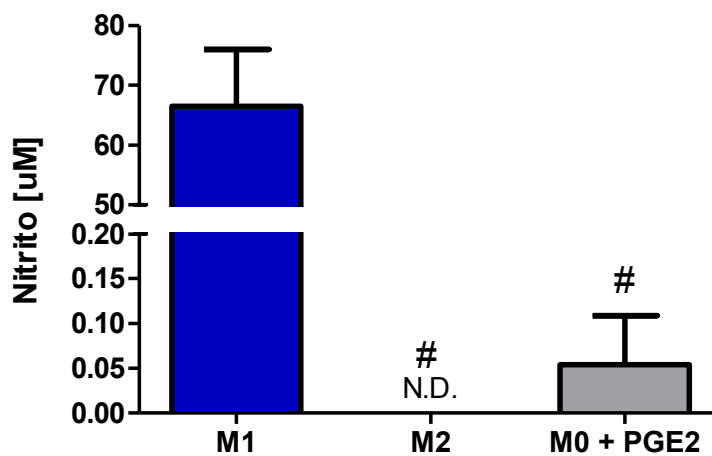
Quando avaliada a produção de NO por macrófagos M0 na presença de PGE₂, observa-se que a quantificação de nitrito foi semelhante à detectada em macrófagos diferenciados em condições polarizantes para M2 (Figura 18).

Figura 17. Influência da PGE₂ na produção de citocinas.



Tendência do perfil de citocinas produzidas nas diferentes condições experimentais. Somatória de todas as citocinas quantificadas em 3 diferentes experimentos.

Figura 18. Quantificação de NO produzido por macrófagos M0 na presença de PGE₂.



Quantificação de NO a partir do sobrenadante de cultura celular das diferentes condições experimentais de macrófagos M0 incubados por 48h na presença de PGE₂ e em condições polarizantes para M1 e M2. Estatística $p < 0.05$, # vs M1. Média da quantificação de 3 experimentos realizados individualmente.

Portanto, tanto os resultados obtidos por citometria de fluxo, quanto quantificação de citocinas e dosagem de nitrito, demonstram que macrófagos incubados com PGE₂ adotam um perfil M2, corroborando com os dados da literatura (Kim SH, et al. 2011; Mège JL, et al 2011).

Em um segundo momento, investigou-se se a PGE₂ produzida durante a fagocitose de AC e AC-*Sp* estaria interferindo na polarização de macrófagos M1/M2. Para tanto, macrófagos M0 foram tratados com indometacina (10µM) (Indo) ou ibuprofeno (10µM) (Ibup), inibidores não seletivos da enzima COX, na presença de AC ou AC-*Sp*. O tratamento com indometacina resultou em uma modesta expressão da molécula CD206 (0,12%) e um pequeno aumento na expressão de CCR7 (3,89%) quando comparado com macrófagos M0 + AC que não foram submetidos ao tratamento (0,93% para CD206 e 3,66% para CCR7) com os compostos. Por outro lado, quando macrófagos M0 foram incubados na presença do Ibuprofeno, houve redução na expressão de CCR7 (1,36%) como de CD206 (0,51%) quando comparados a macrófagos M0 incubados na presença de AC (Figura 19).

A co-cultura de M0+AC-*Sp* na presença de indometacina resultou no aumento da expressão de CD206 (1,09%) e diminuição na expressão de CCR7 (3,84%) quando comparado com macrófagos M0 incubados apenas com AC-*Sp* não tratados com indometacina (0,24% para CD206 e 5,00% para CCR7). Por outro lado, a incubação com ibuprofeno desencadeou uma maior expressão tanto de CCR7 quanto CD206, 5,66% e 5,91%, respectivamente, quando comparado com a condição AC-*Sp*.

A média das porcentagens de expressão das moléculas de CCR7 e CD206 das repetições biológicas demonstra que na presença dos inibidores de COX, macrófagos M0, co-cultivados com AC, apresentam uma diminuição da expressão da molécula de CD206 e um aumento da expressão de CCR7, sugerindo a polarização para um fenótipo próximo ao M1.

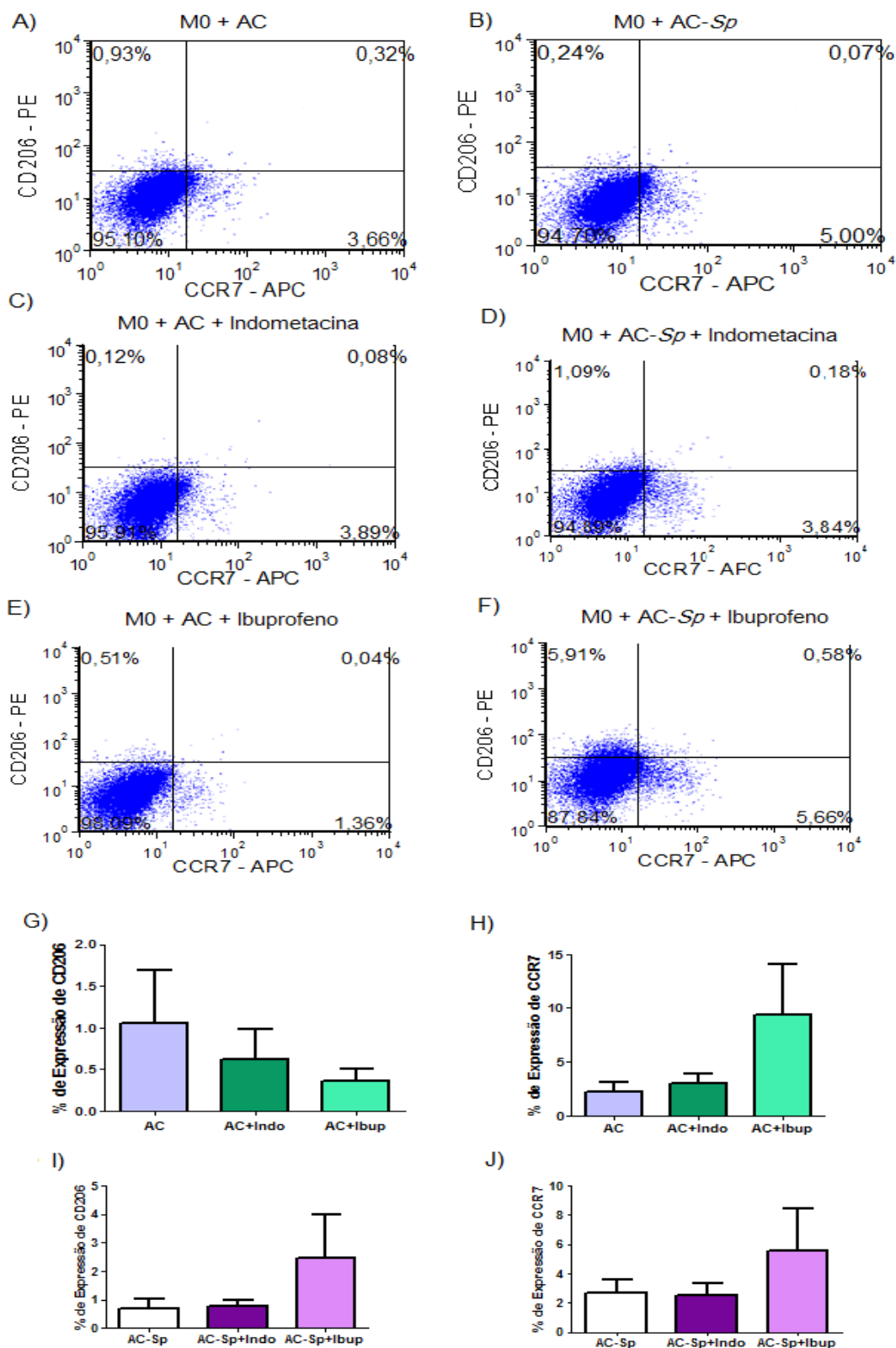
Por outro lado, a média das porcentagens de expressão das moléculas de CCR7 e CD206 das repetições biológicas de macrófagos M0 cultivados na presença de AC-*Sp* e os inibidores de COX apresentaram resultados contraditórios. Na presença de indometacina não houve alteração da expressão destas moléculas.

Entretanto, o tratamento com ibuprofeno resultou no aumento tanto da expressão de CD206 quanto de CCR7 quando comparado com macrófagos M0 na presença de AC-*Sp*. O aumento de CCR7 está associado ao perfil M1, porém como houve um aumento também de CD206, perfil M2, acredita-se que essas células passam a adquirir um fenótipo misto na ausência de PGE₂.

Esses resultados serão validados utilizando marcadores fenotípicos para M1/M2 pela técnica de RT-qPCR.

De maneira geral, nossos resultados corroboram com a literatura vigente. Estudos com macrófagos derivados da medula de animais Balb/c demonstram que a utilização de inibidores de COX-2 bloqueiam a polarização do fenótipo M2 e promovem a atividade pró-inflamatória desses macrófagos (Na YR., et al 2013). O mesmo grupo de pesquisa também demonstrou que tanto inibidores não seletivos de COX como inibidores seletivos para COX-2, na presença de macrófagos, promovem aumento da produção de TNF- α e IL-12p70 (Na YR., et al 2015).

Figura 19. Efeito da inibição de PGE₂ em macrófagos M0 após a fagocitose de diferentes fontes de células apoptóticas



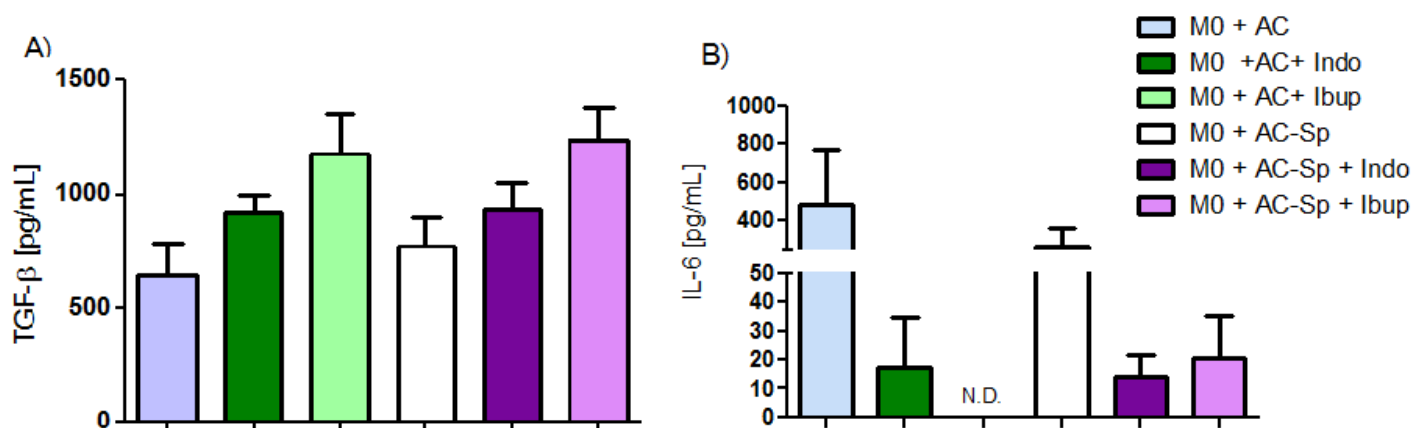
Macrófagos M0 foram tratados com inibidores de COX (indometacina ou ibuprofeno, 10 μ M) e na presença das diferentes fontes de células apoptóticas, ACs e AC-Sp. A cultura celular

foi avaliada por citometria de fluxo quanto à expressão dos receptores CCR7 e CD206. A) Macrófagos M0 co-cultivados com AC. B) Macrófagos M0 co-cultivados com AC-*Sp*. C) Macrófagos M0 incubados indometacina na presença de AC. D) Macrófagos M0 incubados com indometacina na presença de AC-*Sp*. E) Macrófagos M0 incubados com ibuprofeno na presença de AC. F) Macrófagos M0 incubados com ibuprofeno na presença de AC-*Sp*. G) Somatória da porcentagem de expressão da molécula de CD206 de 3 experimentos individuais quando AC foram incubadas com macrófagos M0 na presença ou não dos inibidores. H) Somatória da porcentagem de expressão da molécula de CCR7 de 3 experimentos individuais quando AC foram incubadas com macrófagos M0 na presença ou não dos inibidores. I) Somatória da porcentagem de expressão da molécula de CD206 de 3 experimentos individuais quando AC-*Sp* foram incubadas com macrófagos M0 na presença ou não dos inibidores. J) Somatória da porcentagem de expressão da molécula de CCR7 de 3 experimentos individuais quando AC-*Sp* foram incubadas com macrófagos M0 na presença ou não dos inibidores.

Avaliando a produção de citocinas de macrófagos M0 co-cultivados com AC ou AC-*Sp*, na presença de indometacina ou ibuprofeno, observa-se uma drástica mudança no perfil de citocinas liberadas. Macrófagos M0 incubados com AC na presença dos inibidores liberam altas quantidades de TGF- β e baixas quantidades de IL-6, quando comparados com macrófagos M0 co-cultivados com AC, sem tratamento. Em ambos os casos, os efeitos foram mais pronunciados quando utilizamos o inibidor ibuprofeno. Além disso, nessas condições não detectamos IL-12, TNF- α , IL-1 β e IL-10 (dados não mostrados) (Figura 20).

Um cenário semelhante ocorre com macrófagos M0 co-cultivados na presença de AC-*Sp* e os inibidores. Essas células produzem níveis elevados de TGF- β e menores quantidades de IL-6 quando comparados com macrófagos incubados na presença de apenas AC-*Sp*. Da mesma forma, essas células deixam de produzir IL-10, IL-12, IL-1 β e TNF- α (dados não mostrados).

Figura 20. Influência de inibidores de COX na produção de citocinas.



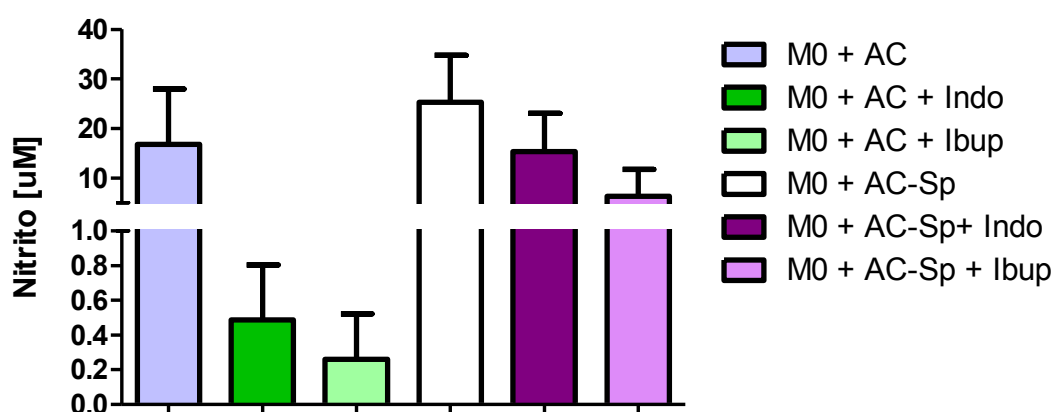
Quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura celular de macrófagos M0 na presença de AC ou AC-Sp e dos inibidores de COX. Resultados expresso em pg/mL. A) TGF-β. B) IL-6. Diferença estatisticamente significativa, $p < 0.05$, * vs M0, # vs M1 e & vs M2. Média da quantificação de 4 experimentos realizados individualmente.

A dosagem de nitrito liberado por macrófagos M0 cultivados com AC ou AC-*Sp* na presença dos diferentes inibidores também foi avaliada. Macrófagos M0 co-cultivados com AC e os inibidores apresentam uma brusca queda na produção de NO, aproximando-se de valores próximos a zero e assemelhando-se a liberação promovida por macrófagos M2. Um fenômeno semelhante, porém menos pronunciado, ocorre com macrófagos M0 incubados com AC-*Sp* e os inibidores de COX. Há uma diminuição na liberação de NO na presença tanto de indometacina quanto de ibuprofeno (Figura 21).

Assim, nossos resultados sugerem que a inibição da PGE₂ liberada durante a fagocitose de AC promoveu um perfil M2 e a inibição deste mediador lipídico durante a fagocitose de AC-*Sp* não foi capaz de alterar bruscamente a liberação de NO por essas células, promovendo ainda um perfil M1.

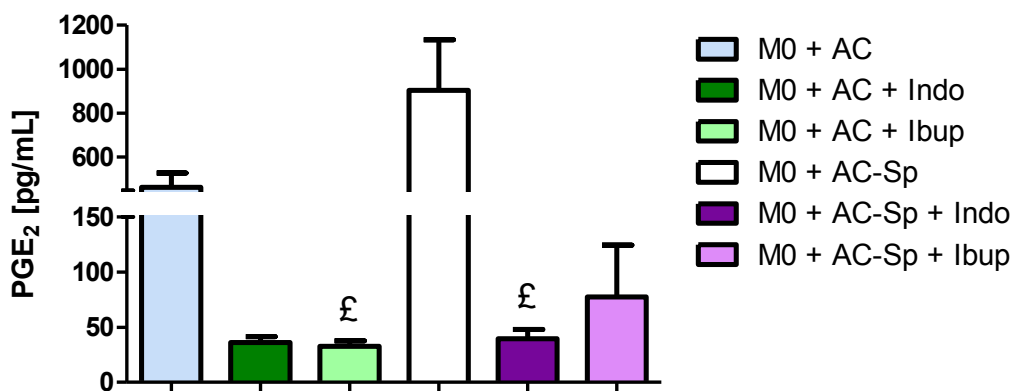
A quantificação de PGE₂ em macrófagos M0 cultivados com AC ou AC-*Sp* na presença dos inibidores não seletivos de COX também foi avaliada. Os resultados demonstram que a presença de ambos os inibidores, indometacina ou ibuprofeno, é capaz de inibir a produção desse mediador em níveis inferiores aos liberados por macrófagos M0, demonstrando assim a eficiência do tratamento na inibição da liberação de PGE₂ em todas as condições experimentais avaliadas.

Figura 21. Quantificação de óxido nítrico produzido macrófagos M0 na presença de inibidores não seletivos de COX.



Quantificação de NO a partir do sobrenadante de cultura celular das diferentes condições experimentais de macrófagos M0 incubados por 48h na presença de AC, AC-Sp e inibidores de COX. Estatística $p < 0.05$, * vs M0, # vs M1. Média da quantificação de 4 experimentos realizados individualmente.

Figura 22. Quantificação de PGE₂ produzida por macrófagos M0 na presença de inibidores não seletivos de COX.



Quantificação de PGE₂ a partir do sobrenadante de cultura celular das diferentes condições experimentais de macrófagos M0 incubados por 48h na presença de AC, AC-Sp e inibidores de COX. Estatística $p < 0.05$, £ vs AC-Sp. Média da quantificação de 4 experimentos realizados individualmente.

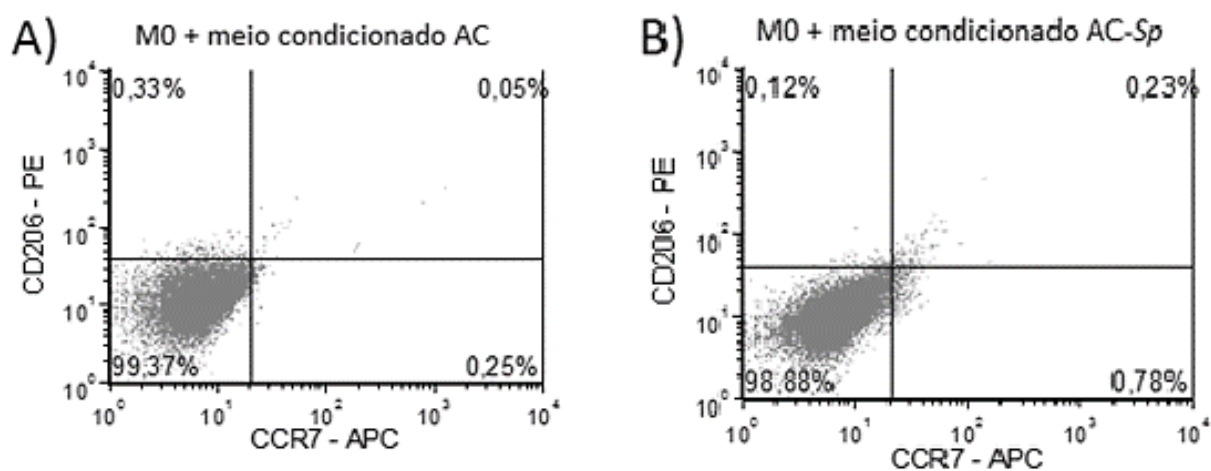
5.6. Envolvimento dos mediadores solúveis produzidos durante a fagocitose de diferentes fontes de células apoptóticas por macrófagos M0 na polarização em macrófagos M1/M2.

Sabendo que a fagocitose de células apoptóticas, infectadas ou estéreis, promove um microambiente rico em citocinas, mediadores lipídicos e fatores de crescimento (Fadok, Bratton et al. 1998; Kim, Chung et al. 2005; Chung, Kim et al. 2006; Medeiros, Al., al. 2009, Torchinsky, Garaude et al. 2010) nos questionamos se o microambiente gerado durante a fagocitose de AC ou AC-*Sp* era imprescindível para a diferenciação de macrófagos M0 ou se o contato célula-célula era o responsável por induzir a polarização dessas células.

Dessa forma, o próximo passo foi avaliar se macrófagos M0 na presença do meio condicionado oriundo da co-cultura de macrófagos M0+AC (meio condicionado AC) ou proveniente da co-cultura de macrófagos M0+AC-*Sp* (meio condicionado AC-*Sp*) seria capaz de promover a polarização de macrófagos M0 em M1/M2.

Diferente do que esperávamos tanto o meio condicionado oriundo da fagocitose de AC quanto o meio condicionado de AC-*Sp* não foram capazes de induzir a polarização de macrófagos M0 em diferentes fenótipos de macrófagos M1/M2 (Figura 23). Esses resultados comprovam a importância do contato célula-célula para ativação e posterior diferenciação de macrófagos M0 em um fenótipo misto de M1/M2, como observado na Figura 10.

Figura 23. Importância do contato célula-célula para a polarização de macrófagos.



Os macrófagos M0 foram incubados por 48h na presença de meios condicionados obtidos de experimentos anteriores. Após esse período, o fenótipo M1/M2 foi avaliado por citometria de fluxo quanto a expressão dos receptores CCR7 e CD206. A) Macrófagos M0 co-cultivados na presença de meio condicionado AC. B) Macrófagos M0 co-cultivados na presença de meio condicionado AC-Sp. Experimento representativos de 3 experimentos realizados individualmente.

Nossos resultados sugerem que apesar da presença de diferentes citocinas envolvidas na diferenciação de macrófagos M1/M2 nos meios condicionados oriundos da fagocitose de AC ou AC-*Sp* por macrófagos M0, os níveis destes mediadores comparados aos utilizados nas condições polarizantes, estão aquém dos utilizados nos controles de M1 e M2. Dessa forma, os dados obtidos sugerem que o meio condicionado apenas não é capaz de justificar o perfil de polarização observado em nossos experimentos, provavelmente devido a quantidades dos mediadores produzidos, e que o contato célula-célula (M0+AC ou M0+AC-*Sp*) parece ser imprescindível para polarização de macrófagos no contexto de eferocitose.

5.7. Determinação da atividade fagocítica e microbicida de macrófagos M0 após a fagocitose de diferentes fontes de células apoptóticas

Os fagócitos residentes, como CDs e macrófagos teciduais, são a primeira linha de defesa do nosso organismo contra microrganismos. Uma vez que essas células reconhecem o patógeno, elas passam a agir de forma a combater e eliminar o foco infeccioso. Sabe-se que durante a fase aguda das infecções há um grande acúmulo de células apoptóticas no tecido afetado (Chung, Kim et al. 2006). Os resultados apresentados anteriormente sugerem que a fagocitose de diferentes fontes de células apoptóticas, AC e AC-*Sp*, por macrófagos M0 resulta em um padrão misto quanto a produção de mediadores solúveis. Há uma predominância de TNF- α e IL-6 mediante a fagocitose de ambas as células apoptóticas, e maiores níveis de PGE₂ na presença de AC-*Sp*. Macrófagos M1/M2 são descritos por apresentarem diferenças significativas na fagocitose e atividade microbicida (Cassetta, Cassol et al., 2011; Biswas SK, Mantovani A., 2012; Arango Duque G, Descoteaux A., 2014). Dessa forma, as funções efetoras destes macrófagos diferenciados na presença de AC e AC-*Sp* foram avaliadas quando desafiados com *S. pneumoniae*.

Como visto na Figura 24, não foram observadas diferenças significativas quanto à capacidade fagocítica de macrófagos em todas as condições avaliadas, assim como nos controles positivos de M1/M2, em condições polarizantes. Entretanto, quando analisamos a atividade microbicida, foi possível detectar

diferenças entre as diferentes condições experimentais (Figura 25). Macrófagos M0 cultivados na presença tanto de AC como de AC-*Sp* apresentam um aumento no número de bactérias recuperadas quando comparado aos macrófagos M0, ou a ambas as condições polarizantes, M1/M2. Ou seja, a presença de ambas as fontes de células apoptóticas promovem um ambiente supressor que dificulta a atividade microbicida destes macrófagos. No entanto, independente da fonte de célula apoptóticas utilizada, não houve diferenças quanto à eficiência da capacidade microbicida por esses macrófagos polarizados. Nos dois casos, além dos macrófagos não serem capazes de eliminar a bactéria fagocitada, há um crescimento bacteriano no interior dessas células.

Analisando os resultados obtidos, podemos perceber que os macrófagos M2 possuíram melhor atividade microbicida quando comparado aos macrófagos M1 e as macrófagos incubados na presença de células apoptóticas estéreis ou infectadas. Dentre as condições experimentais, os macrófagos M1 foram as células que apresentaram atividade microbicida semelhante às células incubadas com os diferentes tipos de células apoptóticas, entretanto, diferente do que ocorre na presença das AC e AC-*Sp*, nos macrófagos M1 não há crescimento do patógeno no interior celular.

Para garantir que o crescimento bacteriano na condição AC-*Sp* era exclusivamente derivado dos ensaios de atividade fagocítica e de atividade microbicida, e não de possíveis bactérias vivas presentes no interior dos neutrófilos apoptóticos, fizemos um grupo experimental que passou por todos os procedimentos, com exceção do desafio com o *Sp*. Nesta condição, contendo apenas o neutrófilo infectados em cultura com macrófagos M0, não foram recuperadas *Sp*, excluindo, portanto, a possibilidade de contaminantes oriundos de bactérias presentes nas células apoptóticas infectadas influenciarem nos resultados (dados não mostrados).

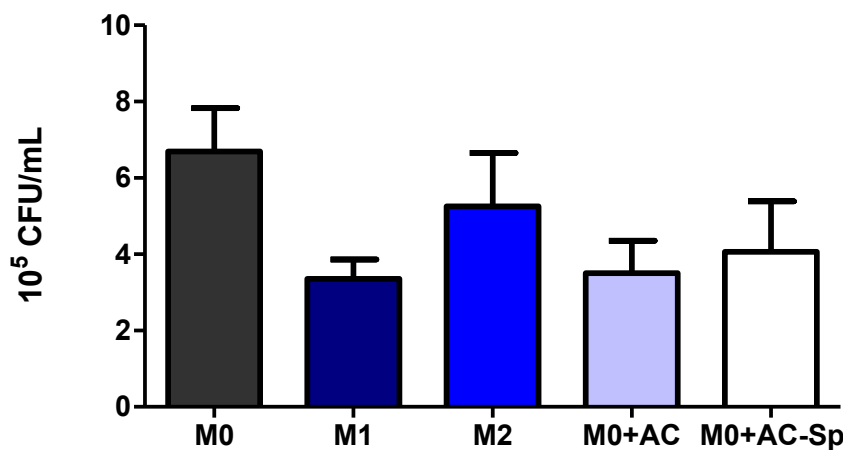
Os resultados aqui apresentados diferem de relatos na literatura, pois em nossas condições experimentais, macrófagos M1 não possuem excelente atividade microbicida, uma vez que esse grupo de macrófagos não foi capaz de eliminar o

patógeno internalizado (Cassetta, Cassol et al., 2011; Biswas SK, Mantovani A., 2012; Arango Duque G, Descoteaux A., 2014).

A baixa atividade microbicida dos nossos macrófagos M1 pode estar relacionada com o fato destas células serem excelentes produtoras de óxido nítrico. Estudos com compostos doadores de NO para o tratamento *T. cruzi* demonstram que altos níveis de NO são capazes de suprimir as respostas do organismo, favorecendo um aumento da parasitemia e diminuição da sobrevivência dos animais testados (Silva JJ et al., 2009). Além disso, já é descrito que NO é capaz de inibir a ativação de inflamassoma, que contribuiria com a eliminação do patógeno fagocitado via NLRP3, promovendo assim a inibição da produção de IL-1 β , porém sem interferir na liberação de IL-6 ou TNF- α (Mao K et. al, 2013). Mediante essa informação e lembrando que, diferente do esperado, não foi detectada a presença de IL-1 β em nossos macrófagos M1 e que houve liberação tanto de IL-6 quanto TNF- α por essas condições experimentais, sugere-se que nossas condições experimentais: macrófagos M1, macrófagos polarizados na presença de AC e macrófagos polarizados na presença de AC-*Sp*, podem estar em um estado de supressão pelo excesso de NO produzido. Ademais, já é descrito que NO é capaz de suprimir a diferenciação de macrófagos M1, uma vez que testes com animais deficientes de iNOS demonstraram aumento na polarização para M1 sem alterar a polarização de macrófagos pela via alternativa (Lu G. et. al, 2015).

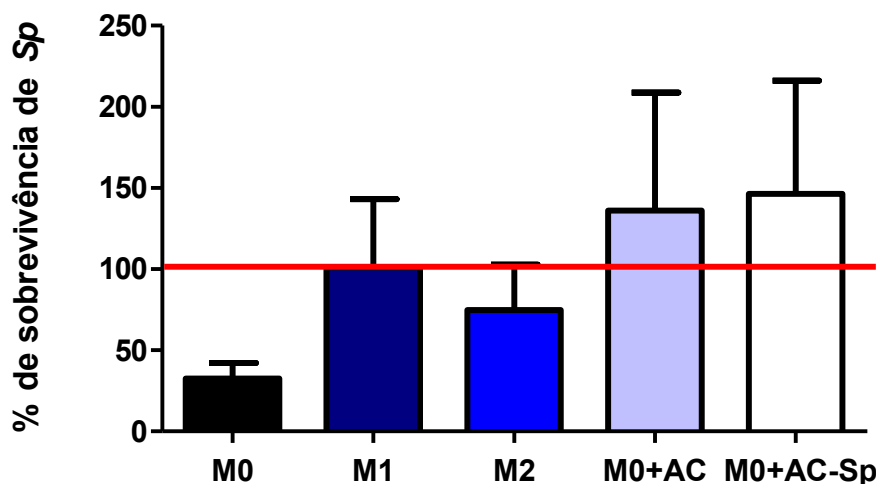
A baixa capacidade microbicida contra *Sp* por macrófagos M1, assim como por macrófagos M0 polarizados na presença dos diferentes tipos de células apoptóticas, pode estar relacionado aos altos níveis de PGE₂ presentes nestas condições experimentais. Nosso e outros grupos de pesquisa demonstraram previamente que a fagocitose de células apoptóticas estéreis (Fadok, Bratton et al. 1998; Medeiros, Al et al., 2009) ou infectadas (dados ainda não publicados) induz a liberação de altos níveis de PGE₂, e a presença deste mediador gera um microambiente imunossupressor que inibe a eliminação de patógenos como o *S. pneumoniae* (Medeiros, Al et al., 2009; Aronoff, DM et al., 2009) e *Clostridium sordellii* (Rogers LM, et al., 2014).

Figura 24. Avaliação da capacidade fagocítica por macrófagos M0 na presença de diferentes tipos de células apoptóticas e em condições polarizantes.



Macrófagos M0 incubados com AC ou AC-Sp por 48h e desafiados com Sp por 3h. Após esse período, as células foram lavadas com PBS, e então lisadas com saponina 0,5% gelada. 10µL do lisado celular diluído (base 10) foram distribuídos em placas de ágar sangue. Após 24h as colônias foram avaliadas quanto à formação do halo de hemólise e as UFC contadas. Resultados expressos em UFC/mL. Média de 4 experimentos realizados individualmente.

Figura 25. Avaliação da atividade microbicida por macrófagos M0 na presença de diferentes tipos de células apoptóticas e em condições polarizantes.



Macrófagos M0 incubados com AC ou AC-Sp, por 48h, e desafiados com *Sp* por 3h. Após esse período as células foram lavadas com PBS, e reincubadas por 4h. Após esse período, as células foram lisadas com saponina 0,5% gelada. 10 μ L do lisado celular diluído (base 10) foram distribuídos em placas de ágar sangue. Após 24h as colônias foram avaliadas quanto à formação do halo de hemólise e as UFC contadas. Resultados expressos em porcentagem de sobrevivência de *Sp*. Média de 4 experimentos realizados individualmente.

6.14. Impacto da instalação de células apoptóticas estéreis ou infectadas *in vivo* na infecção pulmonar por *S. pneumoniae*.

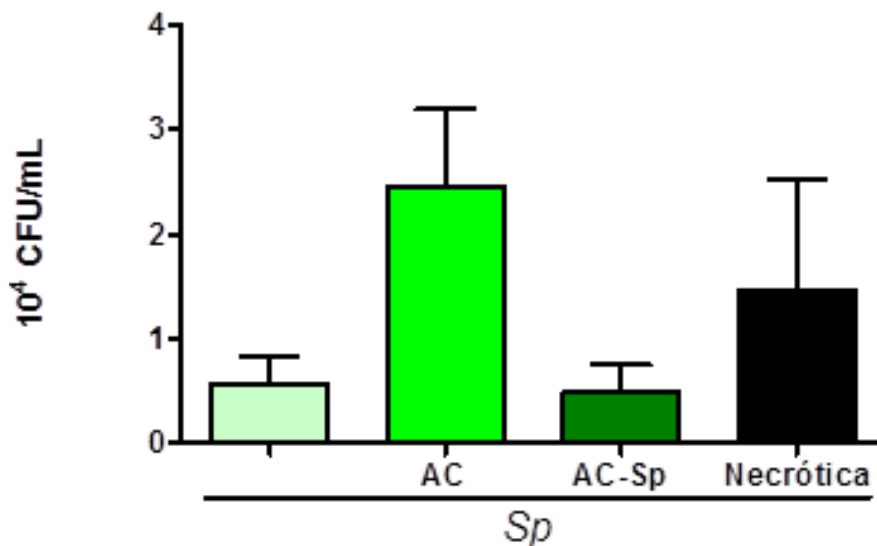
Nosso grupo de pesquisa demonstrou previamente que a presença de AC é capaz de promover um ambiente imunossupressor razão dependente do número de células instiladas no pulmão dos animais desafiados com *S. pneumoniae*. Ou seja, quanto maior o número de AC administradas, maior a imunossupressão e, portanto, maior a recuperação de UFC do pulmão de animais desafiados com *S. pneumoniae* (Medeiros, Al et al., 2009).

Dessa forma, foi avaliado se as diferentes fontes de ACs (AC ou AC-*Sp*), poderiam influenciar na diferenciação de macrófagos pulmonares em M1/M2 e modular o microambiente pulmonar de animais desafiados com *Sp*.

Os resultados obtidos confirmam a publicação anterior do nosso grupo, a fagocitose de AC desencadeia um microambiente extremamente imunossupressor que impede a eliminação da bactéria no pulmão. Por outro lado, embora os nossos resultados *in vitro* não demonstrem diferenças significativas quanto ao padrão de citocinas e PGE₂ liberados pelos macrófagos após a fagocitose das diferentes fontes de células apoptóticas, os experimentos *in vivo* demonstram que o tipo de células apoptóticas administrada interfere no padrão de resolução da infecção por *S. pneumoniae*. Animais que receberam previamente AC-*Sp* conseguem combater a infecção de maneira semelhante aos animais que não receberam nenhum tipo de estímulo imunossupressor (Figura 26).

Para demonstrar que os resultados obtidos eram realmente decorrentes da administração de AC e, portanto, não da presença de células em estado de necrose, que promove um ambiente pró-inflamatório, um grupo experimental foi instilado com células necróticas. Os resultados demonstram uma resposta intermediária entre os animais que receberam AC e os animais que receberam AC-*Sp*. A resposta diferenciada desencadeada pelas células necróticas está provavelmente relacionada com a liberação de DAMPs no microambiente, que promove uma resposta pró-inflamatória e provavelmente maior resolução da infecção. Estes dados representam apenas dois experimentos individuais e o mesmo será repetido para confirmação dos resultados obtidos.

Figura 26. A instilação de AC e AC-*Sp* promove diferentes respostas quanto a capacidade microbicida *in vivo*.



Animais foram divididos em 4 grupos experimentais (controle, desafiados com AC, desafiados com AC-*Sp* e desafiados com células necróticas). No primeiro dia, cada um dos grupos recebeu 10^7 células correspondentes ao grupo a qual cada animal pertencia, e no grupo controle, foi administrado o mesmo volume de PBS. Após 24h, todos os animais foram desafiados com a instilação 10^6 bactérias. Após 48h de instilação da suspensão bacteriana, os animais foram sacrificados e tiveram o pulmão coletado. O tecido pulmonar foi triturado e distribuído em ágar sangue seguindo diluição seriada (base dez) para recuperação de UFC de *Sp*. Experimento representativo de 2 experimentos realizados individualmente.

6. Conclusões

Nossos resultados *in vitro* sugerem que macrófagos M0 cultivados na presença de células apoptóticas infectadas (AC-*Sp*) ou estéreis (AC) adquirem um fenótipo intermediário entre M1 e M2, com liberação de citocinas como IL-12, IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β , óxido nítrico e atividades fagocíticas e microbidas semelhantes. Os ensaios de atividade microbicida sugerem um efeito supressor do NO em nossas condições experimentais. O tratamento das diferentes condições experimentais com inibidores de COX resultou na reversão de um padrão misto de polarização para um padrão associado ao perfil M2. Os resultados *in vivo* demonstram que a fagocitose das diferentes fontes de células apoptóticas induzem respostas diferentes em animais desafiados posteriormente com *S. pneumoniae* sugerindo que possa estar ocorrendo uma polarização diferenciada dos macrófagos presente no tecido pulmonar, influenciando de maneira oposta na eliminação de microrganismos no pulmão destes animais.

7. Bibliografia

Arango DG, Descoteaux A. (2014). "Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases". Front Immunol.; 5: 491.

Ariel, A., Serhan, C.N. (2012). "New lives given by cell death: macrophage differentiation following their encounter with apoptotic leukocytes during the resolution of inflammation". Front Immunol. 3:4.

Armstrong, R. A. (1995). "Investigation of the inhibitory effects of PGE₂ and selective EP agonists on chemotaxis of human neutrophils." Br J Pharmacol 116(7): 2903-2908.

Aronoff, D. M., C. Canetti, et al. (2004). "Prostaglandin E₂ inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP." J Immunol 173(1): 559-565.

Aronoff, D. M., C. Canetti, et al. (2005). "Cutting edge: macrophage inhibition by cyclic AMP (cAMP): differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP-1." J Immunol 174(2): 595-599.

Aronoff, D.M., Lewis C, et al. (2009). "E-prostanoid 3 receptor deletion improves pulmonary host defense and protects mice from death in severe *Streptococcus pneumoniae* infection".J Immunol. 183(4):2642-9.

Azzam, R., K. Kedzierska, et al. (2006). "Impaired complement-mediated phagocytosis by HIV type-1-infected human monocyte-derived macrophages involves a cAMP-dependent mechanism." AIDS Res Hum Retroviruses 22(7): 619-629.

Ballinger, M. N., D. M. Aronoff, et al. (2006). "Critical role of prostaglandin E2 overproduction in impaired pulmonary host response following bone marrow transplantation." J Immunol 177(8): 5499-5508.

Betz, M. and B. S. Fox (1991). "Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines." J Immunol 146(1): 108-113.

Berry,A.,Balard,P., et al. (2007). " IL-13 induces expression of CD36 in human mono cytes through PPARgamma activation". Eur.J.Immunol. 37, 1642–1652.

Biswas SK, Mantovani A.(2012). "Orchestration of metabolism by macrophages". Cell Metab. ;15(4):432-7.

Blander, J. M., Medzhitov, R (2006). " Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells". Nature, vol 440.

Bohlsón, S.S., O'Conner¹, S. et al (2014). "Complement, C1q, and C1q-related molecules regulate macrophage polarization" Front Immunol. 5:402.

Bourdonnay, E., C. H. Serezani, et al. (2012). "Regulation of alveolar macrophage p40phox: hierarchy of activating kinases and their inhibition by PGE₂." J Leukoc Biol 92(1): 219-231.

Bowdish, D. (2013). Propagation & Culturing of Raw 264.7 Cells

Brereton CF, Blander JM. (2010). "Responding to infection and apoptosis - a task for TH17 cells". Ann N Y Acad Sci. 1209:56-67.

Breyer, R. M., C. K. Bagdassarian, et al. (2001). "Prostanoid receptors: subtypes and signaling." Annu Rev Pharmacol Toxicol 41: 661-690.

Brock, T. G., R. W. McNish, et al. (2003). "Prolonged lipopolysaccharide inhibits leukotriene synthesis in peritoneal macrophages: mediation by nitric oxide and prostaglandins." Prostaglandins Other Lipid Mediat 71(3-4): 131-145.

Burke, J. E. and E. A. Dennis (2009). "Phospholipase A2 biochemistry." Cardiovasc Drugs Ther 23(1): 49-59.

Canton J, Khezri R, et al. (2014). " Contrasting phagosome pH regulation and maturation in human M1 and M2 macrophages". Mol Biol Cell. 1;25(21):3330-41.

Campanile, F., A. Giampietri, et al. (1993). "Accelerated hematopoietic recovery and protective effect of the cyclooxygenase inhibitor indomethacin in bacterial infection of neutropenic mice." Cell Immunol 147(2): 341-352.

Cassetta, L., E. Cassol, et al. (2011). "Macrophage polarization in health and disease." ScientificWorldJournal 11: 2391-2402.

Chan Mi Lee e Jim Hu, (2013). " Cell density during differentiation can alter the phenotype of bone marrow-derived macrophages" Cell Biosci. 3: 30.

Chung, E. Y., S. J. Kim, et al. (2006). "Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells." Cell Res 16(2): 154-161.

Christman, B. W., J. W. Christman, et al. (1993). "Prostaglandin E2 limits arachidonic acid availability and inhibits leukotriene B4 synthesis in rat alveolar macrophages by a nonphospholipase A2 mechanism." J Immunol 151(4): 2096-2104.

Dalli J, Serhan CN. (2012). "Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators".Blood. 120(15):e60-72.

de Oliveira Fulco, T., Andrade, P.R., et al (2014). "Effect of apoptotic cell recognition on macrophage polarization and mycobacterial persistence." Infect Immun. 82(9) :3968-78.

Donnelly, L. E. and P. J. Barnes (2012). "Defective phagocytosis in airways disease." Chest 141(4): 1055-1062.

Downes C S, Collins A R, Johnson R T(1979). " DNA damage in synchronized HeLa cells irradiated with ultraviolet". Biophys J. 129–150.

Durner, J.; Gow, A. J.; Stamler, J. S.; Glazebrook, J.(1999); "Ancient origins of nitric oxide signaling in biological systems". PNAS, v.96, n.14, p.206- 207, 1999.

Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. (1998). "Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE₂, and PAF." J Clin Invest 101(4): 890-898.

Freire-De-Lima,C. G.,Xiao,Y. Q.,Gardai, S. J., Bratton, D. L., Schiemann, W. P., and Henson, P. M. (2006). Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta,coordinate-ly induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. J. Biol. Chem. 281, 38376–38384.

Golpon, H. A., Fadok, V. A., et al. (2004). "Life after corpse engulfment: phagocytosis of apoptotic cells leads to VEGF secretion and cell growth". FASEB J. 18, 1716–1718.

Greenberger, M. J., R. M. Strieter, et al. (1995). "Neutralization of IL-10 increases survival in a murine model of Klebsiella pneumonia." J Immunol 155(2): 722-729.

Griess, P. (1879). Deutsch Chem. Ges. 12, 426.

Gualde, N. and H. Harizi (2004). "Prostanoids and their receptors that modulate dendritic cell-mediated immunity." Immunol Cell Biol 82(4): 353-360.

He, ZH, Chen, P. et al. (2015). "Comparison between cigarette smoke-induced emphysema and cigarette smoke extract-induced emphysema" Tobacco Induced Diseases 13:6.

Herd HL, Bartlett KT, et al. (2015). "Macrophage silica nanoparticle response is phenotypically dependent". Biomaterials. 53:574-82.

Hesse M, Modolell M, et al. (2001). " Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism". J Immunol, 167:6533-6544.

Hiemstra, P. S,(2013) "Altered Macrophage Function in Chronic Obstructive Pulmonary Disease" Annals of the American Thoracic Society 10 Suppl: 2013 Dec 180-5

Hochreiter-Hufford A, Ravichandran KS. (2013). " Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion". Cold Spring Harb Perspect Biol. 5(1):a008748.

Inoue, M., Y. Ishibashi, et al. (2012). "Carbocysteine promotes phagocytosis of apoptotic cells by alveolar macrophages." Eur J Pharmacol 677(1-3): 173-179.

Iwasaki, K., K. Noguchi, et al. (2003). "Prostaglandin E2 downregulates interleukin-12 production through EP4 receptors in human monocytes stimulated with lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and interferon-gamma." Oral Microbiol Immunol 18(3): 150-155.

Khan, K. N., K. Stanfield, et al. (2000). "Cyclooxygenase-2 expression in inflammatory lung lesions of nonhuman primates." Vet Pathol 37(5): 512-516.

Korns D, Frasch SC, et al. (2011). "Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation" Front Immunol. 8;2:57

Kim, S., E. Y. Chung, et al. (2005). "Immunological consequences of macrophage-mediated clearance of apoptotic cells." Cell Cycle 4(2): 231-234.

Kunihiko Hiraiwa and Stephan F. van Eeden (2013). "Contribution of Lung Macrophages to the Inflammatory Responses Induced by Exposure to Air Pollutants" Mediators Inflamm., 619523.

Kunkel, S. L., M. Spengler, et al. (1988). "Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression." J Biol Chem 263(11): 5380-5384

Laurent, E., Mitchell D. L., et al (2003). "Impact of p210^{Bcr-Abl} on Ultraviolet C Wavelength-induced DNA Damage and Repair". Clin Cancer Res 9; 3722.

Lopes, M. F., V. F. da Veiga, et al. (1995). "Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease." J Immunol 154(2): 744-752.

Lu G, Zhang R, et al. (2015). "Myeloid cell-derived inducible nitric oxide synthase suppresses M1 macrophage polarization". Nat Commun. 6:6676.

Mantovani, A., Sica, A., and Locati, M. (2005). Macrophage polarization comes of age. Immunity 23, 344–346.

Mao K, Chen S, et al. (2013). "Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock". Cell Res. 23(2):201-12.

Martinez, F. O., Helming, L., and Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. Annu. Rev. Immunol. 27,451–483.

McLeish, K. R., G. T. Stelzer, et al. (1987). "Regulation of oxygen radical release from murine peritoneal macrophages by pharmacologic doses of PGE₂." Free Radic Biol Med 3(1): 15-20.

Medeiros, A. I., Serezani, C. H. et al. (2009). "Efferocytosis impairs pulmonary macrophage and lung antibacterial function via PGE₂/EP2 signaling." J Exp Med 206(1): 61-68.

Mills, C. D. (2012) " M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease". Immunology, 32(06):463-488

Murray PJ, Wynn TA.(2011). "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets".Nat Rev Immunol. 11:723-37.

Murray PJ, Allen JE, et al (2014)." Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines". Immunity. 1:14-20

Na YR, Yoon YN, Son DI, Seok SH.(2013). "Cyclooxygenase-2 inhibition blocks M2 macrophage differentiation and suppresses metastasis in murine breast cancer model". PLoS One. 8(5):e63451.

Na YR, Yoon YN, et al . (2015) "Consistent inhibition of cyclooxygenase drives macrophages towards the inflammatory phenotype". PLoS One. 10(2):e0118203.

Nataraj, C., D. W. Thomas, et al. (2001). "Receptors for prostaglandin E(2) that regulate cellular immune responses in the mouse." J Clin Invest 108(8): 1229-1235.

Paterson G. K., Orihuela C. J.(2011) " Pneumococci: immunology of the innate host response". Respirology. 15(7):1057-63

Rangel Moreno, J., I. Estrada Garcia, et al. (2002). "The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis." Immunology 106(2): 257-266.

Raes, G., DE Baetselier, P., Noel, W., Beschin, A., Brombacher, F., and Hassanzadeh GH,G. (2002). Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. J. Leukoc. Biol. 71,597–602.

Raes, G., Van Den Bergh, R., ta al (2005). Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells. J.Immunol. 6561–6562.

Ramirez-Ortiz ZG, Pendergraft WF et al. (2013). "The scavenger receptor SCARF1 mediates the clearance of apoptotic cells and prevents autoimmunity". Nat Immunol. 14(9):917-26.

Redmond, H. P., J. Shou, et al. (1991). "Immunosuppressive mechanisms in protein-calorie malnutrition." Surgery 110(2): 311-317.

Rogers LM, Thelen T, et al. (2014). "EP4 and EP2 receptor activation of protein kinase A by prostaglandin E2 impairs macrophage phagocytosis of *Clostridium sordellii*". Am J Reprod Immunol. 71(1):34-43.

Rogers, T. L. and I. Holen (2011). "Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates." J Transl Med 9: 177.

Roos, A., W. Xu, et al. (2004). "Mini-review: A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells." Eur J Immunol 34(4): 921-929.

Sahlin, S., Hed, J., Rundquist, I. "Differentiation between attached and ingested immune complexes by a fluorescence quenching cytofluorometric assay". J. Immunological Methodos 60: 115-124.

Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M (2000). "Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD". Chest 117: 684-94.

Serezani, C. H., S. Kane, et al. (2012). "PTEN directly activates the actin depolymerization factor cofilin-1 during PGE₂-mediated inhibition of phagocytosis of fungi." Sci Signal 5(210): ra12.

Sica, A., T. Schioppa, et al. (2006). "Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy." Eur J Cancer 42(6): 717-727.

Silva JJ, Pavanelli WR, et al. (2009). "Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection using ruthenium nitric oxide donors". Antimicrob Agents Chemother. 53(10):4414-21.

Shinomiya, S., H. Naraba, et al. (2001). "Regulation of TNF α and interleukin-10 production by prostaglandins I(2) and E(2): studies with prostaglandin receptor-deficient mice and prostaglandin E-receptor subtype-selective synthetic agonists." Biochem Pharmacol 61(9): 1153-1160.

Sugimoto, Y., Y. Fukada, et al. (2005). "Prostaglandin E2 stimulates granulocyte colony-stimulating factor production via the prostanoid EP2 receptor in mouse peritoneal neutrophils." J Immunol 175(4): 2606-2612.

Szanto, A., Balint, B.L., et al. (2010). "STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPAR γ -regulated gene expression in macrophages and dendritic cells." Immunity 33, 699-712.

Takeuchi O, Akira S. (2011). "Epigenetic control of macrophage polarization". Eur J Immunol. 41(9):2490-3.

Tilley, S. L., T. M. Coffman, et al. (2001). "Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes." Journal of Clinical Investigation 108(1): 15-23.

Torchinsky M. B. et al (2009). " Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T_H17 cell differentiation". Nature. 458, 78-82.

Torchinsky, M. B., J. Garaude, et al. (2010). "Infection and apoptosis as a combined inflammatory trigger." Curr Opin Immunol 22(1): 55-62.

Torroella-Kouri, M., R. Silvera, et al. (2009). "Identification of a subpopulation of macrophages in mammary tumor-bearing mice that are neither M1 nor M2 and are less differentiated." Cancer Res 69(11): 4800-4809.

Vega, M.A. and Corbí, A.L. (2006)."Human macrophage activation: Too many functions and phenotypes for a single cell type" Inmunología 4(25): 248-272.

Zhi-Hui He, Ping Chen, et al. (2015)."Comparison between cigarette smoke-induced emphysema and cigarette smoke extract-induced emphysema". Tob Induc Dis. 13(1): 6.

Zhang X, Goncalves R, Mosser DM.(2008). "The isolation and characterization of murine macrophages". Curr Protoc Immunol. Chapter 14:Unit 14.1.

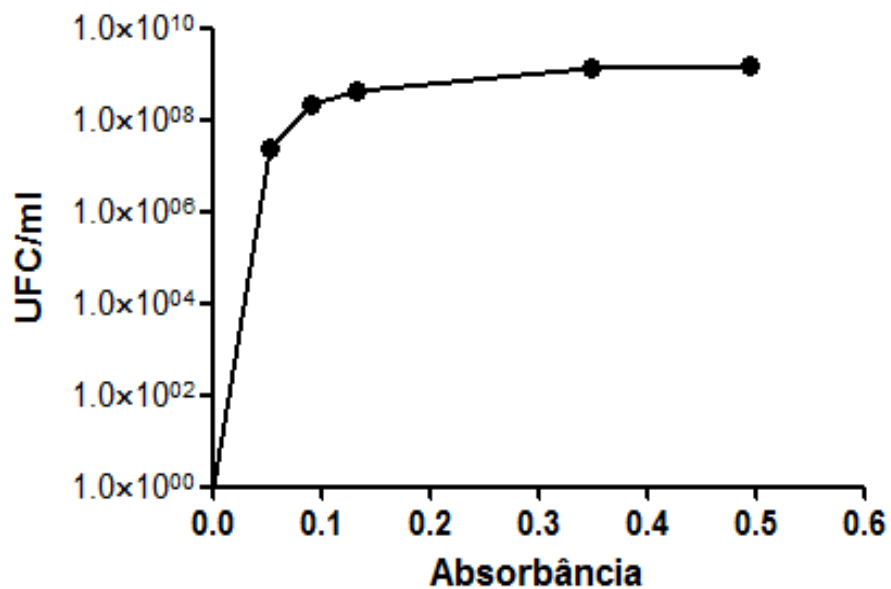
Wang Z., Brandt S., et al (2015) " MicroRNA 21 Is a Homeostatic Regulator of Macrophage Polarization and Prevents Prostaglandin E₂-Mediated M2 Generation". PLoS One 10(2): e0115855.

Wilson HM. (2014). "SOCS Proteins in Macrophage Polarization and Function". Front Immunol. 5:357.

Welch,J.S., Ricote,M., et al (2003). "PPARgamma and PPARdelta negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN-gamma target genes in macrophages". Proc.Natl.Acad.Sci. 100, 6712–6717.

Xiong H, Zhu C, et al. (2004). "Inhibition of interleukin-12 p40 transcription and NF-kappaB activation by nitric oxide in murine macrophages and dendritic cells". J Biol Chem. 279(11):10776-83.

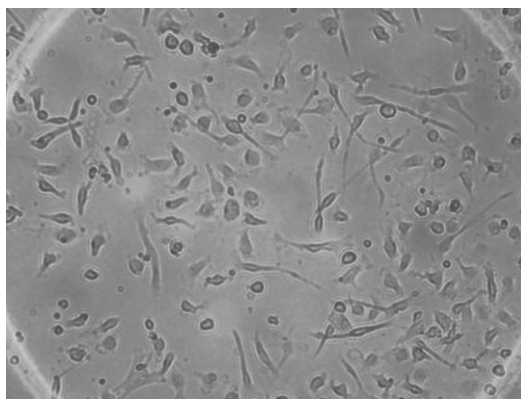
Anexo I

Figura 27. Padronização da curva de crescimento de *S. pneumoniae* (ATCC 49619).

A curva de crescimento bacteriano foi determinada através da contagem de UFC e sua absorbância equivalente D.O. ($\lambda=600$ nm). Experimento representativo de um grupo de cinco experimentos.

Anexo II

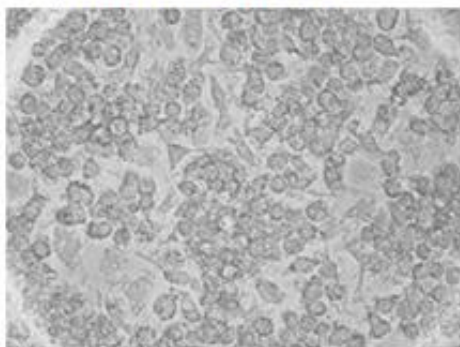
Figura 28. Morfologia de macrófagos ao final de 7 dias de cultura na presença de M-CSF.



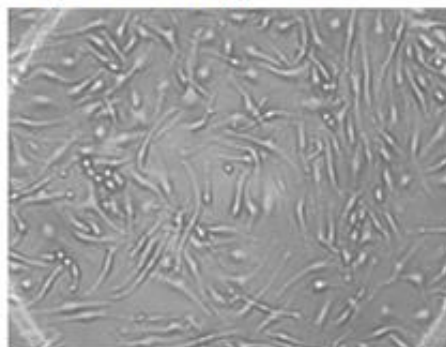
Macrófagos M0 após 7 dias de diferenciação, a partir de células de medula extraídas de fêmures e tíbias de camundongos C57BL/6 cultivadas em meio DMEM completo (10% de SBF, gentamicina, piruvato, aminoácidos não essenciais e 60ng/mL de M-CSF). Aumento de 400x. Um experimento representativo de 7 experimentos individuais.

Figura 29. Morfologia de macrófagos M1 e macrófagos M2.

A) Macrófagos M1



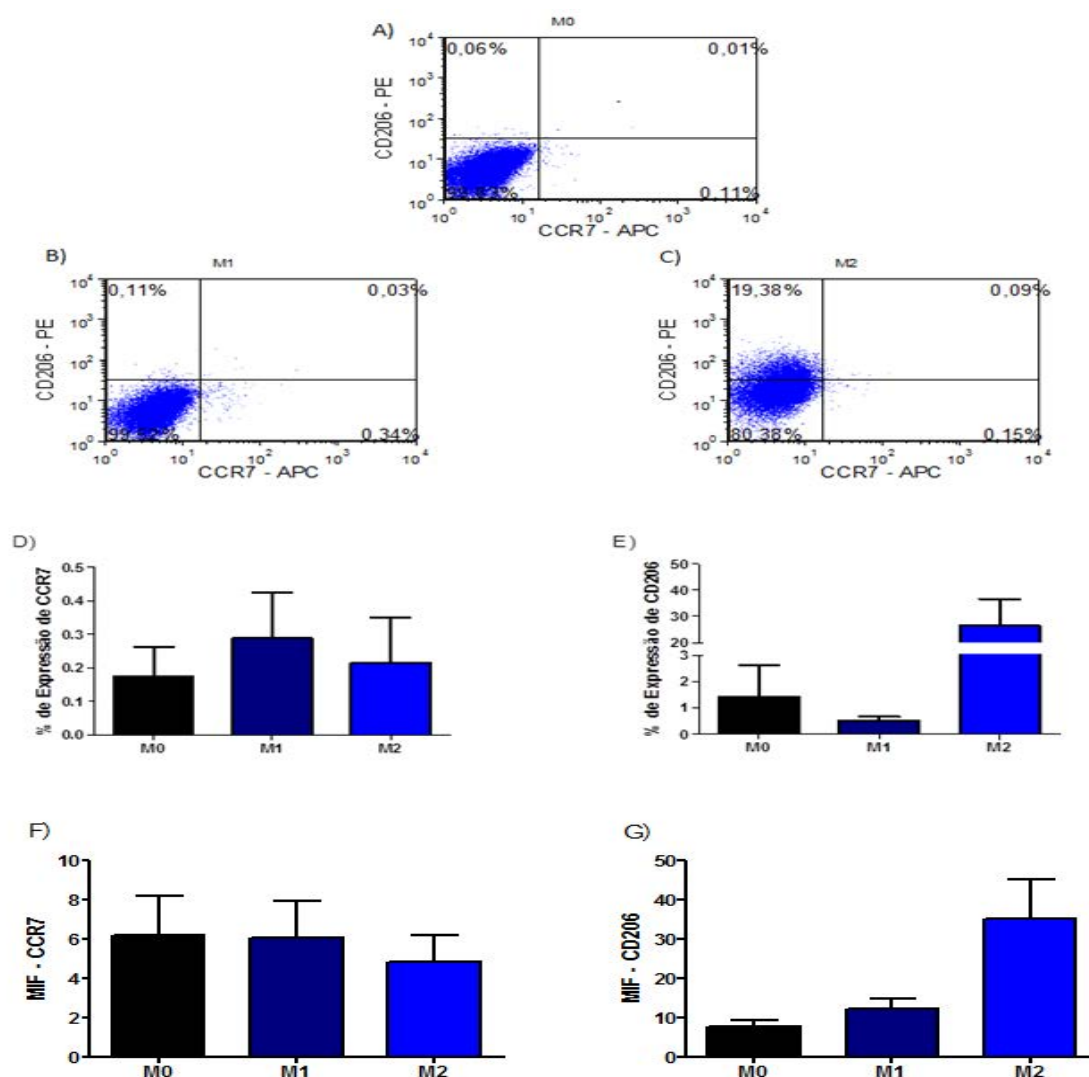
B) Macrófagos M2



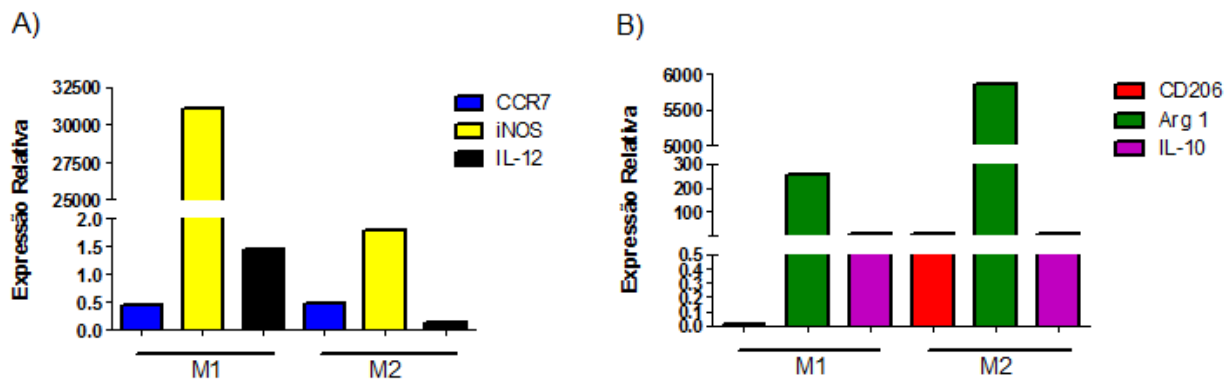
Avaliação morfológica (aumento de 400x) de macrófagos M1 e macrófagos M2, polarizados por 48h a partir de macrófagos M0 em seus respectivos meios polarizantes (500 ng/mL de LPS + 200 ng/mL de IFN-gama + 50 ng de M-CSF para macrófagos M1 e 30 ng/mL de IL-4 + 30 ng/mL de IL-10 + 50 ng/mL de M-CSF para macrófagos M2). A) Macrófagos M1. B) Macrófago M2. Um experimento representativo de um grupo de 7 experimentos individuais.

Anexo III

Figura 30. Fenotipagem das sub-populações de macrófagos M1/M2 diferenciadas a partir de M0.



Fenotipagem por citometria de fluxo de macrófagos M1 e M2, polarizados por 48h a partir de macrófagos M0 em seus respectivos meios polarizantes. A) Macrófagos M0; B) Macrófagos M0 incubados na presença de meio polarizante para M1 (500 ng/mL de LPS + 200 ng/mL de IFN-gama + 50 ng de M-CSF) por 48h; C) Macrófagos M0 incubados na presença de meio polarizante para M2 (30 ng/mL de IL-4 + 30 ng/mL de IL-10 + 50 ng/mL de M-CSF) por 48h. D) Somatória das porcentagens da expressão da molécula de CCR7 referente a 7 experimentos independentes. E) Somatória das porcentagens da expressão da molécula de CD206 referente a 7 experimentos independentes. F) Somatória dos MIFs de CCR7 referente a 7 experimentos independentes. E) Somatória dos MIFs de CD206 referente a 7 experimentos independentes.

Anexo IV**Figura 31. Análise de RT-qPCR de macrófagos M1/M2 diferenciados a partir de M0.**

Macrófagos M0 incubados na presença dos meios polarizantes para M1 ou M2 por 48h foram avaliados quanto a expressão dos genes para: A) iNOS, IL-12 e CCR7; B) Arginase 1, IL-10 e CD206. Os resultados foram expressos utilizando a expressão gênica de macrófagos M0 como controle (1.0) Os resultados são referentes a um experimento representativo de dois experimentos individuais.