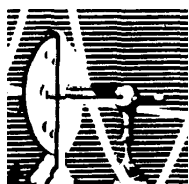


ALESSANDRA D'ALMEIDA FILARDY

“PAPEL DA FAGOCITOSE DE NEUTRÓFILOS
APOPTÓTICOS NA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS
DENDRÍTICAS E MACRÓFAGOS”

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Alessandra D’Almeida Filardy

“PAPEL DA FAGOCITOSE DE NEUTRÓFILOS APOPTÓTICOS NA DIFERENCIAÇÃO
DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E MACRÓFAGOS”

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Biofísica)

Orientador: George Alexandre dos Reis

Rio de Janeiro

2010

Filardy, Alessandra D’Almeida

Papel da fagocitose de neutrófilos apoptóticos na diferenciação de células dendríticas e macrófagos / Alessandra D’Almeida Filardy. - Rio de Janeiro: UFRJ/IBCCF, 2010.

xvi, 130 f.: Il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: George Alexandre dos Reis

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2010.

Orientador : George Alexandre dos Reis.

Bibliografia : f. 97-130.

1. Eferocitose. 2. Imunorregulação. 3. M2b. 4. IL-10. I. George Alexandre dos Reis. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. III. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (Brasil). Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). IV. Título.

Alessandra D’Almeida Filardy

“PAPEL DA FAGOCITOSE DE NEUTRÓFILOS APOPTÓTICOS NA DIFERENCIAÇÃO
DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E MACRÓFAGOS”

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Biofísica).

Rio de Janeiro, 26 de Março de 2010

Aprovada por:

Dr. George Alexandre dos Reis - Professor Titular, UFRJ

Dr. Marcello Andre Barcinski - Professor Titular, USP

Dr. Marcelo Torres Bozza - Professor Adjunto, UFRJ

Dr. Pedro Muanis Persechini - Professor Titular, UFRJ

Dr. Bruno Lourenço Diaz - Professor Adjunto, UFRJ

Dra. Maria Isabel Doria Rossi - Professora Adjunta, UFRJ

Dra. Cerli Rocha Gatass - Professora Adjunta, UFRJ

*Dedico esta tese à minha família: Norma, Jorge,
Clemilde, Andréa e Ricardo.*

Agradecimentos

Gostaria de expressar meu sincero reconhecimento a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

Ao meu orientador, George Alexandre dos Reis, por quem tenho profunda admiração, meu imenso agradecimento por seu exemplo como pesquisador, pela irrestrita orientação, confiança, dedicação, compreensão e amizade, fatores que muito contribuíram para meu crescimento acadêmico. Agradeço também por ter disponibilizado toda a estrutura necessária para a realização desta tese e pela cuidadosa leitura do documento final, o que melhorou substancialmente a qualidade e clareza deste manuscrito.

À Dayana Rodrigues Pires pela importante colaboração na parte experimental deste trabalho, por ser uma aluna tão dedicada e com tanta vontade de aprender. Foi um prazer e um privilégio poder colaborar com uma parte da sua formação. Agradeço também pelo carinho e amizade.

À Flávia Lima Ribeiro Gomes pelo companheirismo e auxílio prestado nas etapas iniciais deste trabalho.

À Marise Pinheiro Nunes por toda ajuda que sempre prestou, por estar sempre disposta à colaborar e pela convivência agradável.

À Marcela de Freitas Lopes pelos momentos de descontração e discussões científicas e ainda pela leitura crítica desta tese e sugestões pertinentes.

À Cristina Maeda Takiya pelo auxílio técnico prestado e por disponibilizar a estrutura de seu laboratório.

Ao Célio Geraldo Freire de Lima por tornar menos árduas e divertidas as horas de trabalho e por disponibilizar alguns reagentes.

À Jorgete Logullo e Lindomar Miranda da Silva pela agradável convivência e valioso apoio técnico fornecido.

Ao Bruno Lourenço Diaz pela revisão cuidadosa desta tese e sugestões valiosas.

Aos membros da banca examinadora pela pronta disponibilidade na leitura e avaliação deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Biologia Imunitária: Ana Caroline Silva, Alex de Freitas, Dayana Pires, Marina Martins, Râmade Calil, Fabrício Montalvão, Wânia Ferraz, Landi Guillermo, Tatiane Cozendey, Natália Vellozo, Aline Laudano, Jorgete Logullo, Lindomar Silva, Marise Nunes, Marcela Freitas, Célio Freire de Lima e George dos Reis pelo agradável convívio e momentos divertidos durante esses anos.

Aos amigos de outros laboratórios: Michelle Diniz, Carolina Koeller e Norton Heise pelos bons momentos vividos.

À coordenação do Curso de Pós Graduação em Biofísica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, na pessoa da professora Narcisa Cunha e Silva, pela compreensão e apoio, principalmente na etapa final de meu doutorado.

Aos meus pais, Norma e Jorge, minha tia Clemilde e minha irmã Andréa, meu profundo agradecimento por todo o amor que sempre me dedicaram, por acreditarem em mim e por me apoiarem em todas as fases da minha vida.

Ao Ricardo Moratelli pelo amor, carinho, plena paciência e inestimável ajuda em todas as etapas deste trabalho.

AO CNPQ, FAPERJ, CAPES E INCT PELO APOIO FINANCEIRO CONCEDIDO AO DESENVOLVIMENTO DESTE TRABALHO.

*“There is no greater impediment to progress in the sciences than
the desire to see it take place too quickly.”*

Georg Christoph Lichtenberg

(1742 - 1799)

Físico, Matemático e Filósofo

Resumo

FILARDY, Alessandra D’Almeida. Papel da fagocitose de neutrófilos apoptóticos na diferenciação de células dendríticas e macrófagos. Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)- Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010

Os neutrófilos estão entre as primeiras células a serem recrutadas para os sítios de infecção ou áreas de inflamação. Após ativados, os neutrófilos entram em apoptose constitutiva e são rapidamente removidos por DCs e macrófagos. Inicialmente, investigamos as consequências imunológicas da remoção fagocítica de neutrófilos inflamatórios apoptóticos, no processo de maturação de células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDDC) de camundongos BALB/c ou B6, induzido por LPS. Nós observamos um bloqueio no aumento da expressão das moléculas de MHC-II e CD86 induzida por LPS, nas iDCs que interagiram com neutrófilos apoptóticos. A eferocitose de neutrófilos inibiu drasticamente a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-12p40 e IL-12p70, enquanto que aumentou a secreção de IL-10. Os efeitos regulatórios dos neutrófilos apoptóticos na secreção de IL-12 eram estritamente dependentes de contato, enquanto que a secreção de IL-10 dependia de fatores solúveis liberados pelas células apoptóticas. A interação entre iDCs e neutrófilos apoptóticos inibiu a capacidade dessas células em induzir a proliferação de linfócitos T alorreativos. Em conjunto, estes dados indicam que a eferocitose de neutrófilos regula negativamente as respostas imunes adaptativas, atuando na modulação do fenótipo das DCs. Numa segunda etapa, verificamos se a fagocitose de células apoptóticas era capaz de induzir um fenótipo estável em macrófagos derivados de medula óssea (BMDM), evidenciado por uma re-estimulação tardia com LPS. A eferocitose anti-inflamatória, representada pela fagocitose de neutrófilos provenientes de camundongos BALB/c, não imprimiu nenhum fenótipo particular nos BMDMs. Por outro lado, a eferocitose pró-inflamatória de neutrófilos de B6 induziu a diferenciação de BMDMs para o fenótipo M2b, caracterizado pela baixa produção de IL-12 e por elevada secreção de IL-10, TNF- α e NO, além da expressão aumentada dos marcadores LIGHT/TNFSF14 e SPHK1. Os macrófagos resultantes favoreceram respostas Th2 e eram permissivos à replicação intracelular de *L.major*. A indução do fenótipo M2b necessitou da atividade de NE e dependeu em parte, da sinalização de TLR4. Nossos resultados sugerem que, nos casos de eferocitose pró-inflamatória, a diferenciação de macrófagos para o fenótipo M2b tem importante papel na resolução da inflamação, mas poderia contribuir para aumentar a resposta humoral de anticorpos e a persistência parasitária em indivíduos infectados.

Abstract

FILARDY, Alessandra D'Almeida. Papel da fagocitose de neutrófilos apoptóticos na diferenciação de células dendríticas e macrófagos. Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)-Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010

Neutrophils are among the first cells to be recruited to the sites of infection or areas of inflammation. Once activated, neutrophils undergo constitutive apoptosis and they are quickly removed by DCs and macrophages. Here, we first investigated the consequences of phagocytic removal of apoptotic inflammatory neutrophils on LPS-driven maturation of bone marrow-derived dendritic cells (BMDDC) from BALB/c or B6 mice. We observed a blockade on MHC-II and CD86 upregulation in iDCs that interacted with apoptotic neutrophils. Neutrophil efferocytosis markedly inhibited the production of the proinflammatory cytokines IL-12p40 and IL-12p70, whereas increased the secretion of IL-10. The regulatory effects on IL-12 secretion required cell contact, while IL-10 secretion required on soluble factors released from apoptotic cells. Interactions between iDCs and apoptotic neutrophils inhibited the ability of these cells to induce alloreactive T lymphocyte proliferation. Together, these data indicate that neutrophil efferocytosis negatively regulates the adaptive immune responses, acting on the DCs phenotype modulation. We then investigated whether phagocytosis of apoptotic cells induces a stable phenotype in bone marrow-derived macrophages (BMDM), as evidenced through late restimulation with LPS. Antiinflammatory efferocytosis, represented by the phagocytosis of BALB/c neutrophils, did not imprint any particular phenotype in BMDMs. On the other hand, proinflammatory efferocytosis of B6 neutrophils induced differentiation of BMDMs into the M2b phenotype, characterized by low IL-12 and high IL-10, TNF- α and NO secretion, in addition to increased expression of LIGHT/TNFSF14 and SPHK1 markers. The resulting macrophages favored Th2 responses and were permissive to intracellular replication of *L.major*. Induction of M2b phenotype required NE activity and was dependent in part, on TLR4 signaling. Our results suggest that, following proinflammatory efferocytosis, macrophage differentiation to a M2b phenotype has an important role in the resolution of inflammation, but could contribute to increased humoral antibody responses and parasite persistence in the infected host.

Lista de Figuras

FIGURA 1. Percentual de neutrófilos apoptóticos.	40
FIGURA 2. Purificação de células TCD4 ⁺ esplênicas	44
FIGURA 3. Diferenciação de células dendríticas a partir de células de medula óssea, utilizando rmGM-CSF	50
FIGURA 4. Neutrófilos apoptóticos bloqueiam o aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias em células dendríticas.	51
FIGURA 5. A interação com neutrófilos apoptóticos modula a secreção de citocinas por células dendríticas	54
FIGURA 6. O contato de neutrófilos apoptóticos com células dendríticas pode ser necessário para a secreção de citocinas.	55
FIGURA 7. A interação entre neutrófilos apoptóticos e células dendríticas inibe a proliferação de células de linfonodo mesentérico.	56
FIGURA 8. A proliferação de MLN induzida por anti-CD3 não é inibida pela interação com neutrófilos apoptóticos.	57
FIGURA 9. A eferocitose de neutrófilos induz o fenótipo M2b em BMDMs-B6.	60
FIGURA 10. A eferocitose de neutrófilos induz o fenótipo M2b em BMDMs-B6.	61
FIGURA 11. A eferocitose de neutrófilos não induz o fenótipo M2b em BMDMs-BALB. . .	63
FIGURA 12. A eferocitose de neutrófilos induz o fenótipo secretor de IL-10 e nitritos em BMDMs-B6, mas não em BMDMs-BALB.	64
FIGURA 13. A fagocitose de neutrófilos apoptóticos induz o fenótipo secretor de IL-10 em BMDMs-B6 independentemente do tratamento com rmIFN- γ	67
FIGURA 14. O fenótipo M2b não é induzido pela fagocitose de partículas de látex por BMDMs-B6.	68
FIGURA 15. A geração do fenótipo M2b é parcialmente dependente de contato entre os neutrófilos apoptóticos e BMDMs-B6.	69
FIGURA 16. BMDMs-B6 que fagocitaram neutrófilos favorecem uma resposta Th2.	70
FIGURA 17. A eferocitose de neutrófilos aumenta a expressão de marcadores de células M2b em BMDMs-B6.	72

FIGURA 18. O contato com neutrófilos apoptóticos na presença de rmIFN- γ induz a produção de TNF- α e IL-10.	73
FIGURA 19. A IL-10 modula parcialmente o fenótipo M2b.	74
FIGURA 20. O TNF- α modula parcialmente o fenótipo M2b.	75
FIGURA 21. A indução do fenótipo M2b em BMDMs-B6 necessita da atividade de NE.	79
FIGURA 22. O bloqueio de TLR4 inibe a secreção de IL-10 em BMDMs-B6 que fagocitaram neutrófilos apoptóticos.	80
FIGURA 23. O fenótipo M2b gerado em BMDMs-B6 após 3 dias da fagocitose de neutrófilos apoptóticos não é capaz de controlar o crescimento parasitário intramacrofágico de <i>L.major</i>	81

Lista de Tabelas

TABELA 1. Caracterização fenotípica e funcional das subpopulações de macrófagos.	12
--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

[³H]-TdR – Timidina Triteriada
ACAMPs – Padrões Moleculares Associados à Células Apoptóticas
ACK – Cloreto de Amônia com Potássio
AICD – Morte Celular Induzida por Ativação
APC – Célula Apresentadora de Antígeno
ARG1 – Arginase 1
B6 – Camundongos C57BL/6
BALB/c – Camundongos BALB/c
BMDDCs – Células Dendríticas Derivadas de Medula Óssea
BMDMs – Macrófagos Derivados de Medula Óssea
BSA – Albumina Sérica Bovina
CC – Quimiocinas da Família CC
CCR – Receptor de Quimiocinas da Família CC
CD – *Cluster of Differentiation*
COL – Colagenase
cpm – Contagem Por Minuto
CR – Receptor de Complemento
DAMPs – Padrões Moleculares Associados à Danos ou Lesões
DC – Célula Dendrítica
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA – Ensaio Imunoenzimático
ERK – *Extracellular signal-regulated kinases*
FasL – Fas Ligante
FcR – Receptores da Porção Fc de Imunoglobulinas
FITC – Isotiocianato de Fluoresceína
FIZZ1 – *Found in Inflammatory Zone*
GC – Glicocorticoide
G-CSF – Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos
GM-CSF – Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
HNPs – Peptídeo Derivado de Neutrófilos Humanos
HSP – Proteína de Choque Térmico

ICAM-3 – Molécula de Adesão Intercelular-3
 IFN- γ – Interferon- γ
 Ig – Imunoglobulina
 IGF-1 – Fator de Crescimento Similar à Insulina 1
 IL – Interleucina
 iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzida
 IRAK – Quinase Associada ao Receptor de IL-1
 LL-37 – Peptídeo Derivado de Catelicidina
 MLN – Células de Linfonodo Mesentérico
 LPS – Lipopolissacarídeo
 M1 – Macrófagos Classicamente Ativados
 M2 – Macrófagos Alternativamente ativados
 MAPK – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
 M-CSF – Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos
 MeOSuc-AAPV-cmk – Peptídeo Inibidor de NE
 MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
 MIF – Fator Inibitório de Macrófagos
 MIP – Proteína Inflamatória de Macrófagos
 MMR – Receptor de Manose
 MPO – Mieloperoxidase
 MyD88 – Fator de Diferenciação Mielóide 88
 NE – Elastase Neutrófila
 NETs – Redes Extracelulares de Neutrófilos
 NK – Células *Natural Killer*
 NO – Óxido Nítrico
 ODC – Ornitina Descarboxilase
 PAF – Fator de Agregação Plaquetária
 PAMP – Padrões Moleculares Associados à Patógenos
 PBMCs – Células Mononucleares Circulantes Derivadas de Sangue Periférico
 PBS – Tampão Salina Fosfato
 PBS-T – PBS-*Tween*
 PE – Ficoeritrina
 PGE₂ – Prostaglandina E₂
 PI3-K – Fosfatidilinositol 3-Quinase
 PICD – Morte Celular Induzida por Fagocitose
 PMA – Acetato de Forbol Miristato
 PMN – Leucócito Polimorfonuclear

PNPP – Paranitrofenol Fosfato
PPAR γ – Receptor Nuclear
PRR – Receptor de Reconhecimento de Padrões
PS – Fosfatidilserina
rm – Recombinante Murino
ROS – Espécies Reativas do Oxigênio
SFB – Soro Fetal Bovino
SPHK1 – Esfingosina Quinase 1
TCR – Receptor de Células T
TGF – Fator de Crescimento Transformante
Th – Células T auxiliaadoras (*helper*)
TLR – Receptores do tipo *Toll*
TNF – Fator de Necrose Tumoral
T_{reg} – Células T Regulatórias
VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular
Z-Pro-D-Leu-D-Ala-NHOH – Peptídeo Inibidor de Colagenase

Sumário

INTRODUÇÃO	4
1. Células Dendríticas	6
2. Macrófagos e seus Subtipos Funcionais	10
2.1 Macrófagos Classicamente Ativados	13
2.2 Macrófagos Alternativamente Ativados	14
2.2.1 Macrófagos M2a	14
2.2.2 Macrófagos M2b	16
2.2.3 Macrófagos M2c	18
3. Neutrófilos	19
4. Apoptose e Remoção Fagocítica de Células Apoptóticas.....	23
5. Remoção Pró-Inflamatória de Células Apoptóticas.....	29
6. Importância da Remoção Fagocítica de Neutrófilos na Infecção por um Protozoário Parasita Intracelular	33
OBJETIVOS	36
MATERIAL & MÉTODOS	38
1. Camundongos e Parasitas	38
2. Obtenção de Células Dendríticas Imaturas e Macrófagos Derivados de Medula Óssea ..	38
3. Obtenção de Neutrófilos Apoptóticos.....	39
4. Interação entre Células Dendríticas e Neutrófilos Apoptóticos.....	41
5. Interação entre Células Dendríticas e Linfócitos Alogênicos.....	41
6. Interação entre Macrófagos e Neutrófilos Apoptóticos	42
7. Obtenção e Purificação de Células T CD4 ⁺	43
8. Interação entre Macrófagos e Células TCD4 ⁺	44

9. Interação entre Macrófagos e Parasitos <i>L. major</i>	45
10. Citometria de Fluxo	45
11. Dosagem de Citocinas	46
12. Dosagem de Óxido Nítrico (NO).....	47
13. Marcação de Moléculas Celulares por ELISA	47
14. Análise Estatística.....	48
RESULTADOS	49
1. Diferenciação de Células Dendríticas a Partir de Células de Medula Óssea.....	49
2. Ingestão de Neutrófilos Apoptóticos Inibe o Aumento da Expressão de Moléculas CD86 e MHC de Classe II em Células Dendríticas	49
3. Ingestão de Neutrófilos Apoptóticos Modula a Secreção de Citocinas Induzida por LPS em Células Dendríticas	52
4. Efeitos Regulatórios de Neutrófilos Apoptóticos são em Parte, Dependentes de Contato	52
5. Interação de Neutrófilos Apoptóticos com Células Dendríticas Inibe a Proliferação de Linfócitos T Alogênicos	53
6. Ingestão de Neutrófilos Apoptóticos Induz um Fenótipo M2b em Macrófagos Imaturos Derivados de Medula Óssea	58
7. A Diferenciação de Macrófagos M2b não é Induzida pela Fagocitose de Partículas Inertes.....	65
8. A Indução do Fenótipo M2b é Parcialmente Dependente do Contato entre Macrófagos e Neutrófilos Apoptóticos.....	65
9. Macrófagos M2b Induzidos pela Fagocitose de Neutrófilos Apoptóticos Induzem uma Resposta de Células TCD4 ⁺ do Tipo Th2.....	66
10. Macrófagos M2b Induzidos pela Fagocitose de Neutrófilos Apoptóticos Expressam Níveis Aumentados de LIGHT/TNFSF14 e SPHK-1.....	71
11. IL-10 e TNF- α Apresentam Ações Opostas e Discretas na Indução do Fenótipo M2b .	71
12. O Fenótipo M2b é Bloqueado Pelo Inibidor de NE e Parcialmente por Anticorpo Anti-TLR4.....	76

13. Macrófagos M2b Induzidos Pela Fagocitose de Neutrófilos Apoptóticos são Permissivos a Replicação por <i>Leishmania</i>	77
DISCUSSÃO	82
CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

Introdução

O interesse na resposta imune inata, frequentemente descrita como primeira linha de defesa contra patógenos invasores, tem crescido bastante nos últimos anos, levando a uma melhor compreensão de sua importância na proteção e suscetibilidade a uma gama de agentes infecciosos, em adição à comunicação complexa entre os sistemas imunes inato e adaptativo (MEDZHITOV, 2007).

Todos os organismos metazoários possuem um sistema de defesa capaz de garantir a sua integridade funcional, repelindo microrganismos invasores. A imunidade inata é o mecanismo de defesa filogeneticamente mais antigo, mais rapidamente acionado e considerado, por muitos autores, como o tipo mais importante de imunidade, uma vez que a maioria dos organismos sobrevive apenas pelos mecanismos da imunidade inata; e apenas os vertebrados mandibulados possuem mecanismos alternativos para o reconhecimento e eliminação de microrganismos, coletivamente chamados de imunidade adaptativa. O reconhecimento imune adaptativo se baseia na geração somática de um repertório randômico e altamente diverso de receptores de antígenos, clonalmente distribuídos nos linfócitos. No caso dos linfócitos T, esse repertório é subsequentemente selecionado por complexos formados entre peptídeos próprios e moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), expressos no timo. Desta forma, a representação geral do sistema imune adaptativo é baseada na seleção e expansão clonal de linfócitos expressando receptores com especificidades particulares, o que leva a geração de memória imunológica, fornecendo uma significativa adaptação aos animais vertebrados (FLAJNIK & KASAHARA, 2010;

MEDZHITOV & JANEWAY, 1997; JANEWAY & MEDZHITOV, 1998; MEDZHITOV, 2001).

A estratégia de reconhecimento do sistema imune inato consiste na combinação de receptores codificados pela linhagem germinativa e conservados somaticamente, denominados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), os quais reconhecem estruturas moleculares constitutivas e evolutivamente conservadas, expressas em microrganismos patogênicos ou não, denominadas padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) (MEDZHITOV & JANEWAY, 1997; JANEWAY & MEDZHITOV, 2002; TAYLOR *et al.*, 2005). Mais recentemente, foi verificado que esses receptores também reconhecem moléculas endógenas que são liberadas em tecidos danificados sob condições infecciosas ou não, denominadas padrões moleculares associados a danos ou lesões (DAMPs) (RIFKIN *et al.*, 2005; WAGNER, 2006; MIYAKE, 2007).

O sistema imune inato é composto por barreiras mecânicas e elementos químicos e celulares e não é capaz de gerar memória imunológica. Nos vertebrados, a imunidade inata é amplamente dependente das células mielóides que incluem os fagócitos mononucleares e os polimorfonucleares (PMN). Os fagócitos são capazes de iniciar respostas imunes inatas efetivas contra microrganismos através do reconhecimento de PAMPs, com consequente internalização microbiana, o que pode levar à destruição e geração de peptídeos antigênicos que serão apresentados aos linfócitos T, e secreção de citocinas, iniciando e instruindo a ativação adequada da resposta imune adaptativa (MEDZHITOV & JANEWAY, 1997; BEUTLER, 2004; POZZI *et al.*, 2005).

O sistema imune inato colabora com o sistema imune adaptativo através de múltiplas interações, onde a participação de um grupo de células, coletivamente denominadas células

apresentadoras de antígenos (APCs), que incluem as células dendríticas (DCs) e os macrófagos derivados de monócitos de sangue periférico, exibe um importante papel.

1. CÉLULAS DENDRÍTICAS

Primeiramente visualizadas como células de Langerhans na pele em 1868, a caracterização funcional de DCs apenas teve início na década de 70, com os trabalhos publicados de STEINMAN & COHN (1973) e STEINMAN e colaboradores (1974). As DCs representam um tipo especial de leucócito capaz de alertar o sistema imune para a presença de infecções e são responsáveis pela ativação e controle das respostas imunes inatas e adaptativas (STEINMAN, 2001; ZITVOGEL, 2002). Inicialmente foi atribuída origem mielóide às DCs devido as suas similaridades funcionais, fenotípicas e morfológicas com macrófagos (VAN FURTH & COHN, 1968), porém, atualmente sabe-se que as DCs podem ser geradas a partir de precursores hematopoiéticos, tanto mielóides, como linfóides na medula óssea, e migram para os sítios de potencial entrada de patógenos (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998; MANZ *et al.*, 2001; ARDAVÍN, 2003; FOGG *et al.*, 2006), onde atuam como componentes cruciais do sistema imune, com papel essencial na indução e controle da imunidade mediada por células T, bem como na modulação de respostas por células B e células *natural killer* (NK).

As funções de DCs estão correlacionadas com o seu estágio de diferenciação. As DCs imaturas (iDCs) possuem uma enorme capacidade de capturar, internalizar e processar antígenos devido a presença de muitos PRRs como receptores do tipo *toll* (TLR), lectinas tipo C e receptores da porção Fc de imunoglobulinas (FcγR e FcεR), bem como de proteínas do sistema complemento (CRs) (VAN KOOYK & GEIJTENBEEK, 2003; BAJTAY *et al.*, 2006; NIMMERJAHM & RAVETCH, 2008; ADEMA, 2009). Por outro lado, são fracas

estimuladoras de células T, pois apresentam baixa expressão de moléculas MHC de classe II (MHC-II) na membrana e quantidades baixas de moléculas co-estimulatórias.

O processo de maturação de DCs altera radicalmente a sua fisiologia, e pode iniciar uma resposta imune adaptativa. A exposição à alérgenos, componentes bacterianos ou virais, citocinas pró-inflamatórias (como IL-1 β , TNF- α , IFN- α , GM-CSF) e dano tecidual são alguns dos estímulos que iniciam o processo de maturação (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998; BELL *et al.*, 1999; SHORTMAN & LIU, 2002; MACAGNO *et al.*, 2007). Em um modelo bem elucidado, o engajamento de TLRs por LPS bacteriano inicia a maturação de DCs, caracterizada pelo aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias como CD80, CD86, CD40, CD54 e MHC-II na superfície celular, necessárias para a ativação de células T virgens, específicas para os peptídeos antigênicos complexados a moléculas de MHC-II, expressos na mesma célula (MEDZHITOV & JANEWAY, 2002). Além disso, o processo de maturação regula o processamento de antígenos, acidificando o pH de vacúolos endocíticos, ativando a proteólise e transportando complexos peptídeo-MHC para a superfície celular. Após interação com antígeno, DCs passam a expressar o receptor de quimiocinas CCR7 que promove a migração de DCs aos órgãos linfóides secundários, mais especificamente nas áreas de células T, onde as quimiocinas-ligantes CCL19 e CCL21, estão sendo produzidas e onde os peptídeos podem ser apresentados aos linfócitos com o TCR específico (VILLADANGOS & SCHNORRER, 2007).

Nessa etapa, as DCs apresentam um fenótipo maduro, o qual é caracterizado pela perda da competência fagocítica, aumento da capacidade imunoestimulatória, como consequência da elevada expressão de complexos peptídeo-MHC e moléculas co-estimulatórias, além da habilidade de secretar citocinas que irão influenciar na qualidade e direcionamento da resposta imune adaptativa (MORELLI *et al.*, 2001; GRANUCCI *et al.*,

2005). Apenas poucas DCs são necessárias para estimular uma forte resposta de células T (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998; SHORTMAN & LIU, 2002). Devido à essas características, as DCs representam as mais potentes células entre as definidas como APCs profissionais se comparadas aos macrófagos e células B (FONG & ENGLEMAN, 2000; JONULEIT *et al.*, 2001).

As DCs são importantes não somente na indução das respostas imunes, como também na manutenção da tolerância. A apresentação de antígenos teciduais por iDCs aos linfócitos T, na ausência de sinais de perigo (MATZINGER, 2002), ou seja, sem co-estimulação apropriada, induz um estado de anergia ou deleção de células T, ou ainda o desenvolvimento de células T regulatórias $CD4^+CD25^+$ induzidas (iT_{reg}), secretoras de IL-10 e TGF- β , o que leva à tolerância ao antígeno apresentado (BANCHEREAU & PALUKA, 2005; KUSHWAH *et al.*, 2009). Da mesma forma, a fagocitose de células apoptóticas por DCs, na ausência de sinais estimulatórios, não induz a ativação dessas células (GALLUCCI *et al.*, 1999; SAUTER *et al.*, 2000; URBAN *et al.*, 2001; STUART *et al.*, 2002). Sendo assim, as DCs também contribuem para a tolerância periférica, promovendo a expansão clonal de células iT_{reg} (FERGUSON & KAZAMA, 2005; BLANDER, 2007; MAHNKE *et al.*, 2007; KUSHWAH *et al.*, 2009; YAMAZAKI & STEINMAN, 2009).

Considerando a plasticidade de DCs, os sinais que determinam a sua função particular e, conseqüentemente, o tipo de resposta imune adaptativa, dependem principalmente do microambiente local, do microrganismo e da subpopulação de DC envolvida. Essas interações são complexas e muito diferentes de um patógeno para outro (DILLON *et al.*, 2004; REDECKE *et al.*, 2004; GRANUCCI *et al.*, 2005). Apesar de todas as DCs compartilharem características relacionadas com o processamento de antígeno e maquinaria de ativação de

células T, existem evidências de que elas diferem na linhagem de origem, fenótipo e em aspectos funcionais (ARDAVÍN *et al.*, 2001; MANZ *et al.*, 2001; SHORTMAN & LIU, 2002; ARDAVÍN, 2003; FOGG *et al.*, 2006).

As DCs derivadas de camundongos são caracterizadas por expressar a molécula CD11c (STEINMAN, 1991; BANCHEREAU & STEINMAN, 1998; ANJUÈRE *et al.*, 1999; BELL *et al.*, 1999; HENRI *et al.*, 2001) e de uma maneira geral, as DCs são classificadas como convencionais (cDCs) e plasmacitóides (pDCs). As cDCs diferem das pDCs não apenas por seus marcadores fenotípicos, mas também por suas propriedades funcionais (BANCHEREAU *et al.*, 2003; DALOD *et al.*, 2003; SATO & FUJITA, 2007). Enquanto que as cDCs são potentes APCs e estão tipicamente associadas com a ativação de célula T e iniciação de uma resposta imune adaptativa, as pDCs apresentam antígenos ineficientemente à células T e possuem apenas uma modesta capacidade de ativar essas células. Essa atividade de APCs deficiente é justificada pelo fato das pDCs não endocitarem antígenos tão bem quanto as cDCs (GROUARD *et al.*, 1997), devido à sua baixa expressão de proteases lisossomais envolvidas no processamento de antígenos (FIEBIGER *et al.*, 2001), e também por sua expressão mínima de moléculas co-estimulatórias e de MHC-II, se comparadas às cDCs (CHEHIMI *et al.*, 1989; GROUARD *et al.*, 1997; ASSELIN-PATUREL *et al.*, 2001). Adicionalmente, pDCs são consideradas como uma subpopulação de DCs especializadas em secretar grande quantidade de IFN-tipo I se estimuladas por diversos vírus, possuindo também a capacidade de produzir IL-12 em resposta à vírus e oligodeoxinucleotídeos CpG, mas não a produtos bacterianos (ASSELIN-PATUREL *et al.*, 2001; NAKANO *et al.*, 2001; DALOD *et al.*, 2002; MARTÍN *et al.*, 2002; ASSELIN-PATUREL *et al.*, 2003; KRUG *et al.*, 2004; BARCHET *et al.*, 2005). Também tem sido proposto que essas células estariam envolvidas na manutenção de tolerância de célula T por induzir a diferenciação de células T T_{reg} , as quais

podem bloquear a ativação de células T virgens por um mecanismo dependente de IL-10 (GILLIET & LIU, 2002; BILSBOROUGH *et al.*, 2003).

Ainda podemos classificar uma outra subpopulação de DCs, as DCs derivadas de monócitos. Diferentes subpopulações de monócitos podem ser precursoras de DCs no estado de repouso e de DCs em qualquer tecido inflamado sob influência de GM-CSF (INABA *et al.*, 1992; YRLID *et al.*, 2006; LANDSMAN *et al.*, 2007; WU & LIU, 2007). DCs intestinais migratórias podem ser derivadas de monócitos *in vivo*, na ausência de estímulos inflamatórios (YRLID *et al.*, 2006), enquanto que monócitos de sangue periférico se diferenciam em DCs nos pulmões sob condições inflamatórias ou não (LANDSMAN *et al.*, 2007). Elas representam o tipo mais comum de DCs utilizadas em estudos da biologia dessas células em camundongos e humanos, e na imunoterapia utilizando vacinas de DCs (WU & LIU, 2007; GEISSMANN *et al.*, 2008).

2. MACRÓFAGOS E SEUS SUBTIPOS FUNCIONAIS

Elie Metchnikoff propôs que a chave da imunidade seria estimular os fagócitos (NATHAN, 2008). Desde então, os imunologistas têm buscado compreender como essas células participam da defesa do hospedeiro.

Os macrófagos são células amplamente distribuídas que se diferenciam a partir de células mononucleares circulantes derivadas de sangue periférico (PBMCs), de origem mielóide, que migram para os tecidos no estado normal ou em resposta a inflamação (GORDON & TAYLOR, 2005). Possuem funções vitais para a homeostase do indivíduo, como a remoção de restos celulares que são gerados durante a embriogênese, e a rápida e eficiente remoção de células apoptóticas, adicionalmente ao seu envolvimento nas respostas imunes (ERWIG & HENSON, 2007).

Os macrófagos têm papel indispensável no sistema imune com funções decisivas em ambas as respostas imunes inatas e adaptativas. Na imunidade inata, os macrófagos residentes fornecem uma defesa imediata contra microrganismos invasores e coordenam o infiltrado leucocítico (GORDON, 2003). Uma vez ativados por produtos microbianos, os macrófagos adquirem competência microbicida que, frequentemente leva à eliminação microbiana (HOEBE *et al.*, 2004). Esses fagócitos também colaboram com células T e B, através de interações celulares e liberação de citocinas, quimiocinas, enzimas, metabólitos derivados do ácido araquidônico e espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (DUFFIELD, 2003; GORDON, 2003; STOUT *et al.*, 2005).

A heterogeneidade dos macrófagos é determinada pela constituição genética, bem como por estímulos teciduais e imunes (MILLS *et al.*, 2000; GORDON & TAYLOR, 2005). A plasticidade dessas células é refletida por sua polarização fenotípica em resposta aos estímulos ambientais, o que culmina em distintos estados funcionais (GORDON, 2003; MARTINEZ *et al.*, 2008; MOSSER & EDWARDS, 2008), relevantes em várias doenças parasitárias e inflamatórias (ANTHONY *et al.*, 2006; HÖLSCHER *et al.*, 2006; WEBER *et al.*, 2007). De uma maneira geral, os macrófagos são classificados como macrófagos classicamente ativados e alternativamente ativados (**TABELA 1**) (GORDON, 2003; MOSSER, 2003; MARTINEZ *et al.*, 2008; MOSSER & EDWARDS, 2008).

Tabela 1. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DAS SUBPOPULAÇÕES DE MACRÓFAGOS

Subpopulações de macrófagos	M1	M2		
		M2a	M2b	M2c
Sinais ativadores	IFN- γ produtos microbianos	IL-4 IL-13	complexos-imunes receptores <i>scavengers</i> ou do complemento histamina prostaglandina + ligantes de TLRs/ TNF- α /IL-1R	GC TGF- β IL-10 células apoptóticas vitamina D3
Principais marcadores biológicos	N.D.	Ym1/2 MMR FIZZ1	$\uparrow$ LIGHT $\uparrow$ SPHK-1	N.D.
Citocinas produzidas	TNF- α IL-12	IL-10	IL-10 TNF- α	IL-10 TGF- β
Moléculas efetoras	ROS NO	arginase	NO	arginase
Resposta de células T tipo	Th1	Th2	Th2	Treg
Apresentação de antígenos	++	+	+++	-
Principal função	microbicida	resolução da inflamação e reparo tecidual	regulatória	regulatória

TLR, receptores do tipo *toll*; IL-1R, receptor de IL-1; GC, glicocorticóides; MMR, receptor de manose; SPHK-1, esfingosina quinase 1; ROS, espécies reativas do oxigênio; NO, óxido nítrico. +, baixa estimulação; ++, boa estimulação; +++, elevada estimulação; -, incapaz de estimular. N.D. , não determinado.

2.1 MACRÓFAGOS CLASSICAMENTE ATIVADOS

Os macrófagos classicamente ativados ou M1 são gerados em resposta a estimulação concomitante com as citocinas IFN- γ e TNF- α ou ainda com IFN- γ e ligantes de TLRs como LPS (ADAMS, 1989), que induzem a transcrição de TNF- α (MOSSER & EDWARDS, 2008). O IFN- γ é secretado por linfócitos TCD4⁺ da subpopulação Th1 e TCD8⁺ e também por células NK, enquanto as APCs constituem a principal fonte de TNF- α (MARTINEZ *et al.*, 2008). Adicionalmente, a produção de IFN- β , induzida por agonistas de TLRs, de forma dependente da proteína adaptadora TRIF (YAMAMOTO *et al.*, 2003), pode substituir o IFN- γ e ativar classicamente os macrófagos (MOSSER & EDWARDS, 2008).

Os macrófagos M1 apresentam morfologia variada, dependente de sua localização, mas são caracterizados por sua habilidade em secretar quantidades significantes de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-23, IL-15, IL-18 e baixas concentrações de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e TGF- β . Também secretam quimiocinas que coordenam o recrutamento de células NK e Th1, orquestrando e amplificando as respostas do tipo 1 (GORDON, 2003; MANTOVANI *et al.*, 2004; ROSENKILDE & SCHWARTZ, 2004; MANTOVANI *et al.*, 2005; MARTINEZ *et al.*, 2006; O'SHEA & MURRAY, 2008). Além disso, células M1 expressam níveis elevados de moléculas de MHC-II e moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, bem como baixos níveis de receptores de manose (MMRs) e Fc γ Rs (BOEHM *et al.*, 1997), o que as tornam, do ponto de vista funcional, boas APCs, capazes de estimular células T virgens (EDWARDS *et al.*, 2006). Os macrófagos M1 também são caracterizados por sua eficiente função endocítica e habilidade de eliminar patógenos intracelulares (EZEKOWITZ & GORDON, 1984; MARTINEZ *et al.*, 2008). O aumento da atividade microbicida é mediado por diferentes

mecanismos incluindo a restrição de ferro ou outros nutrientes para os microrganismos, acidificação do fagossoma, síntese de ROS (CARLIN *et al.*, 1989; GRUENHEID & GROS, 2000), e liberação de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina em virtude da atividade da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), uma isoforma de NO sintase que é induzida por IFN- γ em macrófagos (GRANGER *et al.*, 1990; MACMICKING *et al.*, 1997).

As citocinas pró-inflamatórias produzidas por células M1 são importantes componentes da resposta imune do hospedeiro, mas elas podem causar danos teciduais extensos, como por exemplo, promover o desenvolvimento e expansão de células TCD4⁺ da subpopulação Th17, que estão envolvidas em diversas patologias autoimunes (LANGRISH *et al.*, 2005; BETTELLI *et al.*, 2006; YAWALKAR *et al.*, 2009).

2.2 MACRÓFAGOS ALTERNATIVAMENTE ATIVADOS

Os macrófagos alternativamente ativados ou M2 representam um grupo de células heterogêneo, fenotípica e funcionalmente relacionadas, com um importante papel nas respostas imunes do tipo 2, na fase de resolução da inflamação, reparo tecidual e regulação das respostas imunes. Dependendo do estímulo, os macrófagos M2 podem se diferenciar em, pelo menos, três subpopulações: M2a, M2b e M2c (BENOIT *et al.*, 2008; MARTINEZ *et al.*, 2008).

2.2.1 MACRÓFAGOS M2a

Os macrófagos M2a correspondem aos macrófagos M2 por excelência e foram os primeiros a serem caracterizados (GORDON, 2003). A diferenciação de M2a é obtida pela estimulação de macrófagos com as citocinas IL-4 ou IL-13, principalmente produzidas por células Th2, mastócitos e basófilos (STEIN *et al.*, 1992). Os macrófagos M2a estão envolvidos nas respostas imunes à infecções parasitárias helmínticas (HESSE *et al.*, 2001), doenças

alérgicas (ZHU *et al.*, 2004) e contribuem para a produção de matriz extracelular, na fase de resolução da inflamação (ALBINA *et al.*, 1990).

Macrófagos M2a produzem elevadas concentrações de IL-10, sob condições inflamatórias, e quantidades mínimas de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12, TNF- α e IL-1 β (WANG *et al.*, 1998), além de expressarem altos níveis de quimiocinas que coordenam o recrutamento de eosinófilos, basófilos e algumas células Th2 polarizadas (MANTOVANI *et al.*, 2004). Essas células também expressam vários receptores *scavengers* e lectinas tipo C, incluindo SR-A, MMR (MRC-1), Dectina-1 e DC-SIGN (MARTINEZ *et al.*, 2006). Também expressam fibronectina 1 e proteína β IG-H3, associada de matriz, que promove fibrogênese (GRATCHEV *et al.*, 2001), fator de coagulação XIII e fator de crescimento similar à insulina 1 (IGF-1), que fornecem sinais para o reparo tecidual e proliferação celular (TOROCSIK *et al.*, 2005). Apenas as células M2a expressam o marcador FIZZ1 (*Found in Inflammatory Zone*), uma proteína secretada, encontrada na zona inflamatória, frequentemente associada à inflamação alérgica e pulmonar (HOLCOMB *et al.*, 2000; RAES *et al.*, 2002). A IL-4 também é capaz de induzir a expressão de Ym1/2, proteínas similares à quitinase, também encontradas na zona inflamatória (BLEAU *et al.*, 1999; ZHU *et al.*, 2004) e PPAR γ , receptor nuclear que ao ser ativado, previne a secreção de citocinas pró-inflamatórias e a expressão de iNOS nesses macrófagos (JIANG & DHIB-JALBUT, 1998; RICOTE *et al.*, 1998).

Além disso, macrófagos M2a não são eficientes como APCs e em muitos casos, inibem a proliferação de células T, pois expressam baixos níveis de moléculas de MHC-II e moléculas co-estimulatórias (EDWARDS *et al.*, 2006).

Diferentemente das células M1, as células M2a não expressam iNOS, mas sim elevados níveis de arginase 1 (ARG1), enzima que converte a L-arginina em uréia e ornitina.

Consequentemente, essas células falham em produzir NO e são significativamente comprometidas na sua habilidade microbicida para patógenos intracelulares (MODOLELL *et al.*, 1995; HESSE *et al.*, 2001), entretanto, elas sintetizam poliaminas, a partir de ornitina, que estimulam o crescimento celular; enquanto que a prolina e hidroxiprolina estimulam a formação de colágeno e o reparo tecidual (HESSE *et al.*, 2001).

2.2.2 MACRÓFAGOS M2b

Os macrófagos do tipo II ou M2b apresentam um fenótipo claramente distinto das demais células M2 e aproximado dos macrófagos M1 (EDWARDS *et al.*, 2006). Essas células são induzidas após o reconhecimento de complexos imunes por Fc γ R em conjunto com a estimulação de TLRs por LPS ou ácido lipoteicóico, do receptor da citocina IL-1 (IL-1R) por IL-1 β , de CD40 por CD40L ou até mesmo de CD44 por componentes de matriz extracelular (SUTTERWALA *et al.*, 1998; BOWIE & O'NEILL, 2000; GERBER & MOSSER, 2001; ANDERSON & MOSSER, 2002a; ANDERSON & MOSSER, 2002b). Além disso, os CRs (YOSHIDA *et al.*, 1998; SOHN *et al.*, 2003) e receptores *scavengers* (SUTTERWALA *et al.*, 1998; MOSSER & EDWARDS, 2008) podem substituir os complexos imunes na indução do fenótipo M2b, bem como prostaglandinas (STRASSMANN *et al.*, 1994) e histamina (SIROIS *et al.*, 2000). Esses macrófagos são caracterizados pela elevada expressão de IL-10 e baixa produção de IL-12, um perfil de citocinas que favorece o desenvolvimento de respostas imunes adaptativas do tipo 2 (SUTTERWALA *et al.*, 1998; BOWIE & O'NEILL, 2000; ANDERSON & MOSSER, 2002a; ANDERSON & MOSSER, 2002b).

Os macrófagos M2b também são capazes de secretar quantidades significantes de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e NO, e não apresentam atividade arginase e nem estão envolvidos no reparo tecidual, como as células M2a. Ao invés disso, apresentam atividade regulatória ou

anti-inflamatória, como discutido adiante (GERBER & MOSSER, 2001; EDWARDS *et al.*, 2006).

Do ponto de vista funcional, os macrófagos M2b expressam níveis elevados de MHC-II e moléculas co-estimulatórias e são eficientes APCs, promovendo a proliferação e diferenciação de células Th2 (ANDERSON & MOSSER, 2002a; EDWARDS *et al.*, 2006). Essas células também induzem a produção de anticorpos, principalmente o isotipo IgG1, que está associado à respostas Th2 (ANDERSON & MOSSER, 2002b). Além disso, os macrófagos M2b produzem a quimiocina CCL1/I-309, o único agonista de CCR8, que parece ser de relevância para o recrutamento de células T_{reg} (MARTINEZ *et al.*, 2008).

As células M2b expressam dois marcadores que podem ser utilizados para identificar essa subpopulação no tecido: esfingosina quinase 1 (SPHK1) e LIGHT ou TNFSF14, membro da superfamília do TNF. É característico o aumento da expressão dessas proteínas em macrófagos M2b comparado com uma modesta expressão em células M1 (EDWARDS *et al.*, 2006).

Os macrófagos M2b podem ser induzidos por microrganismos, o que reflete na supressão da secreção da citocina pró-inflamatória IL-12 e produção de IL-10, permitindo aos patógenos escaparem das respostas imunes efetivas. Um exemplo é a infecção por *Leishmania spp.*, que opsonizada por IgGs do hospedeiro, induz o programa de diferenciação de macrófagos em células M2b, mais permissivas ao crescimento microbiano intracelular, o que culmina na progressão da doença (KANE & MOSSER, 2001; MILES *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2007). Por outro lado, as células M2b suprimem as respostas inflamatórias exacerbadas, prevenindo o choque tóxico (SUTTERWALA *et al.*, 1998), a remissão da nefrite observada

no lúpus eritematoso (SCHIFFER *et al.*, 2008) e a reversão da autoimunidade na esclerose múltipla (WEBER *et al.*, 2007).

2.2.3 MACRÓFAGOS M2c

O fenótipo de macrófagos M2c é induzido através da estimulação por IL-10, TGF- β , hormônios como os glicocorticóides (GC) e vitamina D3 ou células apoptóticas (GOERDT & ORFANOS, 1999; GOUGH *et al.*, 2001). As células T_{reg} constituem a principal fonte das citocinas IL-10 e TGF- β , enquanto que os GC são liberados pelas células da glândula adrenal em resposta à situações de estresse como privação de nutrientes, dor, trauma e infecção (VALLEDOR & RICOTE, 2004).

Os macrófagos M2c produzem elevadas concentrações de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β , o que faz dessas células, potentes reguladoras das respostas imunes inflamatórias iniciadas por células M1, além de sua importância na eliminação, por fagocitose, de restos celulares (MARTINEZ *et al.*, 2008). Os macrófagos M2c são deficientes na função microbicida, pois a ação de GC nessas células, suprime fortemente a transcrição de genes pró-inflamatórios como o de iNOS (VALLEDOR & RICOTE, 2004).

Adicionalmente, essas células assumem funções imunossupressoras que podem ser mediadas pelas citocinas que produzem. A IL-10 e o TGF- β têm papel crítico em limitar a duração e intensidade das reações imunes e inflamatórias, através da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-18 e reduzir a apresentação de antígenos por macrófagos, através da diminuição da expressão de moléculas de MHC-II e co-estimulatórias (BODGAN *et al.*, 1992). Essas células também são capazes de inibir a proliferação de células T através de contato celular direto, o que pode envolver um mecanismo mediado por receptor (LOKE *et al.*, 2000), além de promover o desenvolvimento

de células T_{reg} (FRANCHIMONT, 2004). Da mesma forma que a IL-10, o TGF- β também contribui na imunorregulação mediada por M2c, através da regulação da ativação e quimiotaxia de células do sistema imune e inibição da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 α e IL-18, induzidas por LPS, além de atuar como um regulador negativo da expressão de CD163 em macrófagos, um receptor envolvido na remoção de hemácias (BODGAN *et al.*, 1992). A produção de TGF- β por macrófagos após a fagocitose de células apoptóticas, em presença de estímulos inflamatórios, também pode contribuir para a função regulatória dos macrófagos M2c (FADOK *et al.*, 1998; FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000; HUYNH *et al.*, 2002; LUCAS *et al.*, 2006).

Sob condições normais, os macrófagos M2c são encontrados na placenta, pulmões e sítios imunoprivilegiados. Essas células também são frequentemente encontradas em doenças inflamatórias crônicas como, artrite reumatóide, aterosclerose e psoríase, sugerindo que essas células assumem importante função no encerramento da resposta imune e na limitação da inflamação, protegendo os órgãos e tecidos adjacentes das respostas imunes deletérias (MOSSER, 2003; VAN GINDERACHTER *et al.*, 2006).

3. NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos são as células do sistema imune inato mais abundantes e as primeiras a serem recrutadas para o sítio de infecção ou áreas de inflamação, constituindo a defesa celular primária contra infecções por bactérias, fungos e protozoários (FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003).

Os neutrófilos se desenvolvem a partir de precursores mielóides presentes na medula óssea. O processo de diferenciação e maturação dessas células é induzido por várias citocinas, incluindo GM-CSF, IL-3 e G-CSF. A medula óssea de um indivíduo saudável produz mais de

10^{11} neutrófilos por dia e essa produção aumenta para 10^{12} na inflamação aguda. Os neutrófilos maduros são liberados para a corrente sanguínea, onde circulam por aproximadamente 10 a 24 horas até serem recrutados para os tecidos inflamados (ATHENS *et al.*, 1961; APPELBERG, 2007; LASKAY *et al.*, 2008). A sobrevivência dessas células nos tecidos é de aproximadamente 1 a 2 dias, sendo interrompida por apoptose constitutiva (SAVILL *et al.*, 1989; HASLETT, 1997).

A resposta imune mediada por neutrófilos é um processo que ocorre em várias etapas, começando pela rolagem e adesão ao endotélio vascular ativado, extravasamento e migração para o foco inflamatório ou áreas de dano tecidual, e eliminação *in situ* do microrganismo, através da fagocitose, geração de ROS e liberação de substâncias microbicidas (FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003). A maioria dessas etapas é dependente da mobilização de grânulos e vesículas secretórias presentes no citoplasma dos neutrófilos. A capacidade microbicida dessas células é atribuída à presença de diferentes tipos de grânulos em seu citoplasma, como os grânulos primários ou azurofílicos, os secundários ou específicos, de gelatinase e vesículas secretórias, que contêm em seu interior não apenas substâncias proteolíticas, bactericidas e sideróforos, mas também receptores de membrana como Mac-1, CD14 e Fc γ R, importantes na adesão dos neutrófilos ao endotélio, matriz extracelular, produtos bacterianos e mediadores solúveis da inflamação (SENGELOV *et al.*, 1993; DETMERS *et al.*, 1995; BORREGAARD & COWLAND, 1997; FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003).

O recrutamento e ativação de neutrófilos podem ser induzidos por moléculas quimiotáticas, derivadas do hospedeiro ou de microrganismos, que são reconhecidas por receptores, presentes na superfície celular dos neutrófilos. Dentre essas moléculas, encontram-se a IL-8, LPS e peptídeos N-formil (fMLP). Além disso proteases, citocinas/quimiocinas e

agonistas/ligantes de TLRs, como elastase, proteinase 3, TNF- α , IFN- γ , PAF e RANTES também estão envolvidas na ativação de neutrófilos através da indução de moléculas de adesão no endotélio, ativação de integrinas e quimiotaxia dos neutrófilos (COHEN, 1994; BERGER *et al.*, 1996).

Considerados como fagócitos profissionais, os neutrófilos são capazes de reconhecer e ingerir microorganismos, processo que pode ser facilitado pela opsonização prévia dos microorganismos com fragmentos circulantes do componente C3 do sistema complemento e imunoglobulinas. A fagocitose também pode ser estimulada pela sinalização gerada através do reconhecimento direto de PAMPs pelos PRRs nessas células (OFEK *et al.*, 1995; BROWN & GORDON, 2001; UTHAISANGSOOK *et al.*, 2002; UNDERHILL & GANTNER, 2004; KENNEDY *et al.*, 2007).

Frequentemente, a fagocitose é seguida pela fusão do fagossoma com os grânulos citosólicos, convertendo o fagossoma em fagolisossoma, dentro dos quais a morte microbiana é alcançada por uma combinação de mecanismos não oxidativos e oxidativos (NATHAN, 2006). Potentes mecanismos de morte não oxidativos incluem a liberação de peptídeos antimicrobianos, como as catelicidinas e defensinas, enzimas hidrolíticas e a atividade das catepsinas e outras proteases, enquanto que o mecanismo dependente de oxigênio, também chamado de “explosão” oxidativa, envolve a geração não mitocondrial de ROS através de um complexo enzimático, ligado à membrana dos vacúolos fagocíticos, o NADPH oxidase. A partir da redução do oxigênio molecular, NADPH oxidase cataliza a formação de ânions superóxido (O_2^-), os quais podem rapidamente dismutar para peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e diversas outras ROS (DINAUER *et al.*, 2000; REEVES *et al.*, 2002; SEGAL, 2005). Um mecanismo microbicida adicional envolve a ação da mieloperoxidase (MPO), uma hemoproteína presente nos grânulos azurofílicos, que reage com H_2O_2 , aumentando o

potencial tóxico deste oxidante. Através da oxidação do ânion cloreto, tirosina e nitrito, o sistema H_2O_2 -MPO induz a formação de ácido hipocloroso (HClO), outros produtos clorados, radicais tirosina e intermediários reativos do nitrogênio, todos capazes de atacar as membranas de microorganismos (KLEBANOFF, 1999).

Em 2004 foi descrito um novo mecanismo microbicida mediado por neutrófilos, baseado na liberação de “armadilhas” extracelulares por essas células, denominado NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*) (BRINKMANN *et al.*, 2004). As NETs são extrusões da membrana plasmática de neutrófilos ativados, contendo DNA, histonas e proteases derivadas dos grânulos azurofílicos, que se ligam e matam bactérias, fungos e parasitos no meio extracelular. As NETs são liberadas por neutrófilos ativados, o que culmina em um processo de morte celular que é distinto da apoptose e necrose e depende da geração de ROS pela NADPH oxidase. Essa nova descrição de morte dependente de ROS, é também chamada de NETose e permite aos neutrófilos uma completa função microbicida, mesmo após a sua morte (BUCHANAN *et al.*, 2006; BRINKMANN & ZYCHLINSKY, 2007; FUCHS *et al.*, 2007; STEINBERG & GRINSTEIN, 2007; GUIMARÃES-COSTA *et al.*, 2009).

A duração da resposta imune e da ação tóxica de células efectoras são finamente controladas (LENARDO *et al.*, 1999). Os neutrófilos produzem uma grande variedade de moléculas tóxicas que podem causar dano significativo aos tecidos e órgãos do hospedeiro se a resposta inflamatória não for fortemente regulada. A resolução da resposta inflamatória é um processo complexo e inclui a produção de mediadores anti-inflamatórios e a apoptose de neutrófilos, seguido da remoção de corpos apoptóticos pelos macrófagos, com o objetivo de restabelecer e manter a homeostase do sistema imune (SAVILL *et al.*, 1989; WHYTE *et al.*, 1993; KOBAYASHI *et al.*, 2005).

4. APOPTOSE E REMOÇÃO FAGOCÍTICA DE CÉLULAS APOPTÓTICAS

A apoptose é um tipo de morte celular programada, definida como uma forma auto-controlada de morte celular, que tem importantes implicações no desenvolvimento e homeostase do organismo, e também pode ser induzida no curso das respostas imunes e inflamatórias. A renovação normal de células, independente do tipo celular e localização tecidual é governado pela apoptose, e defeitos nesse mecanismo de morte celular levam a condições patológicas, incluindo o câncer e doenças autoimunes (LENARDO *et al.*, 1999; MEIER *et al.*, 2000; SAVILL & FADOK, 2000).

Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas características. Tais alterações incluem redução do volume citoplasmático da célula e perda da aderência à matriz celular e células vizinhas, com a consequente aquisição de uma forma esférica; e condensação da cromatina, que se concentra junto à membrana nuclear, formando o núcleo picnótico. Inicialmente, a membrana plasmática permanece íntegra e as organelas bem preservadas com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar permeabilização da membrana externa. Mais tardiamente, a membrana celular forma vesiculações (*blebs*) e a célula pode se fragmentar, originando os chamados corpos apoptóticos. A fragmentação do DNA, com padrão oligonucleossomal é um dos parâmetros bioquímicos característicos da apoptose, facilmente observado em gel de agarose. Adicionalmente, a exposição precoce de fosfatidilserina (PS) no folheto externo da membrana plasmática e a ativação de caspases podem ser utilizadas para identificar células em apoptose (STRASSER *et al.* 2000; ZIEGLER & GROSCURTH, 2004; KENNEDY & DELEO, 2009).

A maioria das alterações morfológicas observadas na apoptose é causada por uma série de caspases, cisteíno-proteases evolutivamente conservadas que possuem um resíduo de

cisteína em seus sítios ativos, o que é crítico para a atividade proteolítica que ocorre nos resíduos de ácido aspártico das proteínas-alvo. Quando as caspases são ativadas, elas clivam substratos específicos, podendo ativá-los ou inativá-los (COHEN *et al.*, 1997; MINKO *et al.*, 2001).

O processo de apoptose pode ser deflagrado por diversos estímulos como a ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, privação de fatores de crescimento e níveis aumentados de ROS (HENGARTNER, 2000). A ativação da apoptose pode ser iniciada pela via intrínseca ou mitocondrial ou pela via extrínseca, que envolve a família dos receptores de morte celular, incluindo receptor de TNF α e Fas (CD95). Entretanto, essas vias convergem para uma maquinaria de execução de morte comum, culminando na ativação da enzima efetora neste processo, a caspase-3 (THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998; HENGARTNER, 2000).

Durante as respostas inflamatórias agudas, um grande número de neutrófilos é mobilizado e recrutado para os tecidos. Como dito anteriormente, os neutrófilos inflamatórios secretam proteases, citocinas, quimiocinas e mediadores solúveis que regulam a inflamação. Entretanto, essas células têm vida curta, e entram em apoptose constitutiva ou espontânea como um mecanismo de manter a homeostase (HASLETT, 1999; SAVILL *et al.*, 1989).

Os neutrófilos apoptóticos apresentam um decréscimo geral na função celular e capacidade pró-inflamatória, bem como uma reduzida responsividade a estímulos externos (DRANSFIELD *et al.*, 1995). Adicionalmente, a membrana plasmática se mantém íntegra, limitando a liberação do conteúdo celular tóxico. Todas essas características são essenciais para a remoção não inflamatória dessas células senescentes (WHYTE *et al.*, 1993; KOBAYASHI *et al.*, 2005).

A apoptose de neutrófilos pode ser iniciada pela via intrínseca (ROS) ou extrínseca (TNF- α ou ligante de Fas- FasL/CD95L) (TSUYUKI *et al.*, 1995; MURRAY *et al.*, 1997). Os neutrófilos também entram em apoptose após a fagocitose, um processo também conhecido como morte celular induzida por fagocitose (PICD, *Phagocytosis-induced cell death*) (KENNEDY & DELEO, 2009).

Ao contrário da necrose, a apoptose dos neutrófilos é considerada uma “morte silenciosa”, uma vez que células apoptóticas são reconhecidas e rapidamente fagocitadas por macrófagos teciduais, não induzindo lesão tecidual ou liberação de moléculas tóxicas que estariam desta forma, danificando os tecidos do hospedeiro (HENSON & JOHNSTON, 1987; SAVILL & FADOK, 2000).

A remoção imediata e eficiente de células apoptóticas por fagocitose, também chamada de eferocitose (GARDAI *et al.*, 2005), é crucial para evitar a perda da integridade celular e extravasamento do conteúdo intracelular, e por limitar as respostas imunes contra auto-antígenos derivados dessas células. A eliminação de células apoptóticas é mediada principalmente, por fagócitos profissionais como macrófagos e DCs, mas fagócitos não-profissionais também podem participar deste processo (RAVICHANDRAN & LORENZ, 2007).

A importância do reconhecimento e ingestão de células apoptóticas por fagócitos é corroborada pelo vasto número de ligantes e receptores envolvidos (SAVILL *et al.*, 2002; MOREIRA & BARCINSKI, 2004; RAVICHANDRAN & LORENZ, 2007; ERWIG & HENSON, 2008).

As células apoptóticas apresentam diversas mudanças na composição de suas membranas plasmáticas. Dentre as mudanças de superfície, a mais universal e melhor

caracterizada é a perda da assimetria fosfolipídica e a translocação de PS do folheto interno para o folheto externo da bicamada lipídica, o que ocorre muito precocemente no processo apoptótico (FADOK *et al.*, 1992; MARTIN *et al.*, 1995). Adicionalmente a PS, outras moléculas que estão normalmente confinadas no lado citosólico da membrana celular, aparecem na superfície da célula, como a anexina I, que co-localiza com PS (ARUR *et al.*, 2003), calreticulina, uma proteína do retículo endoplasmático, ICAM-3 e DNA (PALANIYAR *et al.*, 2004). Também podem ocorrer modificações de moléculas de superfície por oxidação (ARROYO *et al.*, 2002; GREENBERG *et al.*, 2006) e alterações nas cadeias de açúcares resultando em sítios similares a partículas de lipoproteínas oxidadas e sítios de ligação de opsoninas, como os que ligam trombospondina, lectinas, as proteínas do complemento C1q e C3b e várias colectinas (TAKIZAWA *et al.*, 1996; CHANG *et al.*, 1999; VANDIVIER *et al.*, 2002). As moléculas expostas em células apoptóticas foram coletivamente chamadas de padrões moleculares associados a células apoptóticas (ACAMPs) (FRANC *et al.*, 1999), e são reconhecidas por um grupo diversificado de PRRs presentes em macrófagos e iDCs (REN & SAVILL, 1998; FRANC *et al.*, 1999; GREGORY, 2000; ERWIG & HENSON, 2008).

Os ACAMPs são reconhecidos simultânea ou alternativamente por distintos PRRs, incluindo as lectinas (ligam açúcares alterados) (EZEKOWITZ *et al.*, 1990), o receptor de vitronectina $\alpha_v\beta_3$ (liga trombospondina-1) (SAVILL *et al.*, 1990) pela lactaderina ou MFG-E8, que funciona como uma ponte entre $\alpha_v\beta_3$ e PS (HANAYAMA *et al.*, 2002), receptores scavengers (ligam motivos similares a lipoproteína de baixa densidade oxidada-LDL) (GORDON, 1999), CD14 (liga ICAM3) (GREGORY, 1998) e CD91 (liga C1q através da calreticulina) (OGDEN *et al.*, 2001; GARDAI *et al.* 2005), porém não é necessário que todos esses ACAMPs sejam expostos nas células apoptóticas para que haja sua remoção, bem como

nem todos os receptores são necessários para mediar o reconhecimento celular e fagocitose. Ainda, o mesmo ligante pode ser reconhecido por diferentes receptores, amplificando as possibilidades de reconhecimento, o que visa garantir a máxima eficiência na remoção de células apoptóticas (MOREIRA & BARCINSKI, 2004).

Entretanto, o reconhecimento de células apoptóticas parece ser dependente da coleção de receptores que estão sendo expressos e o estado de ativação do fagócito durante o processo e também da célula que está sendo ingerida (FADOK *et al.*, 1992; PRADHAN *et al.*, 1997; SAVILL *et al.*, 2002). Nesse sentido, o comportamento diferencial dos fagócitos profissionais diante do material apoptótico pode ser explicado pelas diferenças dos receptores usados na internalização de células apoptóticas, ou por suas diversas habilidades intrínsecas como APCs, o que poderia ativar distintas vias de sinalização (RUBARTELLI *et al.*, 1997). A ingestão de células apoptóticas por iDCs, por exemplo, envolve a participação dos receptores $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$, dependendo da subpopulação envolvida, enquanto que nos macrófagos, somente há o envolvimento de $\alpha_v\beta_3$ (RUBARTELLI *et al.*, 1997; ALBERT *et al.*, 1998a; ALBERT *et al.*, 1998b). Adicionalmente, iDCs não somente internalizam as células apoptóticas, mas também geram epítopos peptídicos derivados das células apoptóticas, que são apresentados, via MHC classe I e classe II, para os linfócitos (ALBERT *et al.* 1998a; INABA *et al.* 1998).

Macrófagos que reconhecem ou ingerem leucócitos apoptóticos são capazes de liberar citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (VOLL *et al.*, 1997) e TGF- β (FADOK *et al.*, 1998; FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000) e sua habilidade de secretar citocinas pró-inflamatórias como IL-12 (VOLL *et al.*, 1997) e TNF- α (FADOK *et al.*, 1998) é suprimida (VOLL *et al.*, 1997; FADOK *et al.*, 1998; FADOK *et al.*, 2000). Essa supressão é mediada pela secreção autócrina e parácrina de prostaglandina E₂ (PGE₂) e TGF- β (FADOK *et al.*, 1998; FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000).

O efeito anti-inflamatório de células em apoptose é acompanhado da indução de um programa alternativo de diferenciação nos macrófagos, refletido pela indução da atividade de ornitina descarboxilase (ODC), produção de poliaminas, e inibição da produção de NO (FREIRE-DE-LIMA *et al.* 2000; RAES *et al.*, 2007), bem como a promoção de angiogênese (GOLPON *et al.*, 2004). A injeção de células apoptóticas acelera a resolução do processo inflamatório *in vivo* (HUYNH *et al.*, 2002), desta forma, a remoção de células apoptóticas parece disparar uma via bioquímica envolvida na resolução da inflamação e reparo tecidual (GOLPON *et al.*, 2004).

A remoção fagocítica de neutrófilos apoptóticos ativa um programa metabólico em macrófagos, caracterizado pela secreção de fatores anti-inflamatórios e fibrogênicos como TGF- β e PGE₂, que atuam na resolução da inflamação e reparo tecidual. Esses mesmos fatores são capazes de regular negativamente o potencial pró-inflamatório dos macrófagos que ingeriram essas células apoptóticas, através do controle da síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-1 β e IL-8 (FADOK *et al.* 1998; HASLETT, 1999; SAVILL *et al.* 2002; RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004). Em paralelo, a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por iDCs inibe sua maturação pelo decréscimo da secreção de IL-12, expressão de moléculas co-estimulatórias e de moléculas de MHC-II, o que reduz sua habilidade de estimular células T virgens (URBAN *et al.* 2001; STUART *et al.* 2002). Uma vez que os neutrófilos são células potencialmente tóxicas e prontamente recrutadas em processos inflamatórios, sua eficiente eliminação parece ter consequências adicionais na imunorregulação.

A eliminação de células apoptóticas também é um mecanismo da imunidade inata, uma vez que vários patógenos apresentam estruturas que reagem cruzadamente com

moléculas endógenas alteradas pela apoptose, e são reconhecidas por macrófagos e iDCs pelo mesmo conjunto de PRRs como o CD14 e TLR2 (FRANC *et al.*, 1999).

5. REMOÇÃO PRÓ-INFLAMATÓRIA DE CÉLULAS APOPTÓTICAS

A remoção fagocítica de células apoptóticas frequentemente gera um poderoso ambiente anti-inflamatório e imunossupressor (SAVILL & FADOK, 2000), porém sob determinadas circunstâncias, também pode induzir reações inflamatórias (BORGES *et al.*, 2001; HOHLBAUM *et al.*, 2002; ZHENG *et al.*, 2004; FRANSEN *et al.*, 2009). Os mecanismos capazes de gerar inflamações pós-apoptose não estão bem definidos e podem variar de acordo com a antigenicidade intrínseca das células alvo em apoptose, a história de ativação ou estresse antes da morte celular, a natureza do indutor, bem como a via de morte celular e a disponibilidade de células do sistema imune capazes de responder ao estímulo apoptótico (HOHLBAUM *et al.*, 2002; GREEN *et al.*, 2009).

A molécula FasL parece mediar tanto as reações apoptóticas quanto as inflamatórias. O FasL é constitutivamente expresso em epitélios da placenta, testículo, globo ocular e cérebro, locais onde sua potente atividade pró-apoptótica parece contribuir para o estado de imunoprivilégio desses órgãos (GRIFFITH *et al.*, 1995; FERGUSON & GRIFFITH, 2006; STEIN-STREILEIN, 2008). Adicionalmente, a apoptose mediada pela interação entre Fas e FasL possui um papel crítico na homeostasia do sistema imune (KRAMMER, 2000). A molécula FasL tem papel integral na regulação das interações entre linfócitos, uma vez que sua expressão em linfócitos T ativados, é o principal mecanismo molecular responsável pelo processo de morte celular programada induzida por ativação (AICD, *Activation-Induced Cell Death*), que está implicado na eliminação de linfócitos T ativados ao final de uma resposta

imune e na depleção periférica de clones de células T auto-reativos (VAN PARIJS *et al.*, 1996; KRAMMER, 2000).

Tem sido relatado um papel pró-inflamatório para FasL em estudos com implante de tumor e rejeição de transplantes. A expressão de FasL, após transfecção gênica em células tumorais (ARAI *et al.*, 1997; SEINO *et al.*, 1997) e em células de tecidos transplantados (KANG *et al.*, 1997), parece facilitar a destruição dessas células por disparar uma resposta inflamatória mediada por neutrófilos (ARAI *et al.*, 1997; SEINO *et al.*, 1997; MIWA *et al.*, 1998; SHIMIZU *et al.*, 1999; RESTIFO, 2000).

No modelo de silicose, foi demonstrado que a sílica induz a expressão de FasL e a apoptose dos macrófagos pulmonares. A injúria tecidual do parênquima pulmonar é decorrente do extravasamento de neutrófilos, que por sua vez é induzido pela expressão de FasL nos macrófagos. Além disso, camundongos *gld*, deficientes em FasL, não desenvolvem silicose (BORGES *et al.*, 2001).

O reconhecimento concomitante de PAMPs e ACAMPs pelas células do sistema imune pode determinar a diferença entre a morte celular “silenciosa” e a inflamatória ou imunogênica (induzida por patógenos) (GREEN *et al.*, 2009). A apoptose de neutrófilos induzida por bactérias tem papel relevante na imunomodulação de macrófagos (PERSKVIST *et al.*, 2002; ZHENG *et al.*, 2004). Dados publicados por ZHENG e colaboradores (2004) revelaram que macrófagos que fagocitaram neutrófilos que sofreram apoptose induzida por bactérias, apresentaram uma maior produção de TNF- α , mas não de TGF- β , se comparados aos que fagocitaram neutrófilos, cuja apoptose foi induzida por radiação ultravioleta (UV). Adicionalmente, foi observada uma ligação entre a apoptose de neutrófilos induzida por bactérias e a liberação de proteínas de choque térmico (HSP, *Heat Shock Proteins*) HSP60 e

HSP70, e ainda que a inclusão dessas proteínas recombinantes em cultura potencializou a produção de TNF- α estimulada por LPS nos macrófagos. No entanto, segundo este trabalho, a ativação pró-inflamatória dos macrófagos não é decorrente da presença de bactérias nos neutrófilos apoptóticos, mas sim pela liberação de sinais de perigo por essas células, representados pelas HSP. Da mesma forma, DCs que fagocitaram neutrófilos apoptóticos infectados por bactérias, apresentaram um aumento na secreção das citocinas IL-23, IL-6 e TGF- β e promoveram a diferenciação e expansão de células com perfil inflamatório, Th17 (TORCHINSKY *et al.*, 2009).

Macrófagos murinos expostos a uma combinação de neutrófilos apoptóticos e ligantes de TLR4, TLR2 e TLR9 são capazes de elaborar uma resposta de citocinas que é qualitativamente diferente das respostas a esses estímulos administrados individualmente. Os neutrófilos apoptóticos, quando co-administrados com estímulos imunes inatos como o LPS, são capazes de induzir uma rápida e elevada secreção, mesmo que temporariamente limitada, de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , MIP-1 α e MIP-2 (LUCAS *et al.*, 2003).

Como anteriormente discutido, é notória a importância dos neutrófilos nos processos inflamatórios. No sítio de inflamação, as proteases derivadas dos grânulos de neutrófilos são capazes de recrutar e ativar macrófagos a produzir e liberar citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 e TNF- α , além de aumentarem a capacidade fagocítica dessas células (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2007; MEYER-HOFFERT, 2009; SOEHNLEIN, 2009).

A elastase neutrofílica (NE) é uma das principais serino-proteases presentes nos grânulos azurofílicos de neutrófilos, constitutivamente liberada nos sítios de inflamação (RAINER *et al.*, 1998; PHAM, 2006). A NE é capaz de clivar glicosaminoglicanas de matriz extracelular e liberar proteoglicanos que podem funcionar como ligantes endógenos de

TLRs (KEY *et al.*, 1992; KLEBANOFF *et al.*, 1993; JOHNSON *et al.*, 2004; BRUNN & PLATT, 2006). Foi relatado que o heparan sulfato é capaz de induzir a maturação de DCs, de forma dependente da expressão de TLR4 (JOHNSON *et al.*, 2002), da mesma forma que o ácido hialurônico, liberado após injúria tecidual, necessita de TLR4, TLR2 e MyD88 *in vitro* e *in vivo* para iniciar respostas inflamatórias, na injúria pulmonar aguda (JIANG *et al.*, 2005). Contudo, não é possível descartar o efeito direto da interação de NE nas moléculas de TLR4. Dados da literatura mostram que a NE induz a secreção de IL-8 por células epiteliais através do engajamento de TLR4 (DEVANEY *et al.*, 2003) e que nas células musculares lisas, a NE induz a rápida associação de MyD88 com IRAK, seguida pela ativação de NFkB (LEE *et al.*, 2006). Além disso, a ativação de macrófagos por neutrófilos inflamatórios também necessita da expressão de TLR4 (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2007). Adicionalmente, a própria NE é capaz de sinergizar com o LPS e aumentar a expressão de TLR4 em monócitos derivados de sangue periférico humano (TSUJIMOTO *et al.*, 2005).

Outras proteases derivadas de neutrófilos também são capazes de ativar monócitos/macrófagos. Os HNPs (*Human Neutrophil Peptides*), também conhecidos como α -defensinas, são capazes de aumentar a secreção de TNF- α e IL-1 α , contudo, os monócitos imaturos somente expressam essas citocinas, em presença de *Staphylococcus aureus* ou PMA (Forbol 12-miristato 13-acetato) (CHALY *et al.*, 2000). A azurocidina é capaz de sinergizar com o LPS na indução de TNF- α e IL-6 (RASMUSSEN *et al.*, 1996), enquanto que o peptídeo derivado de catelicidina, LL-37, é capaz de induzir o processamento e liberação de IL-1 β em monócitos pré-estimulados com LPS (ELSSNER *et al.*, 2004; TOMASINSIG *et al.*, 2008).

Todos esses dados em conjunto revelam como a natureza imunossupressora da eliminação de células apoptóticas pode co-existir com a natureza necessariamente

inflamatória dos processos infecciosos. Nesse sentido, a apoptose pró-inflamatória assume um importante papel nos eventos iniciais da infecção, disparados por estímulos imunes inatos derivados de bactérias ou dano tecidual, ambos geradores de sinais de perigo, contribuindo assim, para o recrutamento e ativação da resposta imune inata, quando a morte celular ocorre em tecidos infectados ou inflamados. Além disso, a visão simplística de neutrófilos como células que cegamente destroem microrganismos e morrem muito rapidamente para influenciar mecanismos imunes subsequentes, é agora certamente, desatualizada.

6. IMPORTÂNCIA DA REMOÇÃO FAGOCÍTICA DE NEUTRÓFILOS NA INFECÇÃO POR UM PROTOZOÁRIO PARASITA INTRACELULAR

As infecções parasitárias em hospedeiros mamíferos podem ter como consequência, a apoptose tanto de parasitas, quanto das próprias células hospedeiras, o que poderia ter implicações imunopatogênicas (DOSREIS & BARCINSKI, 2001). Em infecções acompanhadas de intensa apoptose, a remoção fagocítica de células apoptóticas pode influenciar a sobrevivência de patógenos intracelulares, devido à inativação funcional de macrófagos e a secreção do fator supressivo TGF- β (LOPES & DOSREIS, 2000).

A infecção de camundongos com *Trypanosoma cruzi*, induz a apoptose de células T (LOPES *et al.*, 1995), através do receptor de célula T ou receptor de morte Fas, o que exacerba a replicação de *T. cruzi* em macrófagos co-cultivados com essas células apoptóticas (NUNES *et al.*, 1998). Dados publicados por FREIRE-DE-LIMA e colaboradores (2000) confirmaram que o *T. cruzi* é capaz de explorar essa via fagocítica “silenciosa” para amplificar a sua replicação no hospedeiro. Macrófagos ingerem os linfócitos apoptóticos por um mecanismo dependente da integrina $\alpha_v\beta_3$, e essa ligação, por si só, é suficiente para promover a replicação exacerbada do *T. cruzi*. Foi também identificada, uma via bioquímica

iniciada pela ingestão das células apoptóticas e que consiste na produção de PGE₂ e TGF-β, seguida pelo aumento da atividade ODC e da produção da poliamina putrescina. A PGE₂ e o TGF-β apresentam um efeito supressor sobre a produção de NO, inibindo a atividade microbicida do macrófago, enquanto que a putrescina promove o crescimento do *T. cruzi* (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000).

Apesar da significância da apoptose de linfócitos na modulação da resposta imune ao *T. cruzi*, nas etapas iniciais de um processo infeccioso, os neutrófilos são as primeiras células recrutadas e rapidamente entram em apoptose após ativação, sendo removidos por macrófagos teciduais, eventualmente infectados (SAVILL *et al.*, 1989; HASLETT, 1999).

A remoção fagocítica de neutrófilos apoptóticos pode tanto exacerbar o crescimento, quanto induzir a morte de *Leishmania major* dentro dos macrófagos, dependendo da constituição genética do hospedeiro (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004; RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2005; RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2007). Nesse sentido, a co-cultura de macrófagos e neutrófilos mortos, provenientes de animais BALB/c, suscetíveis à infecção por *L. major*, exacerbou o crescimento parasitário de forma dependente de contato e produção de PGE₂ e TGF-β, enquanto que a co-cultura de macrófagos com neutrófilos de animais C57BL/6 proporcionou o controle do crescimento parasitário, de forma dependente de NE e produção de TNF-α e independente de contato celular. A depleção de neutrófilos *in vivo* reduziu a carga parasitária em animais BALB/c infectados, enquanto que exacerbou a infecção em camundongos resistentes C57BL/6, sugerindo que os neutrófilos protegem contra a infecção nesses camundongos (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004; RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2007).

Adicionalmente, a injeção de um peptídeo inibidor de NE (MeOSuc-AAPV-cmk) exacerbou a infecção por *L. major* nos animais C57BL/6, sugerindo um papel para a NE na função pró-inflamatória e microbicida de neutrófilos de C57BL/6, o que pode ser corroborado

pela diminuição da atividade leishmanicida dos macrófagos de camundongos C57BL/6 que foram co-cultivados com neutrófilos mortos de animais mutantes *pallid*, incapazes de liberar NE para o meio (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2007). Apesar das diferenças funcionais entre os neutrófilos de BALB/c e C57BL/6 não estarem completamente elucidadas, os neutrófilos inflamatórios de C57BL/6 liberam mais NE no sobrenadante do que neutrófilos de BALB/c. Esses dados sugerem que polimorfismos genéticos podem afetar interações entre macrófagos e neutrófilos, podendo ter um importante papel na resistência inata à infecção por *Leishmania* em humanos (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2007).

Esses resultados indicam um papel importante da imunidade inata nas respostas do hospedeiro à infecção por *L. major*, especialmente o papel da NE nas interações entre macrófagos e neutrófilos mortos.

Objetivos

Uma vez elucidado o papel da remoção fagocítica de neutrófilos mortos/apoptóticos por células da imunidade inata, e seu reflexo no paradigma de resistência/suscetibilidade à *L. major* em camundongos, o presente estudo inicialmente objetivou investigar a natureza das interações entre células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDDCs) e neutrófilos inflamatórios apoptóticos. Este estudo corresponderia às primeiras etapas de uma resposta imune adaptativa. Num segundo momento, objetivamos investigar se a remoção fagocítica de neutrófilos inflamatórios apoptóticos, era capaz de induzir a maturação de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) para um fenótipo polarizado e estável.

Pelo exposto, os objetivos específicos desta tese foram:

1. Investigar os efeitos da endocitose de neutrófilos apoptóticos na maturação de BMDDCs, através da expressão das moléculas co-estimulatória CD86 e MHC-II, bem como, da síntese das citocinas IL-12p40, IL-12p70 e IL-10;
2. Investigar a dependência de contato entre BMDDCs e neutrófilos apoptóticos para a síntese de citocinas;
3. Investigar os efeitos da endocitose de neutrófilos apoptóticos por BMDDCs na proliferação de células T alogênicas;
4. Investigar os efeitos tardios da endocitose de neutrófilos apoptóticos na diferenciação de BMDMs, através da análise do perfil de secreção das citocinas IL-12p40, IL-12p70, TNF- α , IL-10 e TGF- β , bem como de nitritos após desafio com LPS e se o fenótipo induzido é dependente de contato entre neutrófilos e macrófagos;

5. Investigar se o fenótipo induzido pela eferocitose de neutrófilos por BMDMs favorece uma resposta imune Th1 ou Th2;
6. Investigar a expressão de marcadores fenotípicos de subpopulações de macrófagos M1 ou M2, após a fagocitose de neutrófilos apoptóticos;
7. Investigar os mecanismos moleculares (TNF- α , IL-10, NE e TLR4) envolvidos na indução do fenótipo obtido após eferocitose de neutrófilos;
8. Comparar os efeitos agudos e tardios da eferocitose na indução da capacidade microbicida de macrófagos.

Material & Métodos

1. CAMUNDONGOS E PARASITAS

Camundongos isogênicos das linhagens BALB/c e C57BL/6 (B6) de ambos os sexos, com idade entre 6-8 semanas, foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - Rio de Janeiro) e mantidos em nosso biotério, sob condições sanitárias convencionais. A utilização dos animais foi baseada em normas estabelecidas pelo Comitê Ética do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

A linhagem de *Leishmania major* (*L. major*) LV39 (MRHO/Sv/59/P) utilizada, é isolada mensalmente das lesões de patas de animais BALB/c infectados, e mantida *in vitro* como promastigotas proliferantes em meio Schneider's (Sigma Chemical Co., EUA) completo, isto é, suplementado com 2 mM de L-glutamina, 2% de urina humana estéril, 10 µg/mL de gentamicina e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco BRL, EUA). As formas promastigotas são mantidas em cultura por até 4 semanas, sem perder sua infectividade.

2. OBTENÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS IMATURAS E MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA

Para obtenção de células dendríticas, células de medula óssea foram cultivadas por 9 dias em presença de GM-CSF recombinante (rmGM-CSF) (R&D Systems, EUA), seguindo metodologia descrita por LUTZ e colaboradores (1999). Resumidamente, as células foram obtidas a partir da medula óssea de tíbias de camundongos com idade entre 6-12 semanas, cultivadas em placas de Petri com 100 mm de diâmetro (TPP, Suíça), na concentração de

2×10^5 células por mL em meio RPMI 1640 (Gibco BRL) completo (2 mM de L-glutamina, 50 μ M de β -mercaptoetanol, 100 mM piruvato, 10 μ g/mL de gentamicina, aminoácidos não essenciais, suplementado com 10% de SFB) e 20 ng/mL de rmGM-CSF. O meio da cultura foi trocado e suplementado com 20 ng/mL de rmGM-CSF a cada 3 dias. No 9º dia, as células não aderentes foram recolhidas, contadas e distribuídas na concentração de 10^5 células/mL nos poços de microplacas de 24 (TPP), 48 ou 96 (Corning Inc, EUA) orifícios para cultura de células.

Para obtenção de macrófagos, células de medula óssea foram cultivadas em meio RPMI completo por 7 dias em presença de M-CSF (20% do sobrenadante de cultura de células L929, como fonte de M-CSF) (ENGLEN *et al.*, 1995), em placas de 24, 48 ou 96 orifícios na concentração de 5×10^4 células/mL, seguindo protocolo adaptado, descrito por SUTTERWALA e colaboradores (1997). Após 7 dias, as culturas foram estimuladas com 0,5 ng/mL de IFN- γ recombinante (rmIFN- γ) (R&D) por 18 horas. Ao final da diferenciação, estima-se que as células atinjam uma concentração de aproximadamente 2×10^5 macrófagos/mL.

3. OBTENÇÃO DE NEUTRÓFILOS APOPTÓTICOS

Os neutrófilos inflamatórios foram obtidos a partir da lavagem da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c ou B6, 7 horas após injeção intraperitoneal de 1mL de meio contendo 3% de tioglicolato de sódio (Sigma) (LI *et al.*, 1997; COOK *et al.*, 2003). Células do exsudato peritoneal foram lavadas com Hanks' (Gibco BRL) e incubadas em meio DMEM (Sigma) incompleto, suplementado com 2 mM de L-glutamina, 50 μ M de β -mercaptoetanol, 100 mM piruvato, 10 μ g/mL de gentamicina e aminoácidos não essenciais, em garrafas plásticas para cultura de células (25 cm²; TPP) por 1 hora a 37°C em atmosfera contendo 7%

de CO₂, com o objetivo de remover macrófagos aderentes. Para a indução de apoptose, células não aderentes (80-90% de neutrófilos) foram lavadas e incubadas em meio DMEM incompleto por 18 horas a 37°C em atmosfera contendo 7% de CO₂ (SAVILL *et al.*, 1989). Seguindo esta metodologia, o percentual de neutrófilos apoptóticos obtido é superior a 85% (Figura 1).

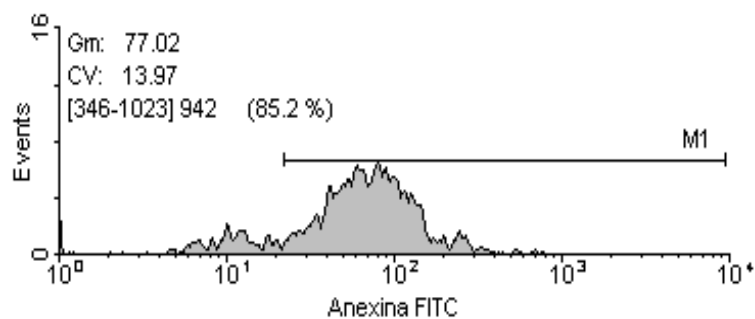


FIGURA 1. Percentual de neutrófilos apoptóticos. Análise de citometria de fluxo de neutrófilos apoptóticos derivados de camundongos B6, obtidos pela técnica de *aging*. As células analisadas foram selecionadas por sua expressão de Gr1 e dentro dessa população, foi analisado o percentual de células anexina positivas. Os neutrófilos foram marcados com anexina-V-FITC. Foi obtido um percentual de 85,2 % de neutrófilos apoptóticos.

4. INTERAÇÃO ENTRE CÉLULAS DENDRÍTICAS E NEUTRÓFILOS APOPTÓTICOS

BMDDCs de camundongos B6 (BMDDCs-B6) ou BALB/c (BMDDCs-BALB) foram co-cultivadas ou não com neutrófilos apoptóticos singênicos (proporção 1:5) e após 2 horas, foi adicionado 1µg/mL de LPS derivado de *Salmonella enterica* sorotipo *typhimurium* (Sigma) por 24 horas a 37°C, em atmosfera contendo 7% de CO₂. Nas culturas onde foi avaliada a participação do contato físico, os neutrófilos foram separados ou não das BMDDCs por uma membrana impermeável a células, com diâmetro de poro de 0,2 µm (Nalge Nunc, EUA), sendo o conjunto equilibrado com 1 mL de meio RPMI completo. Ao final do tempo de incubação, as células foram avaliadas fenotípica e funcionalmente através da expressão de moléculas co-estimulatórias por citometria de fluxo, dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias no sobrenadante da co-cultura por ensaio imunoenzimático (ELISA) do tipo sanduíche e capacidade de induzir uma resposta alorreativa em linfócitos T.

5. INTERAÇÃO ENTRE CÉLULAS DENDRÍTICAS E LINFÓCITOS ALOGÊNICOS

Para avaliar a capacidade de BMDDCs em induzir proliferação de linfócitos T, BMDDCs-B6 foram previamente estimuladas com meio, LPS ou neutrófilos apoptóticos singênicos em presença ou não de LPS. Após 24 horas, as células foram lavadas com Hanks' e passadas em gradiente de Ficoll 1083 (Sigma), com o objetivo de eliminar totalmente os neutrófilos, de acordo com as instruções do fabricante. As BMDDCs-B6 foram então, contadas, ajustadas para as concentrações de 2×10^4 e 1×10^4 células/mL e co-cultivadas com 3×10^5 células T, provenientes de linfonodos mesentéricos de animais BALB/c, em placas de 96 orifícios de fundo chato (Corning Inc) por 5 dias. Para avaliar a capacidade de regulação direta dos neutrófilos nas células T, foram co-cultivados 10^5 neutrófilos com 3×10^5 células T por 24 horas. Para verificar a capacidade proliferativa de linfócitos T, foi adicionado à cultura, 1µCi de timidina tritiada ($[^3\text{H}]$ -TdR) (Amersham Bio Sciences, Inglaterra). Após 16 horas,

as células foram coletadas em filtro de fibra de vidro, em um coletor semi-automatizado (PHD™ Cell Harvester, Cambridge Technology, INC.). A proliferação foi medida através da incorporação de [³H]-TdR ao DNA, por espectroscopia de cintilação líquida (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, Beckman Coulter™, EUA) e os resultados foram expressos em contagem por minuto (cpm).

6. INTERAÇÃO ENTRE MACRÓFAGOS E NEUTRÓFILOS APOPTÓTICOS

Foi estabelecido um protocolo composto por duas etapas: cultura e diferenciação de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs), seguido de re-estimulação com LPS. Os BMDMs de camundongos B6 (BMDMs-B6) ou BALB/c (BMDMs-BALB) foram tratados com 0,5 ng/mL de rmIFN- γ por 18 horas. Após etapa de lavagem com Hanks', as células foram cultivadas por 3 dias a 37°C em atmosfera contendo 7% de CO₂ com os diferentes tratamentos que incluíam a administração de meio apenas, 100 ng/mL de LPS; 5 ng/mL de IL-4 recombinante (rmIL-4) (R&D), neutrófilos apoptóticos (proporção de macrófagos: neutrófilos de 1:5) ou partículas de látex (10⁶ por poço; Sigma). Em alguns experimentos, os macrófagos e neutrófilos foram separados ou não por uma membrana com diâmetro de poro de 0,2 μ m, e esta esteve presente nos primeiros 3 dias de cultura. Em outros, as co-culturas de BMDMs e neutrófilos apoptóticos foram tratadas com 10 μ g/mL de anticorpos monoclonais neutralizantes anti-IL-10 (JES052A5, R&D), anti-TNF- α (MP6-XT3, R&D), anti-TLR4 (MTS510, eBioscience, EUA) ou os isotipos-controle IgG1 (eBioscience) ou IgG_{2a} (eBioscience), 10 μ g/mL de inibidor de NE (MeOSuc-AAPV-cmk, Calbiochem, EUA) ou inibidor de collagenase (Z-Pro-D-Leu-D-Ala-NHOH, Calbiochem) por 3 dias. Na segunda etapa, após 3 dias, as monocamadas de BMDMs foram lavadas com Hanks' e desafiadas com meio ou elevada dose de LPS (1 μ g/mL) por mais 48 horas a 37°C em atmosfera contendo 7%

de CO₂. Após tempo de incubação, os sobrenadantes foram avaliados para a dosagem de citocinas e nitritos.

7. OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS T CD4⁺

Baços de animais BALB/c ou B6 foram coletados e homogeneizados em meio DMEM incompleto, no interior de placas de Petri de vidro contendo malha de aço inoxidável estéril. O material obtido foi centrifugado a 1600 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em solução ACK (*ammonium chloride-potassium-* 0,82% cloreto de amônio, 0,1% bicarbonato de potássio e 0,003% EDTA) para lise de hemácias por 5 minutos a temperatura ambiente. Após lavagem com Hanks' contendo 10% de SFB, a solução ACK foi removida e o material foi centrifugado a 1600 rpm por 10 minutos a 4°C. O botão celular foi ressuspensão em meio DMEM completo e em seguida, as células passaram por um processo de purificação, utilizando colunas de lã de nylon, como descrito por JULIUS e colaboradores (1973). As colunas de lã de nylon foram lavadas e incubadas com Hanks' contendo 10% de SFB, em estufa por 1 hora a 37°C em atmosfera contendo 7% de CO₂. Após este período, a suspensão de células foi aplicada na coluna numa relação de 10⁸ células para cada 0,6 g de lã de nylon compactada em seringas de 10 mL, e após 1 hora a 37°C em atmosfera contendo 7% de CO₂, foram eluídas com 10 mL de Hanks' contendo 10% de SFB, centrifugadas e ressuspensas em DMEM completo. A contagem das células viáveis foi feita em câmara de Neubauer pela técnica da exclusão do corante Azul de Trypan. Para obtenção de células TCD4⁺, as células T obtidas por filtração (2x10⁶/mL), foram tratadas com 10 µg/mL de anticorpos monoclonais anti-CD8, anti-B220, anti-Mac-1, anti-MHC-II (BD-Pharmingen, EUA) por 40 minutos a 4 °C. Em seguida as células foram lavadas e incubadas com esferas magnéticas cobertas com anticorpos anti-Ig de rato (BioMag perceptive Biosystems, EUA) numa razão de 4 esferas:1célula por 20 minutos a

temperatura ambiente. A seleção negativa foi realizada através de um separador magnético (Advanced Magnetix Inc., EUA) após 3 ciclos de separação magnética, resultando em um percentual de células TCD4⁺ purificadas de 92,1 % (**Figura 2**).

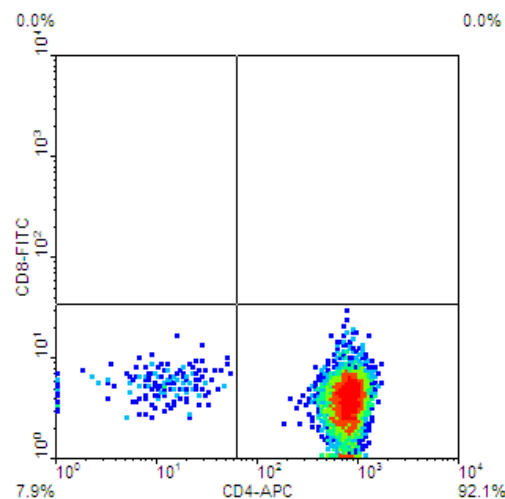


FIGURA 2. Purificação de células TCD4⁺ esplênicas. Análise de citometria de fluxo de células TCD4⁺ esplênicas derivadas de camundongos C57BL/6, marcadas com anticorpo anti-CD4-FITC. Foi obtido um percentual de 92,1 % de células TCD4⁺.

8. INTERAÇÃO ENTRE MACRÓFAGOS E CÉLULAS TCD4⁺

Os BMDMs foram cultivados por 3 dias a 37°C em atmosfera contendo 7% de CO₂ com meio ou neutrófilos apoptóticos (proporção 1:5). Posteriormente, 10⁵ BMDMs/poço foram co-cultivados por 7 dias, com 5x10⁵ células TCD4⁺ alogênicas esplênicas, altamente purificadas, como descrito em seção anterior. No 4º dia de cultura, foi adicionado 1 ng/mL de IL-2 recombinante (rmIL-2) (BD-Pharmingen). As células TCD4⁺ diferenciadas foram removidas e re-cultivadas na concentração de 2,5x10⁵ células/poço em placas de 96 orifícios,

fundo chato, contendo 10 µg/mL de anticorpo monoclonal anti-CD3ε (145.2C11, BD-Pharmingen), previamente imobilizado em placas. Os sobrenadantes foram coletados após 48 horas para a pesquisa das citocinas IFN-γ, IL-4 e IL-10 por ELISA do tipo sanduíche.

9. INTERAÇÃO ENTRE MACRÓFAGOS E PARASITOS *L. MAJOR*

BMDMs-B6 (2×10^5) foram estimulados com rmIFN-γ, lavados e infectados com 2×10^6 formas promastigotas de *L. major* em meio RPMI completo. Após 4 horas, os parasitas extracelulares foram removidos e as monocamadas foram re-incubadas com meio, 100 ng/mL de LPS; 5 ng/mL de rmIL-4 ou neutrófilos apoptóticos (proporção de macrófagos: neutrófilos de 1:5) por 3 dias a 37°C em atmosfera contendo 7% de CO₂. Alternativamente, os BMDMs foram cultivados por 3 dias com meio, LPS, rmIL-4 ou neutrófilos apoptóticos, posteriormente, lavados e infectados com *L. major* por 4 horas, e após remoção dos parasitas extracelulares por lavagem com Hanks', foram incubados a 37°C em atmosfera contendo 7% de CO₂. Após 3 dias de incubação, todas as monocamadas foram lavadas e transferidas para o meio Schneider's suplementado com 2 mM de L-glutamina, 2% de urina humana estéril, 10 µg/mL de gentamicina e 20% de SFB, e incubadas a 26 °C em estufa BOD por mais 3-4 dias adicionais. A carga parasitária intracelular relativa de formas amastigotas de *L. major* foi verificada através da contagem do número de formas promastigotas extracelulares liberadas (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004).

10. CITOMETRIA DE FLUXO

Células dendríticas foram recuperadas dos poços de microplacas de experimentos, contadas e ajustadas para $0,5-1,0 \times 10^6$ células/tubo de citometria. Anticorpos conjugados com fluorocromos FITC ou PE foram utilizados para os procedimentos de citometria de fluxo. As células foram lavadas com tampão de FACS, tratadas com 50 µL de anti-CD16/CD32 (Fc

Block) (BD-Biosciences, EUA) (diluição 1:50) para bloquear os receptores Fc presentes nas células, minimizando ligações inespecíficas, e incubadas por 15 minutos a 4 °C. Após incubação foram adicionados os anticorpos anti-CD11c conjugado com PE (marcador de DC murina), anti-MHC-II conjugado com FITC e anti-CD86 conjugado com FITC na diluição de 1: 50 em tampão de FACS e incubados por 30 minutos a 4 °C, protegidos da luz. As células (10^4 por aquisição) foram analisadas no citômetro de fluxo BD FACS-Calibur. Células CD11c positivas foram eletronicamente inseridas em um *gate*, e o percentual de células positivas foi determinado utilizando o programa de análises de citometria de fluxo, WinMDI versão 2.8 para *Windows*.

11. DOSAGEM DE CITOCINAS

Citocinas (IL-12p40/IL-23, IL-12p70, TNF- α , IL-10, TGF- β , IFN- γ e IL-4) foram quantificadas no sobrenadante de cultura celular após 24 ou 48 horas de incubação através da técnica ELISA do tipo sanduíche, de acordo com metodologia preconizada pelos fabricantes (R&D; e-Bioscience). Os sobrenadantes foram centrifugados com o objetivo de eliminar restos celulares, podendo ser armazenados a -20° C até sua utilização. Resumidamente, placas de 96 poços com fundo chato foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de captura diluídos em PBS ou tampão de captura (fornecido pelo fabricante) e incubadas a 4°C por 18 horas. Após etapa de lavagem com PBS contendo 0,05% Tween 20 (PBS-T) (Sigma), a placa foi bloqueada com PBS contendo 10% de SFB por 2 horas a temperatura ambiente, seguida de nova etapa de lavagem com PBS-T. Os sobrenadantes, bem como as citocinas recombinantes (curva-padrão) foram adicionados e incubados a 4°C por 18 horas. Para a dosagem de TGF- β , PBS contendo 10% de SFB foi substituído por PBS contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA) e os sobrenadantes das células foram acidificados com HCl 1N por 1 hora a temperatura ambiente, etapa seguida da neutralização com NaOH 1N. Após

lavagem com PBS-T, foram adicionados os anticorpos secundários de detecção, marcados com biotina, diluídos em PBS contendo 10% de SFB ou em tampão de ensaio (fornecido pelo fabricante). A placa foi incubada por 3 horas a temperatura ambiente e lavada com PBS-T. A reação foi revelada com fosfatase alcalina conjugada à estreptoavidina (Southern Biotechnology Associates INC, EUA) diluída na proporção de 1:2000 em PBS contendo 10% de SFB, seguida de incubação a 37°C por 1 hora. Após etapa de lavagem, foi adicionado o substrato paranitrofenol fosfato (PNPP) (Sigma) diluído em tampão TRIS-MgCl₂ (pH 9,8). A densidade óptica foi obtida através de leitura em espectrofotômetro de placa (VERSA_{Max} Microplate Reader, Molecular Devices, EUA), com filtro de 405 nm. As concentrações das citocinas foram calculadas a partir dos valores obtidos da curva padrão de citocinas recombinantes e os resultados foram expressos em pg/mL.

12. DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

O NO produzido pelos macrófagos foi determinado indiretamente, a partir da quantificação de nitritos (NO₂⁻), um metabólito estável. O sobrenadante da cultura foi diluído em uma proporção de 1:1 com o reagente de Griess (composto por 0,1% dihidrocloreto naftiletilenodiamina, 1% sulfanamida e 2,5% de ácido fosfórico) e homogeneizado. A densidade óptica foi lida em espectrofotômetro de placa com filtro de 540 nm. A determinação da concentração de nitrito foi calculada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂) e os resultados foram expressos em µM (GREEN *et al* 1982; STUEHR & NATHAN, 1989).

13. MARCAÇÃO DE MOLÉCULAS CELULARES POR ELISA

A expressão dos marcadores de subpopulações dos macrófagos foi avaliada pela técnica de ELISA celular (BORGES *et al.*, 2001). Os BMDMs (10⁴/200µL) foram cultivados em microplacas de 96 orifícios, pré-tratados com rmIFN-γ e estimulados com rmIL-4 ou

neutrófilos apoptóticos (proporção 1:5) por 3 dias a 37°C em atmosfera contendo 7% de CO₂, como descrito acima. Após período de incubação, as monocamadas foram fixadas com PBS contendo 4% de paraformaldeído por 30 minutos, e bloqueadas com PBS contendo 10% de SFB por 2 horas, a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS-T, e incubadas com 5 µg/mL de anticorpo monoclonal anti-LIGHT/TNFSF14 (R&D) ou 5 µg/mL de anticorpo policlonal anti-SPHK1 (Santa Cruz Biotechnology, EUA) por 18 horas. Após lavagem com PBS-T, foi adicionado 5 µg/mL de anticorpo anti IgG de rato biotinilado (Vector, EUA) ou 5 µg/mL de anticorpo anti IgG de cabra biotinilado (Vector) diluídos em PBS contendo 10% de SFB, para detectar LIGHT ou SPHK1 respectivamente. A placa foi incubada por 3 horas a temperatura ambiente e lavada com PBS-T. A reação foi revelada com fosfatase alcalina conjugada à estreptoavidina diluída na proporção de 1:2000 em PBS contendo 10% de SFB, seguida de incubação a 37°C por 1 hora. Após etapa de lavagem, foi adicionado o substrato PNPP diluído em tampão TRIS-MgCl₂. A densidade óptica foi obtida através de leitura em espectrofotômetro de placa, com filtro de 405 nm. Resultados são a média e erro padrão (SE) das leituras de absorbância das triplicatas de cultura.

14. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (SD). A análise estatística foi realizada no programa *SigmaPlot* para *Windows*, empregando o teste *t* de *Student* para amostras independentes. Diferenças com um valor de $p < 0,05$ ou $p < 0,01$ foram consideradas significantes. Todos os experimentos mostrados foram repetidos, com resultados semelhantes.

Resultados

PARTE I

1. DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS A PARTIR DE CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA

As BMDDCs-B6 ou BMDDCs-BALB foram cultivadas por 9 dias em presença de rmGM-CSF. No 9º dia as células não-aderentes foram recolhidas, contadas e distribuídas na concentração de 10^5 células/mL nos poços de microplacas para cultura de células (**Figura 3A**). Como controle do processo de diferenciação, 1×10^6 células foram marcadas com anticorpo anti-CD11c conjugado a PE e o percentual de células $CD11c^+$ foi avaliado por citometria de fluxo. Os experimentos subsequentes foram feitos, considerando válidas, culturas com um percentual de no mínimo, 80 % de células dendríticas diferenciadas (**Figuras 3B e 3C**).

2. INGESTÃO DE NEUTRÓFILOS APOPTÓTICOS INIBE O AUMENTO DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CD86 E MHC DE CLASSE II EM CÉLULAS DENDRÍTICAS

Para avaliar os efeitos da eferocitose de neutrófilos na maturação de BMDDCs induzida por LPS, foi investigada a expressão de moléculas de MHC-II e moléculas co-estimulatórias (**Figura 4**). As BMDDCs-B6 foram estimuladas com LPS por 24 horas, resultando em um aumento da expressão das moléculas acessórias MHC-II (**Figura 4A**) e de CD86 (**Figura 4B**). Porém, quando essas células foram co-cultivadas com neutrófilos apoptóticos singênicos e concomitantemente estimuladas com LPS, foi observado um bloqueio no aumento da expressão dessas moléculas.

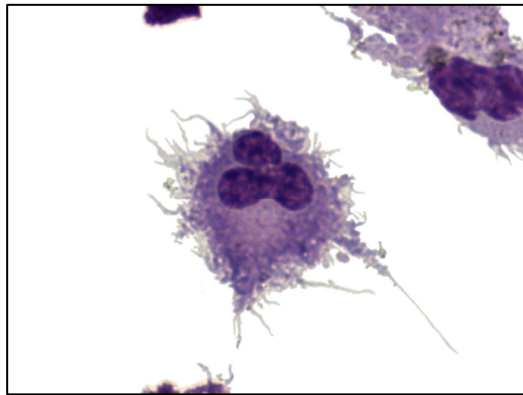
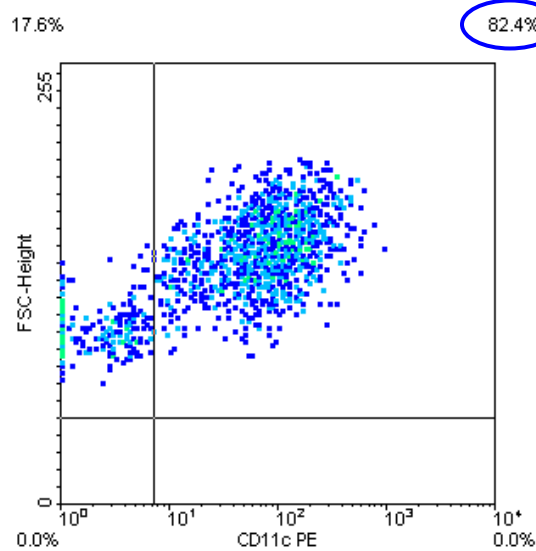
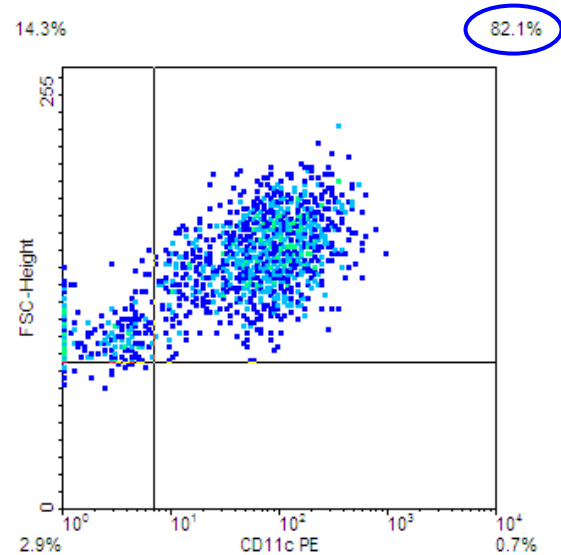
A**B****C**

FIGURA 3. Diferenciação de células dendríticas a partir de células de medula óssea, utilizando rmGM-CSF. (A) Coloração de BMDDCs-B6 resultantes do processo de diferenciação *in vitro* com o kit panótico rápido. Aumento de 400 X. (B e C) Análise de citometria de fluxo para células resultantes, marcadas com o anticorpo CD11c-PE de animais (B) C57BL/6 e (C) BALB/c.

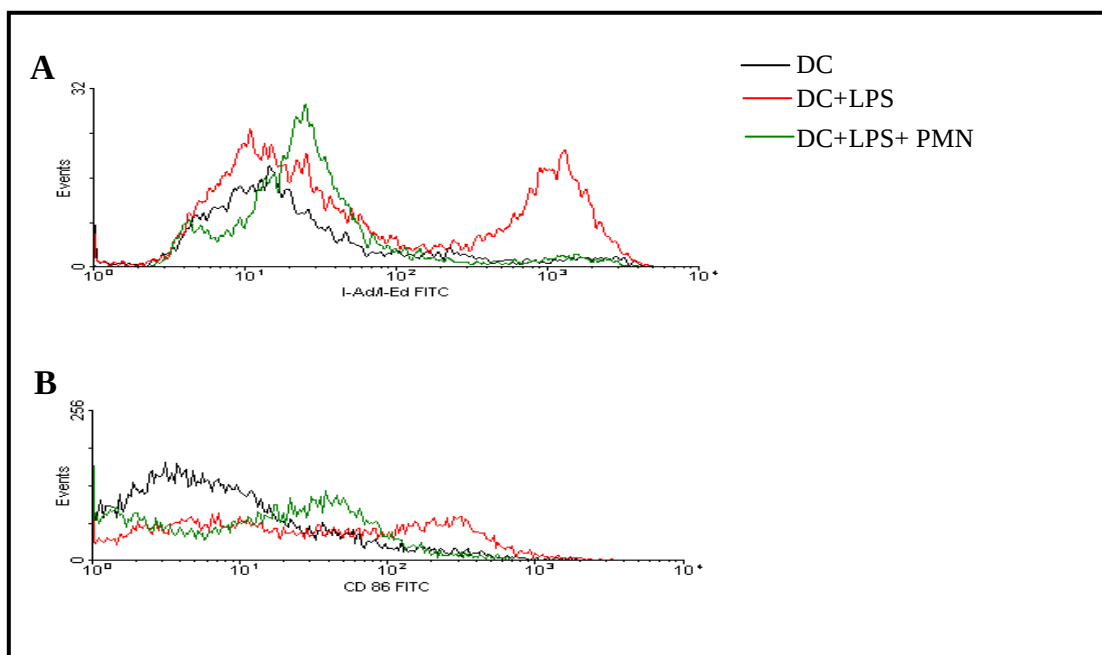


FIGURA 4. Neutr3filos apopt3ticos bloqueiam o aumento da express3o de mol3culas co-estimulat3rias em c3lulas dendr3ticas. As BMDDCs-B6 foram selecionadas por sua express3o de CD11c e dentro dessa popula3o, foram analisadas a express3o de (A) MHC-II e de (B) CD86 por FACS. DC-c3lula dendr3tica de camundongo C57BL/6; PMN-neutr3filo apopt3tico; I-Ad/I-Ed-MHC-II.

3. INGESTÃO DE NEUTRÓFILOS APOPTÓTICOS MODULA A SECREÇÃO DE CITOCINAS INDUZIDA POR LPS EM CÉLULAS DENDRÍTICAS

A secreção de citocinas em BMDDCs induzida por LPS está representada na **Figura 5**. Os dados permitiram observar que as BMDDCs-B6 secretaram IL-12p40 (**Figura 5A**), IL-12p70, a isoforma de IL-12 biologicamente ativa (**Figura 5B**), e IL-10 (**Figura 5C**) em resposta ao LPS. A presença de neutrófilos apoptóticos inibiu drasticamente a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-12p40 e IL-12p70, enquanto que aumentou a secreção de IL-10. Em vários experimentos independentes, a produção de IL-12p70 foi sempre maior em BMDDCs-B6 (**Figura 5B**) do que BMDDCs-BALB (**Figura 5E**), mas a produção de IL-12p40 foi similar em ambas as linhagens de camundongos (**Figuras 5A e 5D**).

4. EFEITOS REGULATÓRIOS DE NEUTRÓFILOS APOPTÓTICOS SÃO EM PARTE, DEPENDENTES DE CONTATO

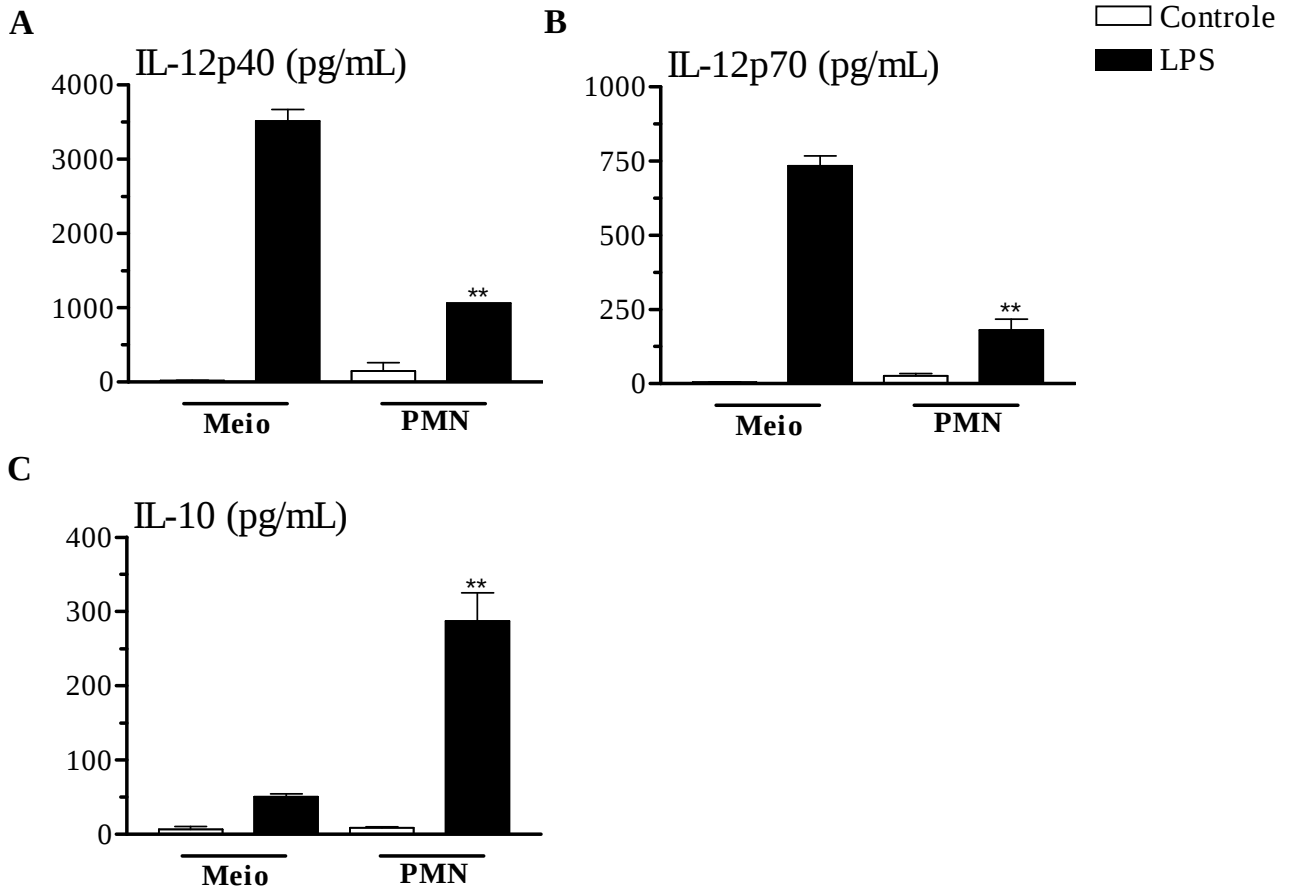
Os resultados apresentados na **Figura 6** demonstram os efeitos regulatórios de neutrófilos apoptóticos na secreção de citocinas de forma dependente ou independente de contato. As BMDDCs-B6 foram co-cultivadas com neutrófilos apoptóticos em um sistema onde as células são separadas ou não por uma membrana com um diâmetro de poro de 0,2 μm . Para controlar o efeito da presença da membrana na cultura, as BMDDCs-B6 e neutrófilos foram também cultivados juntos, porém na presença da membrana. Como mostrado na **Figura 6**, a simples presença da membrana inibiu a secreção de IL-12p70 (**Figura 6A**) e IL-12p40 (**Figura 6B**), mas não de IL-10 (**Figura 6C**), por BMDDCs-B6 em resposta ao LPS. Por outro lado, a presença de neutrófilos apoptóticos somente inibiu a secreção de IL-12p40 e IL-12p70 na ausência da membrana. Notavelmente, a inibição da secreção de IL-12p40 e IL-12p70 induzida por LPS em BMDDCs-B6 que interagiram diretamente com neutrófilos apoptóticos foi de aproximadamente, 3,5 e 3,9 vezes,

respectivamente, enquanto que a separação das células resultou numa inibição menor do que 1,5 vezes na secreção de IL-12p40 e 1,0 vez na de IL-12p70. Esses resultados sugerem que o contato direto entre essas células é necessário para modular a secreção de IL-12. Curiosamente, a secreção de IL-10 foi parcialmente diminuída quando as células foram separadas pela membrana, sugerindo que este efeito é também mediado por fatores solúveis liberados pelas células apoptóticas.

5. INTERAÇÃO DE NEUTRÓFILOS APOPTÓTICOS COM CÉLULAS DENDRÍTICAS INIBE A PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T ALOGÊNICOS

Adicionalmente, estudamos o efeito dos neutrófilos apoptóticos sobre a capacidade co-estimulatória de BMDDCs-B6 em linfócitos T alogênicos (**Figura 7**). Os dados mostram que o pré-tratamento das BMDDCs-B6 com neutrófilos apoptóticos de mesma linhagem inibiu a capacidade dessas células de induzir a proliferação de linfócitos T alorreativos. Também observamos que a co-cultura de neutrófilos apoptóticos não foi capaz de inibir a ativação de linfócitos T induzida por anti-CD3 imobilizado em placa, na ausência de BMDDCs (**Figura 8**).

C57BL/6



BALB/c

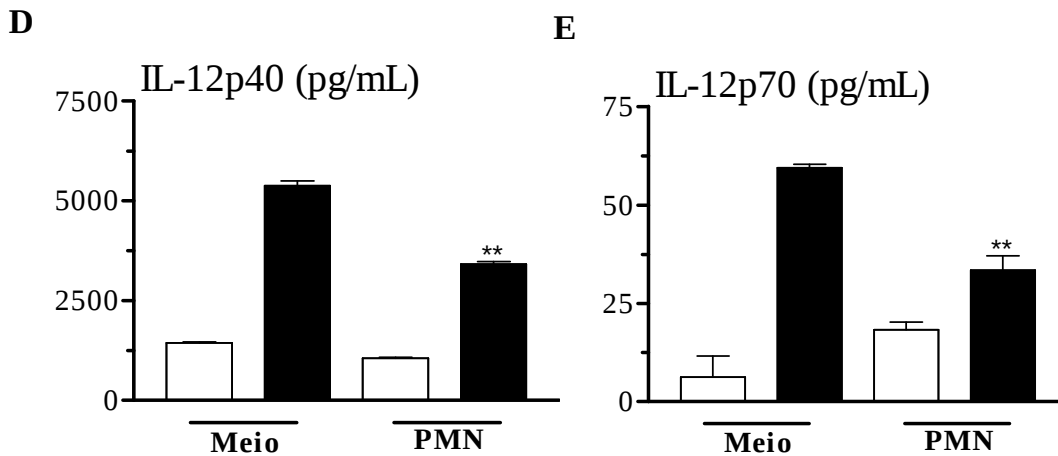


FIGURA 5. A interação com neutrófilos apoptóticos modula a secreção de citocinas por células dendríticas. BMDDCs-B6 ou BMDDCs-BALB foram co-cultivadas com neutrófilos apoptóticos em presença ou não de LPS (1µg/mL) por 24 horas. Sobrenadantes foram coletados, centrifugados e testados para as citocinas solúveis (A) IL-12p40, (B) IL-12p70 e (C) IL-10 derivadas de BMDDCs-B6 e (D) IL-12p40 e (E) IL-12p70 derivadas de BMDDCs-BALB, por ELISA tipo sanduíche. LPS-lipopolissacarídeo; PMN- neutrófilo apoptótico. ** $p < 0,01$ comparado ao LPS. Dados comparativos de pelo menos, três experimentos independentes.

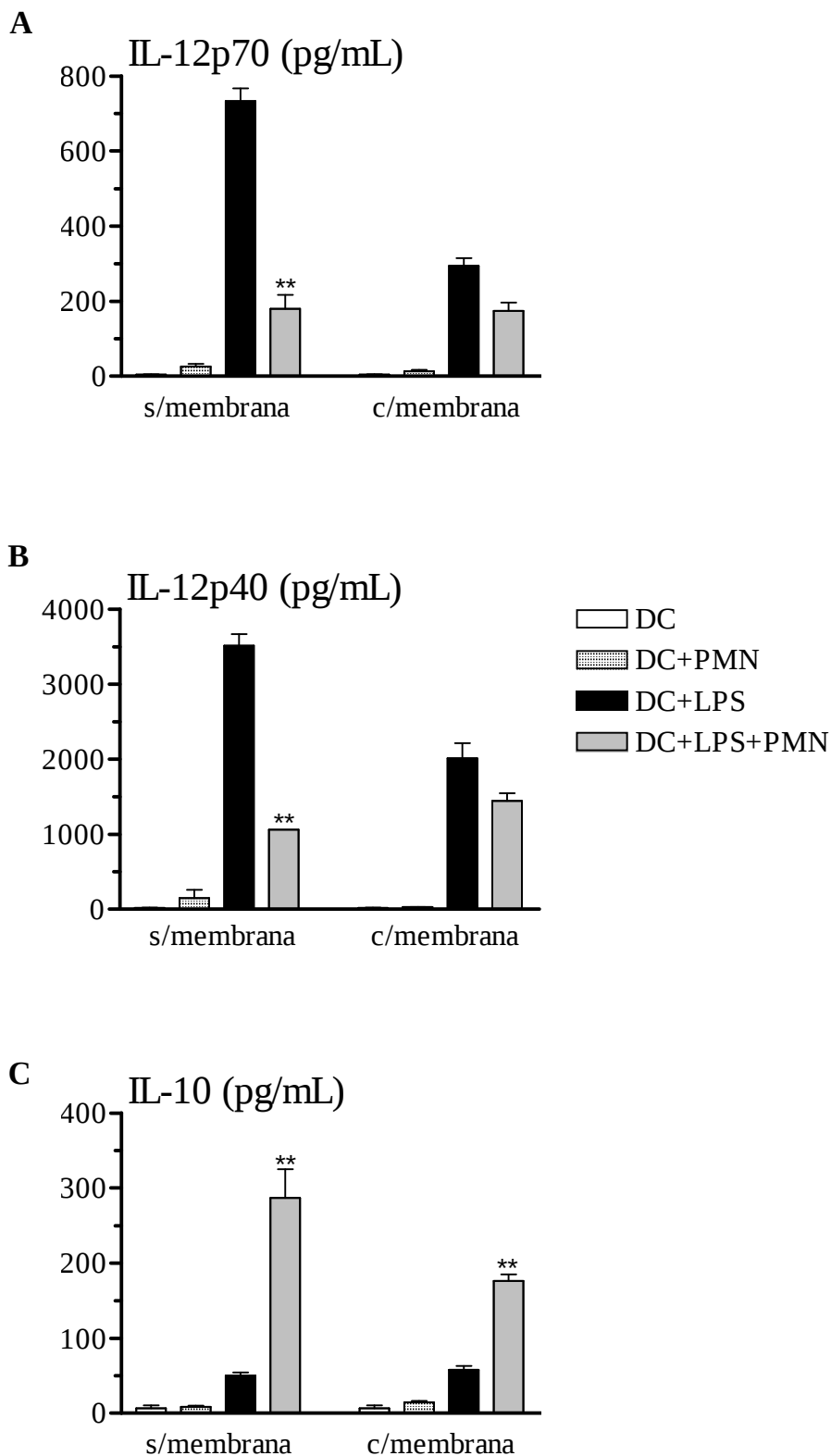


FIGURA 6. O contato de neutrófilos apoptóticos com células dendríticas pode ser necessário para a secreção de citocinas. BMDDCs-B6 e neutrófilos apoptóticos singênicos foram cultivados por 24 horas, separados por uma membrana impermeável a células. Sobrenadantes foram coletados, centrifugados e testados para citocinas solúveis (A) IL-12p70, (B) IL-12p40 e (C) IL-10 por ELISA tipo sanduíche. DC-células dendríticas; LPS- lipopolissacarídeo; PMN-neutrófilo apoptótico. ** $p < 0,01$ comparado com LPS. Dados representativos de pelo menos, três experimentos independentes.

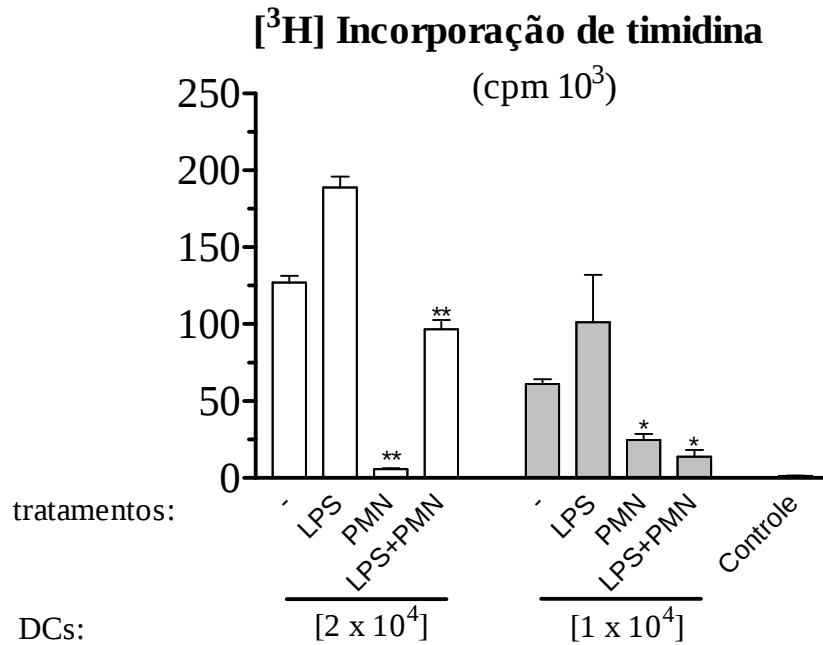


FIGURA 7. A interação entre neutrófilos apoptóticos e células dendríticas inibe a proliferação de células de linfonodo mesentérico. BMDMs-B6 foram pré-tratadas com ou sem LPS (10 ng/mL), neutrófilos apoptóticos ou ambos. A RLM foi realizada co-cultivando diferentes concentrações de BMDDCs-B6 com MLN (3x10⁵) derivadas de camundongos BALB/c. O efeito inibitório dos neutrófilos apoptóticos na proliferação de MLN foi comparado pela incorporação de timidina [³H]. LPS-lipopolissacarídeo; PMN- neutrófilo apoptótico; RLM- reação linfocitária mista; MLN-células de linfonodo mesentérico. ** $p < 0,01$ ou * $p < 0,05$ comparado com LPS. Dados representativos de pelo menos, três experimentos independentes.

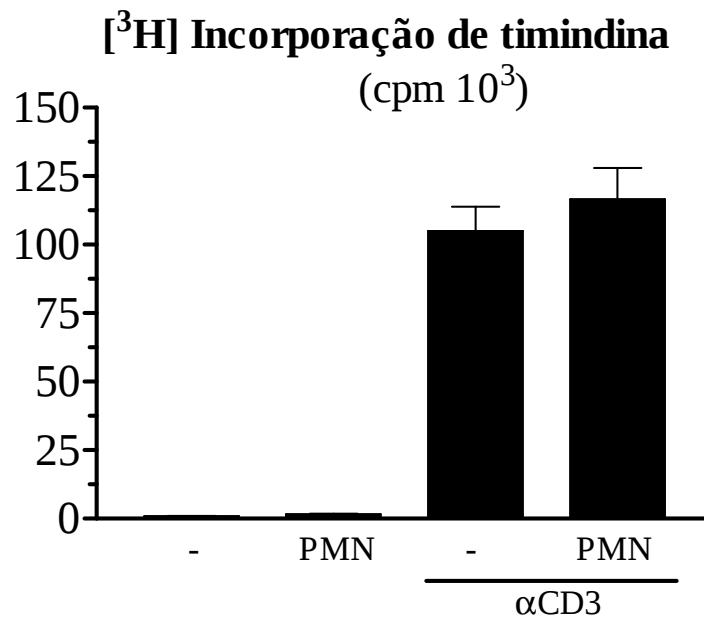


FIGURA 8. A proliferação de MLN induzida por anti-CD3 não é inibida pela interação com neutrófilos apoptóticos. MLN (3×10^5) derivadas de camundongos BALB/c foram co-cultivadas com neutrófilos apoptóticos de camundongos C57BL/6 (10^5) por 24 horas em presença ou não de anti-CD3 aderido aos poços de microplacas de 96 poços. A proliferação foi avaliada pela incorporação de timidina [³H]. LPS- lipopolissacarídeo; PMN- neutrófilo apoptótico; MLN-células de linfonodo mesentérico.

PARTE II

6. INGESTÃO DE NEUTRÓFILOS APOPTÓTICOS INDUZ UM FENÓTIPO M2b EM MACRÓFAGOS IMATUROS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA

A fagocitose de neutrófilos apoptóticos é capaz de induzir respostas anti ou pró-inflamatórias em macrófagos inflamatórios infectados com *L. major*, dependendo da linhagem murina utilizada (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004). No entanto, ainda não foi investigado se estas respostas induzem um fenótipo estável em macrófagos. Para avaliar esta questão, utilizamos BMDMs-B6 obtidos pelo cultivo de células de medula óssea por 7 dias em presença de M-CSF. No 8º dia as células foram pré-tratadas com rmIFN- γ e posteriormente, submetidas a diferentes estímulos por 3 dias (**Figura 9**), como meio de cultura apenas (**Figura 9A**), rmIL-4 (**Figura 9B**) ou neutrófilos apoptóticos (**Figura 9C**). Nós observamos que os BMDMs-B6 tratados com rmIL-4 apresentaram uma morfologia mais espalhada (**Figura 9B**), enquanto que os BMDMs-B6 tratados com neutrófilos apoptóticos estavam mais aderidos, porém com formato fusiforme (**Figura 9C**).

O desafio com uma elevada dose de LPS em BMDMs-B6 revelou o padrão de citocinas e nitritos secretados no sobrenadante de cultura (**Figura 10**). Nossas tentativas de gerar macrófagos M1 utilizando rmIFN- γ e LPS foram infrutíferas devido à ocorrência do fenômeno de tolerância à endotoxina durante a etapa de re-estimulação, revelado pela diminuição da capacidade de secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e TNF- α , bem como nitritos (**Figura 10**). Esse fenômeno já havia sido anteriormente observado por outros autores (SEVERN *et al.*, 1993; STOUT *et al.*, 2005).

Alternativamente, os macrófagos assemelhados a M1 foram gerados a partir de um sinergismo entre as citocinas rmIFN- γ e rmIL-4, como já descrito na literatura (BOGDAN *et*

al., 1991; D'ANDREA *et al.*, 1995). Os BMDMs-B6 que foram pré-tratados com rmIFN- γ e cultivados com rmIL-4 exibiram um fenótipo M1 após desafio com LPS, caracterizado pela elevada produção de IL-12p40 (**Figura 10A**), IL-12p70 (**Figura 10B**), TNF- α (**Figura 10C**) e nitritos (**Figura 10F**) e baixa secreção de IL-10 (**Figura 10D**), se comparados aos BMDMs-B6 cultivados apenas com meio. Por outro lado, BMDMs-B6 que fagocitaram neutrófilos apoptóticos de mesma linhagem e foram re-estimulados com LPS, foram capazes de secretar pequenas quantidades de IL-12p70 (**Figura 10B**), mas elevadas concentrações de IL-10 (**Figura 10D**) e nitritos (**Figura 10F**) quando comparados aos controles. A eferocitose de neutrófilos é capaz de induzir a secreção IL-12p40 por BMDMs-B6, porém a quantidade secretada correspondeu a aproximadamente, metade da secretada por macrófagos M1 (BMDMs-B6 tratados com rmIL-4). Da mesma forma, secreção de IL-12p70 correspondeu a menos de 15% da quantidade secretada pelos macrófagos M1 e mais que o dobro de IL-10 e nitritos em relação aos BMDMs-B6-controle, tratados apenas com meio. Conforme mostrado por EDWARDS e colaboradores (2006), além de outras características, macrófagos com esse perfil de secreção são classificados como macrófagos do tipo II ou M2b.

Adicionalmente, verificamos o perfil de secreção de citocinas como TNF- α (**Figura 10C**) e TGF- β (**Figura 10E**) pelos BMDMs-B6 e observamos que a eferocitose de neutrófilos também foi capaz de aumentar a secreção de ambas as citocinas, especialmente a de TGF- β constitutiva, ou seja, independente do re-estímulo com LPS. Essas propriedades foram igualmente observadas nos macrófagos M1.

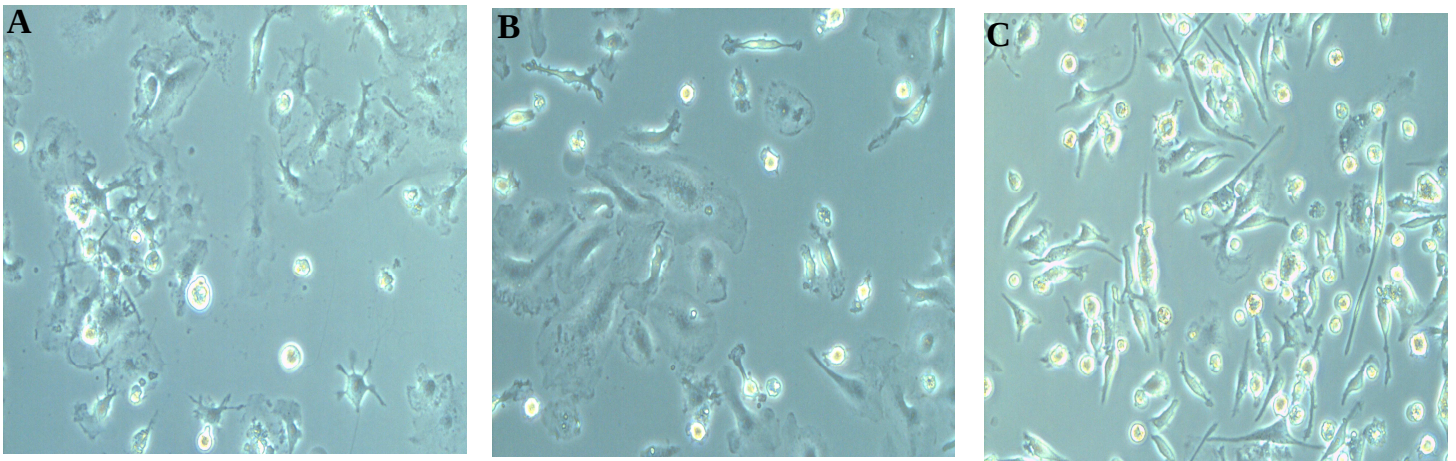


FIGURA 9. A eferocitose de neutrófilos induz o fenótipo M2b em BMDMs-B6. Micrografias de monocamadas de BMDMs-B6 pré-tratados com rmIFN- γ após 3 dias de tratamento com (A) meio; (B) rmIL-4 ou (C) neutrófilos apoptóticos. Aumento de 200 X.

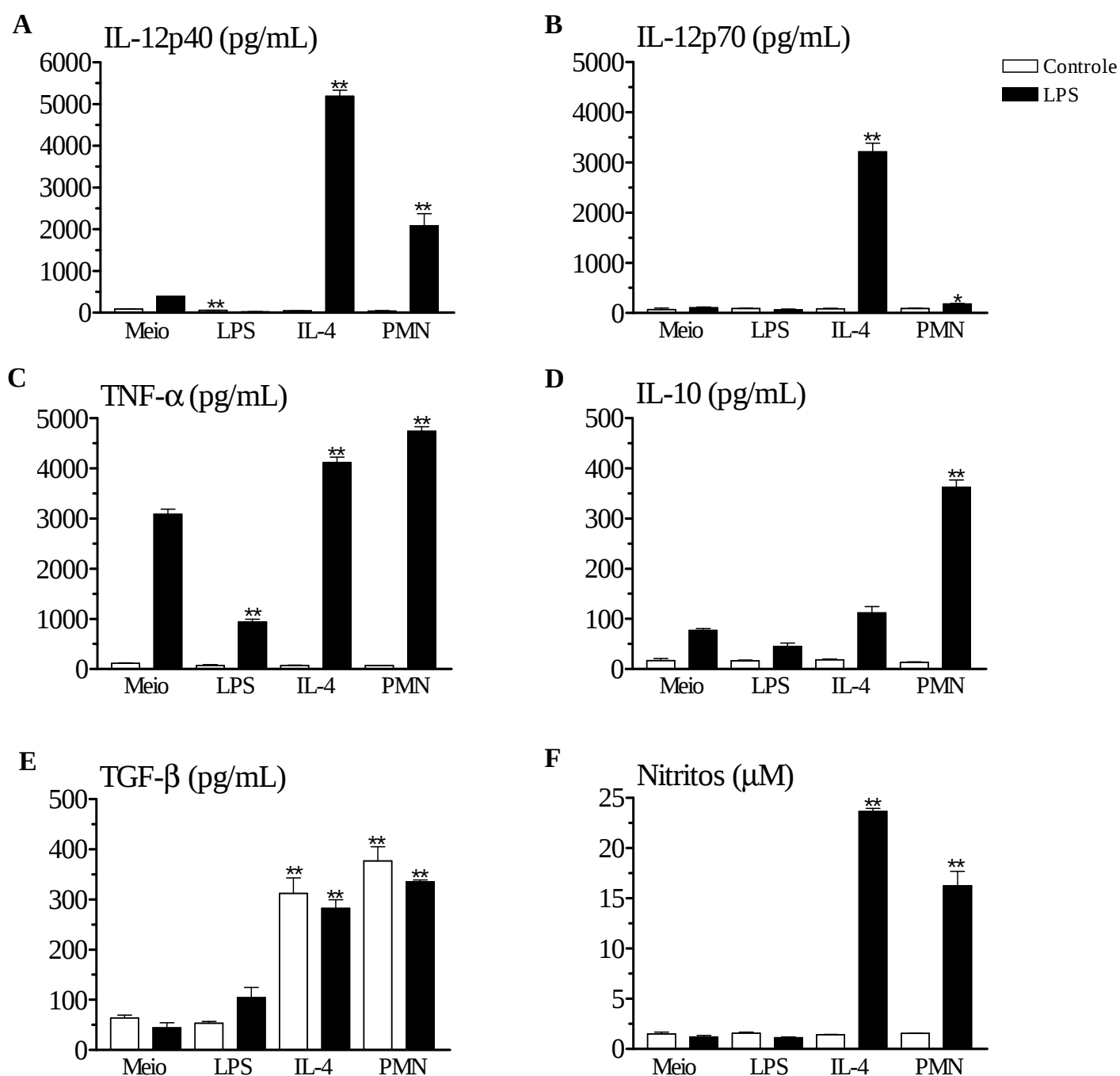


FIGURA 10. A eferocitose de neutrófilos induz o fenótipo M2b em BMDMs-B6. BMDMs-B6 foram pré-tratados com rmIFN- γ (0,5 ng/mL) e estimulados com meio, LPS (100 ng/mL), rmIL-4 (5 ng/mL) ou neutrófilos apoptóticos por 3 dias e desafiados com LPS (1 μ g/mL). Sobrenadantes foram coletados após 48 horas, centrifugados e testados para citocinas solúveis (**A**) IL-12p40, (**B**) IL-12p70, (**C**) TNF- α , (**E**) TGF- β , (**D**) IL-10 por ELISA tipo sanduíche e (**F**) nitritos. LPS-lipopolissacarídeo; PMN- neutrófilo apoptótico. ** p <0,01 ou * p <0,05 comparado com meio ou meio em presença de LPS. Dados representativos de pelo menos, três experimentos independentes.

Dados publicados por RIBEIRO-GOMES e colaboradores (2004) mostraram que, diferente da resposta gerada em camundongos B6, a fagocitose de neutrófilos apoptóticos induz uma resposta anti-inflamatória em macrófagos de camundongos BALB/c. Estabelecendo o mesmo protocolo utilizado para os BMDMs-B6, objetivamos investigar os efeitos tardios da fagocitose de neutrófilos apoptóticos singênicos em BMDMs-BALB.

Como mostrado na **Figura 11**, de forma similar aos BMDMs-B6, a estimulação de BMDMs-BALB com rmIL-4 também foi capaz de induzir um fenótipo M1 após desafio com LPS, caracterizado pelo aumento da secreção de IL-12p40 (**Figura 11A**), IL-12p70 (**Figura 11B**) e nitritos (**Figura 11F**) e baixa secreção de IL-10 (**Figura 11D**). O contato com neutrófilos apoptóticos não foi capaz de induzir o fenótipo polarizado M2b em BMDMs-BALB, já que essas células, quando desafiadas com LPS, secretaram IL-12p40, IL-12p70 e IL-10 de maneira similar aos BMDMs-controle, apenas cultivados com meio. Não foi possível observar diferenças na secreção de TNF- α (**Figura 11C**) entre os BMDMs-BALB-controle e os M1 ou os BMDMs tratados com neutrófilos apoptóticos. Por outro lado, eferocitose de neutrófilos induziu um aumento de TGF- β constitutivo e induzido por LPS, igualmente observado nas células M1.

A **Figura 12** sumariza duas das principais características apresentadas por macrófagos M2b. Observamos que BMDMs-B6 que interagiram com neutrófilos apoptóticos foram capazes de secretar elevadas concentrações de IL-10 e nitritos em comparação aos controles, o que não foi observado em BMDMs-BALB. Esses dados sugerem que o fenótipo M2b foi induzido em decorrência da eferocitose de neutrófilos de B6 por BMDMs-B6, mas não por BMDMs-BALB.

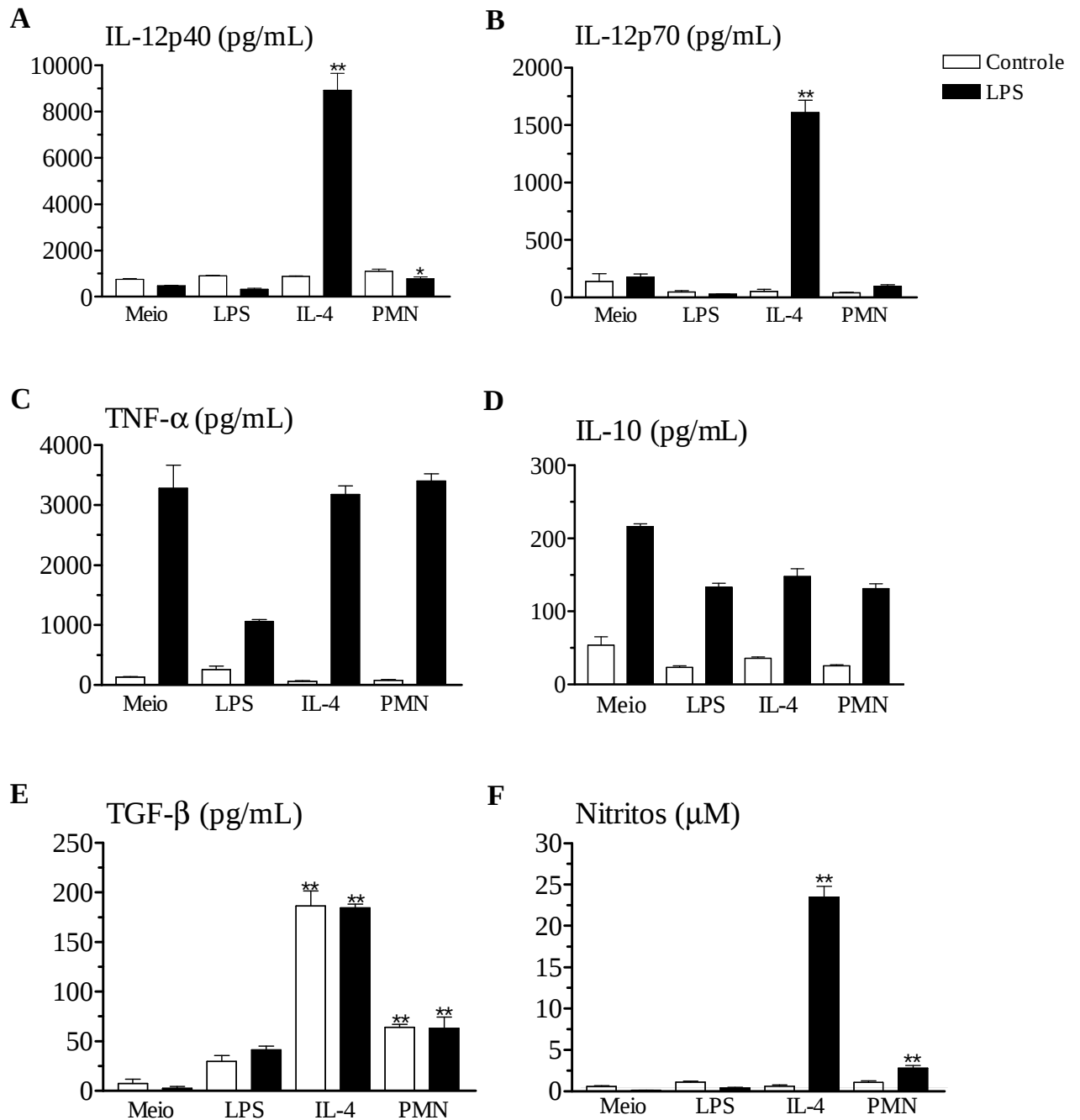


FIGURA 11. A eferocitose de neutrófilos não induz o fenótipo M2b em BMDMs-BALB. BMDMs-BALB foram pré-tratados com rmIFN- γ (0,5 ng/mL) e estimulados com meio, LPS (100 ng/mL), rmIL-4 (5 ng/mL) ou neutrófilos apoptóticos por 3 dias e desafiados com LPS (1 μ g/mL). Sobrenadantes foram coletados após 48 horas, centrifugados e testados para citocinas solúveis (A) IL-12p40, (B) IL-12p70, (C) TNF- α , (E) TGF- β , (D) IL-10 por ELISA tipo sanduíche e (F) nitritos. LPS-lipopolissacarídeo; PMN- neutrófilo apoptótico. ** $p < 0,01$ ou * $p < 0,05$ comparado com meio ou meio em presença de LPS. Dados representativos de pelo menos, três experimentos independentes.

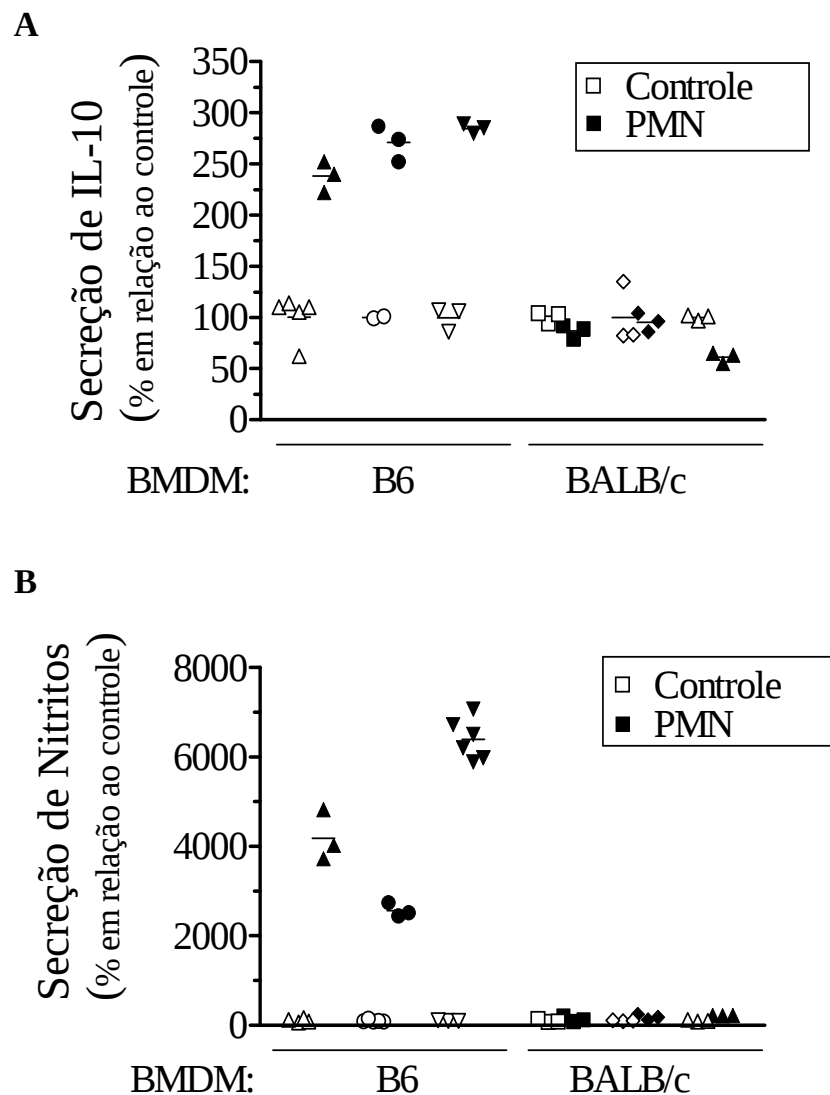


FIGURA 12. A eferocitose de neutrófilos induz o fenótipo secretor de IL-10 e nitritos em BMDMs-B6, mas não em BMDMs-BALB. BMDMs-B6 ou BMDMs-BALB foram pré-tratados com rmIFN- γ (0,5 ng/mL) e estimulados com meio ou neutrófilos apoptóticos por 3 dias e desafiados com LPS (1 μ g/mL). Sobrenadantes foram coletados após 48 horas, centrifugados e testados para a citocina solúvel (A) IL-10 por ELISA tipo sanduíche e para (B) nitritos. LPS-lipopolissacarídeo; PMN- neutrófilo apoptótico. Símbolos vazados (□) representam os controles e símbolos cheios (■) representam os BMDMs tratados com neutrófilos apoptóticos. Dados de três experimentos independentes, onde cada símbolo representa uma triplicada de um experimento isolado.

Também foi possível verificar que a fagocitose de neutrófilos apoptóticos foi capaz de induzir um fenótipo secretor de IL-10 em BMDMs-B6, mas não em BMDMs-BALB, até mesmo na ausência do pré-tratamento dessas células com rmIFN- γ (**Figura 13**).

7. A DIFERENCIAÇÃO DE MACRÓFAGOS M2b NÃO É INDUZIDA PELA FAGOCITOSE DE PARTÍCULAS INERTES

Para verificar o efeito da fagocitose na indução do programa M2b em BMDMs, testamos se a ingestão de partículas inertes, como partículas de látex era capaz de polarizar os BMDMs-B6 (**Figura 14**). Verificamos que os BMDMs-B6 foram capazes de fagocitar prontamente as partículas de látex. De acordo com padrão de secreção de citocinas e nitritos, observamos que a fagocitose de partículas de látex não induziu a secreção de IL-10 (**Figura 14C**) ou nitritos (**Figura 14D**) por BMDMs-B6 pré-tratados com rmIFN- γ , enquanto que a interação com neutrófilos apoptóticos induziu o perfil M2b (**Figura 10**). Estes dados sugerem que a atividade fagocítica apenas, não é capaz de induzir o fenótipo M2b.

8. A INDUÇÃO DO FENÓTIPO M2b É PARCIALMENTE DEPENDENTE DO CONTATO ENTRE MACRÓFAGOS E NEUTRÓFILOS APOPTÓTICOS

Para determinar se o contato celular direto entre neutrófilos apoptóticos e BMDMs-B6 é necessário para a indução do fenótipo M2b, utilizamos um sistema onde os macrófagos pré-tratados com rmIFN- γ foram co-cultivados com os neutrófilos apoptóticos separados ou não por uma membrana com um diâmetro de poro de 0,2 μm . Durante os 3 dias de co-cultura, a membrana esteve presente em todo o sistema, inclusive nos poços onde os BMDMs-B6 e os neutrófilos mantiveram contato direto, com o objetivo de eliminar possíveis interferências da presença da membrana na cultura.

Como mostrado na **Figura 15**, o desafio com LPS revelou que a capacidade de regular a secreção de IL-12p40 (**Figura 15A**) e IL-10 (**Figura 15B**) não é dependente de contato prévio entre neutrófilos e BMDMs-B6, enquanto que a capacidade de secretar TGF- β (**Figura 15C**) e nitritos (**Figura 15D**) é estritamente dependente do contato entre essas células. Os resultados sugerem que a diferenciação M2b depende tanto de fatores solúveis liberados, como do contato com os neutrófilos apoptóticos.

9. MACRÓFAGOS M2b INDUZIDOS PELA FAGOCITOSE DE NEUTRÓFILOS APOPTÓTICOS INDUZEM UMA RESPOSTA DE CÉLULAS TCD4⁺ DO TIPO Th2

Macrófagos M2b são capazes de induzir a diferenciação de células Th2 (ANDERSON & MOSSER, 2002a; EDWARDS *et al.*, 2006). Para investigar se o fenótipo M2b, gerado pela fagocitose de neutrófilos apoptóticos, é capaz de favorecer respostas Th1 ou Th2, BMDMs-B6 foram pré-tratados com rmIFN- γ , estimulados com meio ou neutrófilos apoptóticos, e após período de 3 dias, lavados e co-cultivados com células T CD4⁺ alogênicas, altamente purificadas, juntamente com rmIL-2. Após 7 dias, as células T CD4⁺ foram re-estimuladas com anticorpo anti-CD3, imobilizado. A secreção das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 foi avaliada por ELISA (**Figura 16**). Células TCD4⁺ que foram co-cultivadas com BMDMs-B6 que fagocitaram neutrófilos apoptóticos apresentaram um perfil de secreção de citocinas enviesado para o perfil Th2, se comparados com as células TCD4⁺ incubadas com BMDMs-B6-controle, uma vez que observa-se um aumento de 3,2 vezes na secreção de IL-4 (**Figura 16A**), 3,5 vezes na secreção de IL-10 (**Figura 16B**), e apenas 1,4 vezes na secreção de IFN- γ (**Figura 16C**). Os dados sugerem que a interação com neutrófilos apoptóticos induziu um fenótipo que favorece respostas Th2.

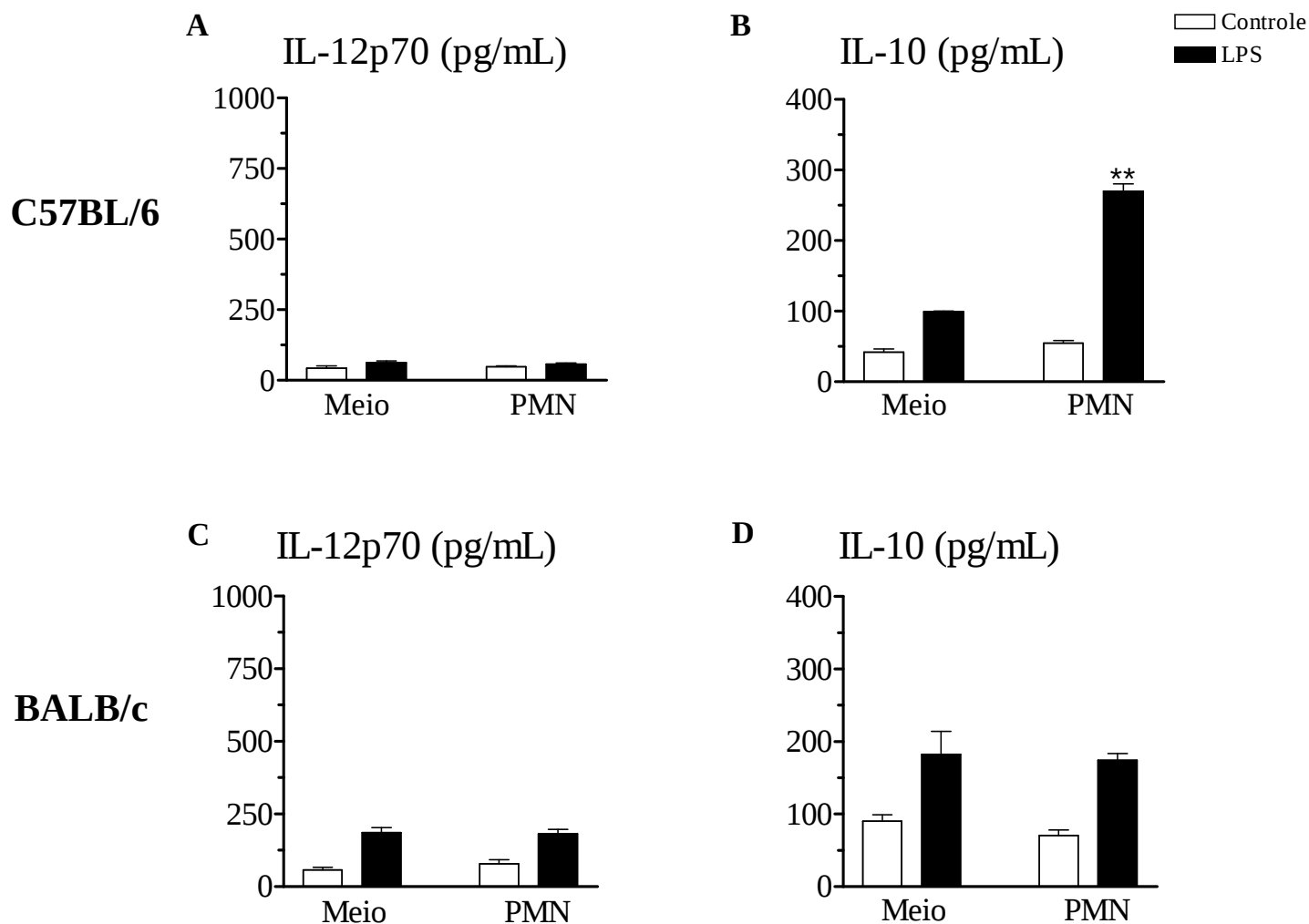


FIGURA 13. A fagocitose de neutrófilos apoptóticos induz o fenótipo secretor de IL-10 em BMDMs-B6 independentemente do tratamento com $\text{rmIFN-}\gamma$. (A e B) BMDMs-B6 ou (C e D) BMDMs-BALB foram estimulados com meio ou neutrófilos apoptóticos por 3 dias e desafiados com LPS ($1\mu\text{g/mL}$). Sobrenadantes foram coletados após 48 horas, centrifugados e testados para citocinas solúveis por ELISA tipo sanduíche. LPS- lipopolissacarídeo; PMN- neutrófilo apoptótico. ** $p<0,01$ comparado com meio em presença de LPS. Dados representativos de pelo menos, três experimentos independentes.

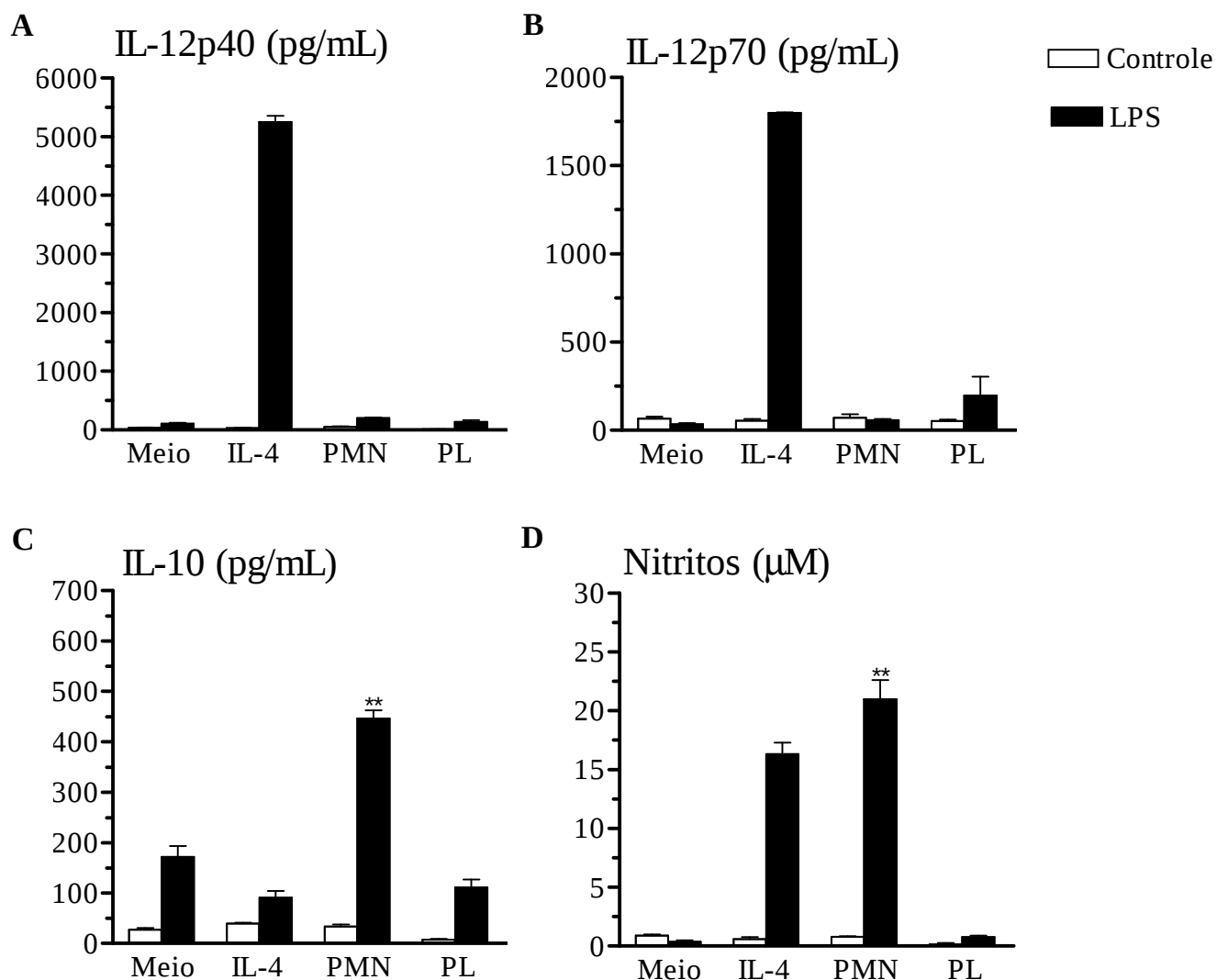


FIGURA 14. O fenótipo M2b não é induzido pela fagocitose de partículas de látex por BMDMs-B6. BMDMs-B6 foram pré-tratados com rmIFN- γ (0,5 ng/mL) e estimulados com meio, rmIL-4 (5 ng/mL), neutrófilos apoptóticos ou partículas de látex por 3 dias e desafiados com LPS (1 μ g/mL). Sobrenadantes foram coletados após 48 horas, centrifugados e testados para as citocinas solúveis (A) IL-12p40, (B) IL-12p70 e (C) IL-10 por ELISA tipo sanduíche e para (D) nitritos. LPS-lipopolissacarídeo; PMN- neutrófilo apoptótico; PL-partículas de látex. ** $p < 0,01$ comparado com meio em presença de LPS. Dados representativos de pelo menos, três experimentos independentes.

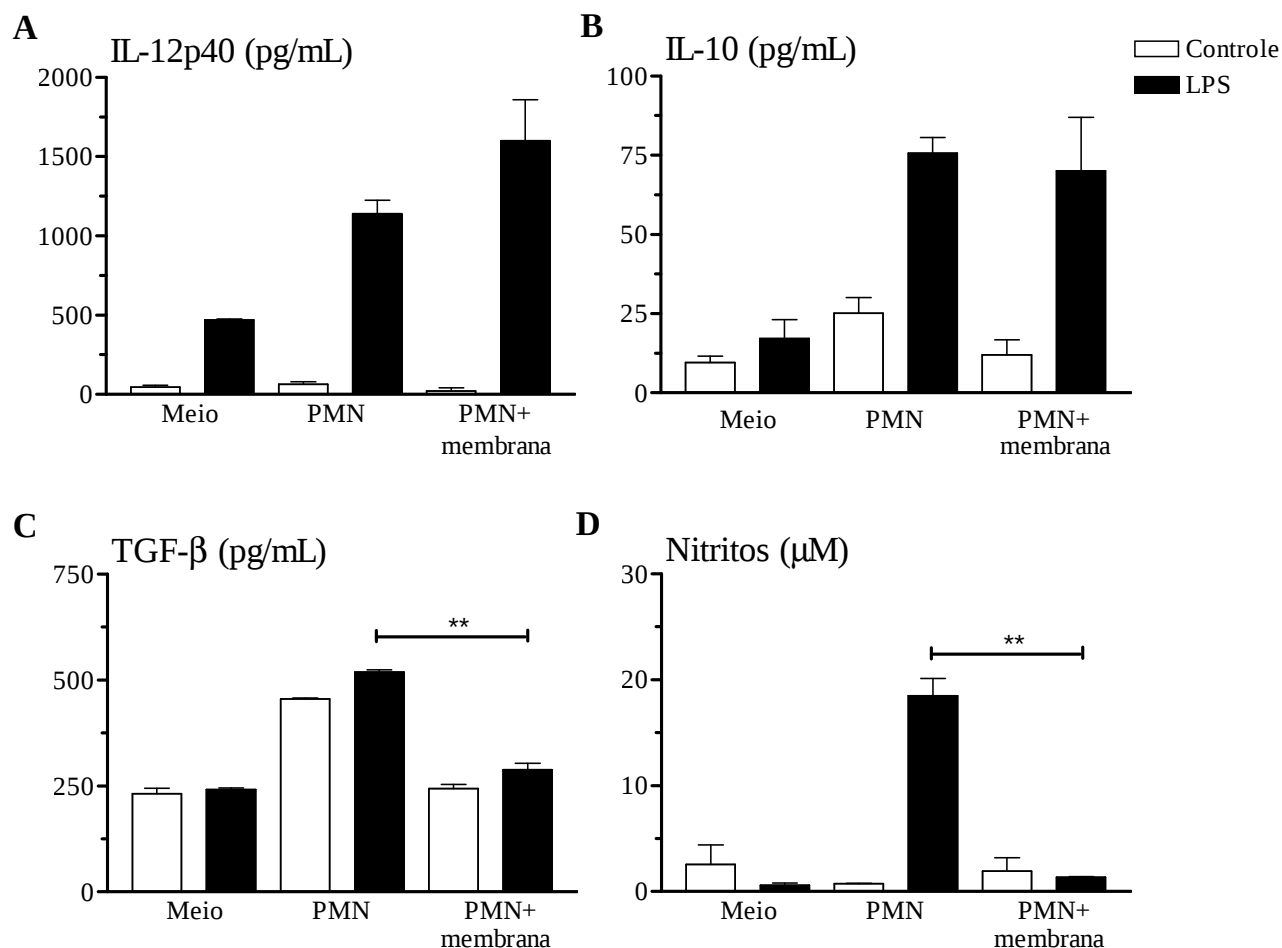


FIGURA 15. A geração do fenótipo M2b é parcialmente dependente de contato entre os neutrófilos apoptóticos e BMDMs-B6. BMDMs-B6 foram pré-tratados com $\text{rmIFN-}\gamma$ (0,5 ng/mL) e estimulados com meio ou neutrófilos apoptóticos por 3 dias, separados ou não por uma membrana impermeável à células e subsequentemente desafiados com LPS (1μg/mL). Sobrenadantes foram coletados após 48 horas, centrifugados e testados para as citocinas solúveis (A) IL-12p40, (B) IL-10 e (C) TGF-β por ELISA tipo sanduíche e para (D) nitritos. LPS-lipopolissacarídeo; PMN- neutrófilo apoptótico. ** $p < 0,01$ comparado com meio em presença de LPS. Dados representativos de pelo menos, três experimentos independentes.

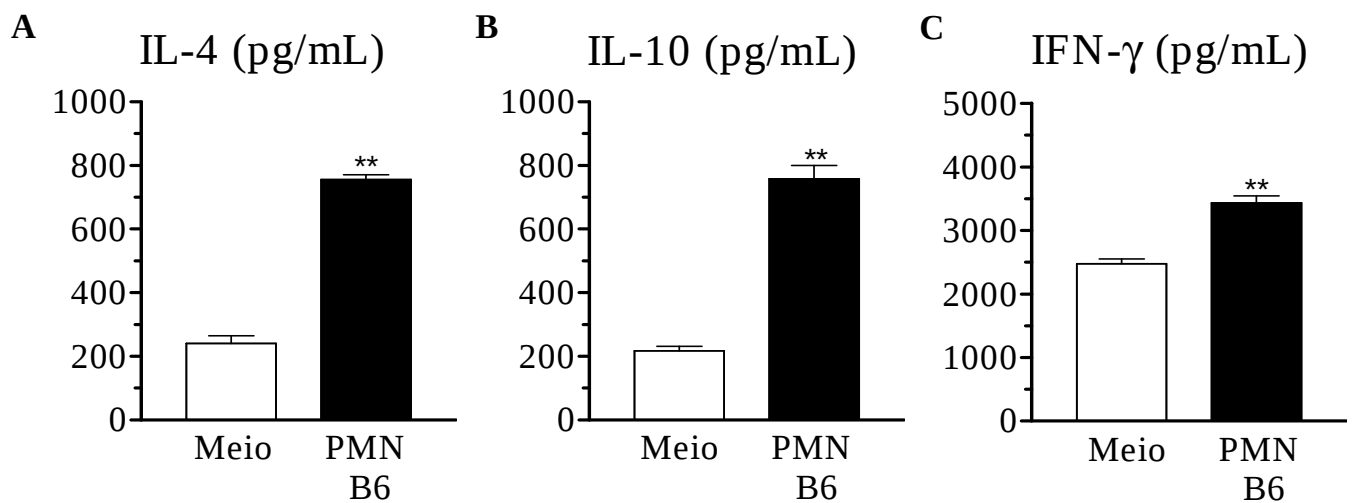


FIGURA 16. BMDMs-B6 que fagocitaram neutrófilos favorecem uma resposta Th2. BMDMs-B6 foram pré-tratados com rmIFN- γ (0,5 ng/mL) e estimulados com meio ou neutrófilos apoptóticos. Após 3 dias, BMDMs-B6 foram co-cultivados com células TCD4⁺ de animais BALB/c em presença de rmIL-2. Após 7 dias de interação, as células TCD4⁺ foram recuperadas e estimuladas com anti-CD3 por 48 horas. Sobrenadantes foram coletados, centrifugados e testados para as citocinas solúveis (**A**) IL-4, (**B**) IL-10 e (**C**) IFN- γ por ELISA tipo sanduíche. PMN- neutrófilo apoptótico. ** $p < 0,01$ comparado com meio. Dados representativos de pelo menos, três experimentos independentes.

10. MACRÓFAGOS M2b INDUZIDOS PELA FAGOCITOSE DE NEUTRÓFILOS APOPTÓTICOS EXPRESSAM NÍVEIS AUMENTADOS DE LIGHT/TNFSF14 E SPHK-1

Macrófagos M2b expressam preferencialmente LIGHT/TNFSF14 e SPHK-1 como marcadores de diferenciação (EDWARDS *et al.*, 2006; MOSSER & EDWARDS, 2008). Para investigar se a fagocitose de neutrófilos apoptóticos é capaz de induzir a expressão desses marcadores, BMDMs-B6 pré-tratados com rmIFN- γ foram cultivados sob diferentes condições, e testados para a expressão de LIGHT e SPHK-1 pela técnica de ELISA celular. Os dados apresentados na **Figura 17** mostram que a expressão de LIGHT (**Figura 17A**) e SPHK-1 (**Figura 17B**) foi significativamente aumentada em BMDMs-B6 que fagocitaram neutrófilos apoptóticos de B6. Similar ao controle com meio, BMDMs-B6 cultivados com rmIL-4 ou neutrófilos apoptóticos de BALB/c apresentaram baixa expressão de LIGHT e SPHK-1.

11. IL-10 E TNF- α APRESENTAM AÇÕES OPOSTAS E DISCRETAS NA INDUÇÃO DO FENÓTIPO M2b

Curiosamente, observamos que na presença de estímulo prévio com rmIFN- γ , o contato com neutrófilos apoptóticos, mas não com rmIL-4, induziu um aumento na produção de TNF- α e também de IL-10 por BMDMs-B6 após 3 dias de cultura, mesmo na ausência do desafio por LPS (**Figura 18**). Para investigar se a secreção de TNF- α ou IL-10 tem algum papel na indução do fenótipo M2b, BMDMs-B6 foram estimulados com neutrófilos apoptóticos singênicos em presença ou não de anticorpos monoclonais neutralizantes anti-IL-10 (**Figura 19**) ou anti-TNF- α (**Figura 20**).

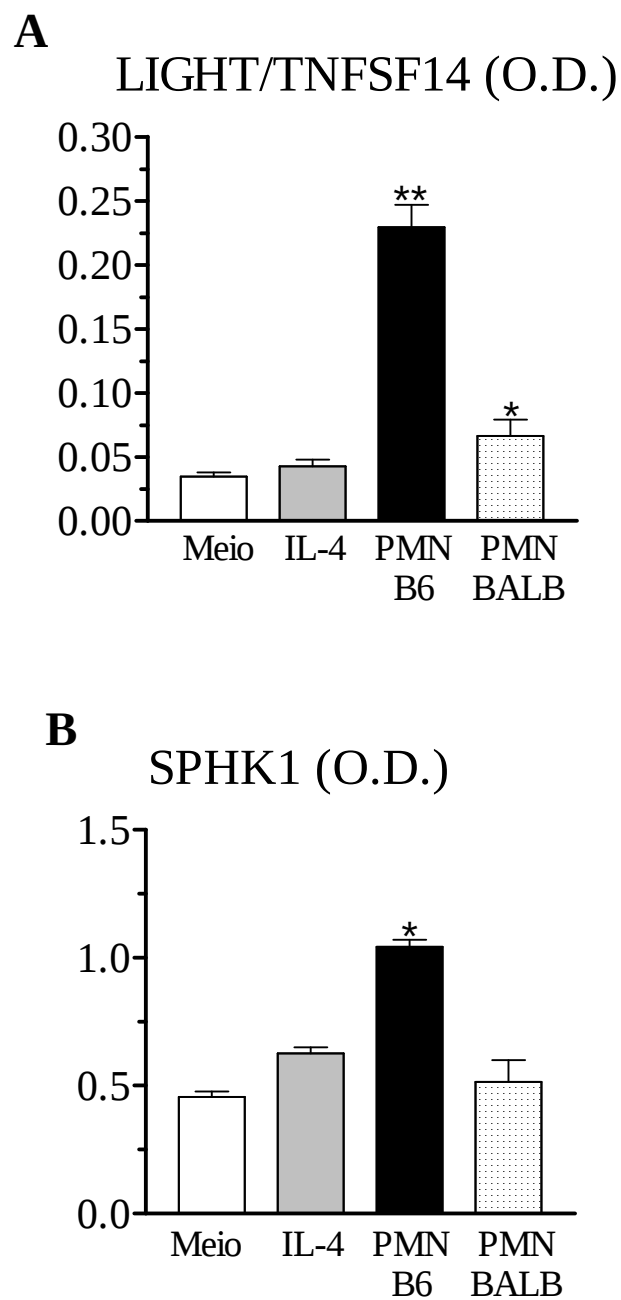


FIGURA 17. A eferocitose de neutrófilos aumenta a expressão de marcadores de células M2b em BMDMs-B6. BMDMs-B6 foram pré-tratados com rmIFN- γ (0,5 ng/mL) e estimulados com meio, IL-4 (5 ng/mL) ou neutrófilos apoptóticos de B6 ou BALB/c por 3 dias. A expressão de **(A)** LIGHT e **(B)** SPHK1 foi verificada por ELISA celular. LPS-lipopolissacarídeo; PMN- neutrófilo apoptótico; SPHK1-esfingosina quinase 1. ** $p < 0,01$ ou * $p < 0,05$ comparado com meio. Dados representativos de pelo menos, três experimentos independentes.

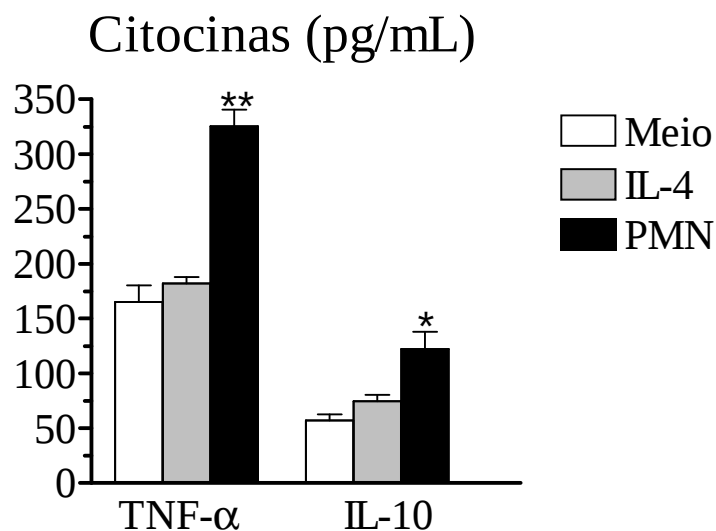


FIGURA 18. O contato com neutrófilos apoptóticos na presença de rmIFN- γ induz a produção de TNF- α e IL-10. BMDMs-B6 foram tratados com rmIFN- γ (0,5 ng/mL) e estimulados com meio, rmIL-4 (5 ng/mL) ou neutrófilos apoptóticos. Sobrenadantes foram coletados após 3 dias, centrifugados e testados para citocinas solúveis por ELISA tipo sanduíche. LPS-lipopolissacarídeo; PMN- neutrófilo apoptótico. ** $p < 0,01$ ou * $p < 0,05$ comparado com meio. Dados representativos de pelo menos, três experimentos independentes.

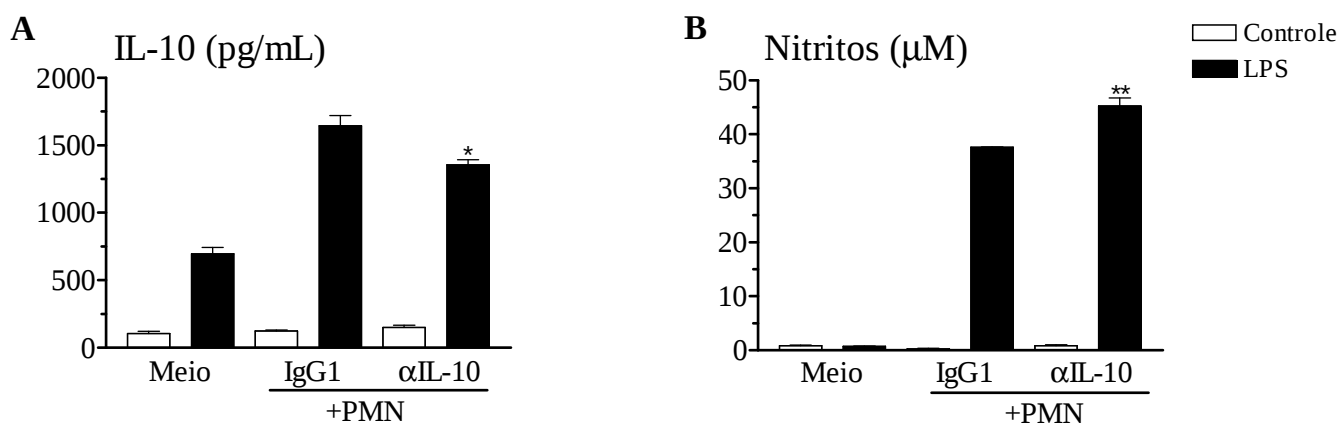


FIGURA 19. A IL-10 modula parcialmente o fenótipo M2b. BMDMs-B6 foram tratados com rmIFN- γ (0,5 ng/mL) e estimulados com meio ou neutrófilos apoptóticos em presença de anticorpos monoclonais anti-IL10 ou seu isotipo por 3 dias e desafiados com LPS (1 μ g/mL). Sobrenadantes foram coletados após 48 horas, centrifugados e testados para a citocina solúvel (**A**) IL-10 e por ELISA tipo sanduíche e para (**B**) nitritos. LPS- lipopolissacarídeo; PMN- neutrófilo apoptótico. ** $p < 0,01$ ou * $p < 0,05$ comparado com o isotipo controle em presença de LPS. Dados representativos de pelo menos, três experimentos independentes.

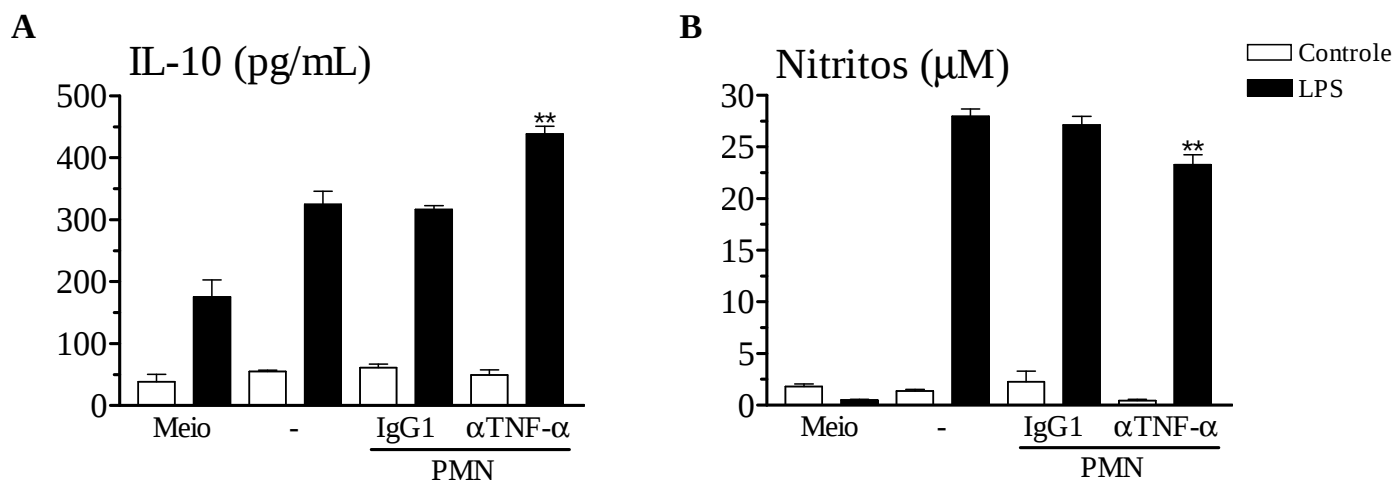


FIGURA 20. O TNF- α modula parcialmente a geração do fenótipo M2b. BMDMs-B6 foram tratados com rmIFN- γ (0,5 ng/mL) e estimulados com meio ou neutrófilos apoptóticos em presença de anticorpos monoclonais anti-TNF- α por 3 dias e desafiados com LPS (1 μ g/mL). Sobrenadantes foram coletados após 48 horas, centrifugados e testados para a citocina solúvel (A) IL-10 por ELISA tipo sanduíche e para (B) nitritos. LPS- lipopolissacarídeo; PMN- neutrófilo apoptótico. ** p <0,01 comparado com o isotipo controle em presença de LPS. Dados representativos de pelo menos, três experimentos independentes.

Os dados expostos na **Figura 19** mostram que a neutralização de IL-10 foi capaz de reduzir parcialmente a secreção de IL-10 (**Figura 19B**) e aumentar a secreção de nitritos (**Figura 19B**) após desafio com LPS, se comparado com o seu isotipo controle. Por outro lado, a neutralização de TNF- α (**Figura 20**) aumentou parcialmente a secreção de IL-10 (**Figura 20A**) e reduziu a secreção de nitritos (**Figura 20B**) após desafio com LPS. Os dados sugerem que, apesar de discretas, a IL-10 e o TNF- α exercem funções modulatórias opostas na indução do fenótipo M2b.

12. O FENÓTIPO M2b É BLOQUEADO PELO INIBIDOR DE NE E PARCIALMENTE POR ANTICORPO ANTI-TLR4

A fagocitose de neutrófilos apoptóticos induz uma resposta pró-inflamatória em macrófagos de B6, resultando na morte de *L. major* por um mecanismo que necessita da atividade de NE e sinalização via TLR4 (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004; 2007). Para investigar o papel da atividade de NE na indução do fenótipo M2b, BMDMs-B6 foram pré-tratados com rmIFN- γ e cultivados por 3 dias com meio ou com neutrófilos apoptóticos em presença do peptídeo inibidor de NE (MeOSuc-AAPV-cmk) ou em presença de um peptídeo controle, inibidor de collagenase (Z-Pro-D-Leu-D-Ala-NHOH); e posteriormente desafiados com LPS. Os dados apresentados na **Figura 21** mostram que o tratamento com o inibidor de NE, mas não com o inibidor controle, reduziu significativamente a capacidade de BMDMs-B6 de diferenciar para o fenótipo M2b, como evidenciado pela secreção de IL-10 (**Figura 21A**) e nitritos (**Figura 21B**).

Vários estudos têm sugerido que a NE é capaz de exercer efeitos pró-inflamatórios através da interação direta com TLR4 (DEVANEY *et al.*, 2003; RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2007) ou indiretamente através da clivagem de proteínas de matriz, que por sua vez podem funcionar como ligantes endógenos de TLR4 (JOHNSON *et al.*, 2002; JIANG *et al.*, 2005).

Para avaliar a participação de TLR4 na indução do fenótipo M2b, BMDMs-B6 foram pré-tratados com rmIFN- γ e posteriormente estimulados com neutrófilos apoptóticos em presença ou não de anticorpos monoclonais neutralizantes anti-TLR4 ou seu isotipo controle (**Figura 22**). Os dados apresentados mostram que o bloqueio da sinalização via TLR4 inibiu parcialmente, a diferenciação de BMDMs-B6 em M2b, pois ocorreu marcante redução da secreção de IL-10 (**Figura 22B**) nos macrófagos que fagocitaram neutrófilos apoptóticos, se comparados ao seu isotipo controle. Curiosamente, a secreção de nitritos não foi afetada pela neutralização de TLR4. Em conjunto, os dados sugerem que a NE exerce um efeito importante na diferenciação M2b, e que a sinalização via TLR4 está parcialmente envolvida neste processo.

13. MACRÓFAGOS M2b INDUZIDOS PELA FAGOCITOSE DE NEUTRÓFILOS APOPTÓTICOS SÃO PERMISSIVOS A REPLICAÇÃO POR *LEISHMANIA*

A fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos peritoneais, derivados de camundongos B6 infectados com *L. major* induz atividade microbicida nessas células (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004). Com o objetivo de investigar o que ocorre após a diferenciação M2b, verificamos o efeito agudo e tardio da fagocitose de neutrófilos apoptóticos na função microbicida de BMDMs-B6.

Na infecção aguda (**Figura 23A**), os macrófagos foram pré-tratados com rmIFN- γ , infectados com *L. major* e cultivados com meio, LPS, rmIL-4 ou neutrófilos apoptóticos. Após 3 dias, a carga parasitária foi avaliada. BMDMs-B6 cultivados com LPS, rmIL-4 ou com neutrófilos apoptóticos foram capazes de eliminar os parasitas *L. major* (**Figura 23A**), confirmando resultados anteriores (BODGAN *et al.*, 1991; RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004).

Ao mesmo tempo, investigamos o efeito da diferenciação de BMDMs-B6 na eliminação parasitária (**Figura 23B**). BMDMs-B6 pré-tratados com rmIFN- γ foram cultivados com meio, LPS, rmIL-4 ou neutrófilos apoptóticos por 3 dias e então infectados com *L. major*, e reincubados por mais 3 dias adicionais. Verificamos que os BMDMs-B6 estimulados com LPS não foram capazes controlar a replicação intracelular de *L. major*, corroborando a ocorrência da tolerância à endotoxina, observada anteriormente através da secreção de citocinas e nitritos. A incubação prévia com rmIL-4 induziu um estado microbicida estável nos macrófagos, evidenciado pela morte de *L. major*. Entretanto, a cultura com neutrófilos apoptóticos por 3 dias, o que promove a diferenciação de células M2b, induziu um estado permissivo nos macrófagos mostrado pelo aumento da replicação intracelular de *L. major* (**Figura 23B**).

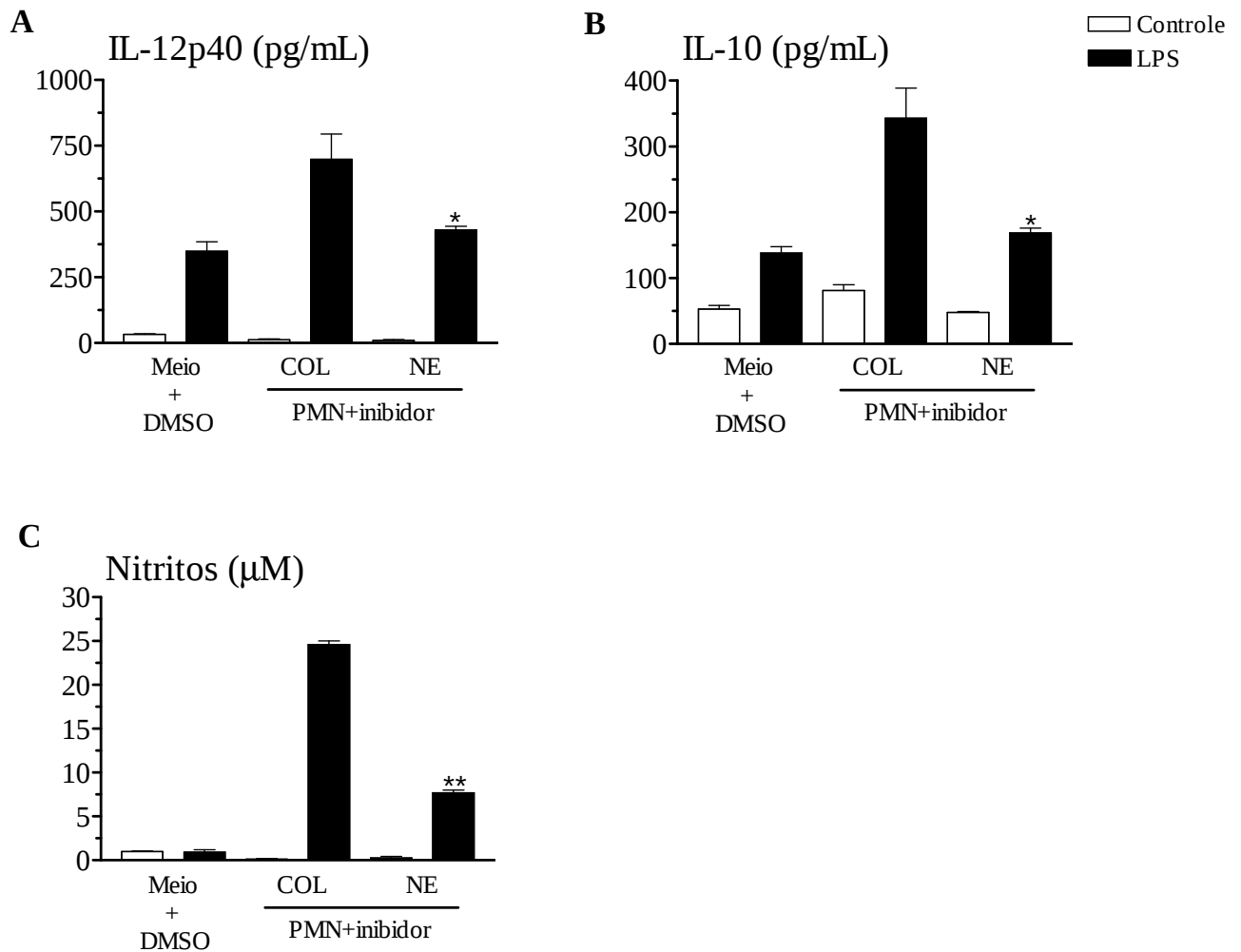


FIGURA 21. A indução do fenótipo M2b em BMDMs-B6 necessita da atividade de NE. BMDMs-B6 foram tratados com rmIFN- γ (0,5 ng/mL) e estimulados com meio ou neutrófilos apoptóticos em presença de solvente para inibidores de proteases, DMSO ou com neutrófilos apoptóticos na presença de inibidor de collagenase Z-Pro-D-Leu-D-Ala-NHOH (COL) ou inibidor de elastase MeOSuc-AAPV-cmk (NE), ambos a 10 μ g/mL. As citocinas (A) IL-12p40 e (C) IL-10 e (C) nitritos secretados foram avaliadas após 3 dias com os estímulos e desafio com LPS (1 μ g/mL). LPS-lipopolissacarídeo; PMN- neutrófilo apoptótico; DMSO-dimetilsulfoxido. ** $p < 0,01$ ou * $p < 0,05$ comparado com PMN em presença de inibidor de COL+LPS. Dados representativos de pelo menos, três experimentos independentes.

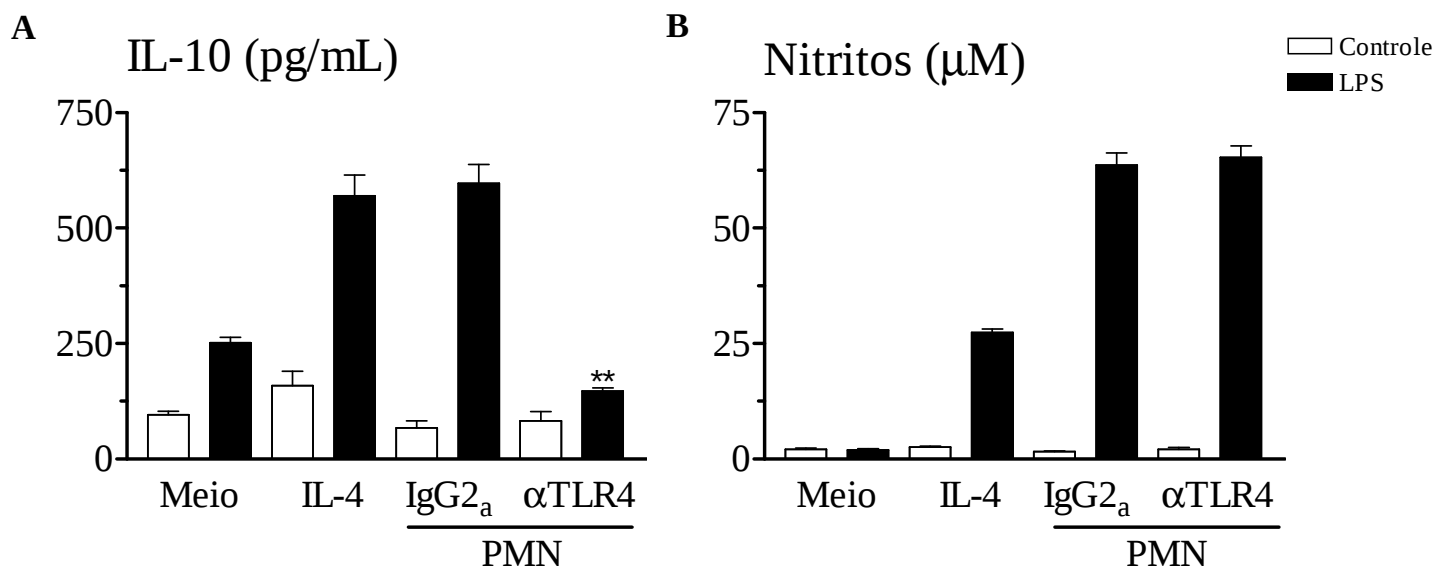


FIGURA 22. O bloqueio de TLR4 inibe a secreção de IL-10 em BMDMs-B6 que fagocitaram neutrófilos apoptóticos. BMDMs-B6 foram tratados com rmIFN- γ (0,5 ng/mL) e estimulados com meio ou neutrófilos apoptóticos em presença de anticorpos monoclonais anti-TLR4 por 3 dias e desafiados com LPS (1 μ g/mL). Sobrenadantes foram coletados após 48 horas, centrifugados e testados para a citocina solúvel (A) IL-10 por ELISA tipo sanduíche e para (B) nitritos. LPS-lipopolissacarídeo; PMN- neutrófilo apoptótico. ** $p < 0,01$ comparado com o isotipo controle em presença de LPS. Dados representativos de pelo menos, três experimentos independentes.

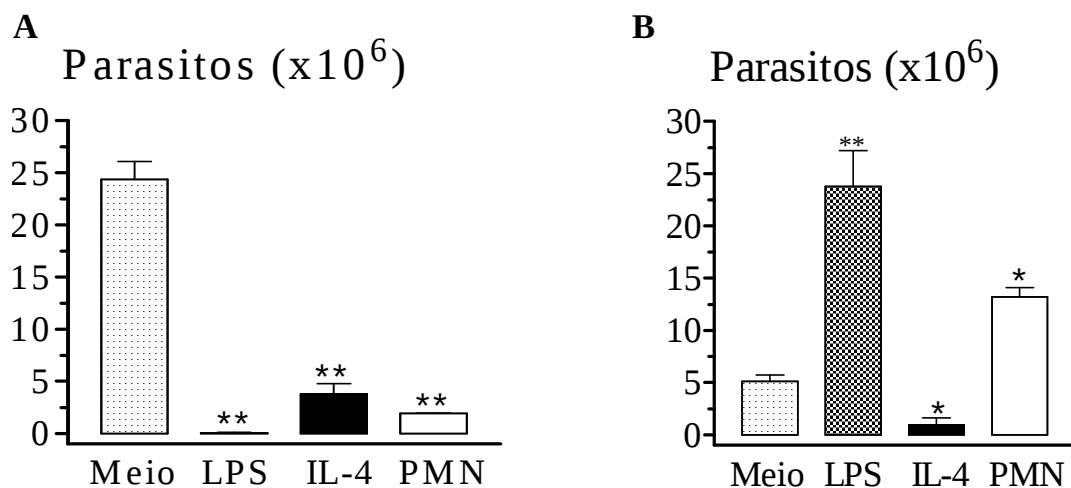


FIGURA 23. O fenótipo M2b gerado em BMDMs-B6 após 3 dias da fagocitose de neutrófilos apoptóticos não é capaz de controlar o crescimento parasitário intramacrofágico de *L. major*. BMDMs-B6 foram pré-tratados com rmIFN- γ (0,5 ng/mL) e (A) infectados com formas promastigotas de *L. major* por 4 horas e então submetidos aos tratamentos com meio, LPS, rmIL-4 ou neutrófilos apoptóticos singênicos por 3 dias ou (B) submetidos aos tratamentos com meio, LPS, rmIL-4 ou neutrófilos apoptóticos singênicos por 3 dias e então infectados com formas promastigotas de *L. major* por 4 horas. Após a infecção, os macrófagos foram cultivados por mais 3 dias adicionais e a carga parasitária foi medida após aproximadamente 7 dias em cultura, pela produção de promastigotas extracelulares em meio Schneider's. LPS-lipopolissacarídeo; PMN- neutrófilo apoptótico. ** $p < 0,01$ ou * $p < 0,05$ comparado com meio. Dados representativos de pelo menos, três experimentos independentes.

Discussão

É essencial que o balanço entre a ativação e desativação das respostas imunes seja mantido para permitir ao hospedeiro elaborar uma resposta eficiente contra potenciais patógenos, causando o mínimo de dano possível. No presente trabalho, nós mostramos que a eferocitose de neutrófilos é um importante mecanismo modulador do fenótipo e funções de DCs e macrófagos derivados de medula óssea. Os neutrófilos e seu conteúdo tóxico são importantes para os mecanismos de defesa do hospedeiro, mas também estão envolvidos no dano tecidual, em uma variedade de doenças infecciosas e/ou inflamatórias. Durante as respostas inflamatórias agudas, um grande número de neutrófilos é mobilizado e recrutado para os tecidos, onde sobrevivem por apenas um curto período de tempo, antes de entrarem em apoptose. Os neutrófilos apoptóticos são rapidamente removidos por DCs e macrófagos (NEWMAN *et al.*, 1982; SAVILL *et al.*, 1989; STEINMAN *et al.*, 2000; CLAYTON *et al.*, 2003). De uma maneira geral, a eferocitose de neutrófilos ou de outras células induz a liberação de citocinas anti-inflamatórias, o que favorece a resolução da resposta inflamatória (COX *et al.*, 1995; HUYNH *et al.*, 2002), assumindo um importante papel na regulação das respostas imunes (GALLUCCI *et al.*, 1999; SAUTER *et al.*, 2000; HART *et al.*, 2008) e nas infecções parasitárias intracelulares (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000; LOPES *et al.*, 2000; RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004).

Dados prévios publicados por nosso grupo demonstraram que dependendo da linhagem genética do hospedeiro, a eferocitose de neutrófilos por macrófagos poderia gerar respostas pró ou anti-inflamatórias, resultando em efeitos opostos na resposta subsequente do hospedeiro à infecção por *L. major*. Foi verificado que a co-cultura de macrófagos e

neutrófilos mortos proporcionou o controle do crescimento parasitário em macrófagos da linhagem B6, o que não ocorreu quando foram utilizadas células da linhagem BALB/c (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004). Para explicar as diferenças encontradas, foi sugerido que a maior liberação de NE pelos neutrófilos de B6 poderia ativar macrófagos, através de algum produto resultante de sua ação enzimática (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2007). Vale ressaltar que a neutralização de NE, bem como a de TNF- α , foi capaz de reverter o efeito da eferocitose de neutrófilos por macrófagos de B6 para o comportamento anti-inflamatório observado em células de BALB/c (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004).

A partir dos resultados obtidos com macrófagos, buscamos investigar se essa dicotomia da eferocitose de neutrófilos se aplicava também na imunidade adquirida utilizando BMDDCs, uma vez que as DCs ocupam uma posição central na imunidade, atuando como verdadeiras “pontes” entre o sistema imune inato e adaptativo. Além da capacidade de fagocitar células apoptóticas (RUBARTELLI *et al.*, 1997; SAUTER *et al.*, 2000; KUSHWAH *et al.*, 2009), as iDCs expressam uma coleção de TLRs, especialmente TLR4, capazes de regular o seu processo de maturação (FEARON & LOCKSLEY, 1996; SCHNARE *et al.*, 2001; EDWARDS *et al.*, 2003) e induzir respostas do tipo Th1 (BELLONE *et al.*, 1997; BARTON & MEDZHITOV, 2002). No presente estudo, investigamos as consequências imunológicas da remoção fagocítica de neutrófilos inflamatórios apoptóticos, no processo de maturação de BMDDCs derivadas de camundongos BALB/c ou B6, induzido por LPS. Nós observamos um bloqueio no aumento da expressão das moléculas de MHC-II e CD86 induzida por LPS, nas DCs que interagiram com neutrófilos apoptóticos. Além disso, a eferocitose de neutrófilos foi capaz inibir drasticamente a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-12p40 e IL-12p70, enquanto que aumentou a secreção de IL-10. Nossos dados estão de acordo com dados da literatura onde a fagocitose de neutrófilos apoptóticos

por iDCs também inibe o seu processo de maturação (STUART *et al.*, 2002; ALEMÁN *et al.*, 2007) e mostram ainda, que a eferocitose de neutrófilos é capaz de reverter a ativação em DCs provocada por LPS.

Nós também analisamos as consequências funcionais das mudanças fenotípicas observadas em iDCs estimuladas com LPS, que interagiram com neutrófilos apoptóticos e observamos que essa interação inibiu a capacidade dessas células em induzir a proliferação de linfócitos T alorreativos, o que também foi visto por outros autores (CLAYTON *et al.*, 2003; ALEMÁN *et al.*, 2007). Esta redução da capacidade co-estimulatória, provavelmente está relacionada com a redução da expressão de moléculas MHC-II e CD86, bem como com a produção de citocinas anti-inflamatórias observadas após o contato com células apoptóticas.

A IL-12 é uma citocina capaz de estimular e direcionar respostas imunes pró-inflamatórias mediadas por células. A inibição desta citocina tem sido correlacionada com a ligação de células apoptóticas a um grande número de receptores fagocíticos utilizados por macrófagos, incluindo alguns que são compartilhados por DCs (SUTTERWALA *et al.*, 1997; SUTTERWALA & MOSSER, 1999). A ingestão de células apoptóticas por iDCs envolve a participação do complexo CD36/integrina e $\alpha_v\beta_5$ /trombospondina, dependendo da subpopulação envolvida (RUBARTELLI *et al.*, 1997; ALBERT *et al.*, 1998a; ALBERT *et al.*, 1998b), o que culmina com a inibição da maturação de DCs humanas (URBAN *et al.*, 2001). Apesar desses estudos não esclarecerem se a internalização das células apoptóticas é necessária para inibir a maturação de iDCs, em concordância com dados da literatura (STUART *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2004; ALEMÁN *et al.*, 2007), nossos dados sugerem que é necessário o contato direto entre iDCs e neutrófilos apoptóticos para que haja a supressão da liberação de IL-12 estimulada por LPS, porém a secreção de IL-10 é parcialmente dependente de fatores solúveis liberados pela célula apoptótica. Outros estudos mostraram que as células

apoptóticas são capazes de secretar fatores solúveis como esfingosina-1-fosfato (WEIGERT *et al.*, 2007; WEIS *et al.*, 2009), TGF- β (CHEN *et al.*, 2001) e proteína quelante de cálcio (DELORENZO *et al.*, 2009), capazes de induzir uma resposta anti-inflamatória em fagócitos, representada pela inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento da liberação de IL-10, VEGF entre outros (CHEN *et al.*, 2001; WEIGERT *et al.*, 2007; DELORENZO *et al.*, 2009; WEIGERT *et al.*, 2009; WEIS *et al.*, 2009).

No presente trabalho, nós não observamos diferenças entre as respostas geradas pela eferocitose de neutrófilos de BALB/c ou B6 em iDCs, como anteriormente verificado em macrófagos (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2007). Em primeiro lugar, esta diferença poderia resultar da composição distinta de proteínas de matriz extracelular e glicosaminoglicanos de superfície celular em DCs e macrófagos (HAIDL & JEFFERIES, 1996; WEGROWSKI & MAQUART, 2006; TROTTEIN *et al.*, 2009). A consequência seria a liberação de diferentes produtos de clivagem pela NE em DCs, que eventualmente não seriam ligantes de TLR4, como ocorre em macrófagos (TERMEEER *et al.*, 2002). Em segundo lugar, foi relatado que a expressão de TLR4 em iDCs humanas é cerca de 10 vezes menor do que em macrófagos (VISINTIN *et al.*, 2001). Desta forma, apenas os macrófagos seriam capazes de responder às doses baixas e não tóxicas de NE que utilizamos ou que foram liberadas pelos neutrófilos.

Estes dados em conjunto ratificam que as DCs são células fundamentais no controle das respostas imunes adaptativas, e que sua ativação deve ser fortemente controlada para que não desencadeie respostas do tipo Th1 contra antígenos próprios e ao mesmo tempo garanta a ativação do sistema imune em situações infecciosas e/ou inflamatórias. Nesse sentido, a eferocitose de neutrófilos não representa um mecanismo imunologicamente inerte, mas sim um mecanismo que contribui para a regulação da maturação de DCs, fornecendo uma

supressão de resposta a auto-antígenos derivados de células apoptóticas e manutenção da tolerância ao próprio.

Macrófagos e DCs derivados de medula óssea são originados a partir de precursores mielóides e compartilham muitas características, enquanto mantém diferenças sutis nas respostas e funções efectoras. Estudos prévios sugerem que a eferocitose induz um fenótipo alternativo de ativação nos macrófagos (RAES *et al.*, 2007; BENOIT *et al.*, 2008), aumentando a quantidade de arginase (JOHANN *et al.*, 2007), ODC (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000) e TGF- β (FADOK *et al.*, 1998; FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000; RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004; SILVA, 2010) e diminuindo sua capacidade de produzir NO (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000; RAES *et al.*, 2007) e de secretar citocinas pró-inflamatórias como IL-12 (VOLL *et al.*, 1997) e TNF- α (FADOK *et al.*, 1998). No entanto, nenhum destes trabalhos investigou a estabilidade do fenótipo induzido pela eferocitose. Desta forma, o presente estudo buscou verificar se a fagocitose de células apoptóticas era capaz de induzir um fenótipo nos macrófagos capaz de se manter estável por pelo menos, três dias, revelado pela estimulação tardia com LPS. Nossos dados sugerem que a eferocitose anti-inflamatória, representada pela fagocitose de neutrófilos provenientes de camundongos BALB/c, não imprime nenhum fenótipo particular nos macrófagos. Por outro lado, a eferocitose pró-inflamatória de neutrófilos de B6 induz um fenótipo estável, verificável após subsequente estimulação com LPS, e caracterizado pela baixa produção de IL-12, elevada secreção de IL-10, TNF- α e NO, além da expressão de marcadores particulares como LIGHT/TNFSF14 e SPHK1, favorecimento de respostas Th2 e permissibilidade à replicação intracelular de *L. major*. Em conjunto, estas características permitiram classificar o fenótipo apresentado como macrófagos do tipo II ou M2b (SUTTERWALA *et al.*, 1998; ANDERSON & MOSSER, 2002a; EDWARDS *et al.*, 2006; MOSSER & EDWARDS, 2008).

A elevada secreção de IL-10 é correlata com o perfil modulador/regulatório das células M2b, uma vez que esta citocina tem um importante papel na inibição de APCs e de respostas do tipo Th1 (ANDERSON & MOSSER, 2002a; MURAI *et al.*, 2009; O'GARRA & MURPHY, 2009; HEDRICH & BREAM, 2010). O aumento de TNF- α observado nos macrófagos que interagiram com neutrófilos apoptóticos pode estar correlacionado com o aumento de IL-10 nos macrófagos M2b, uma vez que essa citocina é capaz de induzir a secreção de IL-10 em macrófagos (BERGER *et al.*, 1997), e parece que essa alça regulatória TNF- α /IL-10 tem bastante relevância no que diz respeito à ação da IL-10 na proteção contra o choque séptico e nas doenças inflamatórias do intestino (GÉRARD *et al.*, 1993; KÜHN *et al.*, 1993). Outro aspecto interessante é que, embora pouca, a secreção de IL-12p40 por macrófagos M2b também poderia contribuir no processo de regulação das respostas imunes inflamatórias, já que evidências mostram que essa subunidade de IL-12 é capaz de formar homodímeros (IL-12p80) que antagonizam o efeito clássico da IL-12, diminuindo as respostas do tipo Th1 e aumentando a suscetibilidade de DCs à patógenos intracelulares (NIGG *et al.*, 2007). Curiosamente, a elevada produção de nitritos pelos macrófagos M2b não garante seu efeito microbicida contra patógenos intracelulares, como mostrado neste trabalho e por outros autores (KANE & MOSSER, 2001; EDWARDS *et al.*, 2006).

Os macrófagos M2b parecem estar mais relacionados aos macrófagos M1 do que aos demais macrófagos M2, uma vez que possuem níveis aumentados de NO e de moléculas co-estimulatórias, secretam elevadas concentrações de TNF- α , além de serem eficientes APCs (EDWARDS *et al.*, 2006). Os macrófagos M1 podem ser gerados em resposta a estimulação concomitante com as citocinas IFN- γ e ligantes de TLRs como LPS (ADAMS, 1989). Em nosso modelo, verificamos que os BMDMs pré-tratados com rmIFN- γ e cultivados com baixas doses de LPS desenvolveram tolerância a endotoxina, verificada após desafio com

elevada dose de LPS. Esse fenômeno também foi observado por SEVERN e colaboradores (1993), onde a tolerância ao LPS foi revelada pela redução da produção de NO, com a consequente redução da atividade leishmanicida pelos macrófagos. A tolerância à endotoxina pode ser resultado da expressão e/ou função diminuída das vias de sinalização comuns e intermediárias envolvidas na sinalização por LPS e IL-1 (MEDVEDEV *et al.*, 2000), onde a proteína adaptadora IRAK-M, um regulador negativo da sinalização de TLRs expresso somente em monócitos/macrófagos, parece desempenhar importante papel (KOBAYASHI *et al.*, 2002; ESCOLL *et al.*, 2003; LIEW *et al.*, 2005).

Estudos prévios indicam que a IL-4 é capaz de sinergizar com o IFN- γ para induzir a atividade leishmanicida e produção de IL-12 e TNF- α em macrófagos (BELOSEVIC *et al.*, 1988; BOGDAN *et al.*, 1991; STENGER *et al.*, 1991; D'ANDREA *et al.*, 1995). Nossos resultados confirmaram que BMDMs pré-tratados com rmIFN- γ e cultivados com rmIL-4 exibem um perfil semelhante aos macrófagos M1 após desafio com LPS, uma vez que secretam elevadas concentrações de IL-12p70, TNF- α e NO, mas baixas quantidades de IL-10.

Alguns trabalhos têm mostrado que o contato entre macrófagos e células apoptóticas é necessário para induzir respostas imunossupressoras, que incluem a produção de IL-10 por monócitos/macrófagos (CHUNG *et al.*, 2007; BYRNE & REEN, 2002). No entanto, nossos dados sugerem que a diferenciação M2b depende tanto de contato celular, como de fatores solúveis liberados por neutrófilos apoptóticos. Nós observamos que produção de IL-10 não foi suprimida quando as células foram separadas por uma membrana impermeável às células, mas a produção de nitritos e TGF- β foi drasticamente diminuída nestas condições. Como discutido anteriormente, a colaboração entre os fatores solúveis liberados pelas células apoptóticas e os mediados pelo contato celular (receptores e ligantes de superfície) é essencial

para que seja formado um ambiente imunossupressor decorrente da remoção fagocítica de células apoptóticas (CHEN *et al.*, 2001; CVETANOVIC & UCKER, 2004; WEIGERT *et al.*, 2007; DELORENZO *et al.*, 2009; WEIGERT *et al.*, 2009; WEIS *et al.*, 2009).

No presente estudo, verificamos que a eferocitose pró-inflamatória é capaz de aumentar a expressão dos marcadores LIGHT/TNFSF14 e SPHK1 nos BMDMs-B6 desafiados com LPS, da mesma forma que nos macrófagos M2b descritos anteriormente (EDWARDS *et al.*, 2006; MOSSER & EDWARDS, 2008). Embora a relação entre a expressão preferencial destas moléculas e a aquisição do fenótipo M2b ainda não esteja clara, o LIGHT está envolvido na co-estimulação de células T através de seu reconhecimento pela molécula HVEM (TR3) (TAMADA *et al.*, 2000), que é expressa na maioria das populações de linfócitos (KWON *et al.*, 1997). Sendo assim, o LIGHT expresso ou secretado por células M2b, assume o papel de uma molécula co-estimulatória adicional, contribuindo para ativação e proliferação de células T (EDWARDS *et al.*, 2006). Por outro lado, a SPHK1 é uma enzima capaz de regular negativamente as respostas inflamatórias Th1 por inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, além de manter a viabilidade e migração celular, prolongar a liberação de citocinas em macrófagos ativados por LPS, e exercer um importante papel na inibição da apoptose, mobilização de cálcio e ativação de ERK1/2 (WU *et al.*, 2004; HAMMAD *et al.*, 2006; WEIGERT *et al.*, 2009). Entretanto, a relevância funcional da expressão de LIGHT e SPHK1 nos macrófagos M2b ainda precisa ser determinada.

Outro resultado observado neste trabalho foi a elevada produção de TNF- α e IL-10 na interação inicial dos neutrófilos apoptóticos com macrófagos pré-tratados com IFN- γ , o que nos levou a investigar a relevância destas citocinas no processo de indução do fenótipo M2b. No entanto, nós observamos, por meio de experimentos de neutralização, que a IL-10 e o

TNF- α exercem apenas funções modulatórias discretas e opostas na indução do fenótipo M2b. Nossos resultados contrastam com o estudo de BERGER e colaboradores (1997), onde a neutralização dessas citocinas foi capaz de realmente reverter o efeito provocado pelo engajamento dos Fc γ R no que diz respeito à indução do fenótipo M2b.

Resultados anteriores publicados por nosso grupo mostraram que neutrófilos apoptóticos de B6, mas não de BALB/c induzem atividade leishmanicida em macrófagos de B6 (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004). Este efeito pró-inflamatório era correlato com aumentada liberação e atividade de NE, e dependia da ativação de TLR4 (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2007). Notavelmente, as proteínas liberadas dos grânulos de neutrófilos ativados são capazes de regular as funções dos macrófagos (SOEHNLEIN, 2009), onde mais especificamente, a NE ativa TLR4 (DEVANEY *et al.*, 2003). Tanto NE quanto TLR4 estão envolvidos na indução da atividade leishmanicida nos macrófagos (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2007).

Nossos resultados indicam que a indução do fenótipo M2b também necessita da atividade NE e de TLR4. Nós verificamos que a inibição de NE reduziu a capacidade de secretar IL-10 e nitritos e que a neutralização da sinalização de TLR4 inibiu a secreção de IL-10 pelos macrófagos. Curiosamente, a neutralização de TLR4 não teve qualquer efeito sobre a capacidade de produzir nitritos nos macrófagos. Esses resultados sugerem que a NE induz a diferenciação de macrófagos tanto por vias dependentes, como independentes de TLR4. No modelo original de diferenciação M2b, os autores descreveram que as células M2b são induzidas após o reconhecimento concomitante de complexos imunes por Fc γ R em conjunto com a estimulação de TLRs por LPS (MOSSER & EDWARDS, 2008). Observamos que a adição de NE purificada falhou em induzir o fenótipo M2b (dados não mostrados). Este

resultado não surpreendeu, uma vez que a indução do fenótipo M2b requer dois sinais distintos, onde um dos sinais é fornecido pela sinalização de TLRs (MOSSER & EDWARDS, 2008). O segundo sinal não foi identificado no presente estudo, mas parece ser fornecido pelos neutrófilos apoptóticos.

Os macrófagos interagem com as células apoptóticas através de múltiplos receptores que medeiam a sinalização intracelular (RAVICHANDRAN & LORENZ, 2007). É notável que interações com células apoptóticas reduzam a secreção de IL-12 e aumentem a de IL-10 por monócitos (VOLL *et al.*, 1997; MIKOLAJCZYK *et al.*, 2009). Esta é uma resposta similar às elicitadas pelo engajamento de FcγR ou receptores iC3b nos monócitos/macrófagos, e que permitem a diferenciação para o fenótipo M2b (SUTTERWALA *et al.*, 1998; YOSHIDA *et al.*, 1998).

As bases da sinalização intracelular responsável pelo disparo do fenótipo M2b não estão esclarecidas. A regulação negativa da produção de IL-12 poderia ser explicada pelo aumento do nível de cálcio intracelular estimulado pela sinalização da célula apoptótica nos macrófagos, à semelhança do encontrado nos macrófagos M2b induzidos pela estimulação de FcγR, receptores de complemento ou receptores *scavengers* (SUTTERWALA *et al.*, 1997). O engajamento de FcγR por complexos imunes dispara vias de sinalização que em última análise, culminam na ativação de fosfolipase C, que por sua vez é capaz de intermediar o aumento dos níveis de cálcio intracelular (ODIN *et al.*, 1991; LIAO *et al.*, 1992). Já foi descrito que o reconhecimento de células apoptóticas induz um substancial influxo de cálcio nos fagócitos e os genes necessários para este influxo são essenciais para a eferocitose (GRONSKI *et al.*, 2009). Adicionalmente, foi demonstrado que o citoplasma de neutrófilos apoptóticos é rico em uma proteína quelante de cálcio, denominada S100A9. Essa proteína é

liberada e parece contribuir para os efeitos anti-inflamatórios observados nos macrófagos após eferocitose de neutrófilos (DE LORENZO *et al.*, 2009).

Uma outra explicação para a regulação negativa de IL-12 após eferocitose de neutrófilos seria a inibição de NF- κ B em resposta ao LPS, levando a profunda inibição das citocinas pró-inflamatórias (AMARILYO *et al.*, 2009). Nesse sentido, evidências apontam que a esfingosina-1-fosfato, produto da degradação enzimática de SPHK1, cuja expressão é característica em células M2b, bloqueia a estimulação da ativação de NF- κ B dependente de LPS em macrófagos (WEIGERT *et al.*, 2007; HUGHES *et al.*, 2008). Também foi relatado que essa proteína diminui a produção de IL-12 e aumenta a de IL-10 em macrófagos, além de estar envolvida na ativação de ERK1/2 e na sinalização de cálcio em macrófagos humanos (WEIGERT *et al.*, 2006; WEIGERT *et al.*, 2007; WEIS *et al.*, 2009).

Ao mesmo tempo, o aumento da produção e secreção de IL-10 nos macrófagos que interagiram com os neutrófilos apoptóticos pode ser explicado pela rápida e elevada ativação de MAPKs, ERK e p38, já que o engajamento de Fc γ R por imunocomplexos em macrófagos é capaz de induzir a ativação dessas enzimas, com a consequente fosforilação da histona H3 do promotor de IL-10, permitindo a ligação do fator de transcrição Sp1 ao promotor do gene que codifica a IL-10 (LUCAS *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2006; CHUNG *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2007). Corroborando esta hipótese, já foi demonstrado que a fosforilação de MAPKs, ERK e p38 parece ser essencial para a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos (PATEL *et al.*, 2006; JEHL *et al.*, 2006).

As células apoptóticas podem ser opsonizadas por iC3b (TAKIZAMA *et al.*, 1996), IgG (HART *et al.*, 2004), proteína C reativa e componente amilóide P do soro (MOLD *et al.*, 2002) e desta forma sua fagocitose pode ser mediada pelos mesmos receptores (CR3/CR4 e

FcγR, respectivamente) que geram a sinalização necessária para a indução do fenótipo M2b (YOSHIDA *et al.*, 1998; GERBER & MOSSER, 2001; ANDERSON & MOSSER, 2002a; ANDERSON & MOSSER, 2002b; SOHN *et al.*, 2003). No entanto, nesse estudo não foi determinado o(s) receptor(es) utilizado(s) pelos macrófagos na ligação com os neutrófilos apoptóticos. Em nosso modelo, fizemos todo o possível para eliminar a opsonização dos neutrófilos. A indução de apoptose foi feita incubando os neutrófilos em meio sem SFB, por 18 horas em estufa, e desta forma possíveis fragmentos de complemento e anticorpos adsorvidos, o que seria pouco provável, uma vez que os neutrófilos eram derivados de animais normais, seriam liberados no meio. Adicionalmente, a interação dos neutrófilos apoptóticos com os macrófagos era feita, muitas vezes, na ausência de soro e na presença de nutridoma. No entanto, não se pode afastar a produção endógena de proteínas do complemento pelos macrófagos. Apesar de ainda restarem questões a serem investigadas a respeito do reconhecimento dos neutrófilos apoptóticos pelos macrófagos, nossos resultados nos permitem sugerir que os neutrófilos apoptóticos poderiam potencialmente iniciar a sinalização intracelular necessária para a diferenciação M2b.

A indução do fenótipo M2b em macrófagos pode ter importantes implicações nas respostas imunes adaptativas. Dados publicados na literatura mostram que as células M2b diferenciadas pela ligação de FcγR em conjunto com um estímulo inflamatório, apresentam elevada capacidade co-estimulatória e podem favorecer respostas Th2, até mesmo *in vivo*. (ANDERSON & MOSSER, 2002a, 2002b; EDWARDS *et al.*, 2006). Nós também verificamos que a interação entre neutrófilos apoptóticos e BMDMs era capaz de gerar um macrófago capaz de induzir uma diferenciação de linfócitos TCD4⁺ esplênicos alogênicos para um viés Th2, favorecendo a produção de IL-4 e IL-10. O favorecimento de respostas Th2 poderia em parte, ser explicado pelo fato da eferocitose em conjunto com a estimulação de

TLR4, ter modificado o fenótipo da APC, induzindo a produção de IL-10 ao invés de IL-12, o que favorece a diferenciação de células Th2 (ANDERSON & MOSSER, 2002a, 2002b; EDWARDS *et al.*, 2006; WEBER *et al.*, 2007). O desenvolvimento de células Th2 pode influenciar negativamente as respostas imunes contra microrganismos intracelulares (MILES *et al.*, 2005).

As células M2b estão envolvidas na suscetibilidade a vários patógenos intracelulares (TRIPP *et al.*, 1995; KANE & MOSSER, 2001; BRANDHORST *et al.*, 2004). A fagocitose de formas amastigotas de *Leishmania* recobertas com IgG do hospedeiro induz um aumento da secreção de IL-10 e a diminuição da secreção de IL-12 e TNF- α em macrófagos, o que inibe sua ativação, aumenta a replicação intracelular de *Leishmania*, contribuindo para a progressão da doença (GERBER & MOSSER, 2001; KANE & MOSSER, 2001). Em outro modelo, a infecção de macrófagos com formas amastigotas de *L. amazonensis* é capaz de induzir a ativação de MAPK e ERK1/2, o que resulta no aumento da secreção de IL-10. A secreção máxima de IL-10 foi alcançada quando as amastigotas estavam opsonizadas com IgG, uma vez que o engajamento de Fc γ R é capaz de induzir a ativação de ERK (YANG *et al.*, 2007). Por este motivo, comparamos o efeito microbicida da eferocitose antes e depois da indução do fenótipo M2b. Da mesma forma que em estudos feitos com outras populações de macrófagos, a eferocitose de neutrófilos (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004), o LPS e a rmIL-4 (BODGAN *et al.*, 1991) induziram atividade leishmanicida em macrófagos pré-estimulados com rmIFN- γ . No entanto, nossos dados demonstraram que os macrófagos com fenótipo M2b já diferenciados por eferocitose, perderam sua atividade leishmanicida. Esses resultados indicam que macrófagos M2b são permissivos ao crescimento intracelular de *L. major*, o que é correlato com o papel deletério dos macrófagos M2b/regulatórios (KANE & MOSSER, 2001) e da IL-10 (KANE & MOSSER, 2001; GROUX *et al.*, 1999) na infecção por *L. major*.

Adicionalmente, a IL-10 parácrina produzida por células mielóides é importante para manter a expressão de Foxp3 e a função supressiva de células T regulatórias (MURAI *et al.*, 2009), o que sugere um outro importante papel da IL-10, na manutenção da persistência do parasita durante a infecção por *Leishmania*.

Nossos resultados indicam que a eferocitose anti-inflamatória não afeta o fenótipo subsequente do macrófago. Por outro lado, a diferenciação para o fenótipo M2b deve ser um destino comum de macrófagos ativados, e um mecanismo seguro de parar a inflamação iniciada pela eferocitose inflamatória. Nesse contexto, o destino da *Leishmania* intracelular nos macrófagos hospedeiros poderia depender do tempo decorrido entre a infecção e fagocitose de neutrófilos senescentes. Apesar de os macrófagos regulatórios ajudarem a resolver a inflamação, eles também poderiam funcionar como nichos permissivos para a persistência parasitária.

Conclusões

Nossos resultados nos permitem concluir que eferocitose de neutrófilos pode determinar o fenótipo e função de células dendríticas e macrófagos derivados de medula óssea, onde:

1. A eferocitose de neutrófilos por iDCs altera sua resposta de maturação frente ao estímulo com LPS, inibindo a secreção de IL-12 e a expressão das moléculas MHC-II e CD86, enquanto que exacerba a secreção de IL-10;
2. a regulação da maturação de iDCs pela eferocitose independe da linhagem genética dos neutrófilos e é mediada tanto por fatores solúveis como por contato celular;
3. a eferocitose de neutrófilos de B6, mas não de BALB/c, induz um fenótipo M2b estável em macrófagos, caracterizado por elevada produção de IL-10, TNF- α e nitritos, e por uma baixa produção de IL-12, frente ao estímulo com LPS;
4. os macrófagos M2b, induzidos pela eferocitose de neutrófilos, aumentam a expressão das proteínas LIGHT/TNFSF14 e SHPK1 e favorecem respostas do tipo Th2;
5. a indução do fenótipo M2b é parcialmente dependente de contato entre macrófagos e neutrófilos apoptóticos e parcialmente dependente de fatores solúveis;
6. a indução do fenótipo M2b necessita da atividade NE e da via TLR4 de sinalização celular;
7. os macrófagos M2b, diferenciados pela eferocitose de neutrófilos, são permissivos à replicação intracelular de *L. major*.

Referências Bibliográficas

ADAMS, D. O. Molecular interactions in macrophage activation. **Immunol Today**, v.10, n.2, Feb, p.33-5. 1989.

ADEMA, G. J. Dendritic cells from bench to bedside and back. **Immunol Lett**, v.122, n.2, Feb 21, p.128-30. 2009.

ALBERT, M. L., B. SAUTER e N. BHARDWAJ. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. **Nature**, v.392, n.6671, Mar 5, p.86-9. 1998a.

ALBERT, M. L., S. F. PEARCE, L. M. FRANCISCO, B. SAUTER, P. ROY, R. L. SILVERSTEIN e N. BHARDWAJ. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. **J Exp Med**, v.188, n.7, Oct 5, p.1359-68. 1998b.

ALBINA, J. E., C. D. MILLS, W. L. HENRY, JR. e M. D. CALDWELL. Temporal expression of different pathways of 1-arginine metabolism in healing wounds. **J Immunol**, v.144, n.10, May 15, p.3877-80. 1990.

ALEMAN, M., S. DE LA BARRERA, P. SCHIERLOH, N. YOKOBORI, M. BALDINI, R. MUSELLA, E. ABBATE e M. SASIAIN. Spontaneous or Mycobacterium tuberculosis-induced apoptotic neutrophils exert opposite effects on the dendritic cell-mediated immune response. **Eur J Immunol**, v.37, n.6, Jun, p.1524-37. 2007.

AMARILYO, G., I. VERBOVETSKI, M. ATALLAH, A. GRAU, G. WISER, O. GIL, Y. BEN-NERIAH e D. MEVORACH. iC3b-opsonized apoptotic cells mediate a distinct anti-inflammatory response and transcriptional NF-kappaB-dependent blockade. **Eur J Immunol**, Dec 28. 2009.

ANDERSON, C. F. e D. M. MOSSER. Cutting edge: biasing immune responses by directing antigen to macrophage Fc gamma receptors. **J Immunol**, v.168, n.8, Apr 15, p.3697-701. 2002a.

ANDERSON, C. F. e D. M. MOSSER. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. **J Leukoc Biol**, v.72, n.1, Jul, p.101-6. 2002b.

ANJUERE, F., P. MARTIN, I. FERRERO, M. L. FRAGA, G. M. DEL HOYO, N. WRIGHT e C. ARDAVIN. Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. **Blood**, v.93, n.2, Jan 15, p.590-8. 1999.

ANTHONY, R. M., J. F. URBAN, JR., F. ALEM, H. A. HAMED, C. T. ROZO, J. L. BOUCHER, N. VAN ROOIJEN e W. C. GAUSE. Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. **Nat Med**, v.12, n.8, Aug, p.955-60. 2006.

APPELBERG, R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. **Trends Microbiol**, v.15, n.2, Feb, p.87-92. 2007.

ARAI, H., D. GORDON, E. G. NABEL e G. J. NABEL. Gene transfer of Fas ligand induces tumor regression in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.94, n.25, Dec 9, p.13862-7. 1997.

ARDAVIN, C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. **Nat Rev Immunol**, v.3, n.7, Jul, p.582-90. 2003.

ARDAVIN, C., G. MARTINEZ DEL HOYO, P. MARTIN, F. ANJUERE, C. F. ARIAS, A. R. MARIN, S. RUIZ, V. PARRILLAS e H. HERNANDEZ. Origin and differentiation of dendritic cells. **Trends Immunol**, v.22, n.12, Dec, p.691-700. 2001.

ARROYO, A., M. MODRIANSKY, F. B. SERINKAN, R. I. BELLO, T. MATSURA, J. JIANG, V. A. TYURIN, Y. Y. TYURINA, B. FADEEL e V. E. KAGAN. NADPH oxidase-dependent oxidation and externalization of phosphatidylserine during apoptosis in Me2SO-differentiated HL-60 cells. Role in phagocytic clearance. **J Biol Chem**, v.277, n.51, Dec 20, p.49965-75. 2002.

ARUR, S., U. E. UCHE, K. REZAUL, M. FONG, V. SCRANTON, A. E. COWAN, W. MOHLER e D. K. HAN. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. **Dev Cell**, v.4, n.4, Apr, p.587-98. 2003.

ASSELIN-PATUREL, C., A. BOONSTRA, M. DALOD, I. DURAND, N. YESSAAD, C. DEZUTTER-DAMBUYANT, A. VICARI, A. O'GARRA, C. BIRON, F. BRIERE e G. TRINCHIERI. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. **Nat Immunol**, v.2, n.12, Dec, p.1144-50. 2001.

ASSELIN-PATUREL, C., G. BRIZARD, J. J. PIN, F. BRIERE e G. TRINCHIERI. Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. **J Immunol**, v.171, n.12, Dec 15, p.6466-77. 2003.

ATHENS, J. W., O. P. HAAB, S. O. RAAB, A. M. MAUER, H. ASHENBRUCKER, G. E. CARTWRIGHT e M. M. WINTROBE. Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. **J Clin Invest**, v.40, Jun, p.989-95. 1961.

BAJTAY, Z., E. CSOMOR, N. SANDOR e A. ERDEI. Expression and role of Fc- and complement-receptors on human dendritic cells. **Immunol Lett**, v.104, n.1-2, Apr 15, p.46-52. 2006.

BANCHEREAU, J. e A. K. PALUCKA. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. **Nat Rev Immunol**, v.5, n.4, Apr, p.296-306. 2005.

BANCHEREAU, J. e R. M. STEINMAN. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v.392, n.6673, Mar 19, p.245-52. 1998.

BANCHEREAU, J., S. PACZESNY, P. BLANCO, L. BENNETT, V. PASCUAL, J. FAY e A. K. PALUCKA. Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy. **Ann N Y Acad Sci**, v.987, Apr, p.180-7. 2003.

BARCET, W., A. KRUG, M. CELLA, C. NEWBY, J. A. FISCHER, A. DZIOONEK, A. PEKOSZ e M. COLONNA. Dendritic cells respond to influenza virus through TLR7- and PKR-independent pathways. **Eur J Immunol**, v.35, n.1, Jan, p.236-42. 2005.

BARTON, G. M. e R. MEDZHITOV. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. **Curr Opin Immunol**, v.14, n.3, Jun, p.380-3. 2002.

BELL, D., J. W. YOUNG e J. BANCHEREAU. Dendritic cells. **Adv Immunol**, v.72, p.255-324. 1999.

BELLONE, M., G. IEZZI, P. ROVERE, G. GALATI, A. RONCHETTI, M. P. PROTTI, J. DAVOUST, C. RUGARLI e A. A. MANFREDI. Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. **J Immunol**, v.159, n.11, Dec 1, p.5391-9. 1997.

BELOSEVIC, M., C. E. DAVIS, M. S. MELTZER e C. A. NACY. Regulation of activated macrophage antimicrobial activities. Identification of lymphokines that cooperate with IFN-gamma for induction of resistance to infection. **J Immunol**, v.141, n.3, Aug 1, p.890-6. 1988.

BENOIT, M., B. DESNUES e J. L. MEGE. Macrophage polarization in bacterial infections. **J Immunol**, v.181, n.6, Sep 15, p.3733-9. 2008.

BERGER, S. P., M. A. SEELLEN, P. S. HIEMSTRA, J. S. GERRITSMA, E. HEEMSKERK, F. J. VAN DER WOUDE e M. R. DAHA. Proteinase 3, the major autoantigen of Wegener's granulomatosis, enhances IL-8 production by endothelial cells in vitro. **J Am Soc Nephrol**, v.7, n.5, May, p.694-701. 1996.

BERGER, S., R. CHANDRA, H. BALLO, R. HILDENBRAND e H. J. STUTTE. Immune complexes are potent inhibitors of interleukin-12 secretion by human monocytes. **Eur J Immunol**, v.27, n.11, Nov, p.2994-3000. 1997.

BETTELLI, E., Y. CARRIER, W. GAO, T. KORN, T. B. STROM, M. OUKKA, H. L. WEINER e V. K. KUCHROO. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v.441, n.7090, May 11, p.235-8. 2006.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Mol Immunol**, v.40, n.12, Feb, p.845-59. 2004.

BILSBOROUGH, J., T. C. GEORGE, A. NORMENT e J. L. VINEY. Mucosal CD8alpha+ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. **Immunology**, v.108, n.4, Apr, p.481-92. 2003.

BLANDER, J. M. Signalling and phagocytosis in the orchestration of host defence. **Cell Microbiol**, v.9, n.2, Feb, p.290-9. 2007.

BLEAU, G., F. MASSICOTTE, Y. MERLEN e C. BOISVERT. Mammalian chitinase-like proteins. **Exs**, v.87, p.211-21. 1999.

BOEHM, U., T. KLAMP, M. GROOT e J. C. HOWARD. Cellular responses to interferon-gamma. **Annu Rev Immunol**, v.15, p.749-95. 1997.

BOGDAN, C., J. PAIK, Y. VODOVOTZ e C. NATHAN. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. **J Biol Chem**, v.267, n.32, Nov 15, p.23301-8. 1992.

BOGDAN, C., S. STENGER, M. ROLLINGHOFF e W. SOLBACH. Cytokine interactions in experimental cutaneous leishmaniasis. Interleukin 4 synergizes with interferon-gamma to activate murine macrophages for killing of *Leishmania major* amastigotes. **Eur J Immunol**, v.21, n.2, Feb, p.327-33. 1991.

BORGES, V. M., H. FALCAO, J. H. LEITE-JUNIOR, L. ALVIM, G. P. TEIXEIRA, M. RUSSO, A. F. NOBREGA, M. F. LOPES, P. M. ROCCO, W. F. DAVIDSON, R. LINDEN, H. YAGITA, W. A. ZIN e G. A. DOSREIS. Fas ligand triggers pulmonary silicosis. **J Exp Med**, v.194, n.2, Jul 16, p.155-64. 2001.

BORREGAARD, N. e J. B. COWLAND. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, v.89, n.10, May 15, p.3503-21. 1997.

BOWIE, A. e L. A. O'NEILL. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. **J Leukoc Biol**, v.67, n.4, Apr, p.508-14. 2000.

BRANDHORST, T. T., M. WUTHRICH, B. FINKEL-JIMENEZ, T. WARNER e B. S. KLEIN. Exploiting type 3 complement receptor for TNF-alpha suppression, immune evasion, and progressive pulmonary fungal infection. **J Immunol**, v.173, n.12, Dec 15, p.7444-53. 2004.

BRINKMANN, V. e A. ZYCHLINSKY. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. **Nat Rev Microbiol**, v.5, n.8, Aug, p.577-82. 2007.

BRINKMANN, V., U. REICHARD, C. GOOSMANN, B. FAULER, Y. UHLEMANN, D. S. WEISS, Y. WEINRAUCH e A. ZYCHLINSKY. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v.303, n.5663, Mar 5, p.1532-5. 2004.

BROWN, G. D. e S. GORDON. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. **Nature**, v.413, n.6851, Sep 6, p.36-7. 2001.

BRUNN, G. J. e J. L. PLATT. The etiology of sepsis: turned inside out. **Trends Mol Med**, v.12, n.1, Jan, p.10-6. 2006.

BUCHANAN, J. T., A. J. SIMPSON, R. K. AZIZ, G. Y. LIU, S. A. KRISTIAN, M. KOTB, J. FERAMISCO e V. NIZET. DNase expression allows the pathogen group A Streptococcus to escape killing in neutrophil extracellular traps. **Curr Biol**, v.16, n.4, Feb 21, p.396-400. 2006.

BYRNE, A. e D. J. REEN. Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. **J Immunol**, v.168, n.4, Feb 15, p.1968-77. 2002.

CARLIN, J. M., E. C. BORDEN e G. I. BYRNE. Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity inhibits Chlamydia psittaci replication in human macrophages. **J Interferon Res**, v.9, n.3, Jun, p.329-37. 1989.

CHALY, Y. V., E. M. PALEOLOG, T. S. KOLESNIKOVA, TIKHONOV, II, E. V. PETRATCHENKO e N. N. VOITENOK. Neutrophil alpha-defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells. **Eur Cytokine Netw**, v.11, n.2, Jun, p.257-66. 2000.

CHANG, M. K., C. BERGMARK, A. LAURILA, S. HORKKO, K. H. HAN, P. FRIEDMAN, E. A. DENNIS e J. L. WITZTUM. Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, n.11, May 25, p.6353-8. 1999.

CHEHIMI, J., S. E. STARR, H. KAWASHIMA, D. S. MILLER, G. TRINCHIERI, B. PERUSSIA e S. BANDYOPADHYAY. Dendritic cells and IFN-alpha-producing cells are two functionally distinct non-B, non-monocytic HLA-DR+ cell subsets in human peripheral blood. **Immunology**, v.68, n.4, Dec, p.486-90. 1989.

CHEN, W., M. E. FRANK, W. JIN e S. M. WAHL. TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. **Immunity**, v.14, n.6, Jun, p.715-25. 2001.

CHUNG, H., S. SEO, M. MOON e S. PARK. IGF-I inhibition of apoptosis is associated with decreased expression of prostate apoptosis response-4. **J Endocrinol**, v.194, n.1, Jul, p.77-85. 2007.

CLAYTON, A. R., R. L. PRUE, L. HARPER, M. T. DRAYSON e C. O. SAVAGE. Dendritic cell uptake of human apoptotic and necrotic neutrophils inhibits CD40, CD80, and CD86 expression and reduces allogeneic T cell responses: relevance to systemic vasculitis. **Arthritis Rheum**, v.48, n.8, Aug, p.2362-74. 2003.

COHEN, D. M., S. C. BHALLA, E. J. ANAÏSSIE, J. P. HESTER, C. A. SAVARY e J. H. REX. Effects of in vitro and in vivo cytokine treatment, leucapheresis and irradiation on the function of human neutrophils: implications for white blood cell transfusion therapy. **Clin Lab Haematol**, v.19, n.1, Mar, p.39-47. 1997.

COHEN, M. S. Molecular events in the activation of human neutrophils for microbial killing. **Clin Infect Dis**, v.18 Suppl 2, Feb, p.S170-9. 1994.

COOK, A. D., E. L. BRAINE e J. A. HAMILTON. The phenotype of inflammatory macrophages is stimulus dependent: implications for the nature of the inflammatory response. **J Immunol**, v.171, n.9, Nov 1, p.4816-23. 2003.

COX, G., J. CROSSLEY e Z. XING. Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.12, n.2, Feb, p.232-7. 1995.

CVETANOVIC, M. e D. S. UCKER. Innate immune discrimination of apoptotic cells: repression of proinflammatory macrophage transcription is coupled directly to specific recognition. **J Immunol**, v.172, n.2, Jan 15, p.880-9. 2004.

DALOD, M., T. HAMILTON, R. SALOMON, T. P. SALAZAR-MATHER, S. C. HENRY, J. D. HAMILTON e C. A. BIRON. Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. **J Exp Med**, v.197, n.7, Apr 7, p.885-98. 2003.

DALOD, M., T. P. SALAZAR-MATHER, L. MALMGAARD, C. LEWIS, C. ASSELIN-PATUREL, F. BRIERE, G. TRINCHIERI e C. A. BIRON. Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. **J Exp Med**, v.195, n.4, Feb 18, p.517-28. 2002.

D'ANDREA, A., X. MA, M. ASTE-AMEZAGA, C. PAGANIN e G. TRINCHIERI. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. **J Exp Med**, v.181, n.2, Feb 1, p.537-46. 1995.

DE LORENZO, B. H., L. C. GODOY, E. B. R. R. NOVAES, R. L. PAGANO, M. A. AMORIM-DIAS, D. M. GROSSO, J. D. LOPES e M. MARIANO. Macrophage suppression following phagocytosis of apoptotic neutrophils is mediated by the S100A9 calcium-binding protein. **Immunobiology**, Aug 3. 2009.

DETMERS, P. A., D. ZHOU, D. POWELL, H. LICHENSTEIN, M. KELLEY e R. PIRONKOVA. Endotoxin receptors (CD14) are found with CD16 (Fc gamma RIII) in an intracellular compartment of neutrophils that contains alkaline phosphatase. **J Immunol**, v.155, n.4, Aug 15, p.2085-95. 1995.

DEVANEY, J. M., C. M. GREENE, C. C. TAGGART, T. P. CARROLL, S. J. O'NEILL e N. G. MCELVANEY. Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4. **FEBS Lett**, v.544, n.1-3, Jun 5, p.129-32. 2003.

DILLON, S., A. AGRAWAL, T. VAN DYKE, G. LANDRETH, L. MCCAULEY, A. KOH, C. MALISZEWSKI, S. AKIRA e B. PULENDRAN. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. **J Immunol**, v.172, n.8, Apr 15, p.4733-43. 2004.

DINAUER, M. C., J. A. LEKSTROM-HIMES e D. C. DALE. Inherited Neutrophil Disorders: Molecular Basis and New Therapies. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p.303-318. 2000.

DOSREIS, G. A. e M. A. BARCINSKI. Apoptosis and parasitism: from the parasite to the host immune response. **Adv Parasitol**, v.49, p.133-61. 2001.

DRANSFIELD, I., S. C. STOCKS e C. HASLETT. Regulation of cell adhesion molecule expression and function associated with neutrophil apoptosis. **Blood**, v.85, n.11, Jun 1, p.3264-73. 1995.

DUFFIELD, J. S. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. **Clin Sci (Lond)**, v.104, n.1, Jan, p.27-38. 2003.

EDWARDS, J. P., X. ZHANG, K. A. FRAUWIRTH e D. M. MOSSER. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. **J Leukoc Biol**, v.80, n.6, Dec, p.1298-307. 2006.

ELSSNER, A., M. DUNCAN, M. GAVRILIN e M. D. WEWERS. A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. **J Immunol**, v.172, n.8, Apr 15, p.4987-94. 2004.

ENGLEN, M. D., Y. E. VALDEZ, N. M. LEHNERT e B. E. LEHNERT. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is expressed and secreted in cultures of murine L929 cells. **J Immunol Methods**, v.184, n.2, Aug 18, p.281-3. 1995.

ERWIG, L. P. e P. M. HENSON. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. **Cell Death Differ**, v.15, n.2, Feb, p.243-50. 2008.

ERWIG, L. P. e P. M. HENSON. Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis. **Am J Pathol**, v.171, n.1, Jul, p.2-8. 2007.

ESCOLL, P., C. DEL FRESNO, L. GARCIA, G. VALLES, M. J. LENDINEZ, F. ARNALICH e E. LOPEZ-COLLAZO. Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. **Biochem Biophys Res Commun**, v.311, n.2, Nov 14, p.465-72. 2003.

EZEKOWITZ, R. A. e S. GORDON. Alterations of surface properties by macrophage activation: expression of receptors for Fc and mannose-terminal glycoproteins and differentiation antigens. **Contemp Top Immunobiol**, v.13, p.33-56. 1984.

EZEKOWITZ, R. A., C. A. SIEFF, M. C. DINAUER, D. G. NATHAN, S. H. ORKIN e P. E. NEWBURGER. Restoration of phagocyte function by interferon-gamma in X-linked chronic granulomatous disease occurs at the level of a progenitor cell. **Blood**, v.76, n.12, Dec 15, p.2443-8. 1990.

FADOK, V. A., D. L. BRATTON, A. KONOWAL, P. W. FREED, J. Y. WESTCOTT e P. M. HENSON. 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**, v.101, n.4, Feb 15, p.890-8. 1998.

FADOK, V. A., D. L. BRATTON, D. M. ROSE, A. PEARSON, R. A. EZEKEWITZ e P. M. HENSON. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. **Nature**, v.405, n.6782, May 4, p.85-90. 2000.

FADOK, V. A., J. S. SAVILL, C. HASLETT, D. L. BRATTON, D. E. DOHERTY, P. A. CAMPBELL e P. M. HENSON. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. **J Immunol**, v.149, n.12, Dec 15, p.4029-35. 1992.

FAURSCHOU, M. e N. BORREGAARD. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect**, v.5, n.14, Nov, p.1317-27. 2003.

FEARON, D. T. e R. M. LOCKSLEY. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science**, v.272, n.5258, Apr 5, p.50-3. 1996.

FERGUSON, T. A. e H. KAZAMA. Signals from dying cells: tolerance induction by the dendritic cell. **Immunol Res**, v.32, n.1-3, p.99-108. 2005.

FERGUSON, T. A. e T. S. GRIFFITH. A vision of cell death: Fas ligand and immune privilege 10 years later. **Immunol Rev**, v.213, Oct, p.228-38. 2006.

FIEBIGER, E., P. MERANER, E. WEBER, I. F. FANG, G. STINGL, H. PLOEGH e D. MAURER. Cytokines regulate proteolysis in major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by dendritic cells. **J Exp Med**, v.193, n.8, Apr 16, p.881-92. 2001.

FLAJNIK, M. F. e M. KASAHARA. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. **Nat Rev Genet**, v.11, n.1, Jan, p.47-59. 2010.

FOGG, D. K., C. SIBON, C. MILED, S. JUNG, P. AUCOUTURIER, D. R. LITTMAN, A. CUMANO e F. GEISSMANN. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. **Science**, v.311, n.5757, Jan 6, p.83-7. 2006.

FONG, L. e E. G. ENGLEMAN. Dendritic cells in cancer immunotherapy. **Annu Rev Immunol**, v.18, p.245-73. 2000.

FRANC, N. C., K. WHITE e R. A. EZEKOWITZ. Phagocytosis and development: back to the future. **Curr Opin Immunol**, v.11, n.1, Feb, p.47-52. 1999.

FRANCHIMONT, D. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. **Ann N Y Acad Sci**, v.1024, Jun, p.124-37. 2004.

FRANSEN, J. H., L. B. HILBRANDS, C. W. JACOBS, G. J. ADEMA, J. H. BERDEN e J. VAN DER VLAG. Both early and late apoptotic blebs are taken up by DC and induce IL-6 production. **Autoimmunity**, v.42, n.4, May, p.325-7. 2009.

FREIRE-DE-LIMA, C. G., D. O. NASCIMENTO, M. B. SOARES, P. T. BOZZA, H. C. CASTRO-FARIA-NETO, F. G. DE MELLO, G. A. DOSREIS e M. F. LOPES. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**, v.403, n.6766, Jan 13, p.199-203. 2000.

FUCHS, T. A., U. ABED, C. GOOSMANN, R. HURWITZ, I. SCHULZE, V. WAHN, Y. WEINRAUCH, V. BRINKMANN e A. ZYCHLINSKY. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **J Cell Biol**, v.176, n.2, Jan 15, p.231-41. 2007.

GALLUCCI, S., M. LOLKEMA e P. MATZINGER. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. **Nat Med**, v.5, n.11, Nov, p.1249-55. 1999.

GARDAI, S. J., K. A. MCPHILLIPS, S. C. FRASCH, W. J. JANSSEN, A. STAREFELDT, J. E. MURPHY-ULLRICH, D. L. BRATTON, P. A. OLDENBORG, M. MICHALAK e P. M. HENSON. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. **Cell**, v.123, n.2, Oct 21, p.321-34. 2005.

GEISSMANN, F., C. AUFFRAY, R. PALFRAMAN, C. WIRRIK, A. CIOCCA, L. CAMPISI, E. NARNI-MANCINELLI e G. LAUVAU. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. **Immunol Cell Biol**, v.86, n.5, Jul, p.398-408. 2008.

GERARD, C., C. BRUYNS, A. MARCHANT, D. ABRAMOWICZ, P. VANDENABEELE, A. DELVAUX, W. FIERS, M. GOLDMAN e T. VELU. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. **J Exp Med**, v.177, n.2, Feb 1, p.547-50. 1993.

GERBER, J. S. e D. M. MOSSER. Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors. **J Immunol**, v.166, n.11, Jun 1, p.6861-8. 2001.

GILLIET, M. e Y. J. LIU. Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells. **Hum Immunol**, v.63, n.12, Dec, p.1149-55. 2002.

GOERDT, S. e C. E. ORFANOS. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. **Immunity**, v.10, n.2, Feb, p.137-42. 1999.

GOLPON, H. A., V. A. FADOK, L. TARASEVICIENE-STEWART, R. SCERBAVICIUS, C. SAUER, T. WELTE, P. M. HENSON e N. F. VOELKEL. Life after corpse engulfment:

phagocytosis of apoptotic cells leads to VEGF secretion and cell growth. **Faseb J**, v.18, n.14, Nov, p.1716-8. 2004.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, v.3, n.1, Jan, p.23-35. 2003.

GORDON, S. e P. R. TAYLOR. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol**, v.5, n.12, Dec, p.953-64. 2005.

GORDON, S. Macrophage-restricted molecules: role in differentiation and activation. **Immunol Lett**, v.65, n.1-2, Jan, p.5-8. 1999.

GOUGH, M. J., A. A. MELCHER, A. AHMED, M. R. CRITTENDEN, D. S. RIDDLE, E. LINARDAKIS, A. N. RUCHATZ, L. M. EMILIUSEN e R. G. VILE. Macrophages orchestrate the immune response to tumor cell death. **Cancer Res**, v.61, n.19, Oct 1, p.7240-7. 2001.

GRANGER, D. L., J. B. HIBBS, JR., J. R. PERFECT e D. T. DURACK. Metabolic fate of L-arginine in relation to microbiostatic capability of murine macrophages. **J Clin Invest**, v.85, n.1, Jan, p.264-73. 1990.

GRANUCCI, F., M. FOTI e P. RICCIARDI-CASTAGNOLI. Dendritic cell biology. **Adv Immunol**, v.88, p.193-233. 2005.

GRATCHEV, A., P. GUILLOT, N. HAKIY, O. POLITZ, C. E. ORFANOS, K. SCHLEDZEWSKI e S. GOERDT. Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein betaIG-H3. **Scand J Immunol**, v.53, n.4, Apr, p.386-92. 2001.

GREEN, D. R., T. FERGUSON, L. ZITVOGEL e G. KROEMER. Immunogenic and tolerogenic cell death. **Nat Rev Immunol**, v.9, n.5, May, p.353-63. 2009.

GREEN, L. C., D. A. WAGNER, J. GLOGOWSKI, P. L. SKIPPER, J. S. WISHNOK e S. R. TANNENBAUM. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v.126, n.1, Oct, p.131-8. 1982.

GREENBERG, M. E., M. SUN, R. ZHANG, M. FEBBRAIO, R. SILVERSTEIN e S. L. HAZEN. Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in

macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. **J Exp Med**, v.203, n.12, Nov 27, p.2613-25. 2006.

GREGORY, C. D. CD14-dependent clearance of apoptotic cells: relevance to the immune system. **Curr Opin Immunol**, v.12, n.1, Feb, p.27-34. 2000.

GREGORY, C. D. Phagocytic clearance of apoptotic cells: food for thought. **Cell Death Differ**, v.5, n.7, Jul, p.549-50. 1998.

GRIFFITH, T. S., T. BRUNNER, S. M. FLETCHER, D. R. GREEN e T. A. FERGUSON. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. **Science**, v.270, n.5239, Nov 17, p.1189-92. 1995.

GRONSKI, M. A., J. M. KINCHEN, I. J. JUNCADILLA, N. C. FRANC e K. S. RAVICHANDRAN. An essential role for calcium flux in phagocytes for apoptotic cell engulfment and the anti-inflammatory response. **Cell Death Differ**, v.16, n.10, Oct, p.1323-31. 2009.

GROUARD, G., M. C. RISSOAN, L. FILGUEIRA, I. DURAND, J. BANCHEREAU e Y. J. LIU. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. **J Exp Med**, v.185, n.6, Mar 17, p.1101-11. 1997.

GROUX, H., F. COTTREZ, M. ROULEAU, S. MAUZE, S. ANTONENKO, S. HURST, T. MCNEIL, M. BIGLER, M. G. RONCAROLO e R. L. COFFMAN. A transgenic model to analyze the immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen-presenting cells. **J Immunol**, v.162, n.3, Feb 1, p.1723-9. 1999.

GRUENHEID, S. e P. GROS. Genetic susceptibility to intracellular infections: Nramp1, macrophage function and divalent cations transport. **Curr Opin Microbiol**, v.3, n.1, Feb, p.43-8. 2000.

GUIMARAES-COSTA, A. B., M. T. NASCIMENTO, G. S. FROMENT, R. P. SOARES, F. N. MORGADO, F. CONCEICAO-SILVA e E. M. SARAIVA. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.106, n.16, Apr 21, p.6748-53. 2009.

Haidl, I. D. e W. A. JEFFERIES. The macrophage cell surface glycoprotein F4/80 is a highly glycosylated proteoglycan. **Eur J Immunol**, v.26, n.5, May, p.1139-46. 1996.

HAMMAD, S. M., T. A. TAHA, A. NAREIKA, K. R. JOHNSON, M. F. LOPES-VIRELLA e L. M. OBEID. Oxidized LDL immune complexes induce release of sphingosine kinase in human U937 monocytic cells. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v.79, n.1-2, Mar, p.126-40. 2006.

HANAYAMA, R., M. TANAKA, K. MIWA, A. SHINOHARA, A. IWAMATSU e S. NAGATA. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. **Nature**, v.417, n.6885, May 9, p.182-7. 2002.

HART, S. P., I. DRANSFIELD e A. G. ROSSI. Phagocytosis of apoptotic cells. **Methods**, v.44, n.3, Mar, p.280-5. 2008.

HART, S. P., K. M. ALEXANDER e I. DRANSFIELD. Immune complexes bind preferentially to Fc gamma RIIA (CD32) on apoptotic neutrophils, leading to augmented phagocytosis by macrophages and release of proinflammatory cytokines. **J Immunol**, v.172, n.3, Feb 1, p.1882-7. 2004.

HASLETT, C. Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. **Br Med Bull**, v.53, n.3, p.669-83. 1997.

HASLETT, C. Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. **Am J Respir Crit Care Med**, v.160, n.5 Pt 2, Nov, p.S5-11. 1999.

HEDRICH, C. M. e J. H. BREAM. Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease. **Immunol Res**, Jan 20. 2010. In press.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, n.6805, Oct 12, p.770-6. 2000.

HENRI, S., D. VREMEC, A. KAMATH, J. WAITHMAN, S. WILLIAMS, C. BENOIST, K. BURNHAM, S. SAELAND, E. HANDMAN e K. SHORTMAN. The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. **J Immunol**, v.167, n.2, Jul 15, p.741-8. 2001.

HENSON, P. M. e R. B. JOHNSTON, JR. Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. **J Clin Invest**, v.79, n.3, Mar, p.669-74. 1987.

HESSE, M., M. MODOLELL, A. C. LA FLAMME, M. SCHITO, J. M. FUENTES, A. W. CHEEVER, E. J. PEARCE e T. A. WYNN. 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**, v.167, n.11, Dec 1, p.6533-44. 2001.

HOEBE, K., E. JANSSEN e B. BEUTLER. The interface between innate and adaptive immunity. **Nat Immunol**, v.5, n.10, Oct, p.971-4. 2004.

HOHLBAUM, A. M., R. R. SAFF e A. MARSHAK-ROTHSTEIN. Fas-ligand--iron fist or Achilles' heel? **Clin Immunol**, v.103, n.1, Apr, p.1-6. 2002.

HOLCOMB, I. N., R. C. KABAKOFF, B. CHAN, T. W. BAKER, A. GURNEY, W. HENZEL, C. NELSON, H. B. LOWMAN, B. D. WRIGHT, N. J. SKELTON, G. D. FRANTZ, D. B. TUMAS, F. V. PEALE, JR., D. L. SHELTON e C. C. HEBERT. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. **Embo J**, v.19, n.15, Aug 1, p.4046-55. 2000.

HOLSCHER, C., B. ARENDSE, A. SCHWEGMANN, E. MYBURGH e F. BROMBACHER. Impairment of alternative macrophage activation delays cutaneous leishmaniasis in nonhealing BALB/c mice. **J Immunol**, v.176, n.2, Jan 15, p.1115-21. 2006.

HUGHES, J. E., S. SRINIVASAN, K. R. LYNCH, R. L. PROIA, P. FERDEK e C. C. HEDRICK. Sphingosine-1-phosphate induces an antiinflammatory phenotype in macrophages. **Circ Res**, v.102, n.8, Apr 25, p.950-8. 2008.

HUYNH, M. L., V. A. FADOK e P. M. HENSON. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. **J Clin Invest**, v.109, n.1, Jan, p.41-50. 2002.

INABA, K., M. INABA, N. ROMANI, H. AYA, M. DEGUCHI, S. IKEHARA, S. MURAMATSU e R. M. STEINMAN. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **J Exp Med**, v.176, n.6, Dec 1, p.1693-702. 1992.

INABA, K., S. TURLEY, F. YAMAIDE, T. IYODA, K. MAHNKE, M. INABA, M. PACK, M. SUBKLEWE, B. SAUTER, D. SHEFF, M. ALBERT, N. BHARDWAJ, I. MELLMAN e R. M. STEINMAN. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. **J Exp Med**, v.188, n.11, Dec 7, p.2163-73. 1998.

JANEWAY, C. A., JR. e R. MEDZHITOV. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**, v.20, p.197-216. 2002.

JANEWAY, C. A., JR. e R. MEDZHITOV. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. **Semin Immunol**, v.10, n.5, Oct, p.349-50. 1998.

JEHLE, A. W., S. J. GARDAI, S. LI, P. LINSEL-NITSCHKE, K. MORIMOTO, W. J. JANSSEN, R. W. VANDIVIER, N. WANG, S. GREENBERG, B. M. DALE, C. QIN, P. M. HENSON e A. R. TALL. ATP-binding cassette transporter A7 enhances phagocytosis of apoptotic cells and associated ERK signaling in macrophages. **J Cell Biol**, v.174, n.4, Aug 14, p.547-56. 2006.

JIANG, D., J. LIANG, J. FAN, S. YU, S. CHEN, Y. LUO, G. D. PRESTWICH, M. M. MASCARENHAS, H. G. GARG, D. A. QUINN, R. J. HOMER, D. R. GOLDSTEIN, R. BUCALA, P. J. LEE, R. MEDZHITOV e P. W. NOBLE. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. **Nat Med**, v.11, n.11, Nov, p.1173-9. 2005.

JIANG, H. e S. DHIB-JALBUT. Differential induction of IL-12 by IFN-beta and IFN-gamma in human macrophages. **J Interferon Cytokine Res**, v.18, n.9, Sep, p.697-703. 1998.

JOHANN, A. M., V. BARRA, A. M. KUHN, A. WEIGERT, A. VON KNETHEN e B. BRUNE. Apoptotic cells induce arginase II in macrophages, thereby attenuating NO production. **Faseb J**, v.21, n.11, Sep, p.2704-12. 2007.

JOHNSON, G. B., G. J. BRUNN e J. L. PLATT. Cutting edge: an endogenous pathway to systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-like reactions through Toll-like receptor 4. **J Immunol**, v.172, n.1, Jan 1, p.20-4. 2004.

JOHNSON, G. B., G. J. BRUNN, Y. KODAIRA e J. L. PLATT. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. **J Immunol**, v.168, n.10, May 15, p.5233-9. 2002.

JONULEIT, H., E. SCHMITT, K. STEINBRINK e A. H. ENK. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. **Trends Immunol**, v.22, n.7, Jul, p.394-400. 2001.

JULIUS, M. H., E. SIMPSON e L. A. HERZENBERG. A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. **Eur J Immunol**, v.3, n.10, Oct, p.645-9. 1973.

KANE, M. M. e D. M. MOSSER. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **J Immunol**, v.166, n.2, Jan 15, p.1141-7. 2001.

KANG, S. M., D. B. SCHNEIDER, Z. LIN, D. HANAHAN, D. A. DICHEK, P. G. STOCK e S. BAEKKESKOV. Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction. **Nat Med**, v.3, n.7, Jul, p.738-43. 1997.

KENNEDY, A. D. e F. R. DELEO. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. **Immunol Res**, v.43, n.1-3, p.25-61. 2009.

KENNEDY, A. D., J. A. WILLMENT, D. W. DORWARD, D. L. WILLIAMS, G. D. BROWN e F. R. DELEO. Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. **Eur J Immunol**, v.37, n.2, Feb, p.467-78. 2007.

KEY, N. S., J. L. PLATT e G. M. VERCELLOTTI. Vascular endothelial cell proteoglycans are susceptible to cleavage by neutrophils. **Arterioscler Thromb**, v.12, n.7, Jul, p.836-42. 1992.

KIM, S., K. B. ELKON e X. MA. Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. **Immunity**, v.21, n.5, Nov, p.643-53. 2004.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase. **Proc Assoc Am Physicians**, v.111, n.5, Sep-Oct, p.383-9. 1999.

KLEBANOFF, S. J., M. G. KINSELLA e T. N. WIGHT. Degradation of endothelial cell matrix heparan sulfate proteoglycan by elastase and the myeloperoxidase-H₂O₂-chloride system. **Am J Pathol**, v.143, n.3, Sep, p.907-17. 1993.

KOBAYASHI, K., L. D. HERNANDEZ, J. E. GALAN, C. A. JANEWAY, JR., R. MEDZHITOV e R. A. FLAVELL. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. **Cell**, v.110, n.2, Jul 26, p.191-202. 2002.

KOBAYASHI, S. D., J. M. VOYICH, C. BURLAK e F. R. DELEO. Neutrophils in the innate immune response. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v.53, n.6, Nov-Dec, p.505-17. 2005.

KRAMMER, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature**, v.407, n.6805, Oct 12, p.789-95. 2000.

KRUG, A., A. R. FRENCH, W. BARCHET, J. A. FISCHER, A. DZIOONEK, J. T. PINGEL, M. M. ORIHUELA, S. AKIRA, W. M. YOKOYAMA e M. COLONNA. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. **Immunity**, v.21, n.1, Jul, p.107-19. 2004.

KUHN, R., J. LOHLER, D. RENNICK, K. RAJEWSKY e W. MULLER. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, v.75, n.2, Oct 22, p.263-74. 1993.

KUSHWAH, R., J. R. OLIVER, J. ZHANG, K. A. SIMINOVITCH e J. HU. Apoptotic dendritic cells induce tolerance in mice through suppression of dendritic cell maturation and induction of antigen-specific regulatory T cells. **J Immunol**, v.183, n.11, Dec 1, p.7104-18. 2009.

KWON, B. S., K. B. TAN, J. NI, K. O. OH, Z. H. LEE, K. K. KIM, Y. J. KIM, S. WANG, R. GENTZ, G. L. YU, J. HARROP, S. D. LYN, C. SILVERMAN, T. G. PORTER, A. TRUNEH e P. R. YOUNG. A newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily with a wide tissue distribution and involvement in lymphocyte activation. **J Biol Chem**, v.272, n.22, May 30, p.14272-6. 1997.

LANDSMAN, L., C. VAROL e S. JUNG. Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. **J Immunol**, v.178, n.4, Feb 15, p.2000-7. 2007.

LANGRISH, C. L., Y. CHEN, W. M. BLUMENSCHIEIN, J. MATTSON, B. BASHAM, J. D. SEDGWICK, T. MCCLANAHAN, R. A. KASTELEIN e D. J. CUA. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **J Exp Med**, v.201, n.2, Jan 17, p.233-40. 2005.

LASKAY, T., G. VAN ZANDBERGEN e W. SOLBACH. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology**, v.213, n.3-4, p.183-91. 2008.

LEE, K. Y., S. C. HO, H. C. LIN, S. M. LIN, C. Y. LIU, C. D. HUANG, C. H. WANG, K. F. CHUNG e H. P. KUO. Neutrophil-derived elastase induces TGF-beta1 secretion in human airway smooth muscle via NF-kappaB pathway. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.35, n.4, Oct, p.407-14. 2006.

LENARDO, M., K. M. CHAN, F. HORNUNG, H. MCFARLAND, R. SIEGEL, J. WANG e L. ZHENG. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. **Annu Rev Immunol**, v.17, p.221-53. 1999.

LI, Y. M., G. BAVIELLO, H. VLASSARA e T. MITSUHASHI. Glycation products in aged thioglycollate medium enhance the elicitation of peritoneal macrophages. **J Immunol Methods**, v.201, n.2, Feb 28, p.183-8. 1997.

LIAO, F., H. S. SHIN e S. G. RHEE. Tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 induced by cross-linking of the high-affinity or low-affinity Fc receptor for IgG in U937 cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.89, n.8, Apr 15, p.3659-63. 1992.

LIEW, F. Y., H. LIU e D. XU. A novel negative regulator for IL-1 receptor and Toll-like receptor 4. **Immunol Lett**, v.96, n.1, Jan 15, p.27-31. 2005.

LOKE, P., A. S. MACDONALD, A. ROBB, R. M. MAIZELS e J. E. ALLEN. Alternatively activated macrophages induced by nematode infection inhibit proliferation via cell-to-cell contact. **Eur J Immunol**, v.30, n.9, Sep, p.2669-78. 2000.

LOPES, M. F. e G. A. DOSREIS. Experimental Chagas disease: phagocytosis of apoptotic lymphocytes deactivates macrophages and fuels parasite growth. **Apoptosis**, v.5, n.3, Jun, p.221-4. 2000.

LOPES, M. F., V. F. DA VEIGA, A. R. SANTOS, M. E. FONSECA e G. A. DOSREIS. Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. **J Immunol**, v.154, n.2, Jan 15, p.744-52. 1995.

LUCAS, M., L. M. STUART, A. ZHANG, K. HODIVALA-DILKE, M. FEBBRAIO, R. SILVERSTEIN, J. SAVILL e A. LACY-HULBERT. Requirements for apoptotic cell contact in regulation of macrophage responses. **J Immunol**, v.177, n.6, Sep 15, p.4047-54. 2006.

LUCAS, M., L. M. STUART, J. SAVILL e A. LACY-HULBERT. Apoptotic cells and innate immune stimuli combine to regulate macrophage cytokine secretion. **J Immunol**, v.171, n.5, Sep 1, p.2610-5. 2003.

LUCAS, M., X. ZHANG, V. PRASANNA e D. M. MOSSER. ERK activation following macrophage FcgammaR ligation leads to chromatin modifications at the IL-10 locus. **J Immunol**, v.175, n.1, Jul 1, p.469-77. 2005.

LUTZ, M. B., N. KUKUTSCH, A. L. OGILVIE, S. ROSSNER, F. KOCH, N. ROMANI e G. SCHULER. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. **J Immunol Methods**, v.223, n.1, Feb 1, p.77-92. 1999.

MACAGNO, A., G. NAPOLITANI, A. LANZAVECCHIA e F. SALLUSTO. Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. **Trends Immunol**, v.28, n.5, May, p.227-33. 2007.

MACMICKING, J., Q. W. XIE e C. NATHAN. Nitric oxide and macrophage function. **Annu Rev Immunol**, v.15, p.323-50. 1997.

MAHNKE, K., T. S. JOHNSON, S. RING e A. H. ENK. Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: a two-way relationship. **J Dermatol Sci**, v.46, n.3, Jun, p.159-67. 2007.

MANTOVANI, A., A. SICA e M. LOCATI. Macrophage polarization comes of age. **Immunity**, v.23, n.4, Oct, p.344-6. 2005.

MANTOVANI, A., A. SICA, S. SOZZANI, P. ALLAVENA, A. VECCHI e M. LOCATI. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**, v.25, n.12, Dec, p.677-86. 2004.

MANZ, M. G., D. TRAVER, T. MIYAMOTO, I. L. WEISSMAN e K. AKASHI. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. **Blood**, v.97, n.11, Jun 1, p.3333-41. 2001.

MARTÍN, P., G. M. DEL HOYO, F. ANJUERE, C. F. ARIAS, H. H. VARGAS, L. A. FERNANDEZ, V. PARRILLAS e C. ARDAVIN. Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha⁺ B220⁺ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. **Blood**, v.100, n.2, Jul 15, p.383-90. 2002.

MARTIN, S. J., C. P. REUTELINGSPERGER, A. J. MCGAHON, J. A. RADER, R. C. VAN SCHIE, D. M. LAFACE e D. R. GREEN. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **J Exp Med**, v.182, n.5, Nov 1, p.1545-56. 1995.

MARTINEZ, F. O., A. SICA, A. MANTOVANI e M. LOCATI. Macrophage activation and polarization. **Front Biosci**, v.13, p.453-61. 2008.

MARTINEZ, F. O., S. GORDON, M. LOCATI e A. MANTOVANI. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. **J Immunol**, v.177, n.10, Nov 15, p.7303-11. 2006.

MATZINGER, P. The danger model: a renewed sense of self. **Science**, v.296, n.5566, Apr 12, p.301-5. 2002.

MEDVEDEV, A. E., K. M. KOPYDLOWSKI e S. N. VOGEL. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. **J Immunol**, v.164, n.11, Jun 1, p.5564-74. 2000.

MEDZHITOV, R. e C. A. JANEWAY, JR. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**, v.296, n.5566, Apr 12, p.298-300. 2002.

MEDZHITOV, R. e C. A. JANEWAY, JR. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell**, v.91, n.3, Oct 31, p.295-8. 1997.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v.449, n.7164, Oct 18, p.819-26. 2007.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v.1, n.2, Nov, p.135-45. 2001.

MEIER, P., A. FINCH e G. EVAN. Apoptosis in development. **Nature**, v.407, n.6805, Oct 12, p.796-801. 2000.

MEYER-HOFFERT, U. Neutrophil-derived serine proteases modulate innate immune responses. **Front Biosci**, v.14, p.3409-18. 2009.

MIKOLAJCZYK, T. P., J. E. SKRZECZYNSKA-MONCZNIK, M. A. ZAREBSKI, E. A. MAREWICZ, A. M. WISNIEWSKA, M. DZIEBA, J. W. DOBRUCKI e J. R. PRYJMA. Interaction of human peripheral blood monocytes with apoptotic polymorphonuclear cells. **Immunology**, v.128, n.1, Sep, p.103-13. 2009.

MILES, S. A., S. M. CONRAD, R. G. ALVES, S. M. JERONIMO e D. M. MOSSER. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. **J Exp Med**, v.201, n.5, Mar 7, p.747-54. 2005.

MILLS, C. D., K. KINCAID, J. M. ALT, M. J. HEILMAN e A. M. HILL. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **J Immunol**, v.164, n.12, Jun 15, p.6166-73. 2000.

MINKO, T., P. KOPECKOVA e J. KOPECEK. Preliminary evaluation of caspases-dependent apoptosis signaling pathways of free and HPMA copolymer-bound doxorubicin in human ovarian carcinoma cells. **J Control Release**, v.71, n.3, Apr 28, p.227-37. 2001.

MIWA, K., M. ASANO, R. HORAI, Y. IWAKURA, S. NAGATA e T. SUDA. Caspase 1-independent IL-1 β release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. **Nat Med**, v.4, n.11, Nov, p.1287-92. 1998.

MIYAKE, Y., K. ASANO, H. KAISE, M. UEMURA, M. NAKAYAMA e M. TANAKA. Critical role of macrophages in the marginal zone in the suppression of immune responses to apoptotic cell-associated antigens. **J Clin Invest**, v.117, n.8, Aug, p.2268-78. 2007.

MODOLELL, M., I. M. CORRALIZA, F. LINK, G. SOLER e K. EICHMANN. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. **Eur J Immunol**, v.25, n.4, Apr, p.1101-4. 1995.

MOLD, C., R. BACA e T. W. DU CLOS. Serum amyloid P component and C-reactive protein opsonize apoptotic cells for phagocytosis through Fc γ receptors. **J Autoimmun**, v.19, n.3, Nov, p.147-54. 2002.

MOREIRA, M. E. e M. A. BARCINSKI. Apoptotic cell and phagocyte interplay: recognition and consequences in different cell systems. **An Acad Bras Cienc**, v.76, n.1, Mar, p.93-115. 2004.

MORELLI, A. E., A. F. ZAHORCHAK, A. T. LARREGINA, B. L. COLVIN, A. J. LOGAR, T. TAKAYAMA, L. D. FALO e A. W. THOMSON. Cytokine production by mouse myeloid dendritic cells in relation to differentiation and terminal maturation induced by lipopolysaccharide or CD40 ligation. **Blood**, v.98, n.5, Sep 1, p.1512-23. 2001.

MOSSER, D. M. e J. P. EDWARDS. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**, v.8, n.12, Dec, p.958-69. 2008.

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **J Leukoc Biol**, v.73, n.2, Feb, p.209-12. 2003.

MURAI, M., O. TUROVSKAYA, G. KIM, R. MADAN, C. L. KARP, H. CHEROUTRE e M. KRONENBERG. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. **Nat Immunol**, v.10, n.11, Nov, p.1178-84. 2009.

MURRAY, J., J. A. BARBARA, S. A. DUNKLEY, A. F. LOPEZ, X. VAN OSTADE, A. M. CONDLIFFE, I. DRANSFIELD, C. HASLETT e E. R. CHILVERS. Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro. **Blood**, v.90, n.7, Oct 1, p.2772-83. 1997.

NAKANO, H., M. YANAGITA e M. D. GUNN. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. **J Exp Med**, v.194, n.8, Oct 15, p.1171-8. 2001.

NATHAN, C. Metchnikoff's Legacy in 2008. **Nat Immunol**, v.9, n.7, Jul, p.695-8. 2008.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat Rev Immunol**, v.6, n.3, Mar, p.173-82. 2006.

NEWMAN, S. L., J. E. HENSON e P. M. HENSON. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. **J Exp Med**, v.156, n.2, Aug 1, p.430-42. 1982.

NIGG, A. P., S. ZAHN, D. RUCKERL, C. HOLSCHER, T. YOSHIMOTO, J. M. EHRCHEIN, F. WOLBING, M. C. UDEY e E. VON STEBUT. Dendritic cell-derived IL-12p40 homodimer contributes to susceptibility in cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **J Immunol**, v.178, n.11, Jun 1, p.7251-8. 2007.

NIMMERJAHN, F. e J. V. RAVETCH. Fcgamma receptors as regulators of immune responses. **Nat Rev Immunol**, v.8, n.1, Jan, p.34-47. 2008.

NUNES, M. P., R. M. ANDRADE, M. F. LOPES e G. A. DOSREIS. Activation-induced T cell death exacerbates Trypanosoma cruzi replication in macrophages cocultured with CD4+ T lymphocytes from infected hosts. **J Immunol**, v.160, n.3, Feb 1, p.1313-9. 1998.

ODIN, J. A., J. C. EDBERG, C. J. PAINTER, R. P. KIMBERLY e J. C. UNKELESS. Regulation of phagocytosis and [Ca²⁺]_i flux by distinct regions of an Fc receptor. **Science**, v.254, n.5039, Dec 20, p.1785-8. 1991.

OFEK, I., J. GOLDHAR, Y. KEISARI e N. SHARON. Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. **Annu Rev Microbiol**, v.49, p.239-76. 1995.

O'GARRA, A. e K. M. MURPHY. From IL-10 to IL-12: how pathogens and their products stimulate APCs to induce T(H)1 development. **Nat Immunol**, v.10, n.9, Sep, p.929-32. 2009.

OGDEN, C. A., A. DECATHELINEAU, P. R. HOFFMANN, D. BRATTON, B. GHEBREHIWET, V. A. FADOK e P. M. HENSON. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. **J Exp Med**, v.194, n.6, Sep 17, p.781-95. 2001.

O'SHEA, J. J. e P. J. MURRAY. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. **Immunity**, v.28, n.4, Apr, p.477-87. 2008.

PALANIYAR, N., J. NADESALINGAM, H. CLARK, M. J. SHIH, A. W. DODDS e K. B. REID. Nucleic acid is a novel ligand for innate, immune pattern recognition collectins surfactant proteins A and D and mannose-binding lectin. **J Biol Chem**, v.279, n.31, Jul 30, p.32728-36. 2004.

PATEL, V. A., A. LONGACRE, K. HSIAO, H. FAN, F. MENG, J. E. MITCHELL, J. RAUCH, D. S. UCKER e J. S. LEVINE. Apoptotic cells, at all stages of the death process, trigger characteristic signaling events that are divergent from and dominant over those triggered by necrotic cells: Implications for the delayed clearance model of autoimmunity. **J Biol Chem**, v.281, n.8, Feb 24, p.4663-70. 2006.

PERSKVIST, N., M. LONG, O. STENDAHL e L. ZHENG. Mycobacterium tuberculosis promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/Bcl-xL via an oxygen-dependent pathway. **J Immunol**, v.168, n.12, Jun 15, p.6358-65. 2002.

PHAM, C. T. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. **Nat Rev Immunol**, v.6, n.7, Jul, p.541-50. 2006.

POZZI, L. A., J. W. MACIASZEK e K. L. ROCK. Both dendritic cells and macrophages can stimulate naive CD8 T cells in vivo to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells. **J Immunol**, v.175, n.4, Aug 15, p.2071-81. 2005.

PRADHAN, D., S. KRAHLING, P. WILLIAMSON e R. A. SCHLEGEL. Multiple systems for recognition of apoptotic lymphocytes by macrophages. **Mol Biol Cell**, v.8, n.5, May, p.767-78. 1997.

RAES, G., A. BESCHIN, G. H. GHASSABEH e P. DE BAETSELIER. Alternatively activated macrophages in protozoan infections. **Curr Opin Immunol**, v.19, n.4, Aug, p.454-9. 2007.

RAES, G., W. NOEL, A. BESCHIN, L. BRYN, P. DE BAETSELIER e G. H. HASSANZADEH. FIZZ1 and Ym as tools to discriminate between differentially activated macrophages. **Dev Immunol**, v.9, n.3, Sep, p.151-9. 2002.

RAINER, G. E., A. F. ROWLEY e G. B. NASH. Adhesion-dependent release of elastase from human neutrophils in a novel, flow-based model: specificity of different chemotactic agents. **Blood**, v.92, n.12, Dec 15, p.4819-27. 1998.

RASMUSSEN, P. B., S. BJORN, S. HASTRUP, P. F. NIELSEN, K. NORRIS, L. THIM, F. C. WIBERG e H. FLODGAARD. Characterization of recombinant human HBP/CAP37/azurocidin, a pleiotropic mediator of inflammation-enhancing LPS-induced cytokine release from monocytes. **FEBS Lett**, v.390, n.1, Jul 15, p.109-12. 1996.

RAVICHANDRAN, K. S. e U. LORENZ. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. **Nat Rev Immunol**, v.7, n.12, Dec, p.964-74. 2007.

REDECKE, V., H. HACKER, S. K. DATTA, A. FERMIN, P. M. PITHA, D. H. BROIDE e E. RAZ. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. **J Immunol**, v.172, n.5, Mar 1, p.2739-43. 2004.

REEVES, E. P., H. LU, H. L. JACOBS, C. G. MESSINA, S. BOLSOVER, G. GABELLA, E. O. POTMA, A. WARLEY, J. ROES e A. W. SEGAL. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. **Nature**, v.416, n.6878, Mar 21, p.291-7. 2002.

REN, Y. e J. SAVILL. Apoptosis: the importance of being eaten. **Cell Death Differ**, v.5, n.7, Jul, p.563-8. 1998.

RESTIFO, N. P. Building better vaccines: how apoptotic cell death can induce inflammation and activate innate and adaptive immunity. **Curr Opin Immunol**, v.12, n.5, Oct, p.597-603. 2000.

RIBEIRO-GOMES, F. L., A. C. OTERO, N. A. GOMES, M. C. MONIZ-DE-SOUZA, L. CYSNE-FINKELSTEIN, A. C. ARNHOLDT, V. L. CALICH, S. G. COUTINHO, M. F. LOPES e G. A. DOSREIS. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania* major infection. **J Immunol**, v.172, n.7, Apr 1, p.4454-62. 2004.

RIBEIRO-GOMES, F. L., M. C. MONIZ-DE-SOUZA, M. S. ALEXANDRE-MOREIRA, W. B. DIAS, M. F. LOPES, M. P. NUNES, G. LUNGARELLA e G. A. DOSREIS. Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania* major through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. **J Immunol**, v.179, n.6, Sep 15, p.3988-94. 2007.

RIBEIRO-GOMES, F. L., M. C. MONIZ-DE-SOUZA, V. M. BORGES, M. P. NUNES, M. MANTUANO-BARRADAS, H. D'AVILA, P. T. BOZZA, V. L. CALICH e G. A. DOSREIS. Turnover of neutrophils mediated by Fas ligand drives *Leishmania* major infection. **J Infect Dis**, v.192, n.6, Sep 15, p.1127-34. 2005.

RICOTE, M., J. HUANG, L. FAJAS, A. LI, J. WELCH, J. NAJIB, J. L. WITZTUM, J. AUWERX, W. PALINSKI e C. K. GLASS. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95, n.13, Jun 23, p.7614-9. 1998.

RIFKIN, I. R., E. A. LEADBETTER, L. BUSCONI, G. VIGLIANTI e A. MARSHAK-ROTHSTEIN. Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. **Immunol Rev**, v.204, Apr, p.27-42. 2005.

ROSENKILDE, M. M. e T. W. SCHWARTZ. The chemokine system -- a major regulator of angiogenesis in health and disease. **Apms**, v.112, n.7-8, Jul-Aug, p.481-95. 2004.

RUBARTELLI, A., A. POGGI e M. R. ZOCCHI. The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the alpha(v)beta3 integrin and requires intracellular and extracellular calcium. **Eur J Immunol**, v.27, n.8, Aug, p.1893-900. 1997.

SATO, K. e S. FUJITA. Dendritic cells: nature and classification. **Allergol Int**, v.56, n.3, Sep, p.183-91. 2007.

SAUTER, B., M. L. ALBERT, L. FRANCISCO, M. LARSSON, S. SOMERSAN e N. BHARDWAJ. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. **J Exp Med**, v.191, n.3, Feb 7, p.423-34. 2000.

SAVILL, J. e V. FADOK. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**, v.407, n.6805, Oct 12, p.784-8. 2000.

SAVILL, J. S., P. M. HENSON e C. HASLETT. Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism. **J Clin Invest**, v.84, n.5, Nov, p.1518-27. 1989.

SAVILL, J., I. DRANSFIELD, C. GREGORY e C. HASLETT. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. **Nat Rev Immunol**, v.2, n.12, Dec, p.965-75. 2002.

SAVILL, J., I. DRANSFIELD, N. HOGG e C. HASLETT. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. **Nature**, v.343, n.6254, Jan 11, p.170-3. 1990.

SCHIFFER, L., R. BETHUNAICKAN, M. RAMANUJAM, W. HUANG, M. SCHIFFER, H. TAO, M. P. MADAIO, E. P. BOTTINGER e A. DAVIDSON. Activated renal macrophages are markers of disease onset and disease remission in lupus nephritis. **J Immunol**, v.180, n.3, Feb 1, p.1938-47. 2008.

SCHNARE, M., G. M. BARTON, A. C. HOLT, K. TAKEDA, S. AKIRA e R. MEDZHITOV. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. **Nat Immunol**, v.2, n.10, Oct, p.947-50. 2001.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annu Rev Immunol**, v.23, p.197-223. 2005.

SEINO, K., N. KAYAGAKI, K. OKUMURA e H. YAGITA. Antitumor effect of locally produced CD95 ligand. **Nat Med**, v.3, n.2, Feb, p.165-70. 1997.

SENGELOV, H., L. KJELDSEN e N. BORREGAARD. Control of exocytosis in early neutrophil activation. **J Immunol**, v.150, n.4, Feb 15, p.1535-43. 1993.

SEVERN, A., D. XU, J. DOYLE, L. M. LEAL, C. A. O'DONNELL, S. J. BRETT, D. W. MOSS e F. Y. LIEW. Pre-exposure of murine macrophages to lipopolysaccharide inhibits the induction of nitric oxide synthase and reduces leishmanicidal activity. **Eur J Immunol**, v.23, n.7, Jul, p.1711-4. 1993.

SHIMIZU, J., S. YAMAZAKI e S. SAKAGUCHI. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. **J Immunol**, v.163, n.10, Nov 15, p.5211-8. 1999.

SHORTMAN, K. e Y. J. LIU. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nat Rev Immunol**, v.2, n.3, Mar, p.151-61. 2002.

SILVA, M. T. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. **J Leukoc Biol**, v.87, n.1, Jan, p.93-106. 2010.

SIROIS, J., G. MENARD, A. S. MOSES e E. Y. BISSONNETTE. Importance of histamine in the cytokine network in the lung through H2 and H3 receptors: stimulation of IL-10 production. **J Immunol**, v.164, n.6, Mar 15, p.2964-70. 2000.

SOEHNLEIN, O. An elegant defense: how neutrophils shape the immune response. **Trends Immunol**, v.30, n.11, Nov, p.511-2. 2009.

SOHN, J. H., P. S. BORA, H. J. SUK, H. MOLINA, H. J. KAPLAN e N. S. BORA. Tolerance is dependent on complement C3 fragment iC3b binding to antigen-presenting cells. **Nat Med**, v.9, n.2, Feb, p.206-12. 2003.

STEIN, M., S. KESHAV, N. HARRIS e S. GORDON. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. **J Exp Med**, v.176, n.1, Jul 1, p.287-92. 1992.

STEINBERG, B. E. e S. GRINSTEIN. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. **Sci STKE**, v.2007, n.379, Mar 27, p.pe11. 2007.

STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. **Mt Sinai J Med**, v.68, n.3, May, p.160-6. 2001.

STEINMAN, R. M. e Z. A. COHN. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **J Exp Med**, v.137, n.5, May 1, p.1142-62. 1973.

STEINMAN, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annu Rev Immunol**, v.9, p.271-96. 1991.

STEINMAN, R. M., D. S. LUSTIG e Z. A. COHN. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. **J Exp Med**, v.139, n.6, Jun 1, p.1431-45. 1974.

STEINMAN, R. M., S. TURLEY, I. MELLMAN e K. INABA. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. **J Exp Med**, v.191, n.3, Feb 7, p.411-6. 2000.

STEIN-STREILEIN, J. Immune regulation and the eye. **Trends Immunol**, v.29, n.11, Nov, p.548-54. 2008.

STENGER, S., W. SOLBACH, M. ROLLINGHOFF e C. BOGDAN. Cytokine interactions in experimental cutaneous leishmaniasis. II. Endogenous tumor necrosis factor-alpha production by macrophages is induced by the synergistic action of interferon (IFN)-gamma and interleukin (IL) 4 and accounts for the antiparasitic effect mediated by IFN-gamma and IL 4. **Eur J Immunol**, v.21, n.7, Jul, p.1669-75. 1991.

STOUT, R. D., C. JIANG, B. MATTA, I. TIETZEL, S. K. WATKINS e J. SUTTLES. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. **J Immunol**, v.175, n.1, Jul 1, p.342-9. 2005.

STRASSER, A., L. O'CONNOR e V. M. DIXIT. Apoptosis signaling. **Annu Rev Biochem**, v.69, p.217-45. 2000.

STRASSMANN, G., V. PATIL-KOOTA, F. FINKELMAN, M. FONG e T. KAMBAYASHI. Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2. **J Exp Med**, v.180, n.6, Dec 1, p.2365-70. 1994.

STUART, L. M., M. LUCAS, C. SIMPSON, J. LAMB, J. SAVILL e A. LACY-HULBERT. Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. **J Immunol**, v.168, n.4, Feb 15, p.1627-35. 2002.

STUEHR, D. J. e C. F. NATHAN. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **J Exp Med**, v.169, n.5, May 1, p.1543-55. 1989.

SUTTERWALA, F. S. e D. M. MOSSER. The taming of IL-12: suppressing the production of proinflammatory cytokines. **J Leukoc Biol**, v.65, n.5, May, p.543-51. 1999.

SUTTERWALA, F. S., G. J. NOEL, P. SALGAME e D. M. MOSSER. Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fcgamma receptor type I. **J Exp Med**, v.188, n.1, Jul 6, p.217-22. 1998.

SUTTERWALA, F. S., G. J. NOEL, R. CLYNES e D. M. MOSSER. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. **J Exp Med**, v.185, n.11, Jun 2, p.1977-85. 1997.

TAKIZAWA, F., S. TSUJI e S. NAGASAWA. Enhancement of macrophage phagocytosis upon iC3b deposition on apoptotic cells. **FEBS Lett**, v.397, n.2-3, Nov 18, p.269-72. 1996.

TAMADA, K., K. SHIMOZAKI, A. I. CHAPOVAL, Y. ZHAI, J. SU, S. F. CHEN, S. L. HSIEH, S. NAGATA, J. NI e L. CHEN. LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response. **J Immunol**, v.164, n.8, Apr 15, p.4105-10. 2000.

TAYLOR, P. R., S. GORDON e L. MARTINEZ-POMARES. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. **Trends Immunol**, v.26, n.2, Feb, p.104-10. 2005.

TERMEER, C., F. BENEDIX, J. SLEEMAN, C. FIEBER, U. VOITH, T. AHRENS, K. MIYAKE, M. FREUDENBERG, C. GALANOS e J. C. SIMON. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. **J Exp Med**, v.195, n.1, Jan 7, p.99-111. 2002.

THORNBERRY, N. A. e Y. LAZEBNIK. Caspases: enemies within. **Science**, v.281, n.5381, Aug 28, p.1312-6. 1998.

TOMASINSIG, L., C. PIZZIRANI, B. SKERLAVAJ, P. PELLEGGATTI, S. GULINELLI, A. TOSSI, F. DI VIRGILIO e M. ZANETTI. The human cathelicidin LL-37 modulates the activities of the P2X7 receptor in a structure-dependent manner. **J Biol Chem**, v.283, n.45, Nov 7, p.30471-81. 2008.

TORCHINSKY, M. B., J. GARAUDE, A. P. MARTIN e J. M. BLANDER. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. **Nature**, v.458, n.7234, Mar 5, p.78-82. 2009.

TOROCSIK, D., H. BARDOS, L. NAGY e R. ADANY. Identification of factor XIII-A as a marker of alternative macrophage activation. **Cell Mol Life Sci**, v.62, n.18, Sep, p.2132-9. 2005.

TRIPP, C. S., K. P. BECKERMAN e E. R. UNANUE. Immune complexes inhibit antimicrobial responses through interleukin-10 production. Effects in severe combined immunodeficient mice during *Listeria* infection. **J Clin Invest**, v.95, n.4, Apr, p.1628-34. 1995.

TROTTEIN, F., L. SCHAFFER, S. IVANOV, C. PAGET, C. VENDEVILLE, A. CAZET, S. GROUX-DEGROOTE, S. LEE, M. A. KRZEWSKI-RECCHI, C. FAVEEUW, S. R. HEAD, P. GOSSET e P. DELANNOY. Glycosyltransferase and sulfotransferase gene expression profiles in human monocytes, dendritic cells and macrophages. **Glycoconj J**, v.26, n.9, Dec, p.1259-74. 2009.

TSUJIMOTO, H., S. ONO, T. MAJIMA, N. KAWARABAYASHI, E. TAKAYAMA, M. KINOSHITA, S. SEKI, H. HIRAIDE, L. L. MOLDAWER e H. MOCHIZUKI. Neutrophil elastase, MIP-2, and TLR-4 expression during human and experimental sepsis. **Shock**, v.23, n.1, Jan, p.39-44. 2005.

TSUYUKI, S., C. BERTRAND, F. ERARD, A. TRIFILIEFF, J. TSUYUKI, M. WESP, G. P. ANDERSON e A. J. COYLE. Activation of the Fas receptor on lung eosinophils leads to apoptosis and the resolution of eosinophilic inflammation of the airways. **J Clin Invest**, v.96, n.6, Dec, p.2924-31. 1995.

UNDERHILL, D. M. e B. GANTNER. Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. **Microbes Infect**, v.6, n.15, Dec, p.1368-73. 2004.

URBAN, B. C., T. MWANGI, A. ROSS, S. KINYANJUI, M. MOSOBO, O. KAI, B. LOWE, K. MARSH e D. J. ROBERTS. Peripheral blood dendritic cells in children with acute *Plasmodium falciparum* malaria. **Blood**, v.98, n.9, Nov 1, p.2859-61. 2001.

UTHAISANGSOOK, S., N. K. DAY, S. L. BAHNA, R. A. GOOD e S. HARAGUCHI. Innate immunity and its role against infections. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v.88, n.3, Mar, p.253-64; quiz 265-6, 318. 2002.

VALLEDOR, A. F. e M. RICOTE. Nuclear receptor signaling in macrophages. **Biochem Pharmacol**, v.67, n.2, Jan 15, p.201-12. 2004.

VAN FURTH, R. e Z. A. COHN. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. **J Exp Med**, v.128, n.3, Sep 1, p.415-35. 1968.

VAN GINDERACHTER, J. A., K. MOVAHEDI, G. HASSANZADEH GHASSABEH, S. MEERSCHAUT, A. BESCHIN, G. RAES e P. DE BAETSELIER. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. **Immunobiology**, v.211, n.6-8, p.487-501. 2006.

VAN KOOYK, Y. e T. B. GEIJTENBEEK. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. **Nat Rev Immunol**, v.3, n.9, Sep, p.697-709. 2003.

VAN PARIJS, L., A. IBRAGHIMOV e A. K. ABBAS. The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. **Immunity**, v.4, n.3, Mar, p.321-8. 1996.

VANDIVIER, R. W., C. A. OGDEN, V. A. FADOK, P. R. HOFFMANN, K. K. BROWN, M. BOTTO, M. J. WALPORT, J. H. FISHER, P. M. HENSON e K. E. GREENE. Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. **J Immunol**, v.169, n.7, Oct 1, p.3978-86. 2002.

VILLADANGOS, J. A. e P. SCHNORRER. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. **Nat Rev Immunol**, v.7, n.7, Jul, p.543-55. 2007.

VISINTIN, A., A. MAZZONI, J. H. SPITZER, D. H. WYLLIE, S. K. DOWER e D. M. SEGAL. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. **J Immunol**, v.166, n.1, Jan 1, p.249-55. 2001.

VOLL, R. E., M. HERRMANN, E. A. ROTH, C. STACH, J. R. KALDEN e I. GIRKONTAITE. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. **Nature**, v.390, n.6658, Nov 27, p.350-1. 1997.

WAGNER, H. Endogenous TLR ligands and autoimmunity. **Adv Immunol**, v.91, p.159-73. 2006.

WANG, J., G. RODERIQUEZ, T. ORAVECZ e M. A. NORCROSS. Cytokine regulation of human immunodeficiency virus type 1 entry and replication in human monocytes/macrophages through modulation of CCR5 expression. **J Virol**, v.72, n.9, Sep, p.7642-7. 1998.

WEBER, M. S., T. PROD'HOMME, S. YOUSSEF, S. E. DUNN, C. D. RUNDLE, L. LEE, J. C. PATARROYO, O. STUVE, R. A. SOBEL, L. STEINMAN e S. S. ZAMVIL. Type II

monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. **Nat Med**, v.13, n.8, Aug, p.935-43. 2007.

WEGROWSKI, Y. e F. X. MAQUART. Chondroitin sulfate proteoglycans in tumor progression. **Adv Pharmacol**, v.53, p.297-321. 2006.

WEIGERT, A., A. M. JOHANN, A. VON KNETHEN, H. SCHMIDT, G. GEISSLINGER e B. BRUNE. Apoptotic cells promote macrophage survival by releasing the antiapoptotic mediator sphingosine-1-phosphate. **Blood**, v.108, n.5, Sep 1, p.1635-42. 2006.

WEIGERT, A., N. TZIEPLY, A. VON KNETHEN, A. M. JOHANN, H. SCHMIDT, G. GEISSLINGER e B. BRUNE. Tumor cell apoptosis polarizes macrophages role of sphingosine-1-phosphate. **Mol Biol Cell**, v.18, n.10, Oct, p.3810-9. 2007.

WEIGERT, A., N. WEIS e B. BRUNE. Regulation of macrophage function by sphingosine-1-phosphate. **Immunobiology**, v.214, n.9-10, p.748-60. 2009.

WEIS, N., A. WEIGERT, A. VON KNETHEN e B. BRUNE. Heme oxygenase-1 contributes to an alternative macrophage activation profile induced by apoptotic cell supernatants. **Mol Biol Cell**, v.20, n.5, Mar, p.1280-8. 2009.

WHYTE, M. K., L. C. MEAGHER, J. MACDERMOT e C. HASLETT. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. **J Immunol**, v.150, n.11, Jun 1, p.5124-34. 1993.

WU, L. e Y. J. LIU. Development of dendritic-cell lineages. **Immunity**, v.26, n.6, Jun, p.741-50. 2007.

WU, W., R. D. MOSTELLER e D. BROEK. Sphingosine kinase protects lipopolysaccharide-activated macrophages from apoptosis. **Mol Cell Biol**, v.24, n.17, Sep, p.7359-69. 2004.

YAMAMOTO, M., S. SATO, H. HEMMI, K. HOSHINO, T. KAISHO, H. SANJO, O. TAKEUCHI, M. SUGIYAMA, M. OKABE, K. TAKEDA e S. AKIRA. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. **Science**, v.301, n.5633, Aug 1, p.640-3. 2003.

YAMAZAKI, S. e R. M. STEINMAN. Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3⁺ regulatory T cells. **J Dermatol Sci**, v.54, n.2, May, p.69-75. 2009.

YANG, Z., D. M. MOSSER e X. ZHANG. Activation of the MAPK, ERK, following *Leishmania amazonensis* infection of macrophages. **J Immunol**, v.178, n.2, Jan 15, p.1077-85. 2007.

YAWALKAR, N., G. G. TSCHARNER, R. E. HUNGER e A. S. HASSAN. Increased expression of IL-12p70 and IL-23 by multiple dendritic cell and macrophage subsets in plaque psoriasis. **J Dermatol Sci**, v.54, n.2, May, p.99-105. 2009.

YOSHIDA, Y., K. KANG, M. BERGER, G. CHEN, A. C. GILLIAM, A. MOSER, L. WU, C. HAMMERBERG e K. D. COOPER. Monocyte induction of IL-10 and down-regulation of IL-12 by iC3b deposited in ultraviolet-exposed human skin. **J Immunol**, v.161, n.11, Dec 1, p.5873-9. 1998.

YRLID, U., C. D. JENKINS e G. G. MACPHERSON. Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions. **J Immunol**, v.176, n.7, Apr 1, p.4155-62. 2006.

ZHANG, X., J. P. EDWARDS e D. M. MOSSER. Dynamic and transient remodeling of the macrophage IL-10 promoter during transcription. **J Immunol**, v.177, n.2, Jul 15, p.1282-8. 2006.

ZHENG, L., M. HE, M. LONG, R. BLOMGRAN e O. STENDAHL. Pathogen-induced apoptotic neutrophils express heat shock proteins and elicit activation of human macrophages. **J Immunol**, v.173, n.10, Nov 15, p.6319-26. 2004.

ZHU, Z., T. ZHENG, R. J. HOMER, Y. K. KIM, N. Y. CHEN, L. COHN, Q. HAMID e J. A. ELIAS. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. **Science**, v.304, n.5677, Jun 11, p.1678-82. 2004.

ZIEGLER, U. e P. GROSCURTH. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci**, v.19, Jun, p.124-8. 2004.

ZITVOGEL, L. Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity. **J Exp Med**, v.195, n.3, Feb 4, p.F9-14. 2002.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)