



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CARLA APARECIDA CECILIO

***“IMUNIDADE E ENVELHECIMENTO: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO
DE ARGINASE E SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO POR
MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS”.***

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Carla Aparecida Cecilio
Wirla Maria S. C. Tamashiro
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia para obtenção do
Título de Doutor em Genética
e Biologia Molecular, na área
de Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Wirla Maria S. C. Tamashiro

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

C324i Cecilio, Carla Aparecida, 1967-
Imunidade e envelhecimento: avaliação da produção de arginase e sintase do óxido nítrico por macrófagos de camundongos / Carla Aparecida Cecilio. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Envelhecimento. 2. Camundongo. 3. Macrófagos. 4. Arginase. 5. Óxido nítrico. I. Tamashiro, Wirla Maria da Silva Cunha, 1950-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Immunity and aging: evaluation of the production of arginase and nitric oxide synthase by mouse macrophages

Palavras-chave em Inglês:

Aging

Mice

Macrophages

Arginase

Nitric oxide

Área de concentração: Imunologia

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro [Orientador]

Selma Giorgio

Liana Maria Cardoso Verinaud

Heloisa Helena de Araújo Ferreira

Maria Cristina Roque Barreira

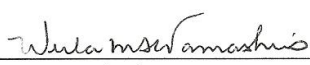
Data da defesa: 11-08-2011

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

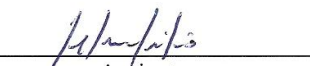
Campinas, 11 de agosto de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro
(Orientadora)


Assinatura

Profª. Dra. Selma Giorgio


Assinatura

Profª. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud


Assinatura

Profª. Dra. Heloisa Helena de Araújo Ferreira


Assinatura

Profª. Dra. Maria Cristina Roque-Barreira


Assinatura

Prof. Dr. Edson Antunes

Assinatura

Profª. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado

Assinatura

Profª. Dra. Sara de Jesus Oliveira

Assinatura

- À DEUS, minha “força maior”, onde eu encontrei as soluções para tudo, que me deu a
oportunidade de aprender e de ser o que sou.

“O Amor De Deus Dá Sentido À Vida” (Salmo 63).

- Aos meus pais, Maria e Maurílio, meus exemplos de vida e amor, pelo incentivo,
apoio e compreensão em todos os momentos de meus estudos.

- Às minhas irmãs, Cássia e Salete, pela especial presença em minha vida.

- Ao meu esposo, Shinji, por estimular a minha caminhada.

- À minha filha, Maria Clara, “minha vida”, que parecia compreender quando eu sugeria
que brincássemos mais tarde enquanto eu montava as apresentações da tese.

AGRADECIMENTOS

- À minha orientadora Profa. Dra. Wirla M. S. C. Tamashiro pela confiança e apoio.
- À Enfa. Dra. Inês da Silva, do Serviço de Enfermagem do Hospital Municipal de Paulínia, que muito apostou em mim (in memoriam).
- À Dirce Lima Gabriel que me acompanhou em muitas etapas desse trabalho e que foi imprescindível nas minhas conquistas.
- Aos amigos do laboratório-1: Patrícia, Ellen, Lóren e Aline, Maristela e Luís Gustavo que me socorreram em diversas fases de meu trabalho, com dedicação e atenção peculiares de cada um.
- Ao Marcos César Meneghetti, técnico em Bioterismo do antigo DMI, pelos cuidados aos animais empregados neste estudo.
- Ao Prof. Dr. Fernando de Queiroz, do Departamento de Farmacologia da FMRP/USP, pela doação de cepa de *Leishmania* e de citocina IL-4, além de disponibilizar seu Laboratório para avaliação da atividade de iNOS.
- Ao pessoal técnico do Laboratório de Marcadores Celulares e Citologia do Hemocentro da UNICAMP, particularmente à Fernanda, pelo auxílio em experimentos de citometria.

- Ao Hospital Municipal de Paulínia, Secretaria de Saúde, Diretoria e Coordenadoria de Enfermagem, pela colaboração e incentivo aos estudos.
- Ao Departamento de Botânica, pela disponibilização do espaço da Câmara escura para realizar a revelação de filmes de raio-X.
- Aos professores e funcionários do antigo DMI.
- Aos professores Selma Giorgio e Heloisa Helena Araújo Ferreira que colaboraram na análise prévia desse trabalho.
- A todos que participaram, direta ou indiretamente na minha vida e nos meus estudos, para a concretização desse sonho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
I - INTRODUÇÃO.....	1
II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
III - OBJETIVOS E ESTRATÉGIAS.....	23
IV - MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
1. - ANIMAIS.....	26
2. - REAGENTES.....	26
3. - PREPARO DAS CÉLULAS.....	26
3.1. - Coleta e cultura de macrófagos peritoneais (MφP).....	26
3.2. - Obtenção de sobrenadante de células L929.....	27
3.3. - Coleta e cultura de células da medula óssea (MφMO).....	27
3.4. - Cultura de <i>Leishmania major</i>	29
3.5. - Preparo de timócitos apoptóticos.....	29
4. - DOSAGEM DE NO ₂ ⁻ EM MACRÓFAGOS.....	30
4.1. - Estimulação das monocamadas de macrófagos com LPS, IL-4, IFN-γ e obtenção de sobrenadantes.....	30
4.2. - Dosagem de NO ₂ ⁻	30
5. - DOSAGEM DE URÉIA EM MACRÓFAGOS.....	31
6. - FAGOCITOSE.....	32
6.1. - Preparo e obtenção de zimosan.....	32
6.2. - Opsonização do zimosan com C3bi.....	33
6.3. - Ensaio de Fagocitose.....	33
7. - AVALIAÇÃO DA CELULARIDADE EM CAVIDADES PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/C.....	34
8. - DETECÇÃO DA SINTASE INDUZÍVEL DE ÓXIDO NÍTRICO E DA ARGINASE.....	34
8.1. - Preparo das amostras.....	34
8.2. - Eletroforeses.....	35
8.3. - Detecção da iNOS e da arginase.....	36
9. - DETECÇÃO E DOSAGEM DE CITOCINAS.....	37
10. - ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	38
V - RESULTADOS.....	39
1.- Efeito do LPS, IL-4 e IFN-γ sobre a atividade da iNOS e arginase em células peritoneais aderentes (MφP) de camundongos naïve e elicitados.....	40
2.- Efeito recíproco do LPS e da IL-4 sobre as atividades da iNOS e arginase em células peritoneais aderentes (MφP) de camundongos naïve e elicitados.....	44
3.- Efeito do LPS, IL-4 e IFN-γ sobre a atividade da iNOS e arginase em células diferenciadas da medula óssea (MφMO) de camundongos.....	47

4.-	<i>Efeito recíproco do LPS e da IL-4 sobre as atividades da iNOS e arginase em células diferenciadas da medula óssea (MϕMO) de camundongos.....</i>	49
5.-	<i>Efeito da fagocitose de <u>Leishmania major</u>, zimosan opsonizado e linfócitos apoptóticos sobre a atividade de arginase e de iNOS em macrófagos peritoneais (MϕP).....</i>	51
6.-	<i>Atividade e expressão da iNOS e arginase em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c jovens e velhos, cultivados na presença de LPS, IL-4 ou IFN-γ.....</i>	57
7.-	<i>Atividade e expressão da iNOS e arginase em macrófagos diferenciados <u>in vitro</u> a partir de precursores da medula óssea de camundongos BALB/c jovens e velhos.....</i>	66
8.-	<i>Produção de citocinas por macrófagos peritoneais ou diferenciados de medula óssea de camundongos BALB/c jovens e velhos, estimulados com LPS.....</i>	70
VI -	DISCUSSÃO.....	73
VII -	PRINCIPAIS RESULTADOS E CONCLUSÕES.	81
VIII -	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
IX -	ANEXOS.....	104

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1 - Efeito do LPS, IL-4 ou IFN- γ sobre a atividade da iNOS e arginase em células peritoneais aderentes (M ϕ P) de camundongos naïve.....	42
Figura 2 - Efeito do LPS, IL-4 ou IFN- γ sobre a atividade da iNOS e arginase em células peritoneais aderentes (M ϕ P) de camundongos pré-tratados com tioglicolato.....	43
Figura 3 - Efeito recíproco do LPS e da IL-4 sobre as atividades da iNOS e arginase em células peritoneais aderentes (M ϕ P) de camundongos naïve.....	45
Figura 4 - Efeito recíproco do LPS e da IL-4 sobre as atividades da iNOS e arginase em células peritoneais aderentes (M ϕ P) de camundongos pré-tratados com tioglicolato.....	46
Figura 5 - Efeito do LPS, IL-4 ou IFN- γ sobre a atividade da iNOS e arginase em M ϕ MO de camundongos.....	48
Figura 6 - Efeito recíproco do LPS e da IL-4 sobre as atividades da iNOS e arginase em M ϕ MO de camundongos.....	50
Figura 7 - Efeito da fagocitose de <i>Leishmania major</i> sobre a atividade da arginase em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 naïve e elicitados.....	54
Figura 8 - Efeito da fagocitose de zimosan opsonizado sobre a atividade da arginase em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 naïve e elicitados.....	55
Figura 9 - Efeito da fagocitose de linfócitos apoptóticos sobre a atividade da arginase em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 naïve e elicitados.....	56
Figura 10 - Avaliação da celularidade em cavidades peritoneais de camundongos BALB/c.....	59
Figura 11 - Atividade da iNOS e arginase em M ϕ P de camundongos BALB/c jovens e velhos naïve, cultivados na presença de LPS, IL-4 ou IFN- γ	60
Figura 12 - Atividade da iNOS e arginase em M ϕ P de camundongos BALB/c jovens e velhos pré-tratados com meio de tioglicolato, cultivados na presença de LPS, IL-4 ou IFN- γ	61
Figura 13 - Análise por Western blot da expressão de arginase em M ϕ P de camundongos BALB/c naïve, jovens e velhos cultivados na presença de LPS ou IL-4.....	62
Figura 14 - Análise por Western blot de expressão de arginase em M ϕ P de camundongos BALB/c elicitados, jovens e velhos cultivados na presença de LPS ou IL-4.....	63
Figura 15 - Análise por Western blot de expressão de iNOS em M ϕ P de camundongos BALB/c naïve, jovens e velhos cultivados na presença de LPS ou IFN- γ	64
Figura 16 - Análise por Western blot da expressão de iNOS em M ϕ P de	

	camundongos BALB/c elicitados, jovens e velhos cultivados na presença de LPS ou IFN- γ	65
Figura 17 -	Atividade da iNOS e arginase em M ϕ MO de camundongos BALB/c jovens e velhos.....	67
Figura 18 -	Análise por Western blot da expressão de arginase em M ϕ MO de camundongos BALB/c naïve, jovens e velhos cultivados na presença de LPS ou IL-4	68
Figura 19 -	Análise por Western blot da expressão de iNOS em M ϕ MO de camundongos BALB/c naïve, jovens e velhos, cultivados na presença de LPS ou IFN- γ	69
Figura 20 -	Detecção de IL-1 α , TNF- α e IL-10 em sobrenadantes de células peritoneais aderentes de camundongos BALB/c jovens e velhos estimulados <i>in vitro</i> com LPS.....	71
Figura 21 -	Detecção de IL-1 α , TNF- α e IL-10 em sobrenadantes de células aderentes diferenciadas de precursores da medula óssea de camundongos BALB/c jovens e velhos estimuladas <i>in vitro</i> com LPS.....	72
Anexo 1.	Microscopia ótica de cultura de células precursoras da medula óssea	105
Anexo 2.	Análise de timócitos por citometria de fluxo.....	106
Anexo 3.	Indução de apoptose em timócitos.....	107
Anexo 4	Cópia do Protocolo CEEA.....	108
Anexo 5.	Cópia da Declaração CEUA.....	109
Anexo 6.	Artigo aceito para publicação no periódico Brazilian Journal of Medical and Biological Research.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC = célula apresentadora de antígeno
- ARG1/ A1/ isoforma I ou forma catiônica
- ARG2/ A4/ isoforma II ou forma aniônica
- C3b = fragmento do sistema complemento
- C5a = fragmento do sistema complemento
- CCL2 = ligante para o receptor de quimiocina 2
- CCR2 = receptor de quimiocina CC-2
- CCR7 = receptor de quimiocina CC-7
- CCR8 = receptor de quimiocina CC-8
- CD3⁺ = *Cluster of differentiation 3*
- CpG DNA = DNA microbiano não-metilado com motivo CpG, no qual a frequência C (citossina) G (guanina) é maior do que em outras regiões e “p” indica que “C” e “G” são conectados por uma ligação fosfodiéster.
- CRP = proteína C reativa (do inglês, *C-reactive protein*)
- CSFs = Fator Estimulador de Colônia
- CX₃CL1 = ligante 1 quimiocina com motivo C-X₃-C
- CX₃CR1 = receptor 1 (CR1) de quimiocina contendo número variável de aminoácidos entre duas cisteínas conservadas (CX₃)
- DCs = células dendríticas
- DNA = ácido dextrorribonucleico
- DO = densidade óptica
- dsRNA = ácido ribonucleico de dupla fita (do inglês, *double-strand RNA*)
- E.P.M = erro padrão da média

- ELISA = Enzyme linked immunoabsorbant assay
- eNOS = sintase do óxido nítrico endotelial
- E-selectinas = moléculas de adesão de baixa afinidade expressas pelo endotélio
- FITC = Isotiocianato de Fluoresceína
- G-CFU = unidades formadoras de colônia de granulócitos.
- GM-CFU = unidades formadoras de colônia de granulócitos e macrófagos.
- GM-CSF = Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos-Macrófagos
- HBSS = solução salina balanceada de Hank's
- HSC = célula-tronco hematopoiética
- ICAM-I = receptores expressos pelo endotélio
- IFN- γ = Interferon-gama
- IL-(1) = Interleucina-1
- iNOS = sintase do óxido nítrico induzida
- ISPF = α -isonitroso-propiofenona
- *L. major* = *Leishmania major*
- LPS = lipopolissacarídeo
- L-selectinas = moléculas de adesão de baixa afinidade expressas pelos fagócitos
- LTA = ácido lipoteicóico (do inglês, *lipoteicoic acid*)
- Ly 6C = antígeno de diferenciação de monócitos/macrófagos e células endoteliais
- M ϕ MO = Macrófagos diferenciados *in vitro* a partir de precursores da medula óssea
- M ϕ P = macrófagos peritoneais
- MBL = lectina ligante de manose (do inglês, *manose binding-lectin*)
- M-CFU = unidades formadoras de colônia de macrófagos

- MMR = receptor de manose (do ingles, *macrophage mannose receptor*)
- MnCl_2 = cloreto de manganês
- MO = medula óssea
- mRNA = ácido ribonucléico mensageiro
- MSR = receptor para detritos de macrófagos (do inglês, *macrophage scavenger receptor*)
- NADPH = nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- NADPH oxidase = complexo enzimático ativo que catalisa a geração da NADPH
- nNOS = sintase do óxido nítrico neuronal
- NO = óxido nítrico
- NO_2 = radical dióxido de nitrogênio
- NOS = sintase do óxido nítrico
- OAT = Ornitina aminotransferase
- PAMPs = padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, *Pathogen-associated molecular patterns*)
- PBS = Salina tamponada
- PGN = Peptídeoglicanos
- PHA = fitohemaglutinina
- PKR = receptor de proteína quinase (do inglês, *protein kinase receptor*)
- PMN = neutrófilos polimorfonucleares
- PMSF = Fluoreto de fenilmetanosulfonila (do inglês, *Phenylmethylsulphonylfluoride*)
- RNA = ácido ribonucléico
- RNI = espécies reativas de Nitrogênio
- ROI = espécies reativas de Oxigênio
- RPMI 1640 = *Roswell Park Memorial Institute 1640*

- SAP = proteína soro amilóide (do inglês, *serum amyloid protein*)
- SDS-PAGE = dodecil sulfato de Sódio
- SFB = Soro Fetal bovino
- sIL-2R = receptor solúvel da interleucina-2
- SPF = *specific pathogen free*
- Stat6 = fator de transcrição 6 da família STAT
- TGF- β = Fator transformador de crescimento- β
- Th1/ TH1 = linfócito T auxiliar 1
- Th2/ TH2 = linfócito T auxiliar 2
- TLR = receptor Toll-símile (do inglês, *Toll-like receptors*)
- TNF- α = Fator de Necrose Tumoral- α
- VCAM = integrinas de alta afinidade que se ligam aos receptores expressos pelo endotélio

RESUMO

Porque as alterações dependentes de idade no sistema imune inato são pouco estudadas, no presente trabalho comparamos macrófagos de camundongos BALB/c jovens (8 semanas de idade) e velhos (72 semanas de idade) quanto às atividade de iNOS e de arginase, bem como a produção de citocinas. Avaliações iniciais realizadas em macrófagos peritoneais (M ϕ P) naïve ou elicitados de camundongos BALB/c jovens mostraram níveis detectáveis de atividade arginase mesmo na ausência de estímulos indutores. Apenas IL-4 induziu aumento da atividade arginase nessas células, enquanto LPS e IFN- γ induziram atividade iNOS. O LPS inibiu a atividade de arginase induzida por IL-4 em M ϕ P e em macrófagos derivados de medula óssea (M ϕ MO). A IL-4 inibiu a produção de NO em M ϕ P naïve e em M ϕ MO, mas não teve efeito em M ϕ P elicitados. A fagocitose de zimosan ou de linfócitos apoptóticos, mas não de *Leishmania major*, resultou em aumento da atividade arginase em macrófagos elicitados e apenas a fagocitose de zimosan induziu aumento da atividade arginase nos macrófagos naïve. A fagocitose de quaisquer das partículas testadas resultou em aumento de atividade arginase quando IL4 foi adicionada em dose sub-ótima às culturas de M ϕ P; a adição de dose sub-ótima de IFN- γ resultou em aumento de atividade arginase apenas em M ϕ P de BALB/c elicitados que fagocitaram *Leishmania major*. Comparativamente, M ϕ P de camundongos C57BL/6 mostraram atividade arginase muito mais reduzida que os camundongos BALB/c após a fagocitose de qualquer das partículas testadas. A fagocitose de zimosan ou de linfócitos apoptóticos, mas não de *L. major*, induziu a atividade arginase em M ϕ P elicitados de C57Bl/6 e a adição de IFN- γ elevou de modo significativo a atividade arginase nessas células. Da mesma forma que em BALB/c,

os M ϕ P de C57BL/6 não mostraram atividade iNOS após a fagocitose de qualquer das partículas testadas, na presença ou ausência de estímulos inflamatórios. Nossos resultados mostram ainda que o envelhecimento altera algumas das atividades de macrófagos de camundongos BALB/c. Nesse sentido, verificamos que M ϕ P de camundongos jovens apresentaram atividade iNOS e arginase mais elevadas do que M ϕ P de camundongos idosos. M ϕ MO de camundongos jovens ou velhos não diferiram significativamente na atividade iNOS, mas a atividade arginase foi mais elevada nos M ϕ MO de animais velhos. A expressão da arginase induzida por IL-4 foi mais elevada em M ϕ P naïve de animais jovens do que de velhos, mas foi igualmente elevada em M ϕ P elicitados e M ϕ MO de camundongos jovens e velhos. Não se observou diferença na expressão de iNOS induzida por IFN- γ em M ϕ P ou M ϕ MO de BALB/c jovens ou velhos. A produção de IL-1 α induzida por LPS foi mais elevada em macrófagos elicitados de camundongos velhos e a de TNF- α foi mais elevada nos macrófagos elicitados de camundongos jovens. A estimulação de M ϕ MO com LPS resultou apenas em produção de TNF- α , cujos níveis foram mais elevados nas células de camundongos velhos. Nossos resultados apontam diferenças dependentes da idade em macrófagos teciduais e diferenciados *in vitro*. Com relação aos macrófagos teciduais, as alterações mais notáveis dependentes da idade foram a redução da produção de TNF- α e da atividade de iNOS. Tendo em vista a importância desses dois mediadores para a eficiente eliminação de patógenos, a sua redução em macrófagos de camundongos velhos pode contribuir para a maior susceptibilidade às infecções na velhice.

ABSTRACT

Given that the age-dependent changes in the innate immune system are poorly studied in the present study we investigated the activity of iNOS and arginase, as well as cytokine production in macrophages from BALB/c young (8 weeks old) and old (72 weeks old). Initial assessments carried out on peritoneal macrophages (PM ϕ) or elicited from naïve BALB/c mice showed that these young phagocytes have detectable levels of arginase activity, even in the absence of inducing stimuli. Only IL-4 induced increased arginase activity in these cells, while LPS and IFN- γ induced iNOS activity. LPS inhibited the arginase activity induced by IL-4 in PM ϕ and macrophages derived from bone marrow (BMM ϕ). IL-4 inhibited NO production in naïve PM ϕ and BMM ϕ in MO, but had no effect on M ϕ P elicited. Phagocytosis of zymosan or apoptotic lymphocytes, but not from *Leishmania major*, resulting in increased arginase activity in elicited macrophages and only the phagocytosis of zymosan induced an increase in arginase activity in naïve macrophages. Phagocytosis of any of the tested particles resulted in an increase in arginase activity when IL4 was added to sub-optimal dose to cultures of PM ϕ , the addition of sub-optimal dose of IFN- γ resulted in increased arginase activity only in PM ϕ of BALB/c elicited that phagocytized *Leishmania major*. Comparatively, PM ϕ of C57BL/6 showed arginase activity much lower than the BALB/c after the phagocytosis of any of the tested particles. Phagocytosis of zymosan or apoptotic lymphocytes, but not *L. major*, induced arginase activity in PM ϕ elicited from C57BL/6 and the addition of IFN- γ significantly increased arginase activity in these cells. Just as in BALB/c, PM ϕ C57BL/6 iNOS showed no activity after phagocytosis of any particles tested either in the presence or absence of inflammatory

stimuli. Our results also show that aging alters some of the activities of macrophages from BALB/c. Similarly, we found that PM ϕ of young mice showed activities iNOS and arginase higher than PM ϕ of old mice. BMM ϕ of young and old mice did not differ significantly in iNOS activity, but arginase activity was higher in BMM ϕ in older animals. The expression of arginase-induced IL-4 was higher in PM ϕ of naïve young mice, but was also high in M ϕ P elicited AND BMM ϕ of young and old mice. No difference was observed in the expression of iNOS induced by IFN- γ in both PM ϕ and BMM ϕ of BALB/c young and old. The production of IL-1 α induced by LPS was higher in elicited macrophages from aged mice and TNF- α was higher in elicited macrophages from young mice. Stimulation of BMM ϕ with LPS only resulted in production of TNF- α , whose levels were higher in cells of aged mice. Our results suggest age-dependent differences in tissue macrophages and differentiated in vitro. With respect to tissue macrophages, the most notable changes were the age-dependent reduction of TNF- α and activity of iNOS. Given the importance of these two mediators in the efficient elimination of pathogens, the reduction in macrophages of aged mice may explain the increased susceptibility to infections in old age.

I - INTRODUÇÃO

A imunosenescência – envelhecimento do sistema imune – leva a alterações dramáticas da capacidade de indivíduos velhos responderem a agentes infecciosos e transformações malignas [CHUNG *et al.*, 2009]. Entre as alterações mais importantes detectadas nos sistema imune de idosos destacam-se as relacionadas à redução de número e função de linfócitos T, cuja capacidade proliferativa frente a mitógenos ou a antígenos encontra-se muito diminuída [VICK & GRUBECK-LOEBENSTEIN, 1997]. Trabalhos recentes também mostram alterações funcionais importantes em linfócitos B no envelhecimento, particularmente as relacionadas à produção de anticorpos contra neo-antígenos [FRASCA *et al.*, 2008; SIEGRIST & ASPINALL, 2009].

A eliminação de parasitas depende, em grande parte, da capacidade de células fagocíticas internalizarem o patógeno e gerarem moléculas com atividade microbicida. A maior parte dos microrganismos fagocitados é eliminada no interior dos macrófagos pela ação de radicais livres de oxigênio, como os ânions superóxido e ácido hipocloroso [BOGDAN, ROLLINGHOFF & DIEFENBACH, 2000]. Macrófagos ativados podem ainda eliminar patógenos pela ação do peróxido de hidrogênio liberado para o meio extracelular [NATHAN *et al.*, 1979b]. Alguns parasitas, no entanto, possuem mecanismos de escape à ação dos radicais livres de oxigênio e só são eliminados quando os fagócitos são estimulados a produzir o óxido nítrico (NO) [GREEN, NACY & MELTZER, 1991]. O lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram negativas e citocinas pró-inflamatórias como o IFN- γ e o TNF- α são os principais indutores da enzima responsável pela síntese de NO em macrófagos, isto é, a sintase induzida do óxido nítrico (iNOS) [STUEHR & MARLETTA, 1987, WANG *et al.*, 1995]. O óxido nítrico é um gás extremamente instável, originado pela ação da iNOS sobre a L-arginina em macrófagos ativados. Por ser uma molécula

altamente reativa, o NO interage com os microrganismos, alterando as propriedades de moléculas vitais para sua sobrevivência e favorecendo a sua eliminação. No entanto, a produção excessiva de NO pode levar à destruição de tecidos sadios do hospedeiro e ao desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas [LIEW, LI & MILLOTT, 1990; GREEN *et al.*, 1990; HIBBS *et al.*, 1988].

Os fagócitos também metabolizam a L-arginina pela via da arginase, tipos I e II, gerando L-ornitina e uréia. A arginase I pode ter seus níveis elevados em macrófagos por citocinas como IL-4 e TGF- β [BOGDAN & NATHAN, 1993]. Portanto, a regulação do metabolismo da L-arginina pelo sistema imune é vital para a resolução de processos infecciosos.

O metabolismo da L-arginina também é reconhecido como um importante regulador do sistema imune adaptativo, uma vez que macrófagos e células dendríticas atuam no processamento e apresentação de antígenos para linfócitos T; o balanço entre iNOS e a Arg1 pode determinar tipos específicos de respostas de células T [BRONTE *et al.*, 2003].

Tendo em vista a importância do metabolismo da arginina na regulação de processos imunes, nosso laboratório iniciou uma linha de investigação visando estudar a relação entre o envelhecimento e a produção de metabólitos da L-arginina em macrófagos peritoneais murinos. Os resultados obtidos nesses trabalhos mostram que a produção de NO por macrófagos peritoneais murinos parece depender do *status* das células empregadas (residentes ou elicitadas) e da idade dos animais dos quais as células são provenientes. De um modo geral, os animais velhos foram menos responsivos aos estímulos que sabidamente induzem à expressão de iNOS [COSTA, 1998].

A produção de citocinas por células da imunidade inata e adaptativa também parece ser afetada pelo envelhecimento. Resultados do nosso e de outros laboratórios mostram que linfócitos de camundongos velhos sob estímulo de Concanavalina-A, proliferam menos e produzem níveis mais reduzidos de IL-2, IFN- γ e IL-10 [PAHLAVANI & RICHARDSON, 1996; CHAKRAVARTI & ABRAHAM, 1999; SIMIONI, COSTA & TAMASHIRO, 2007]. Por outro lado, a literatura mostra que citocinas como IL-6 e TNF- α , bem como antagonistas de citocinas e proteínas de fase aguda, são detectados em níveis mais elevados na circulação de idosos, o que poderia explicar a manutenção de atividade inflamatória e febre prolongadas observadas nesses indivíduos no decurso de um processo infeccioso. Porém, níveis plasmáticos elevados de IL-6 são encontrados em idosos, sem qualquer correlação com doenças ou desordens relacionadas com a velhice. Por outro lado, concentrações elevadas de TNF- α correlacionam-se com processos patológicos como o mal de Alzheimer e aterosclerose em centenários [revisto em BRUUNSGAARD, PEDERSEN & PEDERSEN, 2001]. Entretanto, estudos *in vitro* sobre as diferenças na produção de citocinas dependentes da idade nem sempre proporcionam resultados consistentes com os descritos acima, dificultando sua interpretação. Apesar disso, diversos estudos apontam para uma correlação positiva entre níveis elevados de TNF- α e detecção de sIL-2R - um marcador de ativação de linfócitos - e negativa com níveis de IL-2 em culturas de leucócitos do sangue periférico estimulados com fitohemaglutinina (PHA), um marcador de ativação de linfócitos [CATANIA *et al.*, 1997].

Com o objetivo de avaliar os efeitos do envelhecimento sobre o metabolismo da L-arginina em células fagocíticas, investigamos neste estudo a expressão e atividade de iNOS e arginase em macrófagos de camundongos BALB/c, jovens e velhos, tratados com LPS

e/ou IL-4 e IFN- γ . Avaliamos também a produção de citocinas IL-1, TNF- α e IL-10 liberados por macrófagos de camundongos jovens e velhos estimulados *in vitro* com LPS.

II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

OS MONÓCITOS E OS MACRÓFAGOS

Os monócitos do sangue periférico se originam na medula óssea a partir de precursores mielóides, estimulados por fatores formadores de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CFU) e fatores formadores de colônia de macrófagos (M-CFU). Os monócitos são liberados para o sangue periférico onde circulam por vários dias até atingirem os diferentes tecidos, onde vão constituir a população de macrófagos residentes. Estas células, também conhecidas como histiócitos, desenvolvem um citoplasma abundante, com conteúdo granular e são responsáveis pela remoção de produtos (debris) e pela defesa contra microorganismos invasores [revisto por GORDON, 2003]. A origem e as principais características das células que compõem o sistema fagocítico mononuclear são mostradas na Figura 1.

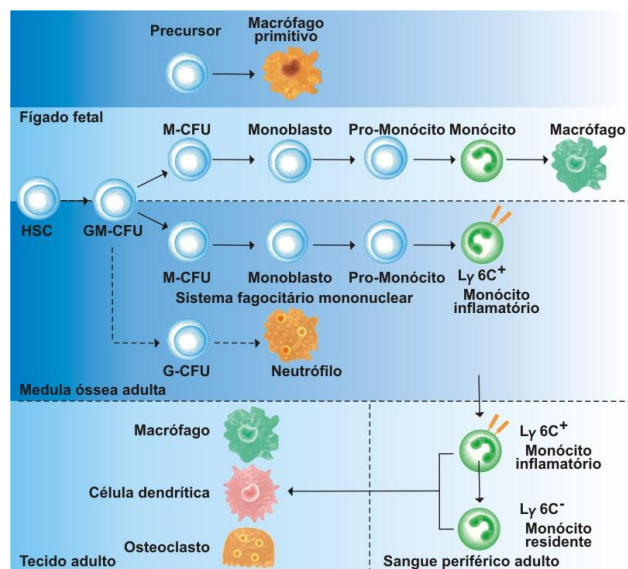


Figura 1. Sistema fagocítico mononuclear. Durante a vida fetal, a hematopoiese ocorre inicialmente, no saco vitelínico e depois no fígado fetal. Gradualmente, essa função é assumida pela medula óssea (MO), estimulada pelos fatores: GM-CFU, M-CFU e G-CFU. Os monócitos da MO são liberados para o sangue periférico adulto, com o fenótipo Ly 6C⁺, podendo se diferenciar em Ly 6C⁻, e células com ambos os fenótipos podem migrar para os tecidos adultos, onde se diferenciam em Macrófagos, Células Dendríticas e Osteoclastos. HSC (do inglês *haematopoietic stem cell*): célula-tronco hematopoiética; GM-CFU (do inglês *granulocyte/macrophage colony-forming unit*): unidade formadora de colônia de macrófago/granulócito; M-CFU (do inglês, *macrophage colony-forming unit*): unidade formadora de colônia de macrófago; G-CFU (do inglês, *granulocyte colony-forming unit*): unidade formadora de colônia de granulócito. Adaptada de GORDON & TAYLOR [2005].

Os macrófagos tissulares são encontrados em todos os órgãos e tecidos do organismo e recebem uma denominação diferente para cada localização, como por exemplo, células microgliais (no sistema nervoso central), células de Kupffer (no fígado), macrófagos alveolares (nos pulmões) e osteoclastos (nos ossos) [GORDON & TAYLOR, 2005].

Além dos macrófagos tissulares, os monócitos também dão origem às células especializadas como as células dendríticas e os osteoclastos. As células dendríticas são células com papel importante na indução de respostas imunes, das quais participam como células apresentadoras de antígenos (APC) para as células T naïve. Morfologicamente, essas células se distinguem dos monócitos e macrófagos por apresentar numerosas projeções membranasas. As células dendríticas interdigitantes ou simplesmente, células dendríticas (DCs), povoam o interstício da maioria dos órgãos como os linfonodos e o baço e estão dispersas por toda a epiderme, onde recebem a denominação de células de Langerhans. Também há outro tipo de DCs, as células dendríticas foliculares, assim chamadas devido a sua localização nos centros germinativos de folículos linfóides dos linfonodos, baço e tecidos linfóides associados às mucosas [KAH-WAI, JACEK & JACEK, 2003].

Durante o processo inflamatório, os monócitos são recrutados para o local da injúria onde vão atuar na destruição dos patógenos e na remodelação tecidual. A migração de células da circulação para o foco da injúria é acompanhada pelo aumento do fluxo sanguíneo local e da permeabilidade capilar, causado pela retração das células endoteliais, o que facilita a passagem das moléculas através do endotélio e permite que fatores solúveis cheguem ao local inflamado [BROWN, 1997].

As primeiras células a chegar ao local da inflamação são os neutrófilos polimorfonucleares (PMN), seguidos pelos macrófagos. A migração dos fagócitos (quimiotaxia) é um fenômeno multimediado, que se inicia pela marginalização dos leucócitos na parede dos vasos, induzida por fatores quimiotáticos, como o fragmento C5a do sistema complemento, que se difundem aos capilares adjacentes, provocando a aderência dos fagócitos que estão circulando pelo vaso sanguíneo (marginalização). A aderência dos fagócitos ao endotélio é inicialmente mediada pela interação entre moléculas de adesão de baixa afinidade, denominadas selectinas, expressas tanto pelos fagócitos (L-selectinas) como pelo endotélio (E-selectinas). A interação entre as selectinas e a pressão exercida pelo fluxo sanguíneo no local permitem o rolamento dos fagócitos sobre o endotélio vascular. Durante esse trajeto e sob estímulos de citocinas como a IL-8 e TNF- α , os leucócitos passam a expressar integrinas de alta afinidade (VCAM), que se ligam aos receptores expressos pelo endotélio (ICAM-I), permitindo a firme adesão do leucócito na parede do vaso, em um processo que leva a ativação dos leucócitos e alterações na organização do citoesqueleto dessas células. Desta forma, por movimentos de diapedese, os fagócitos emitem pseudópodos e atravessam a membrana basal dos capilares, passando para o exterior do vaso em direção ao local da inflamação onde estão os estímulos quimiotáticos [BROWN, 1997; COX & HUTTENLOCHER, 1998].

Na ausência de processo inflamatório, os monócitos do sangue periférico também são capazes de deixar a circulação e repovoar órgãos e tecidos com os chamados macrófagos residentes (células de Kupffer, macrófagos esplênicos, macrófagos alveolares, micróglia, etc). Embora os processos envolvidos na migração dos leucócitos na ausência de

inflamação não estejam esclarecidos, o desenvolvimento de diferentes populações funcionais de macrófagos é conhecido e está resumido na figura 2.

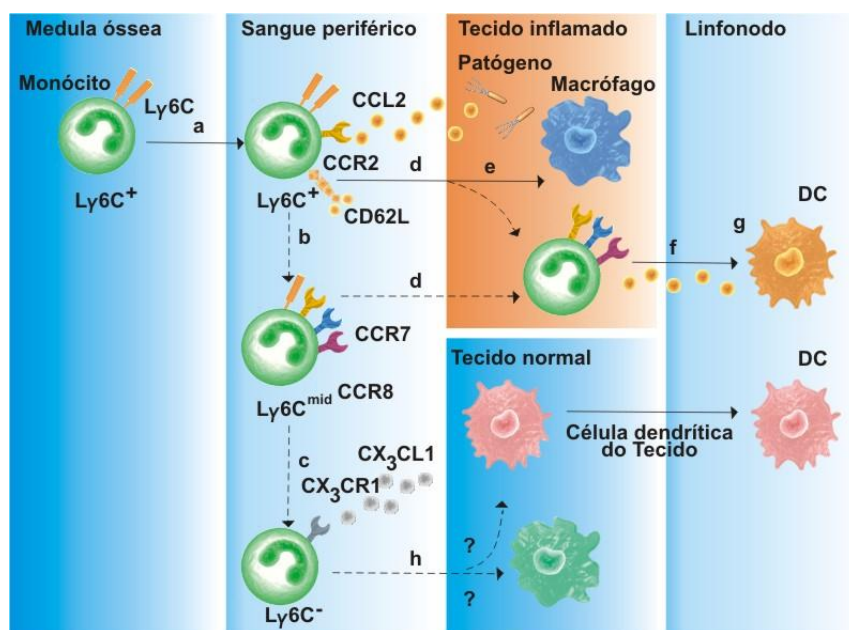


Figura 2. Desenvolvimento e função de subgrupos de monócitos em camundongos. Quando os monócitos partem da medula óssea para o sangue periférico (a), apresentam um fenótipo “inflamatório” (Ly6C⁺), que será mantido enquanto estiver na circulação, podendo ser alterado para “Ly6C^{mid}”, que expressa CCR7 (receptor de quimiocina CC-7), CCR8 e retém CCR2 (b) ou para “Ly6C⁺CCR2⁻”, caracterizado pela alta expressão de CX₃CR1 (receptor de quimiocina 1-CX3) (c). Os monócitos com fenótipos “Ly6C⁺” e “Ly6C^{mid}” respondem a estímulos inflamatórios tais como o CCL2 (ligante para o receptor de quimiocina 2) e são recrutados (d) para as lesões inflamatórias, onde se diferenciam em macrófagos que vão atuar no processo de eliminação de patógenos e de cicatrização (e). Os monócitos “Ly6C⁺” que migraram para os tecidos inflamados também podem se diferenciar em uma célula que expressa CCR7 e CCR8 com potencial para migrar (f) dos tecidos para os linfonodos que drenam a região e lá se transformar em DC (g). Na ausência de inflamação, os monócitos CX₃CR1Ly6C⁻ ligam-se a CX₃CL1 (quimiocina ligante 1 CX₃CR1) entram nos tecidos (h) onde se diferenciam em macrófagos residentes ou em DC teciduais; essas últimas podem se destacar dos tecidos e migrar para os linfonodos, após a fagocitose de partículas. O processo de transmigração dos monócitos CX₃CR1Ly6C⁻ ainda é desconhecido. As setas sólidas representam as vias conhecidas e as pontilhadas refletem dados compilados da literatura recente e especulações [adaptado de GORDON & TAYLOR, 2005].

PAPEL DOS MACRÓFAGOS NA ELIMINAÇÃO DE PATÓGENOS

O reconhecimento de patógenos por células do sistema imune inato se faz através de receptores que interagem com padrões moleculares exibidos pelos microrganismos. Ao contrário do que ocorre no sistema imune adaptativo, o repertório de receptores presentes

nos fagócitos é bastante reduzido. Enquanto o repertório de linfócitos B e T representam mais de 10^6 moléculas distintas na espécie humana, as classes de receptores de padrões moleculares dos fagócitos não perfazem mais do que 10 tipos distintos. Os receptores para padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs, do inglês, *Pathogen-associated molecular patterns*) podem ser expressos na superfície dos fagócitos, ou distribuídos nos compartimentos intracelulares ou ainda serem secretados para a corrente circulatória [revisto por JANEWAY & MEDZHITOV, 2002]. Fazem parte desse grupo de moléculas, o receptor MMR (do inglês, *macrophage mannose receptor*), proteína de superfície que desempenha papel importante na fagocitose de fungos e de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, e os Toll-like receptors (TLR). Outros receptores, como a MBL (do inglês, *mannose binding lectin*), CRP (do inglês, *C-reactive protein*), SAP (do inglês, *serum amyloid protein*), são ligantes solúveis de PAMPs, secretados pelo fígado durante a fase aguda da inflamação. Os receptores MSR (do inglês, *macrophage scavenger receptor*), são proteínas de superfície envolvidas na fagocitose de patógenos capazes de ligar uma variedade de estruturas microbianas, como poliânions, incluindo dsRNA (do inglês *double-strand RNA*), LPS (lipopolissacarídeo) e LTA (do inglês, *lipoteicoic acid*). Entre os receptores de PAMPs de localização intracelular, destacam-se as PKR (do inglês, *protein kinase receptor*), que se ligam a dsRNA durante a replicação viral e bloqueiam a dispersão do agente infeccioso.

Entre os receptores de PAMPs mais estudados encontram-se os TLRs. A maioria dos TLRs é expressa na superfície celular e desempenham papel importante no reconhecimento e internalização de patógenos, desencadeando respostas imunes inatas e adaptativas, pela ativação de vias sinalizadoras pró-inflamatórias [AKIRA & HEMMI,

2003; KUMAR, KAWAI & AKIRA, 2009; KAWAI & AKIRA, 2010]. Os ligantes de algumas dessas moléculas estão listados na Tabela 1.

RECEPTORES <i>Toll-like</i>	LIGANTES
TLR2	Bactérias Gram ⁺ : Peptidoglicanos (PGN), Ácido lipoteicoico (LTA). Bactérias: Lipoproteína Leveduras: Zimosan
TLR2 / TLR1	<i>Neisseria meningitides</i> : Fator solúvel
TLR3	Vírus: RNA dupla fita
TLR4	Bactérias Gram ⁻ : Lipopolissacarídeo (LPS), Ácido lipoteicoico (LTA).
TLR5	Bactérias flageladas: Flagelina
TLR2 / TLR6	Micoplasmas: Lipoproteína
TLR7	Substâncias químicas: Loxoribine, Bropirimine
TLR9	Bactérias, vírus, insetos: CpG DNA não metilado (DNA bacteriano)
TLR10	Ligante desconhecido*
TLR11	Bactérias uropatogênicas, molécula profillin-like (<i>Toxoplasma gondii</i>) [#]

Tabela 1. Ligantes reconhecidos pelos Toll-like receptors. [Tabela adaptada de AKIRA & HEMMI, 2003; KUMAR, KAWAI & AKIRA, 2009*; KAWAI & AKIRA, 2010[#]].

Após fagocitar os microrganismos, os macrófagos são capazes de eliminá-los através da ação de duas vias de oxidação que envolvem a síntese de espécies reativas de Oxigênio (ROI) e de Nitrogênio (RNI). As espécies reativas de Oxigênio são produzidas numa via metabólica denominada explosão respiratória e as espécies reativas de Nitrogênio são produzidas durante a reação de oxidação da L-arginina para L-citrulina, na presença de enzimas denominadas sintases do óxido nítrico (NOS). Para a formação dos ROI e dos RNI é requerido o mesmo agente redutor, o NADPH [NATHAN, *et al.*, 1979a; MONCADA, 2006].

Ambos os grupos de intermediários inorgânicos (ROI e RNI) assumem funções variadas no sistema imune, tanto na imunidade inata como na adquirida, regulando respostas de citocinas, induzindo ou suprimindo a apoptose de várias células do sistema imune [HANSSON *et al.*, 1996] e contribuindo para o dano tecidual observado em doenças autoimunes e em outros processos inflamatórios crônicos [BOGDAN, ROLLINGHOFF & DIEFENBACH, 2000].

A explosão respiratória consiste em uma série de eventos metabólicos coordenados, que levam à produção do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio. O ânion superóxido é formado pela redução monoeletrônica do oxigênio, tendo o NADPH como doador específico de elétrons. O complexo enzimático ativo que catalisa a geração do ânion superóxido a partir do O_2 é chamado de NADPH oxidase e é composto de proteínas citosólicas e de membrana. Esta via tem importante papel na destruição de células neoplásicas e de micróbios intracelulares facultativos [NATHAN *et al.*, 1979a; NATHAN *et al.*, 1979b; ALEXANDER & VICKERMAN, 1975].

Certos microrganismos e protozoários patogênicos são capazes de parasitar os macrófagos sem ser eliminados pelos produtos da explosão respiratória [CHANG & DWYER, 1978; LIEW, LI & MILLOT, 1990]. Entretanto, tais patógenos podem ser eliminados quando os macrófagos são ativados por produtos de linfócitos T, como por exemplo, o Interferon-gama ($IFN-\gamma$), que levam à expressão da enzima sintase do óxido nítrico induzida (iNOS), a qual catalisa a oxidação da L-arginina para L-citrulina, gerando o óxido nítrico (NO), que é um gás tóxico [MACKANESS, 1962; GREEN *et al.*, 1990; LIEW *et al.*, 1990; ROACH, KIDERLEN & BLACKWELL, 1991; NATHAN & HIBBS, 1991]. Além da L-arginina, a iNOS usa o oxigênio molecular e o NADPH para gerar o NO

na primeira etapa da reação de oxidação de um dos guanido-nitrogênios do aminoácido. O NO formado poderá reagir com outra molécula similar, ou com oxigênio ou com a água e gerar os produtos finais acumulantes: nitritos, nitratos e o radical dióxido de nitrogênio (NO₂). A reação de oxidação da L-arginina termina com a doação de um átomo de oxigênio ao guanido-nitrogênio oxidado, gerando a L-citrulina [HIBBS *et al.*, 1988; LOWENSTEIN & SNYDER, 1992; GREEN, NACY & MELTZER, 1991].

Precusores hematopoiéticos cultivados *in vitro* na presença de fatores de crescimento, como o CSFs (Fator Estimulador de Colônia), são capazes de se dividir e formar colônias de granulócitos e monócitos, de modo dose-dependente [NICOLA & VADAS, 1984; METCALF, 1985]. Células dendríticas também podem ser diferenciadas de precusores da medula óssea cultivados na presença de GM-CSF (Fator Estimulador de Colônia de granulócitos e macrófagos) [INABA *et al.*, 1992]. DCs diferenciados *in vitro* pelo GM-CSF e ativados com LPS, foram capazes de utilizar a L-arginina pela via da iNOS e pela via da arginase [CORRALIZA *et al.*, 1994].

O metabolismo da L-arginina é agora reconhecido como um importante meio através do qual o sistema imune é regulado, uma vez que os produtos de sua degradação também influenciam as respostas das células T [BRONTE *et al.*, 2003]. Nesse sentido, ZIMMERMANN & ROTHENBERG [2006] identificaram a arginase e seus metabólitos, com efeitos inibitórios sobre a iNOS, como um elemento chave na patogênese da asma.

AS ENZIMAS iNOS e ARGINASE

A produção de óxido nítrico pelas células fagocíticas está sob controle imunológico. Sua produção é positivamente regulada pelo IFN- γ , que age sinergicamente com o Fator de

Necrose Tumoral- α (TNF- α) e com o LPS bacteriano, e é inibida por citocinas como a IL-4 e IL-10 e o Fator transformador de crescimento (TGF)- β [HIBBS *et al.*, 1988; AMES & SHIGENAGA, 1992, CUNHA, MONCADA & LIEW, 1992; BOGDAN *et al.*, 1994]. Por ser altamente mutagênico e tóxico ao DNA e provocar alterações nas funções normais das células e na morte celular, as grandes quantidades de NO produzidas durante as respostas inflamatórias vêm sendo apontadas por vários autores como um dos agentes do processo de envelhecimento [AMES & SHIGENAGA, 1992; KIRKWOOD & KOWALD, 1997; McCANN *et al.*, 1998].

Entretanto, o NO também pode ser produzido em situações fisiológicas, em pequenas quantidades e de modo transitório, através da ação das sintases do óxido nítrico expressas constitutivamente em células endoteliais (eNOS) e em neurônios (nNOS) [CHRISTOPHERSON & BREDT, 1997; HARRISON, 1997; MAYER & HEMMENS, 1997; NATHAN, 1997].

Ao contrário da iNOS, à qual a calmodulina encontra-se permanentemente ligada, as NOS constitutivas ligam-se à calmodulina na dependência do influxo de cálcio para o interior das células, o que explica a transitoriedade de seus efeitos. A forma neuronal está presente no sistema nervoso central e periférico e o NO por ela gerado durante a oxidação da L-arginina tem um papel fisiológico importante como neurotransmissor. Por sua vez, o NO produzido pela ação da eNOS tem grande importância no controle do fluxo sanguíneo e do tônus vascular, devido ao seu papel no relaxamento da musculatura lisa dos vasos [BATLOUNI & RAMIRES, 1994; LORENTE *et al.*, 1993].

Em condições normais, a disponibilidade de L-arginina parece ser um dos principais fatores que limitam a taxa de produção de NO intracelular em células fagocíticas [MORI &

GOTOH, 2000]. Nesse sentido, a expressão da arginase, outra enzima que utiliza a L-arginina como substrato, pode ser responsabilizada por limitar a disponibilidade de L-arginina em macrófagos ativados e, portanto, de geração de NO [MORI *et al.*, 1998; MORRIS, 2002]. Além de regular a síntese de NO, a arginase desempenha um papel importante na remodelação da parede dos vasos e na prevenção de doenças vasculares, constituindo um novo agente promissor na terapêutica vascular [DURANTE, JOHNSON & JOHNSON, 2007].

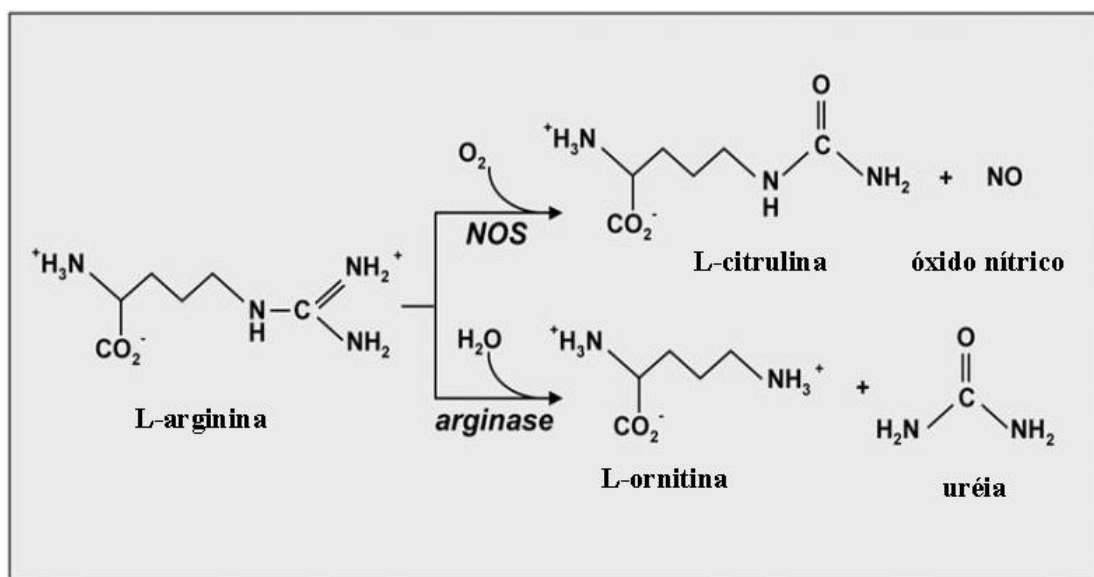


Figura 3- Metabolismo de L-arginina pela sintase do óxido nítrico (NOS) e arginase. A NOS degrada a L-arginina por oxidação em L-citrulina e óxido nítrico (NO), enquanto a arginase hidrolisa a L-arginina a uréia e L-ornitina [adaptado de DURANTE, JOHNSON & JOHNSON, 2007].

A literatura mostra que o tratamento de macrófagos peritoneais ou derivados da medula óssea com IL-4 e IL-13 leva a expressão aumentada de arginase tipo I, com alto consumo de L-arginina, regulando negativamente a produção de NO nessas células. O aumento da expressão de ARG1 em macrófagos murinos estimulados por IL-4 e IL-13 foi

dependente de Stat6, um componente essencial da via sinalizadora de receptores dessas citocinas [RUTSCHMAN *et al.*, 2001].

A arginase está presente nos mamíferos em duas isoformas [JENKINSON, GRODY & CEDERBAUM, 1996], uma catiônica (A1) e outra aniônica (A4), também chamadas isoformas I e II, respectivamente [POREMBSKA, 1973]. Essas isoformas são expressas no intestino, rim e cérebro de ratos [KONARSKA & TOMASZEWSKI, 1986] e suas atividades podem ser detectadas a partir do 13^o e 16^o dias de gestação. No intestino de roedores, a isoforma I da arginase aparece na vida fetal e perdura até o 19^o – 21^o dias da vida pós-natal, ocasião do desmame. Ao redor desse período, começa a aparecer e rapidamente se acumular no intestino a arginase tipo II, sendo esta isoforma a responsável pelo aumento da atividade da arginase no intestino durante o desmame. No rim, no período fetal, apenas a isoforma I está presente. Nesse tecido, a isoforma II só é detectada 3-4 dias antes do nascimento e sua atividade persiste nas duas primeiras semanas de vida pós-natal. No cérebro, as isoenzimas da arginase são formadas mais cedo do que em outros tecidos [WU & MORRIS, 1998]. Foi recentemente demonstrado que a isoforma AI parece ser mais efetiva em regular a produção de NO através da nNOS, provavelmente por competir pela L-arginina [QUE *et al.*, 2002].

As isoformas I e II da arginase, presentes nas células de mamíferos adultos também são denominadas ARG1 (forma catiônica) e ARG2 (aniônica), respectivamente [JENKINSON, GRODY & CEDERBAUM, 1996; POREMBSKA, 1973]. A ARG1 é uma enzima citosólica, expressa em altos níveis no fígado, como um componente do ciclo da uréia, onde hidrolisa a L-arginina dando origem à uréia e a ornitina, sendo este último produto, um precursor para a biossíntese da prolina, glutamato e poliaminas [MEZL & KNOX, 1977; WU & MORRIS, 1998]. A ARG2 é uma enzima mitocondrial expressa em

baixos níveis no rim, cérebro, intestino delgado e glândula mamária, mas com expressão limitada no fígado [BRONTE *et al.*, 2003].

As atividades e regulação da arginase e da Ornitina aminotransferase (OAT) no fígado - um tecido mitótico- são mais elevadas em rato imaturo e diminuídas no rato velho. No córtex do rim - um tecido pós-mitótico -, a atividade da arginase é alta em indivíduos jovens e diminui com o avanço da idade, enquanto a OAT não mostra alteração durante toda vida do animal. Neste tecido, a atividade da arginase é aproximadamente 1/20 da enzima no fígado. Em animais adrenalectomizados ou tratados com hidrocortisona, não se observam alterações na atividade da arginase no fígado e no rim, mas a OAT se mostra alterada no fígado. A Actinomicina D foi capaz de inibir a indução da arginase no fígado e córtex de rim, e da OAT no fígado [PATNAIK & PATNAIK, 1989].

É conhecido de longa data que macrófagos podem ser induzidos a produzir arginase e que isso pode levar a uma perda de sua capacidade citotóxica [KUNG *et al.*, 1977] e ao crescimento de células tumorais [CHANG, LIAO & KUO, 2001]. Entretanto, macrófagos murinos ativados por LPS co-expressam iNOS e a arginase, enzimas que utilizam o mesmo substrato [WANG *et al.*, 1995]. Em respostas imunes adaptativas, a predominância de uma enzima sobre a outra depende da citocina envolvida na estimulação, isto é, citocinas Th1 induzem iNOS e citocinas Th2 induzem a expressão de arginase [MODOLELL *et al.*, 1995]. MUNDER e colaboradores [1999] verificaram que citocinas derivadas de linfócitos Th2 induzem apenas a expressão da ARG1 em macrófagos e células dendríticas; a ARG2 é constitutivamente expressa em macrófagos murinos. Observações posteriores indicam que macrófagos de ratos e camundongos diferem quanto a utilização de L-arginina pelas vias da iNOS e da arginase, em resposta à inflamação. Em ratos, a inflamação provocou o aumento exclusivo da via da iNOS enquanto em camundongos ambas, iNOS e arginase, foram

aumentadas pelo processo inflamatório provocado pela administração de caseína por via intraperitoneal [MULLNER, LÁZÁR & HRABAK, 2002].

Entre os mediadores endógenos, IL-4, IL-10 e prostaglandina E2 se mostram potentes indutores de arginase, enquanto o IFN- γ inibe a síntese da enzima. Por outro lado, a aplicação simultânea de IFN- γ e de IL-4 ou IL-10 às culturas de macrófagos reduz a expressão de ambas as enzimas [MODOLELL *et al.*, 1995].

Como mencionado acima, o LPS induz a co-expressão *in vitro* de arginase e de iNOS em macrófagos peritoneais de ratos [SONOKI *et al.*, 1997; MORI *et al.*, 1998]. Sob estímulo com a endotoxina, as células peritoneais primeiramente expressam a iNOS e logo em seguida expressam a arginase. Cerca de 2 horas após o contato com o LPS, as células começam a expressar o mRNA para iNOS, que em 8-12 horas alcança o pico de produção. O mRNA para a ARG1 só começa a ser expresso cerca de 4 horas após o contato com o LPS, alcançando o pico de expressão em 12 horas. A isoforma II da arginase não foi induzida em macrófagos de ratos pela exposição à endotoxina [MORI *et al.*, 1998]. A expressão da iNOS e da arginase também pode ser observada *in vivo*, em macrófagos de pulmão e baço de ratos após a administração de LPS. Nesse caso, a iNOS alcançou o pico de expressão entre 2-6 horas e a arginase em 12 horas. Em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7, o LPS também co-induziu o mRNA para ARG2 e o mRNA para iNOS [MORI *et al.*, 1998]. Resultados similares foram encontrados por CHANG e colaboradores [1998]. Entretanto, têm sido relatadas discrepâncias com relação à habilidade do LPS induzir também a ARG2 em células mielóides, o que na opinião de alguns autores [WU & MORRIS, 1998; MORRIS, 2002] pode ser atribuído ao uso de linhagens

macrófago-símile ou de culturas primárias de macrófagos derivados da medula óssea [BRONTE *et al.*, 2003].

A quitosana, um aminopolissacarídeo com capacidade de aumentar as funções de células inflamatórias, como macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, foi capaz de ativar tanto a via da iNOS quanto a da arginase, em macrófagos residentes e elicitados com proteose-peptona [PORPORATTO *et al.*, 2003; USAMI *et al.*, 1998; BIANCO *et al.*, 2000]. Em macrófagos elicitados, a atividade arginase se mostrou fortemente aumentada pelo tratamento com quitosana, sugerindo que a atividade cicatrizante do polissacarídeo pode ser devida a elevação da atividade dessa enzima.

Mas, enquanto o papel dos macrófagos como células inflamatórias que expressam iNOS está bem estabelecido, a competência funcional de células expressando arginase em resposta a citocinas ainda não foi completamente elucidada.

MACRÓFAGOS E ENVELHECIMENTO

O envelhecimento está acompanhado por uma redução da eficiência do sistema imune, comprometendo a saúde geral de indivíduos idosos [WICK & GRUBECK-LOEBENSTEIN, 1997; WICK *et al.*, 2000; BEVERLEY & GRUBECK-LOEBENSTEIN, 2000]. Enquanto as mudanças no sistema imune adaptativo em função do avanço da idade estão bem documentadas, as alterações do sistema imune inato são menos descritas. Todavia, é cada vez mais evidente a interdependência dos sistemas imune inato e adaptativo, que cooperam em vários níveis para assegurar uma eficiente resposta imune contra os micróbios e células tumorais. Assim, a disfunção de um braço da imunidade pode comprometer seriamente o funcionamento do conjunto do sistema imunológico,

principalmente em idosos [REIS E SOUSA, 2004]. Profundas alterações no sistema imune adaptativo, principalmente em número e função de células T, podem contribuir para um aumento na susceptibilidade de idosos às doenças auto-imunes, tumores e infecções virais [WICK *et al.*, 2000]. Embora menos estudadas, alterações dependentes da idade no sistema imunológico inato e seu reflexo sobre a saúde dos indivíduos velhos têm sido relatadas. Nesse sentido, foi observado um aumento de reações inflamatórias em idosos, que se correlacionam com condições neurológicas, tais como a doença de Alzheimer e doenças cardiovasculares, tais como a arteriosclerose [revisto em WICK *et al.*, 2000].

Para lidar eficientemente com micróbios, as células do sistema imunológico são capazes de produzir moléculas antimicrobianas, tais como defensinas e lactoferrina, e radicais livres como o peróxido de hidrogênio e o óxido nítrico [revisto em GREEN, NACY & MELTZER, 1991]. Citocinas como IFN- γ e TNF- α , bem como LPS bacteriano, são responsáveis pela expressão da iNOS, e a geração de grandes quantidades de NO em neutrófilos e macrófagos, a partir da conversão da L-arginina [STUEHR & MARLETTA, 1987, MARLETTA *et al.*, 1988; GREEN *et al.*, 1990; LIEW *et al.*, 1990; ROACH *et al.*, 1991]. Quando produzido em grandes quantidades, o NO pode reagir com o ânion superóxido, formando peroxinitrito, uma potente molécula oxidante que contribui para a lesão tecidual em processos inflamatórios [BOGDAN C., ROLLINGHOFF M. & DIEFENBACH A. 2000].

As arginases I e II também são enzimas envolvidas no metabolismo da L-arginina, gerando L-ornitina e uréia. Produtos intermediários da via da arginase são responsáveis pela geração de poliaminas, como a putrescina, espermidina e espermina, moléculas importantes na regulação da proliferação, diferenciação e morte celular [INIESTA *et al.*,

2002; BLANTZ *et al.*, 2000]. Os macrófagos também podem utilizar a L-arginina pela via da arginase, cuja expressão pode ser substancialmente aumentada por citocinas anti-inflamatórias como a IL-4, IL-10 e TGF- β [BOGDAN AND NATHAN, 1993].

Desta forma, o balanço da atividade da iNOS e arginase em macrófagos parece ser crucial para funções dessas células, mas os mecanismos envolvidos neste equilíbrio ainda não estão definidos, bem como não se conhece o perfil de expressão dessas enzimas em macrófagos no envelhecimento.

Embora o envelhecimento esteja associado ao desenvolvimento de doenças crônicas [WICK *et al.*, 2000], ainda não está claro se a atividade inflamatória aumentada causa a patologia associada à idade ou se reflete a soma de vários processos em curso [BRUUNSGAARD, PEDERSEN, & PEDERSEN, 2001]. Contudo, De MARTINIS e colaboradores [2005] consideram que as doenças crônicas da velhice são decorrentes da intensa atividade inflamatória, tendo cunhado o termo “inflamm-ageing” para se referir a tal associação de causa e efeito.

No presente trabalho, analisamos a atividade e a expressão de iNOS e arginase, bem como a produção de citocinas IL-1, TNF- α e IL-10 em macrófagos de camundongos jovens e velhos. Os resultados obtidos são apresentados e discutidos a seguir e indicam que alterações significativas desses parâmetros ocorrem ao longo da vida nas células do sistema imune inato.

III - OBJETIVOS E ESTRATÉGIAS

OBJETIVOS

Investigar a atividade das enzimas iNOS e arginase em macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 jovens frente a diferentes estímulos inflamatórios, considerando-se sua origem e estado de ativação. Estudar comparativamente a atividade e expressão das enzimas iNOS e arginase, bem como a produção de citocinas, em macrófagos de camundongos BALB/c jovens e velhos.

ESTRATÉGIAS

1. Analisar a atividade iNOS e arginase em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c jovens, cultivados na presença de doses padronizadas de LPS, IL-4 ou IFN- γ ;
2. Analisar comparativamente a atividade iNOS e arginase em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 jovens após a fagocitose de *Leishmania major*, zimosan opsonizado ou linfócitos apoptóticos;
3. Comparar a atividade e a expressão da iNOS em macrófagos peritoneais e de medula óssea de camundongos BALB/c jovens e velhos, estimulados *in vitro* com doses padronizadas de LPS ou IFN- γ ;
4. Comparar a atividade e a expressão de arginase em macrófagos peritoneais e de medula óssea de camundongos BALB/c jovens e velhos estimulados *in vitro* com doses padronizadas de IL-4 ou LPS;
5. Comparar a produção de citocinas (IL-1 α , TNF- α e IL-10) por macrófagos peritoneais e de medula óssea obtidos de camundongos BALB/c jovens e velhos.

IV - MATERIAIS E MÉTODOS

1. - ANIMAIS

Camundongas da linhagem BALB/c e C57BL/6 foram obtidas no Centro Multinstitucional de Investigações Biológicas da UNICAMP (CEMIB/UNICAMP) com 4 semanas de idade e mantidas no Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia, em condições SPF (*specific pathogen free*), em ambiente com temperatura controlada, com água e ração em livre demanda. Nos experimentos, esses animais foram utilizados nas idades 8-12 semanas (jovens), 32 semanas (adultos) e 64-72 semanas (velhos). Os protocolos experimentais envolvendo animais de laboratório foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UNICAMP (Protocolo no. 450-1).

2. - REAGENTES

Os seguintes reagentes especiais foram utilizados: LPS (Lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* O26:B6 (DIFCO Laboratories; Detroit, Michigan, USA); IL-4 e IFN- γ (R&D; Minneapolis, MN, USA); Fluoreto de fenilmetanosulfonila (PMSF), Aprotinina, Antipaina, Inibidor de tripsina da soja, Triton X-100, α -isonitroso-propiofenona (ISPF), Leupeptina (USB; Cleveland, OH, USA); Soro Fetal bovino (SFB) foi adquirido da Cultilab (Campinas, SP, Brasil).

3. - PREPARO DAS CÉLULAS

3.1. - Coleta e cultura de macrófagos peritoneais (M ϕ P)

Células das cavidades peritoneais de camundongos da linhagem BALB/c ou C57BL/6, normais ou estimulados com meio de tioglicolato a 3% (3,0 mL/cavidade, 4 dias antes do uso), foram coletados assepticamente com 3,0 mL de meio RPMI (Roswell Park

Memorial Institute) 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA). Os lavados peritoneais foram depositados, individualmente, em tubos estéreis mergulhados em banho de gelo. A concentração celular nos lavados foi ajustada para 1×10^6 células/mL, após contagem em câmara de Neubauer. As suspensões padronizadas de células foram semeadas em placas 96 poços (CORNING), na densidade de 2×10^5 células/poço. A seguir, as placas foram incubadas por 2 horas, a 37°C , em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 e 85% de umidade. Após a incubação, as monocamadas foram lavadas com PBS pH 7,2, para a remoção das células não aderentes. Em alguns experimentos, as suspensões foram semeadas em placas de 24 poços na densidade de 1×10^6 células/mL/poço. Após a aderência ao plástico, as monocamadas de M ϕ P foram incubadas com os estímulos apropriados.

3.2. - Obtenção de sobrenadante de células L929

Fibroblastos de camundongos da linhagem L929 (ATCC), criopreservados em nosso laboratório, foram descongelados em meio RPMI, contendo 10% SFB. As células foram semeadas em frasco de cultura tipo T25 (Corning) e cultivadas a 37°C , em incubadora de CO_2 . Os sobrenadantes das culturas foram coletados cerca de 48 horas após o início das culturas, na fase de crescimento logarítmico, centrifugados a 200g, por 10 min, em centrífuga refrigerada (Revan Instrumentos Científicos LTDA, SP) e estocados a -20°C até o momento do uso, para diferenciação de células da medula óssea.

3.3. - Coleta e cultura de células da medula óssea (M ϕ MO)

As células da medula óssea foram obtidas de fêmures de camundongos BALB/c, de acordo com BOLTZ-NITULESCU *et al.* [1987], com algumas modificações. Brevemente,

os fêmures foram assepticamente deslocados na junção do quadril, separados do corpo e colocados em recipiente estéril, contendo solução de cloreto de sódio 0,15 M, tamponada com fosfatos 0,05 M, pH 7,2 (PBS). Após a completa limpeza dos ossos e remoção da musculatura, o fêmur foi separado da tíbia, as epífises foram cortadas e os ossos foram transferidos para outro recipiente estéril, contendo 8-10 mL de PBS. A medula foi expelida, usando-se uma agulha de insulina através do orifício central do osso, por onde uma solução de PBS foi introduzida repetidas vezes. Uma amostra das células obtidas foi diluída (cerca de 20 vezes) em solução de Turk (2% de ácido acético), contada em câmara de Neubauer e a concentração celular foi ajustada para 2×10^6 células/mL. As suspensões padronizadas de células da medula foram semeadas em placas de Petri (CORNING), na densidade de 8×10^6 células/placa/4 mL, em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SFB, antibiótico (gentamicina, 50 µg/mL), 30% de sobrenadante de células L929 e 5% de soro equino (CULTILAB). A seguir, as placas foram incubadas a 37°C, por 8 dias, em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e 85% de umidade. No quarto dia, o meio de cultura foi completamente removido e as células foram alimentadas com meio fresco. Após o oitavo dia de cultivo, as colônias diferenciadas (Anexo 1) foram removidas por pipetagens vigorosas, após vinte minutos de incubação das placas com solução salina 0,15 M, em banho de gelo. Após a contagem em câmara de Neubauer, a concentração celular foi ajustada para 4×10^6 células/mL e as suspensões foram semeadas em placas de 96 poços (CORNING), na densidade de 2×10^5 células/poço, em meio RPMI 1640 completo (suplementado com 10% de SFB e antibiótico) para os ensaios de atividade iNOS e arginase.

3.4. - Cultura de Leishmania major

A cepa de *Leishmania major* foi cedida pelo Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP) e cultivada em nosso laboratório por passagens a cada 5 a 7 dias em meio Iscoves, contendo 10 mM de HEPES, 2g/L bicarbonato de sódio, 25 mg/L de gentamicina e 20% de SFB. Para os ensaios de fagocitose, as formas promastigotas (fase estacionária) foram coletadas dos frascos de culturas, transferidas para tubos de centrifuga e sedimentadas a 200 g por 20 min. O sedimento foi ressuspensão em meio RPMI incompleto e a suspensão foi novamente centrifugada a 200g por 20 min. O sedimento final foi ressuspensão em meio RPMI completo, contado em câmara de Neubauer, a suspensão foi finalmente ajustada para 3×10^6 formas/mL e utilizadas em experimentos de fagocitose como descritos no item 6.

3.5. – Preparo de timócitos apoptóticos

Timócitos de camundongos jovens (BALB/c ou C57Bl/6) foram tratados com o glicocorticóide dexametasona para indução de apoptose, de acordo com indicações de FADOK e colaboradores [1992]. Brevemente, os timos foram coletados assepticamente e depositados em placas de Petri estéril, contendo meio RPMI incompleto. Os órgãos foram macerados e a suspensão obtida foi filtrada em peneira para a separação dos debris celulares. Após centrifugação a 200g, por 10 minutos, as células foram ressuspensas em meio de cultura. Uma alíquota da suspensão foi utilizada para marcação com anticorpos anti-CD3 (clone 2C11) para análise por citometria de fluxo (FACScalibur, localizado no Hemocentro da UNICAMP); em três marcações independentes, obteve-se entre 81 e 99,7% de células CD3+ nas preparações (Anexo 2). As células foram semeadas em placas de cultura de 6 poços (CORNING) na densidade de 2×10^7 células/3 mL de meio RPMI

contendo 10% SFB, 50 mg/L de Gentamicina, 10 μ M Dexametasona/poço e incubadas a 37°C, em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO₂, por 15 a 18 horas. Após esse período de incubação, as células apoptóticas (Anexo 3) foram coletadas das placas de cultura através de pipetagem suave, centrifugadas a 200g, por 10 minutos, ressuspensas em meio de cultura e ajustadas para uma concentração de 5x10⁶ células/mL, que foram empregadas nos ensaios de fagocitose descritos no item 6.

4. - DOSAGEM DE NO₂⁻ EM MACRÓFAGOS

4.1. - Estimulação das monocamadas de macrófagos com LPS, IL-4, IFN- γ e obtenção de sobrenadantes

Monocamadas de células aderentes (geralmente 90% macrófagos), residentes ou elicitadas pelo tioglicolato (M ϕ P), ou monocamadas de células diferenciadas a partir de células da medula óssea (M ϕ MO) foram estimuladas a secretar óxido nítrico, segundo indicações de DING, NATHAN & STUEHR, [1988], adicionando-se a cada cultura, diferentes concentrações de LPS (1, 10, 100, 1000 ng/mL), IL-4 (0,1, 1, 10 UI/mL) e IFN- γ (0,5, 5, 50 UI/mL), diluídos em meio RPMI contendo 10% de SFB e antibióticos, em volume final de 200 μ L. Após a adição dos estímulos, as placas foram incubadas a 37°C, em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas. Alíquotas de 50 μ L dos sobrenadantes de cada cultura foram coletadas e transferidas, em triplicatas, para uma placa de microtitulação de 96 poços (NUNC, NUNCLON).

4.2. - Dosagem de NO₂⁻

As dosagens de nitrito foram realizadas, segundo indicações de GREEN *et al.* [1982]. Brevemente: 50µL do reagente de Griess (1% de sulfanilamida em ácido fosfórico a 5% e 0,1% de dihidroclorato de naftiletielenodiamina em água destilada) foram acrescentados a cada sobrenadante de cultura de macrófagos, distribuídos previamente em placas de 96 poços. Após agitação das placas, foram realizadas as leituras espectrofotométricas em leitor de ELISA (Multiskan MS, Labsystems, USA), a 540 nm, usando-se, como padrão, soluções de nitrito de sódio (320, 160, 80, 40, 20, 10 e 5 µM). Os resultados foram expressos em µM de nitrito/1x10⁶ células/mL.

5. - DOSAGEM DE URÉIA EM MACRÓFAGOS

A detecção da atividade da arginase foi realizada conforme a metodologia descrita por CORRALIZA *et al.* [1994], com algumas alterações. Brevemente, monocamadas de MφP de camundongos naïve ou elicitados pelo tioglicolato ou de MφMO foram cultivadas na presença ou ausência de estímulos variados (como indicado no item 4.1). Após a remoção dos sobrenadantes, 50µL de uma solução de lise (0,1% de Triton X-100, contendo 5 µg de aprotinina ou do inibidor de tripsina e 5 µg de antipainá ou PMSF), foram adicionados a cada poço de cultura. A mistura foi agitada por 30 min, à temperatura ambiente. Após a lise das células, foram acrescentados, a cada poço, 50µL de uma solução de MnCl₂ 10 mM, em tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 7,5, para a ativação da enzima, por 10 min, a 55⁰C.

Alíquotas de 25µL dos lisados previamente ativados foram transferidas para tubos *ependorf*, aos quais foram adicionados 25 µL de L-arginina a 0,5 M (Sigma, St. Louis, MO 63178, USA), pH 9,7. Após incubação a 37⁰C, por 60 min, a reação de hidrólise da L-

arginina foi interrompida pela adição de 400 µL de uma mistura de ácidos, contendo H₂SO₄, H₃PO₄ e H₂O (1:3:7). A uréia formada foi quantificada através de leitura colorimétrica, a 540 nm, após a adição de 25 µL de uma solução a 9% de ISPF, em etanol absoluto, e aquecimento da mistura a 100°C, por 45 min. Após 10 min no escuro, a DO a 540 nm foi determinada em leitora de microplaca (Multiskan MS, Labsystems, USA), usando alíquotas de 100 µL distribuídas em placas de 96 poços.

A curva de calibração foi preparada com quantidades crescentes de uréia, entre 1,5 e 1200 µg/mL. A cada 100 µL das soluções de uréia, nas concentrações apropriadas, foram adicionados 400 µL da mistura de ácidos e 25 µL de ISPF, procedendo-se a seguir, conforme indicado acima.

6. - FAGOCITOSE

6.1. - Preparo e obtenção de zimosan

O zimosan foi preparado de acordo com as indicações de METCALF *et al.* [1986], com algumas modificações. Brevemente: quinze miligramas (15 mg) de fermento Fleischman (Fermix) foram distribuídos em tubos de vidro, contendo 5 mg/tubo. Cada tubo foi acrescido de 150 mL de solução salina estéril (0,85%), e aquecido em banho-maria Dubnoff a 100°C (Marconi; Piracicaba, SP, Brasil) durante 1 hora. Alíquotas de 50 mL foram separadas por frascos e filtradas em gaze estéril com funil, e centrifugadas 200g por 10 minutos, até que o sobrenadante se apresentasse claro. Para a contagem, foram feitas diluições seriadas 1:100 e 1:1000 em salina 0,85%, sempre homogeneizando a solução em Vortex. As partículas foram ajustadas para a concentração de $1,5 \times 10^8$ /mL e mantidas a -20°C até o uso.

6.2. - Opsonização do zimosan com C3bi

A fagocitose de zimosan foi realizada de acordo com indicações de HANKS [1940], com alterações. Brevemente, partículas de zimosan na densidade de 2×10^8 partículas/2mL foram adicionadas a 200 μ L de soro normal de coelho, esterilizado por filtração e incubadas durante 15 minutos a 37°C, sob agitação. A reação foi interrompida por abaixamento de temperatura (em banho de gelo) e a diluição da suspensão em solução salina 0,15 M a 0°C. Após centrifugação a 200g, por 5 minutos, em centrífuga refrigerada, o sobrenadante foi descartado. Em seguida, o zimosan foi lavado uma vez em solução salina 0,15 M gelada e o sedimento foi ressuspenso em 2 mL de Solução Balanceada de Hank's, contendo Ca^{++} e Mg^{++} (HBSS). A suspensão foi ajustada para a concentração de 1×10^8 partículas/mL e utilizada nos ensaios de fagocitose.

6.3. - Ensaio de Fagocitose

Células do lavado peritoneal de camundongos foram semeadas na densidade de 1×10^6 células/mL, em placas de 24 poços foram incubadas por 18 h com doses sub-ótimas de LPS (100 ng/mL), IL-4 (4ng/mL) ou IFN- γ (5UI/mL). Após lavagem das culturas para remoção dos estímulos, 5×10^6 partículas de zimosan opsonizadas, 5×10^6 linfócitos apoptóticos ou 3×10^6 promastigotas de *L. major* foram adicionados aos poços de cultura e as placas foram incubadas por 3 h a 37°C, em estufa de CO₂. Após esse período, as partículas não fagocitadas foram removidas por lavagem com meio incompleto. As culturas foram re-incubadas em meio RPMI completo por 48 h em estufa de CO₂, quando os sobrenadantes foram coletados para a dosagem de nitrito e citocinas. Posteriormente, as

monocamadas de macrófagos foram preparadas para obtenção de extratos celulares para dosagem de atividade arginase pela conversão de L-arginina em uréia.

7. - AVALIAÇÃO DA CELULARIDADE EM CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS BALB/C

Células residentes ou elicitadas pela administração de tioglicolato a 3% (3,0 mL/cavidade, 4 dias antes do uso) foram coletadas assepticamente da cavidade peritoneal de camundongos da linhagem BALB/c de diferentes faixas etárias, para determinar o número total de células nas cavidades por contagem em câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. e analisados estatisticamente pelo teste de Bonferroni.

8. - DETECÇÃO DA SINTASE INDUZÍVEL DE ÓXIDO NÍTRICO E DA ARGINASE

A técnica de Western blot, descrita por TOWBIN, STAEBELIN & GORDON [1979], foi aplicada para a detecção da produção da Sintase de óxido nítrico e da Arginase por macrófagos de camundongos de diferentes faixas etárias, conforme descrito a seguir.

8.1. - Preparo das amostras

Monocamadas de macrófagos naïve ou elicitados foram preparadas em placas de Petri descartáveis de 100x20mm (CORNING), semeando-se uma suspensão de 1×10^7 células peritoneais em 5,0 mL de meio RPMI com 10% de SFB e 50 ug/mL de gentamicina. As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C, em estufa com 5% de CO₂.

Após a remoção das células não aderentes por lavagem com PBS pH 7,2 estéril, as monocamadas de macrófagos foram incubadas com o meio de cultura contendo 1 µg/mL de LPS ou 50 UI/mL de IFN- γ , por 12 horas, a 37°C, em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ (para detecção da iNOS), ou então com 1 µg/mL de LPS ou 40 UI/mL de IL-4 por 48 horas, a 37°C, em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ (para detecção da arginase). A seguir, as células foram lavadas 3 vezes com PBS, pH 7,2 para a remoção dos estímulos e do excesso de proteínas contidas no meio de incubação. Meio mililitro de tampão de amostra para eletroforese (125 mM de Tris-HCl pH6,8, 2% SDS, 5% de glicerol, 0,003% de azul de bromofenol e 1% de β -mercaptoetanol) foi adicionado a cada placa de Petri. Os extratos celulares obtidos foram transferidos para tubos de centrifuga, tipo *ependorf*, aquecidos por 5 min a 100°C, em banho-maria e a seguir centrifugados por 5 min, a 8.000g, em microcentrífuga (Eppendorf; Westbury, N.Y., U.S.A.) para a remoção dos debris celulares. Os sobrenadantes foram coletados e utilizados imediatamente após a sua obtenção para a separação eletroforética de proteínas.

8.2. - Eletroforese

A separação dos polipeptídeos contidos nos lisados de macrófagos foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (gel de empilhamento a 3% e gel de separação a 7,0%) contendo dodecil sulfato de Sódio (SDS-PAGE), de acordo com indicações de LAEMMLI [1970]. Volumes de 60 µL contendo os lisados originados de 6×10^5 células aderentes foram aplicados nas pistas dos géis de eletroforese, que foi conduzida em equipamento MiniProteanII (BioRad), de acordo com recomendações do fabricante. A corrente foi ajustada para 25mA e a corrida foi realizada em 2 horas.

Após a separação, as proteínas foram transferidas, eletroforéticamente, para membrana de nitrocelulose (S&S), em equipamento Mini transblotting (BioRad), por 2 horas, a 180 mA, em Tris-HCl 25mM, glicina 192mM, 1% de SDS e 18,4% de etanol. A eficiência da transferência foi verificada pela coloração dos géis por 30 min em metanol/ácido acético/água (5/1/15, v/v/v) contendo 0,25% de Coomassie brilliant blue R (Bio-Rad) e descorado em ácido acético/metanol/água (3/2/35, v/v/v). Os sítios reativos foram bloqueados pela imersão das membranas de nitrocelulose em solução de PBS contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé).

8.3. - Detecção da iNOS e da arginase

Para a detecção da iNOS nos diferentes lisados, as membranas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, e a seguir a 4⁰C por 18 horas, com o anticorpo monoclonal anti-macNOS do isotipo IgG2a de camundongo (clone 6; BD Transduction Laboratories, KY, USA) na concentração final de 1 µg/mL (1:500) em PBS pH 7,2 e 1% BSA. Após a lavagem (5 vezes com PBS pH 7,2 contendo 0,1% de Tween 20, PBS-Tw), a fita de nitrocelulose foi incubada por 2 horas a 37⁰C com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase (preparado em nosso laboratório), diluído a 1:500 em PBS, pH 7,2. A reação foi revelada usando o reagente SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate for Western Blotting (v:v), seguindo as instruções do fabricante (Pierce; SINAPSE BIOTECNOLOGIA, Rockford, IL, U.S.A.). Para a detecção da arginase, utilizou-se o mesmo procedimento acima descrito, com as seguintes alterações: a reação de detecção da arginase foi conduzida, empregando-se o anticorpo monoclonal específico do isotipo IgG1 de camundongo (clone 19; BD Transduction Laboratories, KY, USA), na concentração

final de 1 $\mu\text{g/mL}$ (1:000). Após revelação com o composto quimioluminescente, as membranas foram expostas a filmes de raio-X (KODAK XOMAT LS, KODAK) por 5 a 15 min. Os filmes foram revelados com o revelador e fixador para uso odontológico, conforme instruções do fabricante (KODAK). Após a secagem, os filmes foram copiados em aparelho do tipo Scan e as densitometrias integradas das bandas reveladas foram analisadas pelo programa ImageJ de análise de imagem (<http://rsb.info.nih.gov/ij/1997-2007>).

9. - DETECÇÃO E DOSAGEM DE CITOCINAS

Monocamadas de M ϕ P residentes ou elicitados pelo tioglicolato e monocamadas de M ϕ MO de camundongos BALB/c, jovens e velhos, foram preparadas como descrito nos itens 3.1. e 3.3., com as seguintes alterações: as monocamadas de macrófagos foram preparadas em placas de 24 orifícios, nas quais foram semeadas 1 mL de uma suspensão contendo 1×10^6 células de camundongos/mL/poço, do lavado peritoneal ou da suspensão de células da medula óssea diferenciadas em macrófagos na presença de CSFs. Após lavagem para remoção das células não aderentes, foi acrescentado 1 mL de meio RPMI completo, contendo LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) a cada poço de cultura. As placas foram incubadas por 48 horas, a 37°C, em estufa umidificada, em atmosfera contendo 5% de CO₂.

Os sobrenadantes foram coletados e testados para verificar a presença das citocinas IL-1- α , TNF- α e IL-10 por ensaios de ELISA tipo sanduíche, utilizando kits comerciais. Para a detecção de IL-1- α , foram utilizados Kits QuantiKine[®] M murine (R&D systems), para a detecção de TNF- α , foram utilizados Kits DuoSet (R&D systems) e para a detecção de IL-10, foram utilizados Kits OptEIA[™] (Pharmigen), seguindo as instruções do fabricante.

10. - ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos em μM de nitrito/ 1×10^6 células ou μg de uréia/ 1×10^6 células ou pg/mL da citocina/ 1×10^6 células e em seguida, foi realizado o teste t de “*Student*” para determinar se as variações foram estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$. Para a elaboração dessas análises, utilizou-se o Software GraphPad Prism.

V – RESULTADOS

1.- Efeito do LPS, IL-4 e IFN- γ sobre a atividade da iNOS e arginase em células peritoneais aderentes (M ϕ P) de camundongos naïve e elicitados.

Células peritoneais aderentes (M ϕ P) de camundongos naïve ou elicitados pelo tioglicolato foram estimuladas *in vitro* com quantidades crescentes de LPS (1, 10, 100, 1000 ng/mL), IL-4 (0,1, 1 e 10 UI/mL) ou IFN- γ (0,5, 5 e 50 UI/mL). A atividade da iNOS foi inferida pela determinação das quantidades de nitrito presentes nos sobrenadantes das cultura e a atividade de arginase foi inferida a partir da dosagem de uréia, convertida a partir da L-arginina, em reação conduzida na presença dos lisados das células aderentes. Os resultados obtidos estão resumidos nas Figuras 1 e 2.

Como é possível observar na Figura 1 (Painel A), o LPS e o IFN- γ foram capazes de induzir uma elevação significativa e dose-dependente nas quantidades de nitrito nos sobrenadantes de cultura de M ϕ P de camundongos naïve; enquanto que a IL-4, em qualquer das doses utilizadas, não foi capaz de induzir a produção de níveis detectáveis de óxido nítrico nas células residentes.

É possível observar na Figura 1 que os M ϕ P residentes já expressam arginase mesmo quando cultivados na ausência de qualquer estímulo *in vitro*, tendo em vista os níveis de uréia detectados nas reações conduzidas na presença dos extratos desse grupo de células (Painel B). Nenhuma mudança nos níveis de uréia pode ser observada quando as reações foram conduzidas na presença de extratos de M ϕ P naïve estimulados *in vitro* com qualquer das doses de LPS ou de IFN- γ , indicando que estes não são estímulos indutores da expressão da Arg2 para essas células. Por outro lado, a IL-4 foi capaz de elevar significativamente a atividade arginase em M ϕ P residentes de modo dose-dependente.

Macrófagos peritoneais de camundongos elicitados pelo tioglicolato e cultivados na presença de LPS ou IFN- γ também produziram de modo dose-dependente níveis elevados de NO, conforme determinado pela dosagem de nitrito no sobrenadante de cultura dessas células (Figura 2, Painel A). A IL-4 não foi capaz de induzir a produção de níveis detectáveis de óxido nítrico em todas as doses que foram empregadas.

Os extratos obtidos de M ϕ P elicitados e não estimulados também foram capazes de gerar quantidades elevadas de uréia nas reações de hidrólise da L-arginina; cerca de duas vezes mais do que o observado em M ϕ P naïve cultivados em condições idênticas (Figura 2, Painel B). Tanto LPS quanto IFN- γ não foram capazes de elevar os níveis de arginase nas células elicitadas. Ao contrário, IL-4 teve um efeito dose-dependente sobre a expressão de arginase, atingindo níveis significativamente mais levados na dose de 10 UI/mL (Figura 2, Painel B).

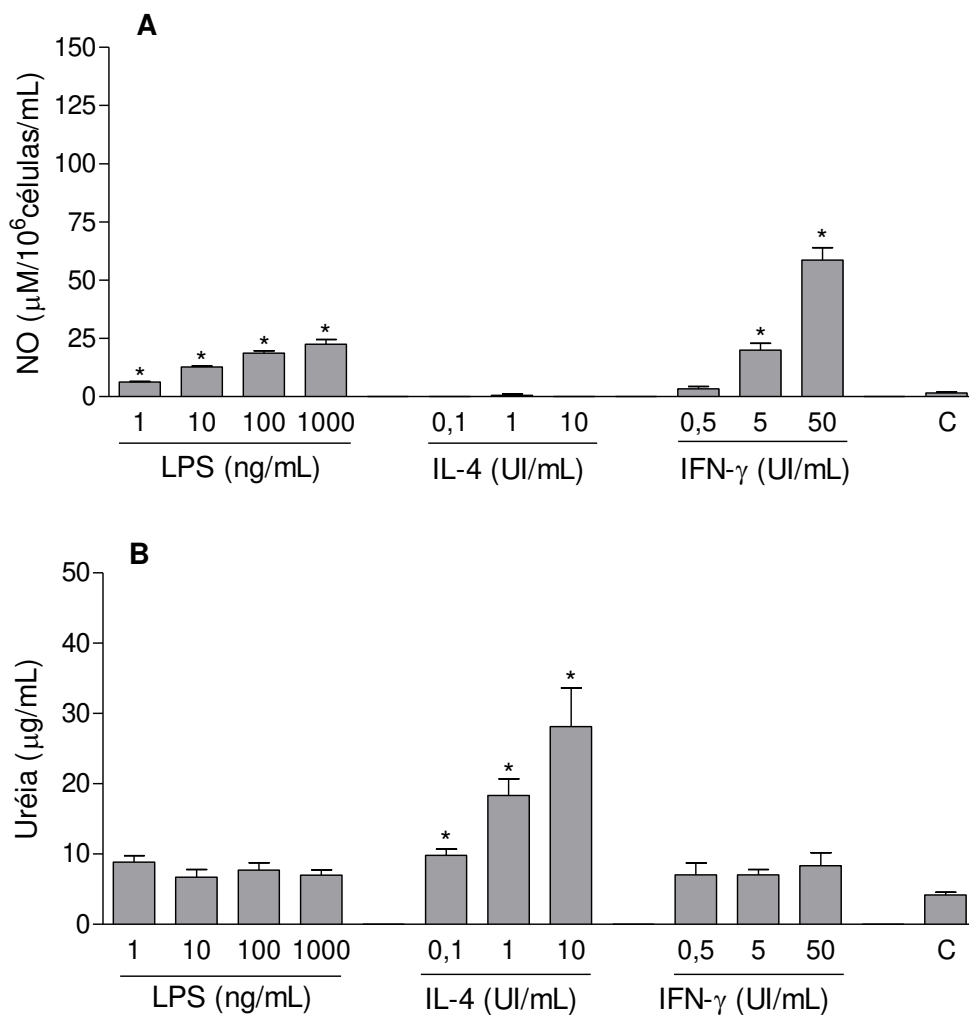


Figura 1 - Efeito do LPS, IL-4 ou IFN- γ sobre a atividade da iNOS e arginase em células peritoneais aderentes (M ϕ P) de camundongos naïve. Pool de células da cavidade peritoneal de camundongos jovens da linhagem BALB/c naïve (n=5) foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 2×10^5 células/poço, em triplicata, e incubadas por 2 h, a 37°C e 5% CO₂. As células não aderentes foram eliminadas por lavagem e os M ϕ P foram cultivados por um período adicional de 48 h, na presença de LPS (1, 10, 100 e 1000 ng/mL), ou IL-4 (0,1, 1 e 10 UI/mL) ou IFN- γ (0,5, 5 e 50 UI/mL). As barras representam os níveis de nitrito liberados nos sobrenadantes de cultura pela ação da iNOS (Painel A) ou de uréia liberada através da conversão da L-arginina pela arginase contida nos extratos celulares (Painel B). A produção de NO foi determinada pela medida de nitrito acumulado nos sobrenadantes de cultura, empregando-se o reagente de Griess. A atividade de arginase nos lisados celulares foi determinada pela conversão da L-arginina em uréia, empregando-se a reação com o α -isonitroso-propiofenona (ISPF) em meio ácido. Os resultados foram analisados pelo teste t de “Student” e as variações estatísticas foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$, representadas por (*) na comparação entre controles e tratados.

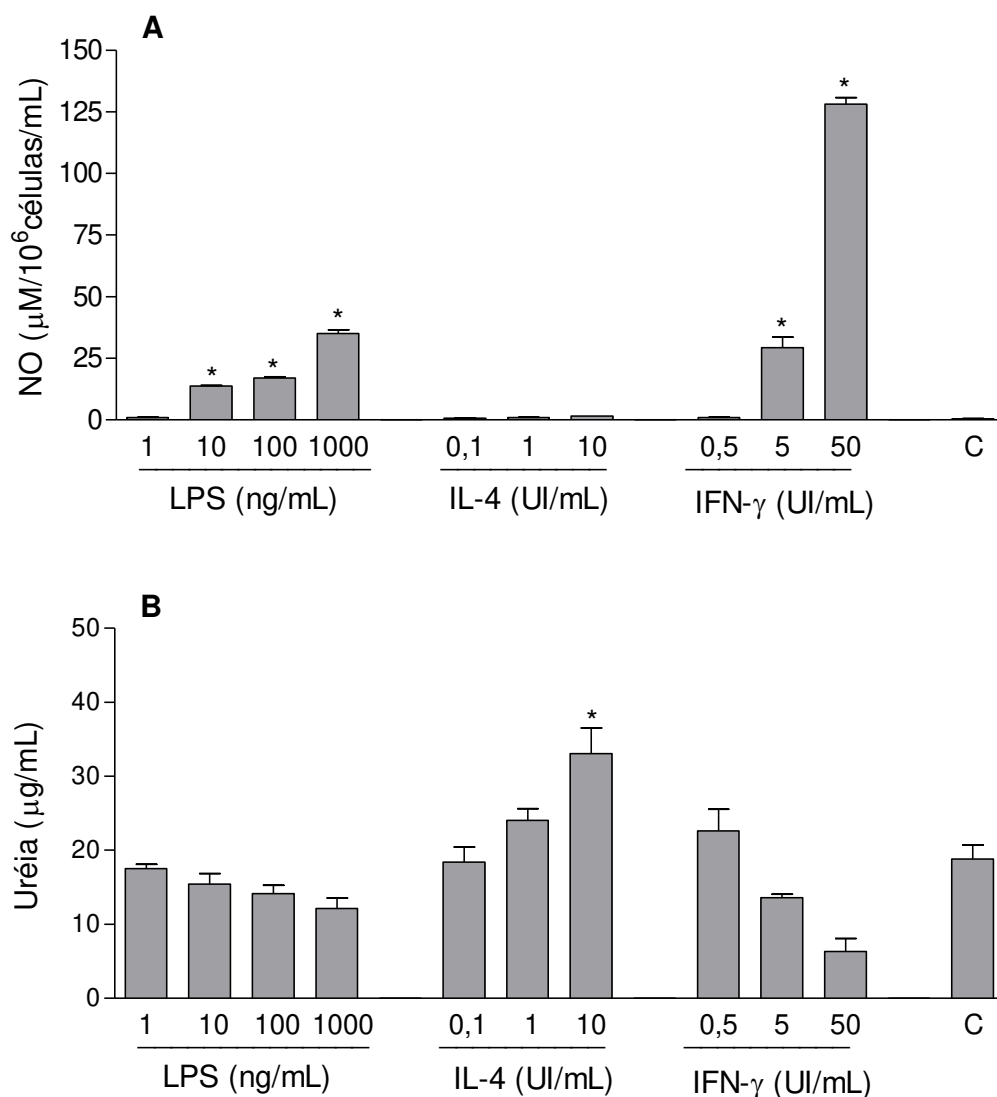


Figura 2 - Efeito do LPS, IL-4 ou IFN- γ sobre a atividade da iNOS e arginase em células peritoneais aderentes (M ϕ P) de camundongos pré-tratados com tioglicolato. Pool de células da cavidade peritoneal de camundongos jovens da linhagem BALB/c naïve (n=5) foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 2×10^5 células/poço, em triplicata, e incubadas por 2 h, a 37°C e 5% CO₂. As células não aderentes foram eliminadas por lavagem e os M ϕ P foram cultivados por um período adicional de 48 h, na presença de LPS (1, 10, 100 e 1000 ng/mL), ou IL-4 (0,1, 1 e 10 UI/mL) ou IFN- γ (0,5, 5 e 50 UI/mL). As barras representam os níveis de nitrito liberados nos sobrenadantes de cultura pela ação da iNOS (Painel A) ou de uréia liberada através da conversão da L-arginina pela arginase contida nos extratos celulares (Painel B). A produção de NO foi determinada pela medida de nitrito acumulado nos sobrenadantes de cultura, empregando-se o reagente de Griess. A atividade de arginase nos lisados celulares foi determinada pela conversão da L-arginina em uréia, empregando-se a reação com o α -isonitroso-propiofenona (ISPF) em meio ácido. Os resultados foram analisados pelo teste t de “Student” e as variações estatísticas foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$, representadas por (*) na comparação entre controles e tratados.

2.- Efeito recíproco do LPS e da IL-4 sobre as atividades da iNOS e arginase em células peritoneais aderentes (MφP) de camundongos naïve e elicitados.

Como esperado, verificamos que IL-4 não induziu a produção de NO por macrófagos peritoneais, conforme estimado pela dosagem de nitrito nos sobrenadantes de cultura. Por outro lado, verificamos que a IL-4 inibiu de modo dose-dependente a produção de NO induzida por LPS em macrófagos naïve (Figura 3, Painel A) e em macrófagos elicitados (Figura 4, Painel A).

O cultivo de macrófagos peritoneais na presença de IL-4 resultou em níveis significativamente mais elevados de atividade da arginase nos extratos de macrófagos naïve (Figura 3, Painel B) e elicitados (Figura 4, Painel B), conforme medido pela conversão de L-arginina em uréia. Contudo, redução significativa na atividade de arginase foi observada em macrófagos cultivados simultaneamente na presença de LPS (1 µg/mL) e IL-4 (1 e 10 UI/mL).

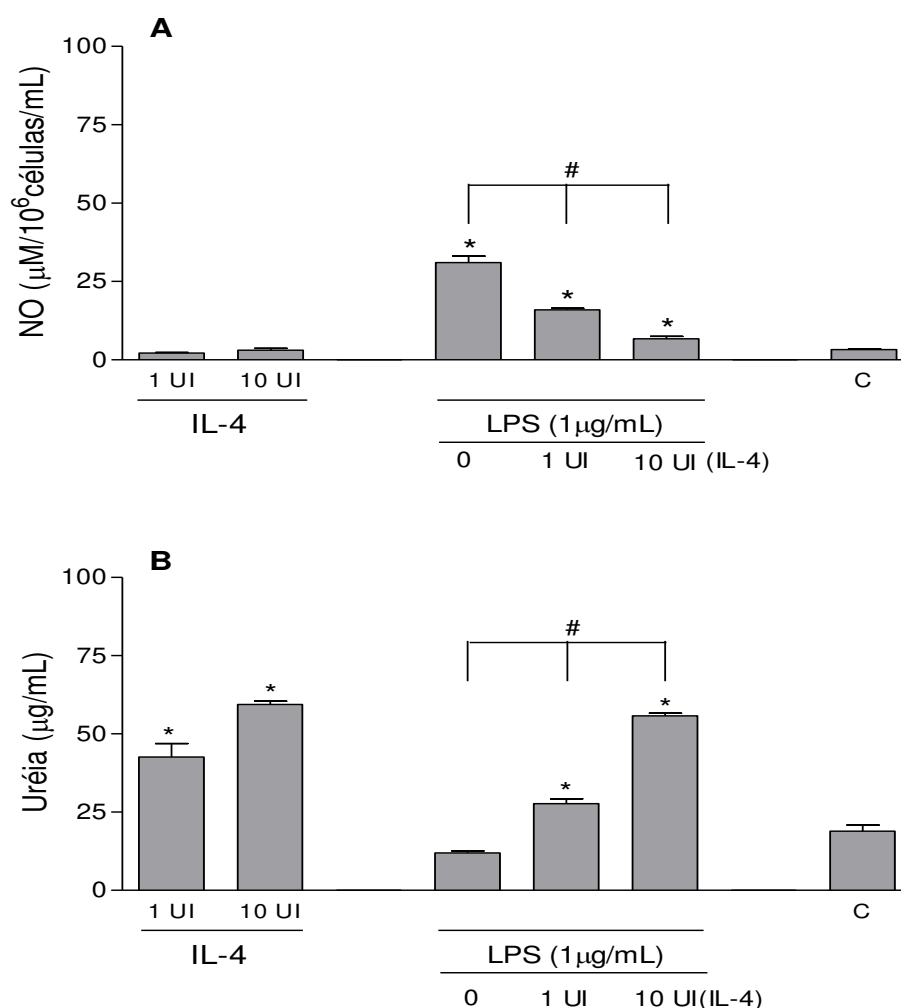


Figura 3 - Efeito recíproco do LPS e da IL-4 sobre as atividades da iNOS e arginase em células peritoneais aderentes (MφP) de camundongos naïve. Pool de células da cavidade peritoneal de camundongos jovens da linhagem BALB/c naïve (n=5) foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 2×10^5 células/poço, em triplicata, e incubadas por 2 h, a 37°C e 5% CO₂. Após a remoção das células não aderentes, os MφP foram incubados a 37°C, por 48 h, com IL-4 nas doses de 1 UI/mL e 10 UI/mL, na presença ou ausência de LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). As barras representam os níveis de nitrito liberados nos sobrenadantes de cultura pela ação da iNOS (Painel A) ou de uréia liberada através da conversão da L-arginina pela arginase contida nos extratos celulares (Painel B). A produção de NO foi determinada pela medida de nitrito acumulado nos sobrenadantes de cultura, empregando-se o reagente de Griess. A atividade de arginase nos lisados celulares foi determinada pela conversão da L-arginina em uréia, empregando-se a reação com o α -isonitroso-propiofenona (ISPF) em meio ácido. Os resultados foram analisados pelo teste t de “Student” e as variações estatísticas foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$, representadas por (*) na comparação entre controles e tratados e (#) na comparação entre tratamentos no mesmo grupo.

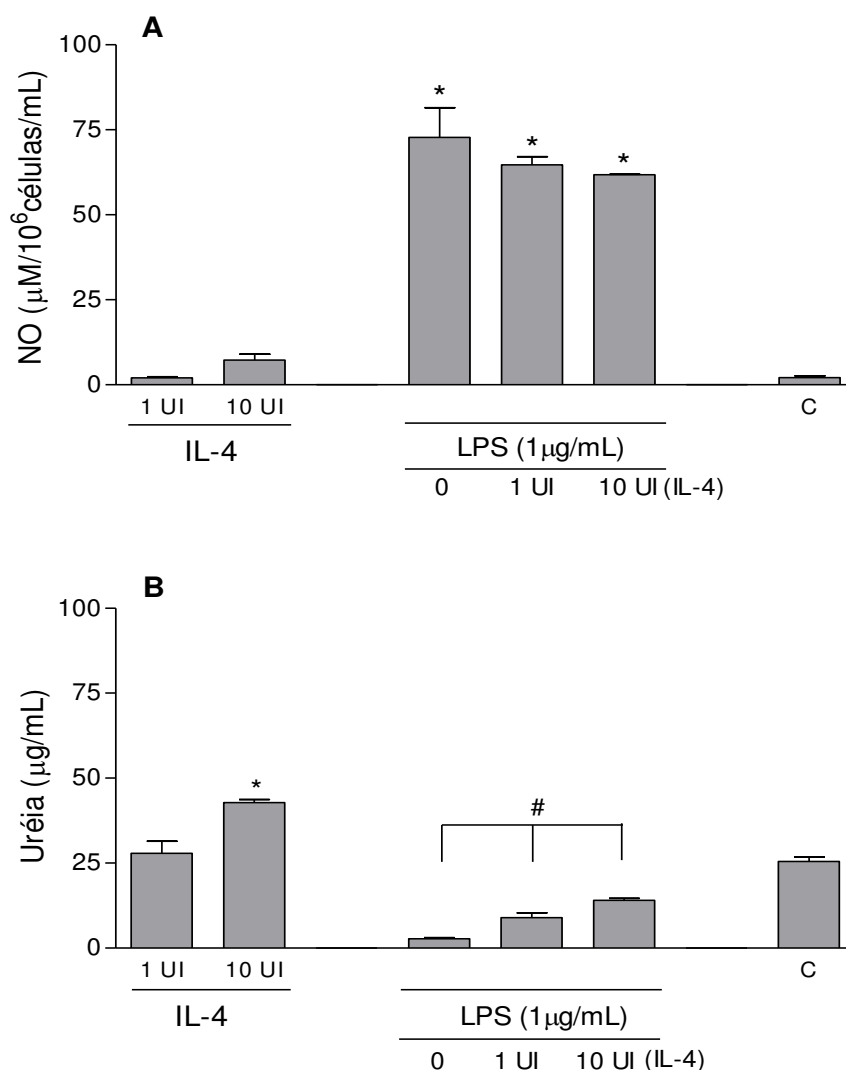


Figura 4 - Efeito recíproco do LPS e da IL-4 sobre as atividades da iNOS e arginase em células peritoneais aderentes (M ϕ P) de camundongos pré-tratados com tioglicolato. Pool de células da cavidade peritoneal de camundongos jovens da linhagem BALB/c naïve (n=5) foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 2×10^5 células/poço, em triplicata, e incubadas por 2 h, a 37°C e 5% CO₂. Após a remoção das células não aderentes, os M ϕ P foram incubados a 37°C, por 48 h, com IL-4 nas doses de 1 UI/mL e 10 UI/mL, na presença ou ausência de LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). As barras representam os níveis de nitrito liberados nos sobrenadantes de cultura pela ação da iNOS (Painel A) ou de uréia liberada através da conversão da L-arginina pela arginase contida nos extratos celulares (Painel B). A produção de NO foi determinada pela medida de nitrito acumulado nos sobrenadantes de cultura, empregando-se o reagente de Griess. A atividade de arginase nos lisados celulares foi determinada pela conversão da L-arginina em uréia, empregando-se a reação com o α -isonitroso-propiofenona (ISPF) em meio ácido. Os resultados foram analisados pelo teste t de “Student” e as variações estatísticas foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$, representadas por (*) na comparação entre controles e tratados e (#) na comparação entre tratamentos no mesmo grupo.

3.- Efeito do LPS, IL-4 e IFN- γ sobre a atividade da iNOS e arginase em células diferenciadas da medula óssea (M ϕ MO) de camundongos.

Células precursoras da medula óssea foram colhidas dos fêmures de camundongos normais e cultivadas por 8 dias, na presença de sobrenadantes de cultura de fibroblastos da linhagem L929 contendo GM-CSF. Após esse período, as células diferenciadas (M ϕ MO) foram examinadas quanto às suas características morfológicas e funcionais.

A análise das células coradas por hematoxilina-eosina revelou a presença de células com aspecto de macrófagos, isto é, células espalhadas, grandes, com citoplasma granular e vacuolado. Os ensaios de fagocitose mostraram que a maioria das células diferenciadas (60-70% das células) foi capaz de internalizar partículas de zimosan opsonizadas com C3b (dados não mostrados). Os M ϕ MO foram cultivados na presença de LPS e/ou IL-4. A atividade da iNOS nessas culturas foi medida indiretamente, determinando-se as quantidades de nitrito nos sobrenadantes de cultura das células aderentes. A expressão de arginase foi verificada nos lisados celulares, medindo-se os níveis de uréia produzidos pela conversão da L-arginina em meio ácido.

O comportamento dos M ϕ MO com relação à expressão de iNOS e arginase está resumido na Figura 5. Da mesma forma que as células peritoneais, as culturas primárias de M ϕ MO foram sensíveis ao IFN- γ e ao LPS para produzir o NO (Painel A) e à IL-4, para produzir a arginase (Painel B).

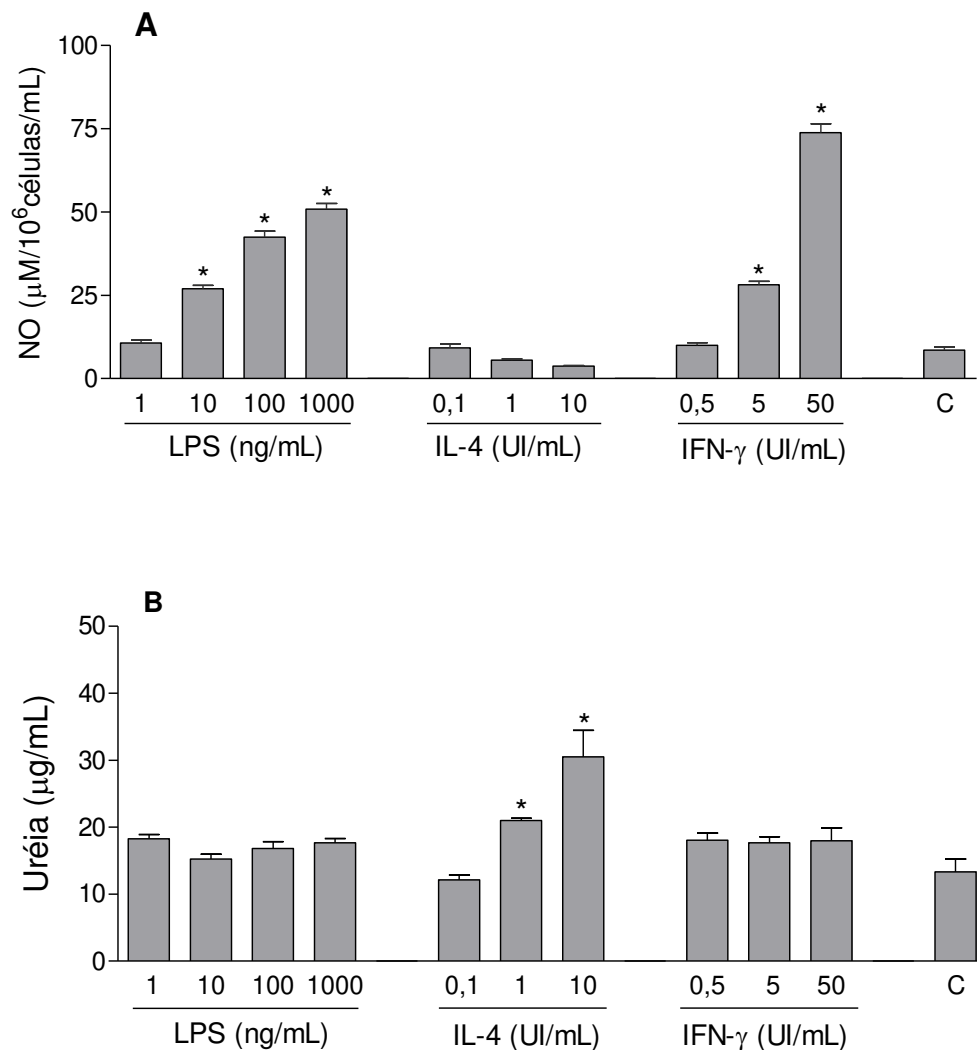


Figura 5 - Efeito do LPS, IL-4 ou IFN- γ sobre a atividade da iNOS e arginase em M ϕ MO de camundongos. Macrófagos foram diferenciados *in vitro* pelo cultivo de precursores da medula óssea de camundongos jovens (n=3), durante 8 dias, na presença de meio condicionado contendo CSF. Os M ϕ MO foram transferidos para placas de 96 poços na densidade de 2×10^5 células/poço, em triplicata, e estimulados com LPS (1, 10, 100 e 1000 ng/mL), IFN- γ (0,5, 5 e 50 UI/mL) ou IL-4 (0,1, 1 e 10 UI/mL), por 48 horas, a 37°C e 5% CO₂. Os sobrenadantes de cultura foram empregados para a dosagem de nitrito pelo reagente de Griess. Os extratos celulares foram empregados como fonte de arginase na reação de conversão da L-arginina em citrulina e uréia, realizada em meio ácido na presença de α -isonitroso-propiofenona (ISPF). Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M da concentração de nitrito/ 10^6 células (Painel A) ou de uréia (Painel B). Os resultados foram analisados pelo teste t de “Student” e as variações estatísticas foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$, representadas por (*) na comparação entre controles e tratados.

4.- Efeito recíproco do LPS e da IL-4 sobre as atividades da iNOS e arginase em células diferenciadas da medula óssea (MφMO) de camundongos.

A Figura 6 resume os resultados obtidos quando se utilizou a IL-4 como estímulo *in vitro*, nas doses de 1 e 10 UI/mL, na presença ou ausência de 1 µg/mL de LPS. Como esperado, os MφMO não foram capazes de produzir NO em resposta à IL-4. Por outro lado, o LPS induziu níveis significativamente elevados de NO ($p < 0,0001$) nos sobrenadantes de cultura, que foram gradativamente reduzidos quando se adicionou doses crescentes de IL-4 à cultura (Painel A).

A IL-4 promoveu de modo dose-dependente o aumento da atividade da arginase nos extratos dos MφMO, conforme avaliado nas reações de conversão da L-arginina em uréia. Porém, nas doses empregadas, a IL-4 não foi capaz de reverter o efeito inibitório induzido pelo LPS sobre a atividade da arginase nessas células (Figura 6, Painel B).

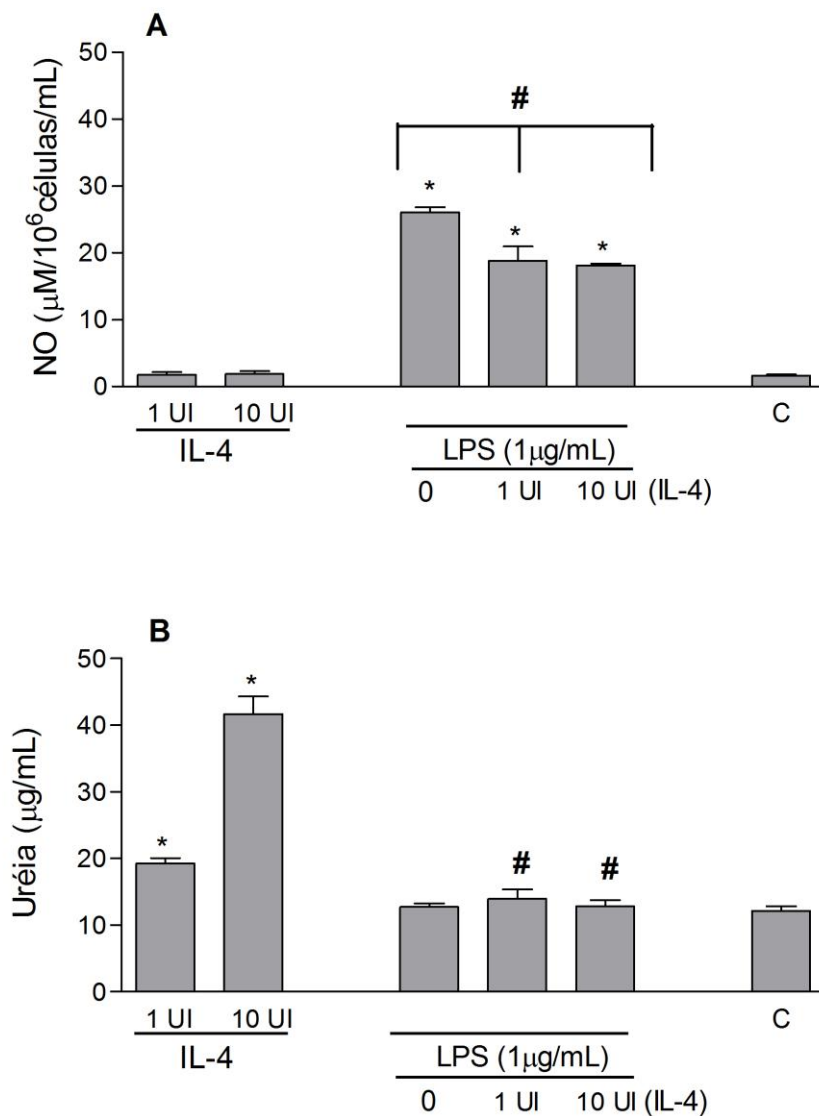


Figura 6 - Efeito recíproco do LPS e da IL-4 sobre as atividades da iNOS e arginase em M ϕ MO de camundongos. Macrófagos foram diferenciados *in vitro* pelo cultivo de precursores da medula óssea de camundongos jovens (n=3), durante 8 dias, na presença de meio condicionado contendo CSF. Os M ϕ MO foram transferidos para placas de 96 poços na densidade de 2×10^5 células/poço, em triplicata, e estimulados *in vitro* com IL-4, nas doses de 1 UI/mL e 10 UI/mL, na presença ou ausência de LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por 48 horas, a 37°C e 5% CO₂. As barras representam os níveis de nitrito, liberados nos sobrenadantes de cultura pela ação da iNOS (Painel A) ou de uréia, liberada através da conversão da L-arginina pela arginase contida nos extratos celulares (Painel B). Os níveis de nitrito foram determinados nos sobrenadantes empregando-se o reagente de Griess e a produção de uréia foi determinada nos extratos celulares empregando-se o α -isonitroso-propiofenona (ISPF) em meio ácido. Os resultados foram analisados pelo teste t de “Student” e as variações estatísticas foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$, representadas por (*) na comparação entre controles e tratados; (#) $p < 0,05$ na comparação entre tratamento no mesmo grupo.

5.- Efeito da fagocitose de Leishmania major, zimosan opsonizado e linfócitos apoptóticos sobre a atividade de arginase e de iNOS em macrófagos peritoneais (MφP)

Para investigar o papel da fagocitose na atividade de arginase ou na produção de óxido nítrico, MφP obtidos de camundongos BALB/c e C57BL/6 jovens, naïve ou elicitados foram tratados com três diferentes tipos de partículas - *Leishmania major*, zimosan opsonizado com C3b ou linfócitos apoptóticos – na presença ou na ausência de doses sub-ótimas de IL-4 (4 UI/mL), LPS (100 ng/mL) ou IFN- γ (5,6 UI/mL).

Como se observa na Figura 7, a internalização de promastigotas de *Leishmania major* por MφP de camundongos BALB/c naïve (Painel A) não modificou os níveis de arginase detectados nos extratos dessas células. O tratamento dos MφP naïve com doses sub-ótimas de IL-4 ou IFN- γ antes da adição do estímulo fagocítico aumentou a atividade arginase nos extratos de MφP naïve. A fagocitose de *L.major* por MφP de camundongos BALB/c elicitados pelo tioglicolato (Painel C) não alterou a atividade arginase nessas células, mas a adição de LPS ou IL-4 aumentou a atividade da enzima nesses extratos (Painel C). A fagocitose de *Leishmania major* por MφP de camundongos C57BL/6 não alterou os níveis de arginase em células naïve (Painel B) ou elicitadas (Painel D) e os pré-tratamentos com LPS, IL-4 ou IFN- γ não alterou de modo significativo essa tendência.

Já a fagocitose de partículas de zimosan (Figura 8) foi capaz de aumentar a atividade arginase em MφP de camundongos BALB/c naïve (Painel A) ou elicitados com tioglicolato (Painel C). O pré-tratamento das células peritoneais com doses sub-ótimas de IL-4 (4 UI/mL), antes da adição das partículas de zimosan, resultou em efeito acentuadamente maior sobre a atividade arginase em MφP de camundongos BALB/c naïve (Painel A) ou elicitados (Painel C) do que os demais estímulos. A internalização de

zimosan por M ϕ P naïve de camundongos C57BL/6, tratados previamente ou não com doses sub-ótimas de IL-4 (4 UI/mL), não resultou na elevação dos níveis de arginase nessas células (Painel B). A atividade de arginase nos extratos de M ϕ P elicitados obtidos de camundongos C57BL/6 foi mais elevada do que a encontrada nos macrófagos de camundongos naïve, mas a fagocitose de zimosan opsonizado elevou apenas discretamente os níveis de arginase nessas células (Painel D). Por outro lado, o tratamento prévio dos macrófagos elicitados de C57BL/6 com dose sub-ótima de IFN- γ elevou significativamente a atividade arginase nessas células (Painel D).

A Figura 9 mostra que a fagocitose de linfócitos apoptóticos por M ϕ P de camundongos BALB/c naïve não induziu alterações nos níveis de arginase expressos por essas células (Painel A); após o pré-tratamento com IL-4 e IFN- γ , os níveis de arginase se elevaram discretamente nas células naïve. Porém, após a fagocitose de linfócitos apoptóticos, os M ϕ P elicitados mostraram atividade de arginase mais elevada que os controles e a adição de IL-4 a essas culturas resultou em discreto aumento desses níveis (Painel C). Nenhum aumento nos níveis de arginase foi observado em M ϕ P de camundongos C57BL/6 naïve que fagocitaram linfócitos apoptóticos, tratados previamente ou não com doses sub-ótimas de IL-4 (Painel B). A fagocitose de linfócitos apoptóticos por M ϕ P elicitados de camundongos C57BL/6 elevou significativamente a atividade de arginase nessas células; o tratamento prévio com dose sub-ótima de IFN- γ aumentou significativamente a atividade arginase nos M ϕ P elicitados desenvolvida após fagocitose de linfócitos apoptóticos (Painel D).

A fagocitose de *Leishmania major*, zimosan opsonizado ou linfócitos apoptóticos não foi capaz de induzir a atividade de iNOS em M ϕ P de camundongos BALB/c ou C57BL/6, naïve ou elicitados com tioglicolato.

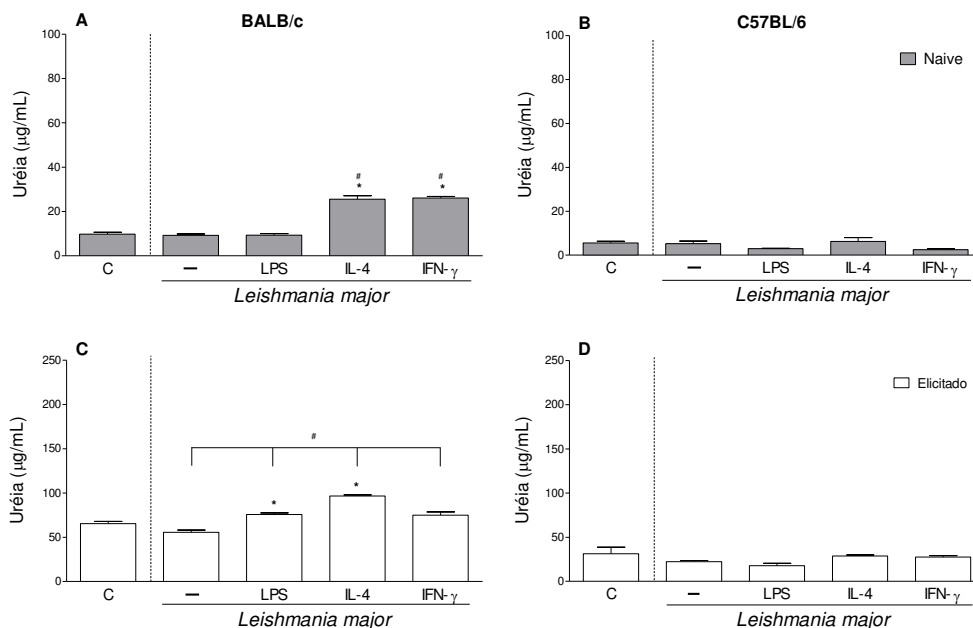


Figura 7 - Efeito da fagocitose de *Leishmania major* sobre a atividade da arginase em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 naïve e elicitados. Pool de células peritoneais foram coletadas de camundongos BALB/c (Painéis A e C) e C57BL/6 (Painéis B e D) naïve (n=15; barras escuras) ou pré-tratados com meio de tioglicolato (n=5; barras claras) e plaqueadas na densidade de 1×10^6 células/poço/mL, em triplicata e incubadas com LPS (100 ng/mL), IL-4 (4 UI/mL) ou IFN- γ (5 UI/ mL) (V:V) por 18 horas. Após a lavagem das culturas para remoção dos estímulos, as formas promastigotas de *Leishmania major* foram adicionadas às culturas na densidade de 3×10^6 parasitas/mL. Após 3 horas de incubação a 37°C e 5% CO₂, os parasitas foram removidos por lavagem, seguindo-se incubação adicional das placas por 48 horas, a 37°C e 5% CO₂. As barras representam os níveis de uréia liberada através da conversão da L-arginina pela arginase contida nos extratos celulares. A produção de uréia foi determinada nos extratos celulares empregando-se o α -isonitroso-propiofenona (ISPF) em meio ácido. Os resultados foram analisados pelo teste t de “Student” e as variações estatísticas foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$, representadas por (*) nas comparações entre controles e os valores obtidos após a fagocitose da partícula na ausência (-) ou na presença de estímulos e (#) nas comparações entre os valores obtidos após a fagocitose da partícula na ausência de estímulos (-) e os valores na presença de estímulos.

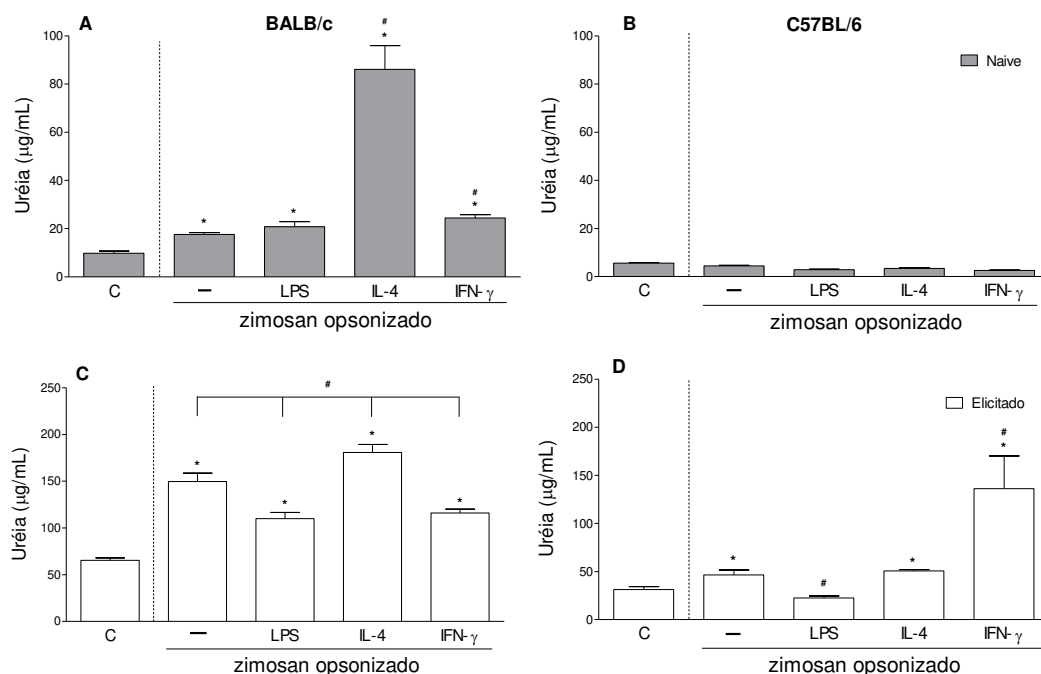


Figura 8 - Efeito da fagocitose de zimosan opsonizado sobre a atividade da arginase em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 naïve e elicitados. Pool de células peritoneais foram coletadas de camundongos BALB/c (Painéis A e C) e C57BL/6 (Painéis B e D) naïve (n=15; barras escuras) ou pré-tratados com meio de tioglicolato (n=5; barras claras) e plaqueadas na densidade de 1×10^6 partículas/poço/mL, em triplicata e incubadas com LPS (100 ng/mL), IL-4 (4 UI/mL) ou IFN- γ (5 UI/mL) (V:V) por 18 horas. Após a lavagem das culturas para remoção dos estímulos, partículas de zimosan opsonizado (5×10^6 partículas/mL) foram adicionadas às culturas. Após 3 horas de incubação a 37°C e 5% CO₂, as partículas foram removidas por lavagem, seguindo-se incubação adicional das placas por 48 horas, a 37°C e 5% CO₂. As barras representam os níveis de uréia liberada através da conversão da L-arginina pela arginase contida nos extratos celulares. A produção de uréia foi determinada nos extratos celulares empregando-se o α -isonitroso-propiofenona (ISPF) em meio ácido. Os resultados foram analisados pelo teste t de “Student” e as variações estatísticas foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$, representadas por (*) nas comparações entre controles e os valores obtidos após a fagocitose da partícula na ausência (-) ou na presença de estímulos e (#) nas comparações entre os valores obtidos após a fagocitose da partícula na ausência de estímulos (-) e os valores na presença de estímulos.

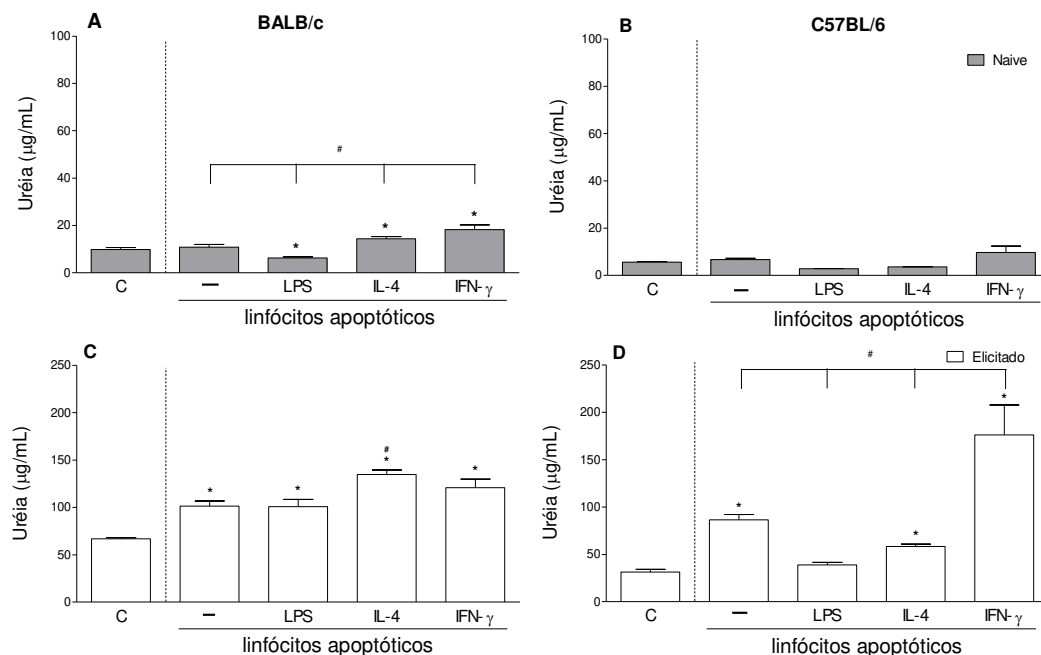


Figura 9 - Efeito da fagocitose de linfócitos apoptóticos sobre a atividade da arginase em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 naïve e elicitados. Células peritoneais foram coletadas de camundongos BALB/c (Painéis A e C) e C57BL/6 (Painéis B e D) naïve (n=15; barras escuras) ou pré-tratados com meio de tioglicolato (n=5; barras clara) e plaqueadas na densidade de 1×10^6 células/poço/mL, em triplicata e incubadas com LPS (100 ng/mL), IL-4 (4 UI/mL) ou IFN- γ (5 UI/ mL) (V:V) por 18 horas. Após a lavagem das culturas para remoção dos estímulos, linfócitos apoptóticos (5×10^6 células/mL) foram adicionados às culturas. Após 3 horas de incubação a 37°C e 5% CO₂, as células apoptóticas não fagocitadas foram removidas por lavagem, seguindo-se incubação adicional das placas por 48 horas, a 37°C e 5% CO₂. As barras representam os níveis de uréia liberada através da conversão da L-arginina pela arginase contida nos extratos celulares. A produção de uréia foi determinada nos extratos celulares empregando-se o α -isonitroso-propiofenona (ISPF) em meio ácido. Os resultados foram analisados pelo teste t de “Student” e as variações estatísticas foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$, representadas por (*) nas comparações entre controles e os valores obtidos após a fagocitose da partícula na ausência (-) ou na presença de estímulos e (#) nas comparações entre os valores obtidos após a fagocitose da partícula na ausência de estímulos (-) e os valores na presença de estímulos.

6.- Atividade e expressão da iNOS e arginase em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c jovens e velhos, cultivados na presença de LPS, IL-4 ou IFN- γ .

Os experimentos seguintes foram realizados para avaliar a atividade/expressão de arginase e iNOS em células aderentes de camundongos BALB/c, em diferentes etapas do seu desenvolvimento pós-natal.

Inicialmente, investigou-se a celularidade em cavidades peritoneais de camundongos BALB/c de diferentes faixas etárias (jovens de 8 semanas de idade; adultos de 32 semanas de idade e; velhos de 64 semanas de idade), naïve ou elicitados com tioglicolato. Um aumento significativo no número de células nessas cavidades foi observado no decorrer do envelhecimento, tanto em cavidades naïve quanto em cavidades elicitadas pelo tioglicolato. As cavidades peritoneais de camundongos naïve velhos mostraram um número de células comparável ao encontrado nas cavidades elicitadas de animais jovens, indicando um estado natural de ativação nos animais mais velhos (Figura 10).

Em experimentos subseqüentes, a produção de óxido nítrico e arginase foi avaliada em culturas realizadas com suspensões padronizadas de macrófagos peritoneais (M ϕ P) naïve e elicitados, obtidas de camundongos jovens e velhos, estimuladas com LPS, IFN- γ ou IL-4. As Figuras 11 e 12 resumem os resultados encontrados nesses experimentos. Os M ϕ P de camundongos jovens produziram níveis de NO significativamente mais elevados em resposta ao LPS e IFN- γ do que os M ϕ P de camundongos velhos (Figura 11, Painel A). Apenas os macrófagos obtidos de camundongos jovens exibiram atividade arginase após o tratamento com IL-4 (Figura 11, Painel B). A produção de óxido nítrico induzida pelo LPS foi significativamente mais elevada nos M ϕ P elicitados provenientes de animais jovens;

mas, MφP jovens e velhos não mostraram diferenças significativas quanto a produção de NO induzida por IFN- γ (Figura 12, Painei A). A atividade arginase em resposta a IL-4 foi similar em MφP elicitados obtidos de camundongos jovens e velhos (Figura 12, Painei B).

A expressão da arginase e da iNOS por *immunoblotting* também foi investigada nos lisados celulares obtidos de animais jovens e velhos e os resultados obtidos podem ser observados nas Figuras 13 a 16.

A Figura 13 mostra que a enzima arginase pode ser detectada em preparações de MφP de camundongos naïve, jovens e velhos, estimulados pela IL-4. Porém, a densitometria das bandas mostrou sinal mais intenso da enzima nos extratos de macrófagos de camundongos jovens do que nos velhos. No entanto, a IL-4 foi igualmente eficiente em induzir o aumento de expressão de arginase em MφP elicitados de camundongos jovens e velhos, embora em células dos animais jovens essa enzima já estivesse expressa em níveis mais elevados nos controles não estimulados pela citocina (Figura 14).

A expressão de iNOS em MφP de camundongos naïve só foi observada após estimulação das células com IFN- γ , não havendo diferenças na expressão da enzima em macrófagos provenientes de camundongos jovens e velhos (Figura 15). Em MφP de camundongos jovens elicitados, a iNOS foi expressa após estimulação com LPS ou com IFN- γ . Em MφP de camundongos velhos, a iNOS foi expressa apenas quando as células foram estimuladas com IFN- γ (Figura 16).

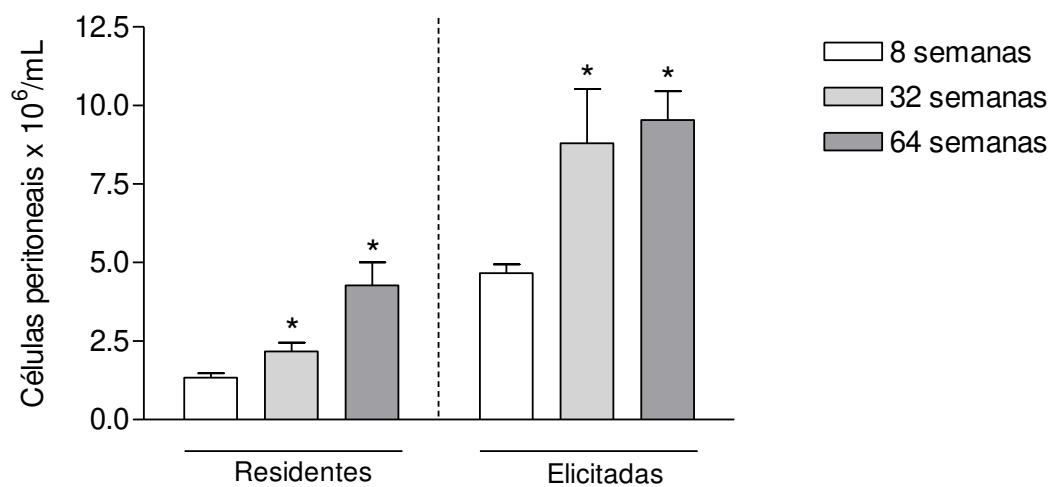


Figura 10 - Avaliação da celularidade em cavidades peritoneais de camundongos BALB/c. O número de células foi determinado em cavidades peritoneais de camundongos BALB/c com 8 (jovem), 32 (adulto) e 64 (velho) semanas de idade, residentes ou elicitados pelo meio de tioglicolato (n=5), através de contagem individual em câmara de Neubauer. Valor $p < 0,05$ (*) no teste One-way ANOVA (Teste de Comparação Múltipla de Bonferroni).

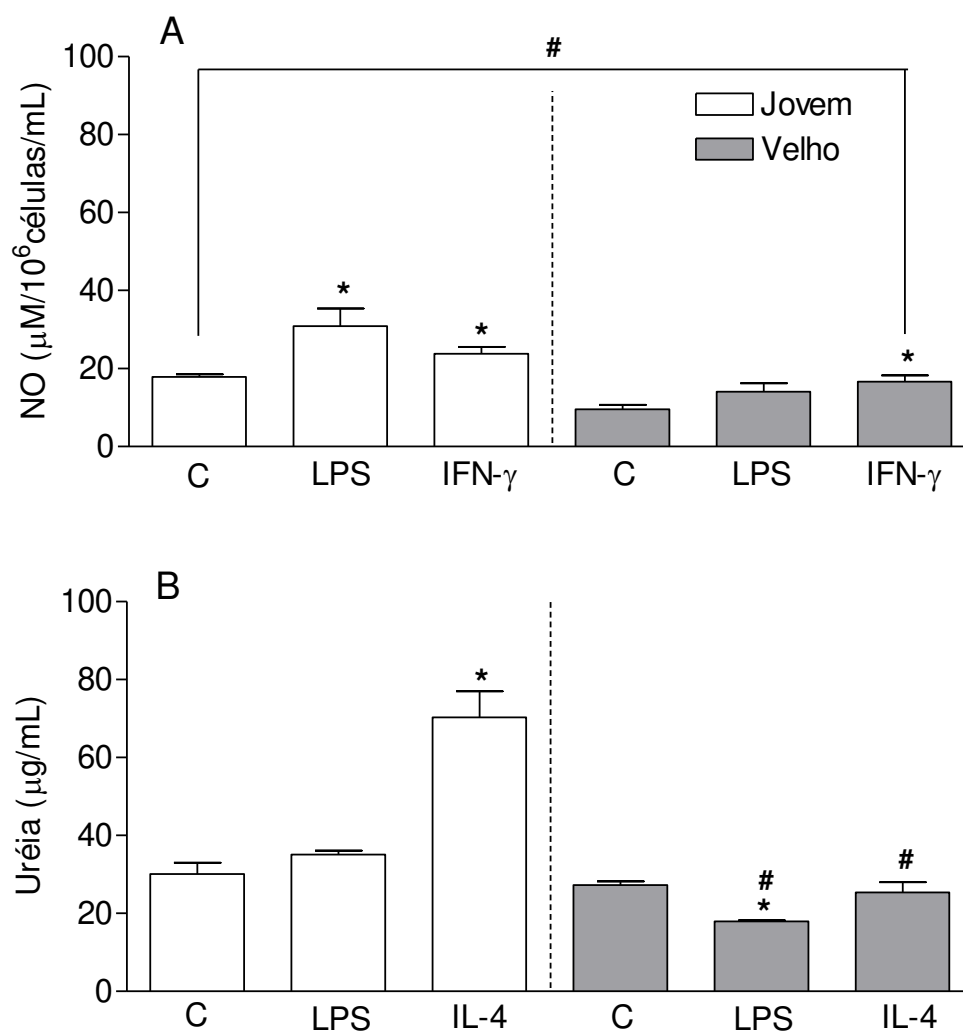


Figura 11 - Atividade de iNOS e arginase em M ϕ P de camundongos BALB/c jovens e velhos naíve, cultivados na presença de LPS, IL-4 ou IFN- γ . Pool de células da cavidade peritoneal de camundongos naíve, jovens ou velhos (n=14) foram semeadas em placas de cultura de 96 poços na densidade de 2×10^5 células/poço, em triplicata. Após remoção das células não aderentes, os M ϕ P foram estimulados *in vitro* com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), IL-4 (40 UI/mL) ou IFN- γ (50 UI/mL), por 48 horas, a 37°C e 5% CO₂. Os sobrenadantes de cultura foram empregados para a dosagem de nitrito pelo reagente de Griess (Painel A) e os extratos celulares foram empregados como fonte de arginase na reação de conversão da L-arginina em citrulina e uréia realizada na presença de α -isonitroso-propiofenona (ISPF) em meio ácido (Painel B). Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M da concentração de Nitrito/ 10^6 células ou de uréia ($\mu\text{g}/\text{mL}$). Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$ representados por (*) na comparação entre controles e diferentes tratamentos e (#) na comparação entre os grupos jovens e velhos, em cada tratamento.

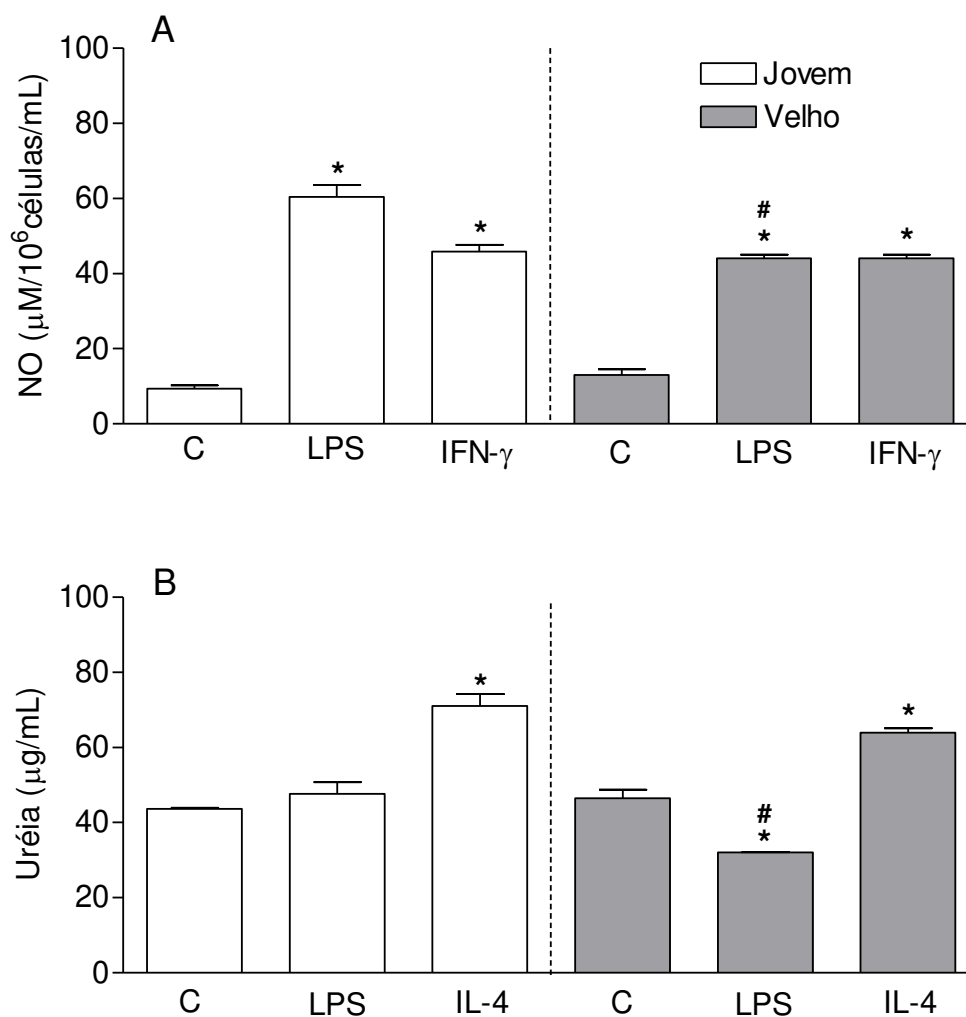


Figura 12 - Atividade de iNOS e arginase em M ϕ P de camundongos BALB/c jovens e velhos pré-tratados com meio de tioglicolato, cultivados na presença de LPS, IL-4 ou IFN- γ . Pool de células da cavidade peritoneal de camundongos jovens ou velhos, pré-tratados com meio de tioglicolato (n=6) foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 2×10^5 células/poço, em triplicata. Após a remoção das células não aderentes, os M ϕ P foram estimulados *in vitro* com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$), IL-4 (40 UI/mL) ou IFN- γ (50 UI/mL), por 48 horas, a 37°C e 5% CO₂. Os sobrenadantes de cultura foram empregados para a dosagem de nitrito pelo reagente de Griess (Painel A) e os extratos celulares foram empregados como fonte de arginase na reação de conversão da L-arginina em citrulina e uréia realizada na presença de α -isonitroso-propiofenona (ISPF) em meio ácido (Painel B). Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M da concentração de Nitrito/ 10^6 células ou de uréia ($\mu\text{g/mL}$). Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$ representados por (*) na comparação entre controles e diferentes tratamentos e (#) na comparação entre os grupos jovens e velhos, em cada tratamento.

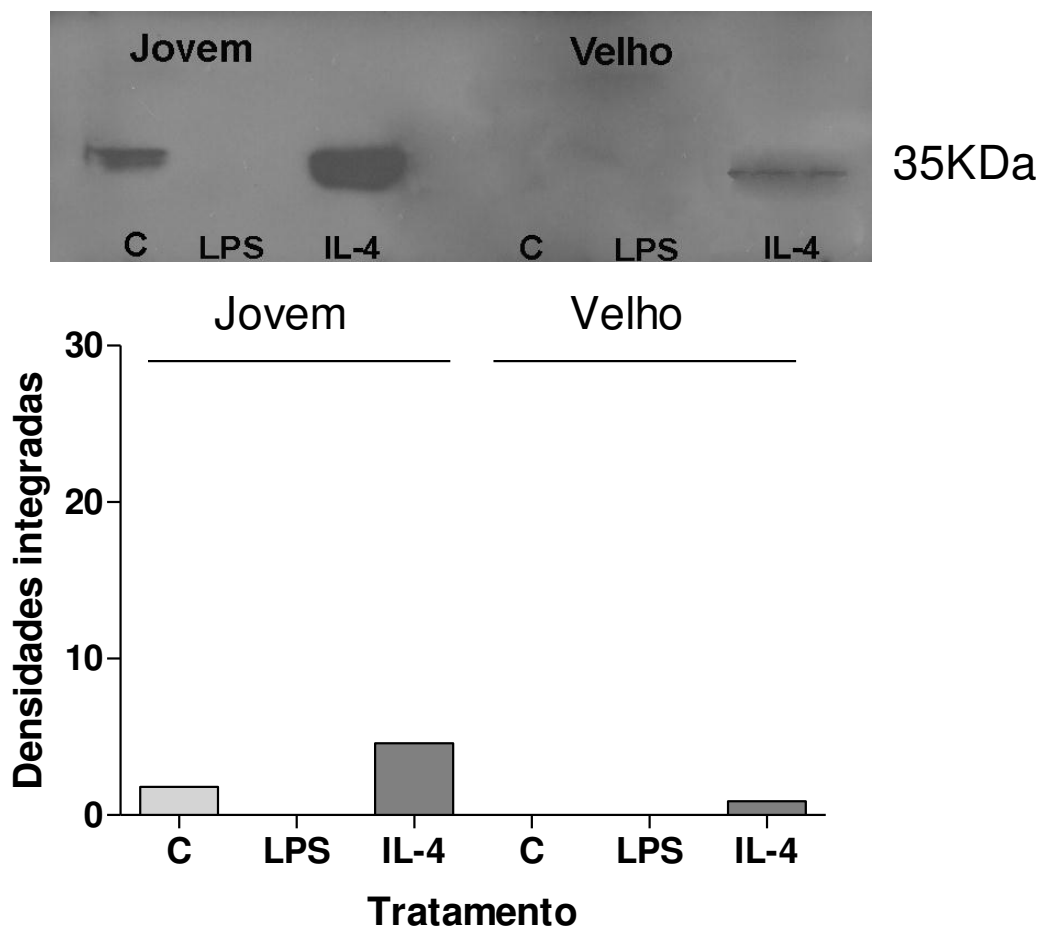


Figura 13 - Análise por Western blot da expressão de arginase em MφP de camundongos BALB/c naïve, jovens e velhos cultivados na presença de LPS ou IL-4. MφP de camundongos naïve foram cultivados na densidade de 10^7 células com os estímulos LPS ($1\mu\text{g/mL}$) ou IL-4 (40 UI/mL), por 48 h. Após remoção das células não aderentes, os MφP foram lisados em $500\mu\text{L}$ de tampão de amostra para eletroforese. Alíquotas de $60\mu\text{l}$ de cada amostra foram separadas eletroforéticamente e a seguir transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram postas a reagir com anticorpo monoclonal anti-arginase (clone 19). As reações foram reveladas com composto quimioluminescente e expostas a filme de raio-X. Após revelação e secagem, os filmes foram copiados em aparelho do tipo Scan. A análise das densitometrias integradas foi feita pelo programa ImageJ.

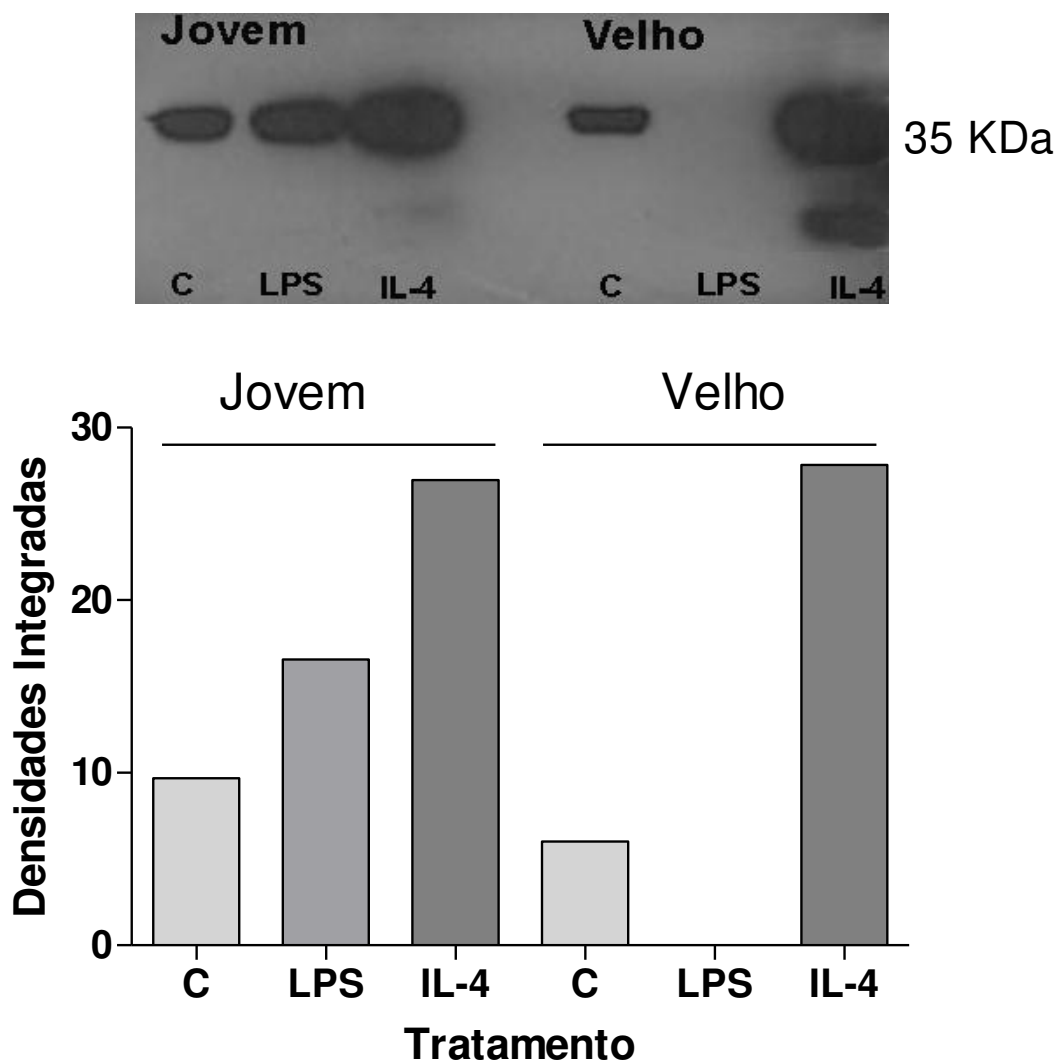


Figura 14 - Análise por Western blot de expressão de arginase em MφP de camundongos BALB/c elicitados, jovens e velhos cultivados na presença de LPS ou IL-4. MφP de camundongos pré-tratados com meio de tioglicolato foram cultivados na densidade de 10^7 células com os estímulos LPS ($1\mu\text{g/mL}$) ou IL-4 (40 UI/mL), por 48 h. Após remoção das células não aderentes, os MφP foram lisados em $500\mu\text{L}$ de tampão de amostra para eletroforese. Alíquotas de $60\mu\text{l}$ de cada amostra foram separadas eletroforéticamente e a seguir transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram postas a reagir com anticorpo monoclonal anti-arginase (clone 19). As reações foram reveladas com composto quimioluminescente e expostas a filme de raio-X. Após revelação e secagem, os filmes foram copiados em aparelho do tipo Scan. A análise das densitometrias integradas foi feita pelo programa ImageJ.

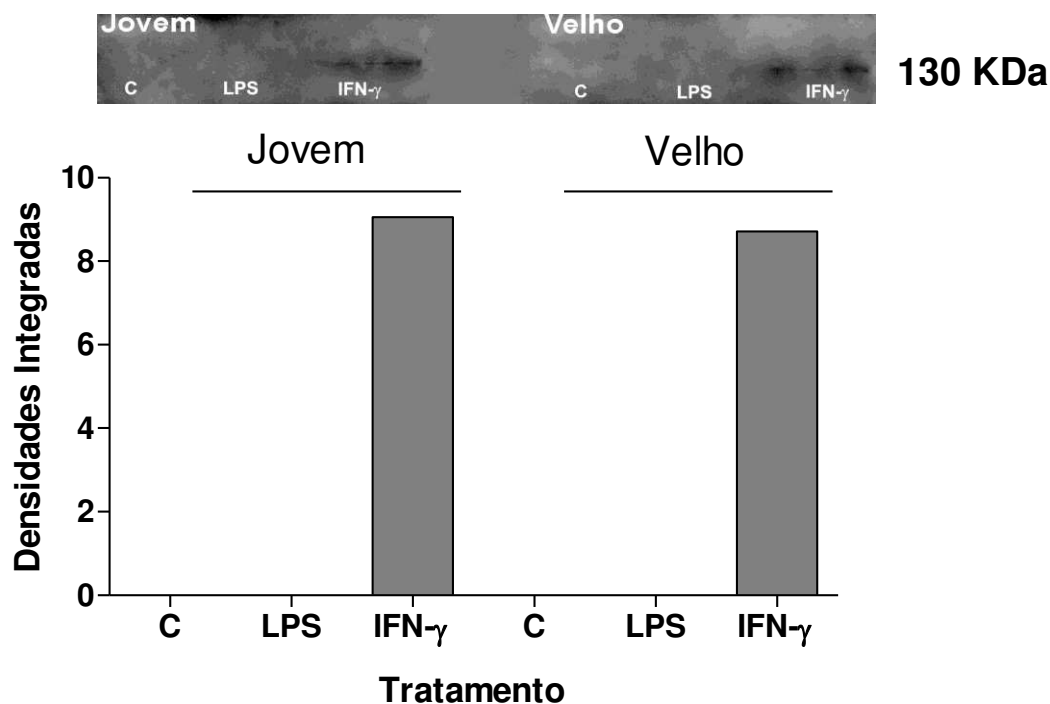


Figura 15 - Análise por Western blot de expressão de iNOS em MφP de camundongos BALB/c naïve, jovens e velhos cultivados na presença de LPS ou IFN-γ. MφP de camundongos naïve foram cultivados na densidade de 10^7 células com os estímulos LPS (1μg/mL) ou IFN-γ (50 UI/mL), por 12 h. Após remoção das células não aderentes, os MφP foram lisados em 500μL de tampão de amostra para eletroforese. Alíquotas de 60μl de cada amostra foram separadas eletroforéticamente e a seguir transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram postas a reagir com anticorpo monoclonal mac-NOS (clone 6). As reações foram reveladas com composto quimioluminescente e expostas a filme de raio-X. Após revelação e secagem, os filmes foram copiados em aparelho do tipo Scan. A análise das densitometrias integradas foi feita pelo programa ImageJ.

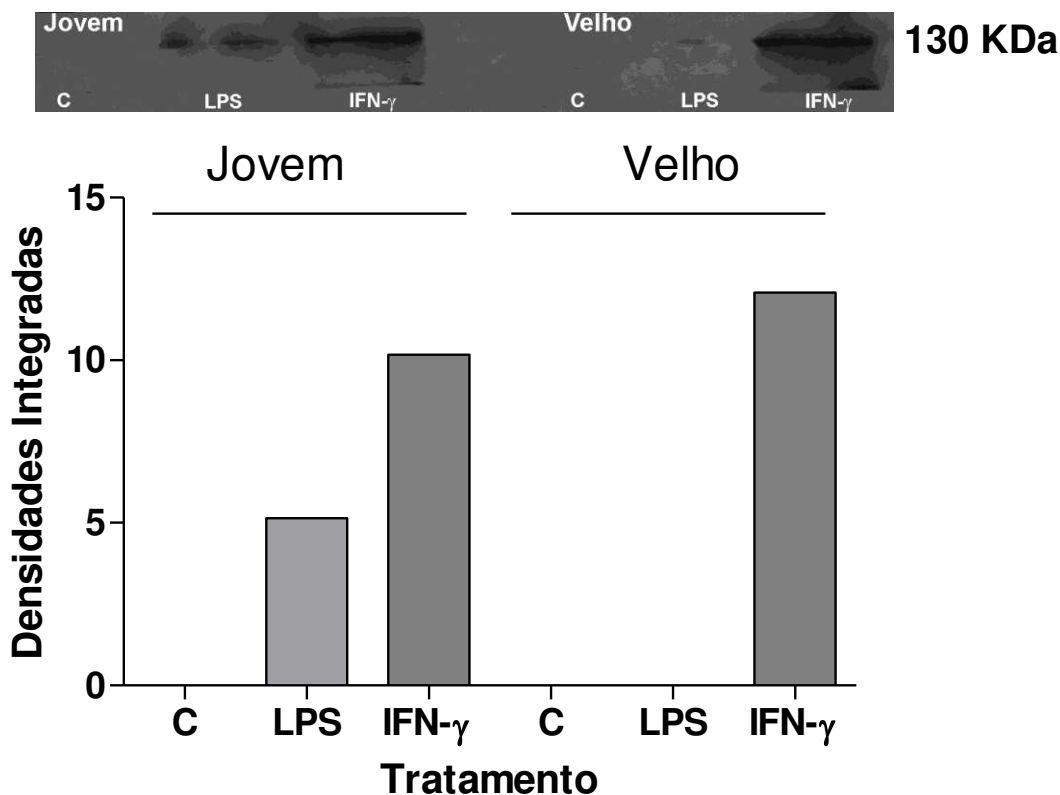


Figura 16 - Análise por Western blot da expressão de iNOS em M ϕ P de camundongos BALB/c elicitados, jovens e velhos cultivados na presença de LPS ou IFN- γ . M ϕ P de camundongos pré-tratados com meio de tioglicolato foram cultivados na densidade de 10^7 células com os estímulos LPS (1 μ g/mL) ou IFN- γ (50 UI/mL), por 12 h. Após remoção das células não aderentes, os M ϕ P foram lisados em 500 μ L de tampão de amostra para eletroforese. Alíquotas de 60 μ l de cada amostra foram separadas eletroforéticamente e a seguir transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram postas a reagir com anticorpo monoclonal mac-NOS (clone 6). As reações foram reveladas com composto quimioluminescente e expostas a filme de raio-X. Após revelação e secagem, os filmes foram copiados em aparelho do tipo Scan. A análise das densitometrias integradas foi feita pelo programa ImageJ.

7.- Atividade e expressão da iNOS e arginase em macrófagos diferenciados in vitro a partir de precursores da medula óssea de camundongos BALB/c jovens e velhos.

As atividades da iNOS e arginase também foram investigadas em macrófagos derivados da medula óssea (M ϕ MO) obtidos de animais jovens e velhos e os resultados estão resumidos nas Figuras 17 a 19. Observa-se que M ϕ MO de animais jovens e velhos foram igualmente capazes de produzir quantidades significativas de óxido nítrico, quando estimulados com LPS e IFN- γ (Figura 17, Painel A). Embora os M ϕ MO de animais velhos tenham exibido atividade arginase em níveis mais elevados em resposta ao estímulo de IL-4 (Figura 17, Painel B), nenhuma diferença significativa na expressão da enzima foi observada em M ϕ MO de camundongos jovens e velhos (Figura 18). A expressão da iNOS em M ϕ MO (Figura 19) acompanhou os resultados observados nos ensaios para detecção de óxido nítrico, isto é, após estimulação com LPS e IFN- γ os M ϕ MO de animais jovens e velhos expressaram iNOS de modo similar.

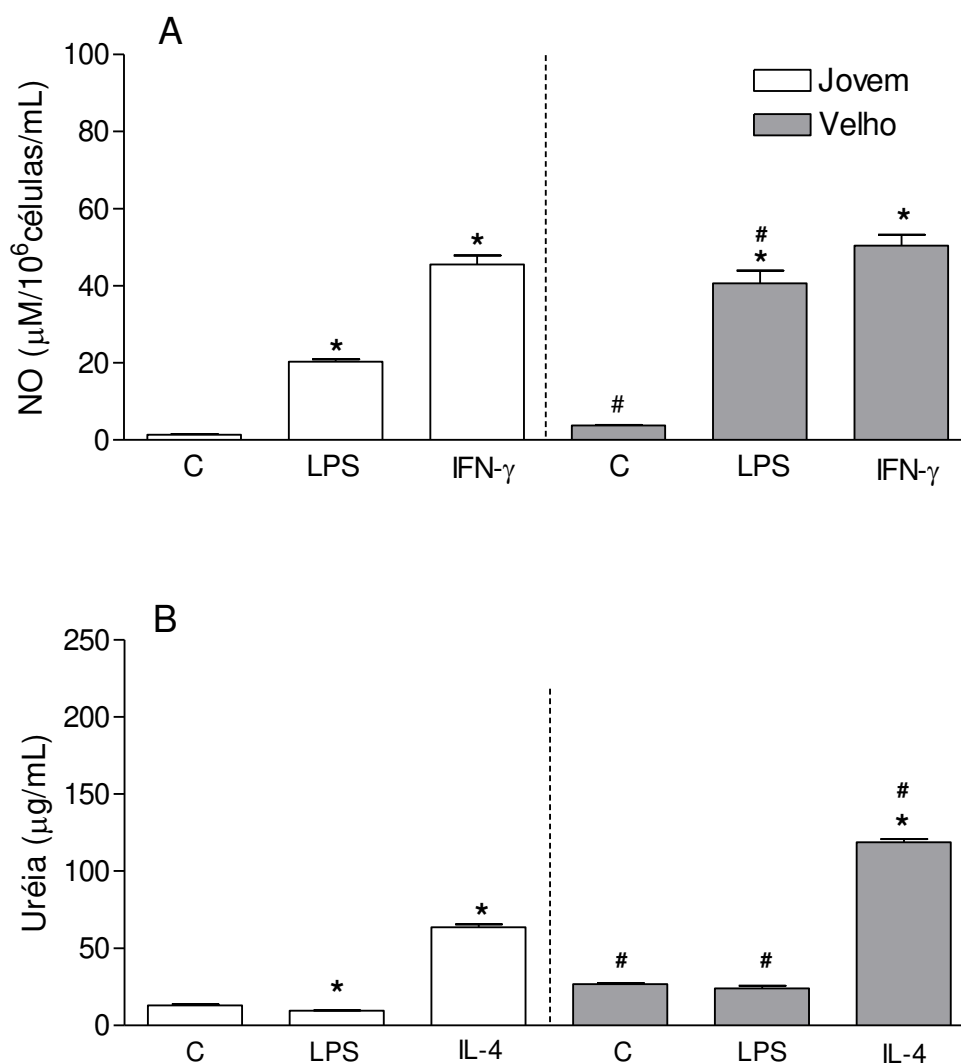


Figura 17 - Atividade de iNOS e arginase em MφMO de camundongos BALB/c jovens e velhos. Macrófagos foram diferenciados *in vitro* pelo cultivo de precursores da medula óssea de camundongos jovens ou velhos (n=13) durante 8 dias, na presença de meio condicionado contendo CSF. Os MφMO foram transferidos para placas de 96 poços na densidade de 2×10^5 células/poço, em triplicata, e estimuladas com LPS (1 μg/mL), IFN-γ (50 UI/mL) ou IL-4 (40 UI/mL), por 48 horas, a 37°C e 5% CO₂. Os sobrenadantes de cultura foram empregados para a dosagem de nitrito pelo reagente de Griess (Painel A) e os extratos celulares foram empregados como fonte de arginase na reação de conversão da L-arginina em citrulina e uréia, realizada na presença de α-isonitroso-propiofenona (ISPF) em meio ácido (Painel B). Os resultados foram expressos como média ± E.P.M da concentração de uréia (μg/mL) ou como média ± E.P.M e da concentração de nitrito/10⁶ células. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$ representados por (*) na comparação entre controles e diferentes tratamentos e (#) entre os grupos jovens e velhos, em cada tratamento.

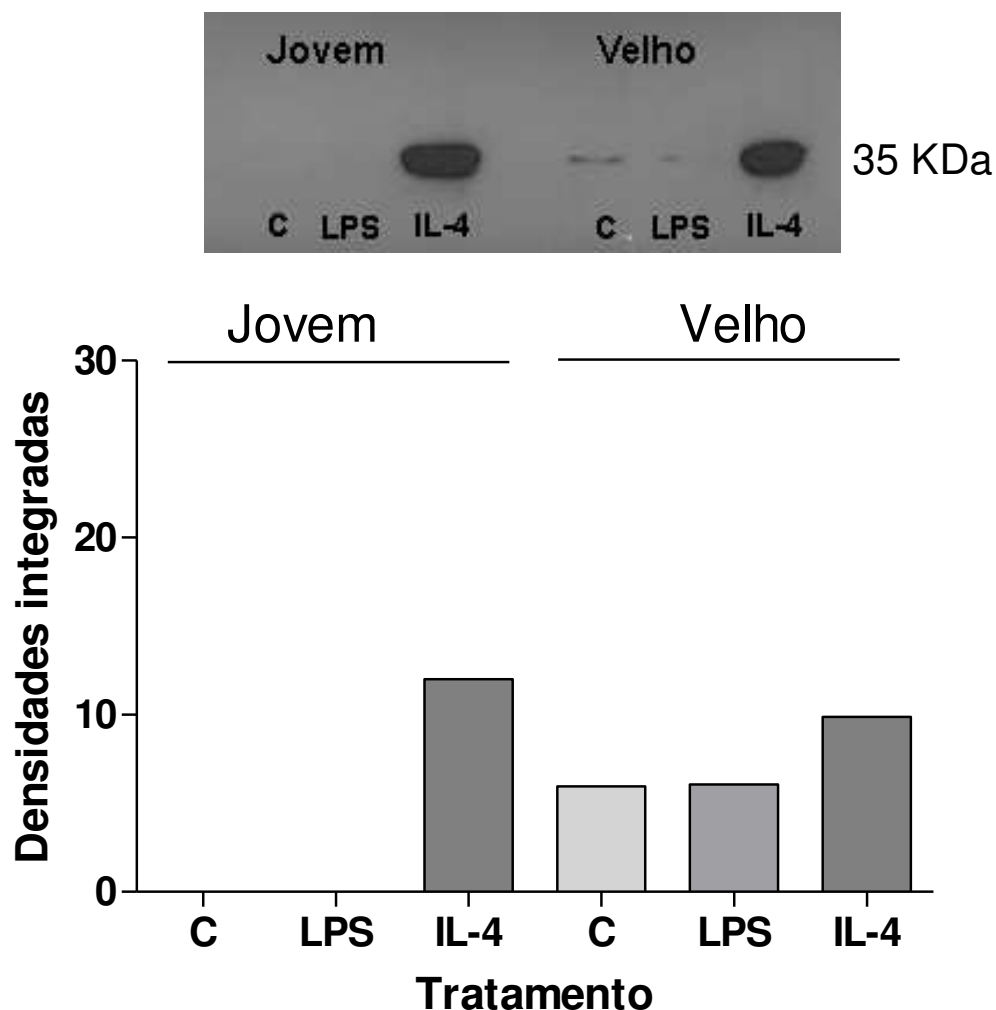


Figura 18 – Análise por Western blot da expressão de arginase em MφMO de camundongos BALB/c naïve, jovens e velhos cultivados na presença de LPS ou IL-4. MφMO de camundongos naïve foram cultivados na densidade de 10^7 células com os estímulos LPS ($1\mu\text{g/mL}$) ou IL-4 (40 UI/mL), por 48 h. Após remoção das células não aderentes, os MφMO foram lisados em $500\mu\text{L}$ de tampão de amostra para eletroforese. Alíquotas de $60\mu\text{l}$ de cada amostra foram separadas eletroforéticamente e a seguir transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram postas a reagir com anticorpo monoclonal anti-arginase (clone 19). As reações foram reveladas com composto quimioluminescente e expostas a filme de raio-X. Após revelação e secagem, os filmes foram copiados em aparelho do tipo Scan. A análise das densitometrias integradas foi feita pelo programa ImageJ.

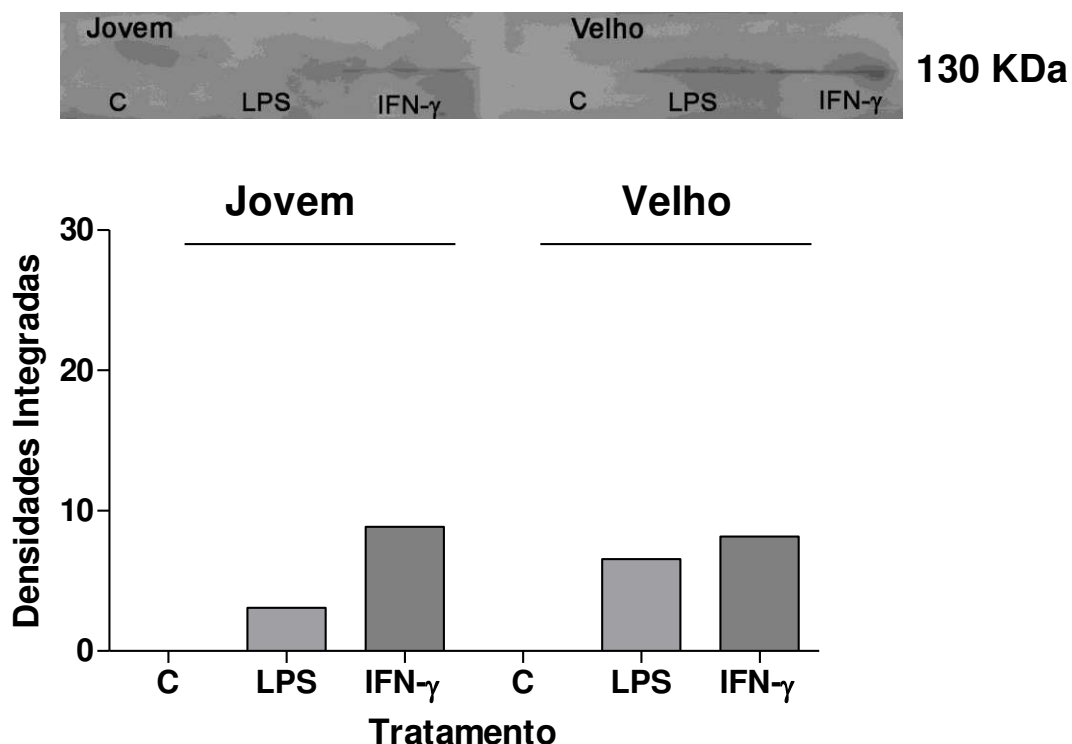


Figura 19 – Análise por Western blot da expressão de iNOS em MφMO de camundongos BALB/c naïve, jovens e velhos, cultivados na presença de LPS ou IFN-γ. MφMO de camundongos naïve foram cultivados na densidade de 10^7 células com os estímulos LPS ($1\mu\text{g/mL}$) ou IFN-γ (50 UI/mL), por 12 h. Após remoção das células não aderentes, os MφMO foram lisados em $500\mu\text{L}$ de tampão de amostra para eletroforese. Alíquotas de $60\mu\text{l}$ de cada amostra foram separadas eletroforicamente e a seguir transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram postas a reagir com anticorpo monoclonal mac-NOS (clone 6). As reações foram reveladas com composto quimioluminescente e expostas a filme de raio-X. Após revelação e secagem, os filmes foram copiados em aparelho do tipo Scan. A análise das densitometrias integradas foi feita pelo programa ImageJ.

8.- Produção de citocinas por macrófagos peritoneais ou diferenciados de medula óssea de camundongos BALB/c jovens e velhos, estimulados com LPS.

A produção de IL-1 α , TNF- α e IL-10 por macrófagos peritoneais (M ϕ P) ou diferenciados a partir de precursores da medula óssea (M ϕ MO) foi investigada nos sobrenadantes das células cultivadas, por 48 horas, na presença de LPS. Os resultados obtidos nesses experimentos estão resumidos nas Figuras 20 e 21.

Pode-se observar que o cultivo de M ϕ P naïve ou elicitados na presença de LPS resultou na produção de IL-1 α em níveis mais elevados que nos controles não tratados com a endotoxina (Figura 20). Porém, nos M ϕ P de animais velhos elicitados, os níveis de IL-1 α foram significativamente mais elevados do que nos demais grupos experimentais (Figura 20, Painel A). Os níveis de TNF- α também aumentaram significativamente após o tratamento com a endotoxina em M ϕ P de camundongos jovens e velhos, naïve e elicitados (figura 20, Painel B). Porém, os níveis de TNF- α foram significativamente mais elevados nos M ϕ P de animais jovens, particularmente de animais elicitados. Por outro lado, a IL-10 não foi induzida pelo LPS em qualquer tipo de células peritoneais aderentes na dose de endotoxina empregada neste trabalho (Figura 20, Painel C).

Diferentemente dos resultados obtidos com células peritoneais, os M ϕ MO de camundongos jovens e velhos, após estímulo *in vitro* com LPS, produziram apenas TNF- α ; os níveis dessa citocina produzidos por M ϕ MO de animais velhos foram significativamente mais elevados do que em M ϕ MO de animais jovens (Figura 21, Painel B). Não foram observadas alterações nos níveis de IL-1 α ou de IL-10 produzidas por M ϕ MO estimulados por LPS em relação aos controles (Figura 21, Painéis A e C).

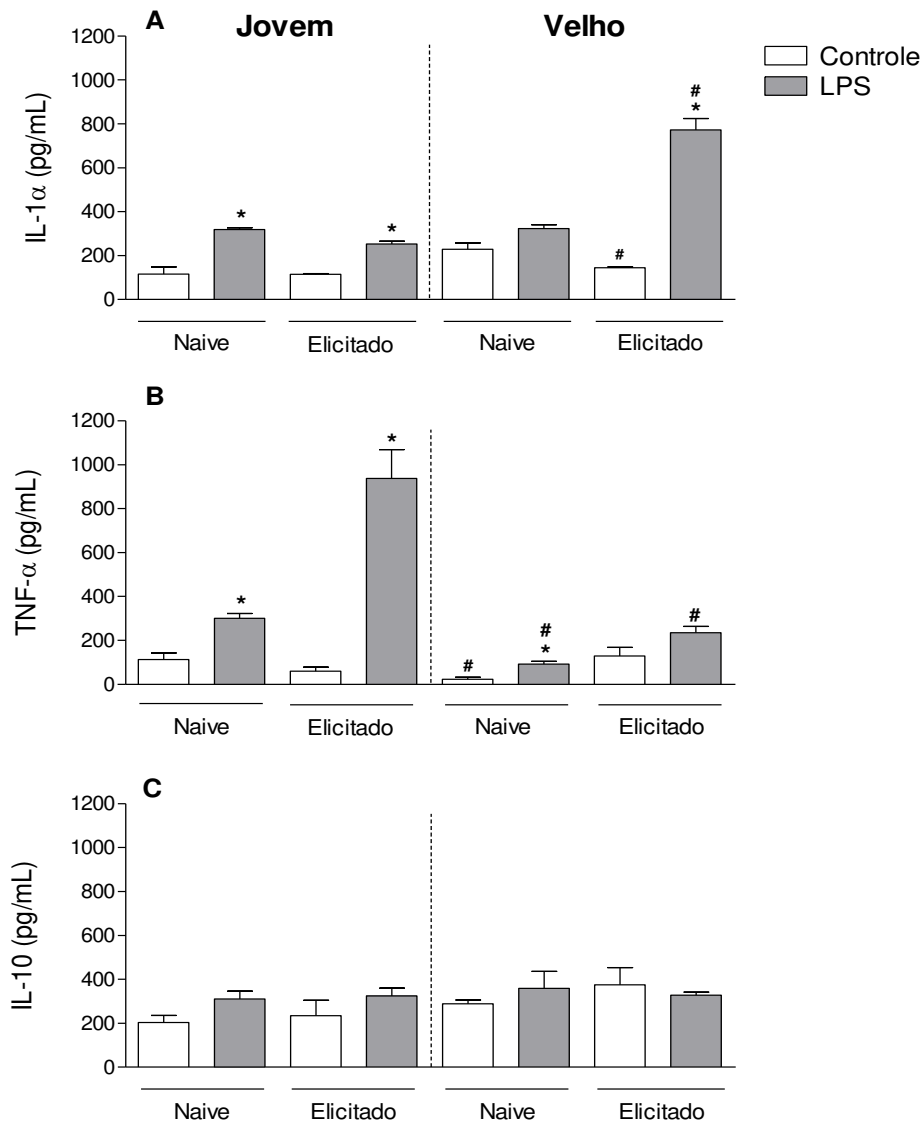


Figura 20 - Detecção de IL-1 α , TNF- α e IL-10 em sobrenadantes de células peritoneais aderentes de camundongos BALB/c jovens e velhos estimulados *in vitro* com LPS. Pool de células peritoneais de camundongos jovens ou velhos, naïve (n=15) ou estimulados com o meio de tioglicolato (n=5) foram plaqueadas na densidade de 10⁶ células/poço/mL, em triplicata, e incubadas na presença ou ausência de LPS (1 μ g/mL), por 48 h, a 37°C e 5% CO₂. Os sobrenadantes das culturas foram dosados por ELISA de captura com kits comerciais para a presença de IL-1 α (Painel A; Kit Quantikine M murine; sensibilidade do teste 5 pg/mL), TNF- α (Painel B; kit DUO SET ELISA Kit; sensibilidade do teste 62,5 pg/mL) e IL-10 (Painel C; kit Pharmingen; sensibilidade do teste 30 pg/mL). As barras representam os níveis de IL-1 α ou TNF- α ou IL-10 detectados em dois experimentos independentes para cada citocina. As variações estatísticas foram determinadas pelo teste t de “Student” (*) na comparação entre células controles e tratadas com LPS; (#) na comparação entre os grupos jovens e velhos em cada tratamento (p<0,05).

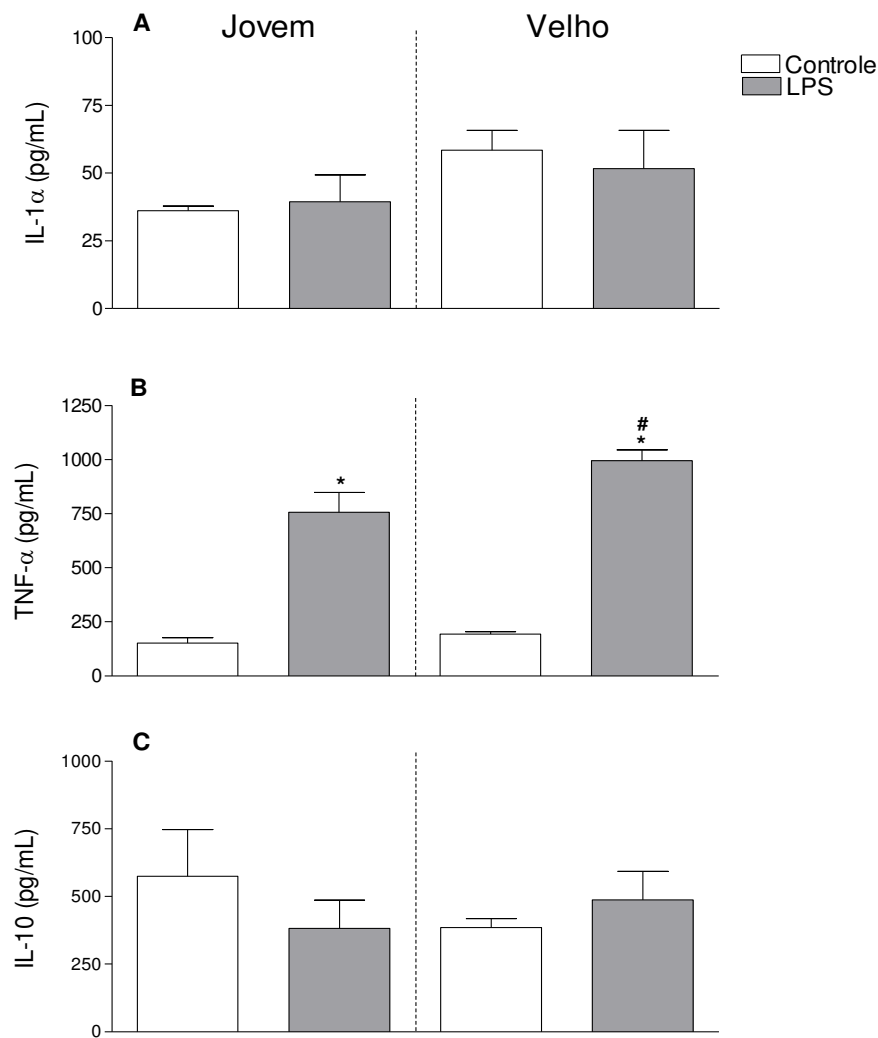


Figura 21 - Detecção de IL-1 α , TNF- α e IL-10 em sobrenadantes de células aderentes diferenciadas de precursores da medula óssea de camundongos BALB/c jovens e velhos estimuladas *in vitro* com LPS. Macrófagos foram diferenciados *in vitro* pelo cultivo de precursores da medula óssea de camundongos jovens ou velhos (n=13) durante 8 dias, na presença de meio condicionado contendo CSF. Os M ϕ MO semeados em placas de 24 poços na densidade de 10⁶ células/poço/mL, em triplicata, e incubados na presença ou ausência de LPS (1 μ g/mL), por 48 h, a 37°C e 5% CO₂. Os sobrenadantes das culturas foram dosados por ELISA de captura com kits comerciais para a presença de IL-1 α (Painel A; Kit Quantikine M murine; sensibilidade do teste 5 pg/mL), TNF- α (Painel B; kit DUO SET ELISA Kit; sensibilidade do teste 62,5 pg/mL) e IL-10 (Painel C; kit Pharmingen; sensibilidade do teste 30 pg/mL). As barras representam os níveis de IL-1 α ou TNF- α ou IL-10 detectados em dois experimentos independentes para cada citocina. As variações estatísticas foram determinadas pelo teste t de “Student” (*) na comparação entre células controles e tratadas com LPS; (#) na comparação entre os grupos jovens e velhos em cada tratamento (p<0,05).

VI – DISCUSSÃO

A L-arginina pode ser metabolizada nas células fagocíticas por duas vias enzimáticas, uma envolvendo a arginase e a outra a iNOS. A arginase apresenta-se em duas isoformas nos fagócitos, uma constitutiva e outra induzida por estímulos microbianos ou por citocinas produzidas por linfócitos TH2. Por outro lado, a metabolização da L-arginina pela sintase do óxido nítrico em fagócitos só ocorre após a expressão da forma induzida da enzima, isto é a iNOS. A expressão da iNOS é geralmente induzida por produtos microbianos e/ou por citocinas derivadas de células TH1 [revisto em PERANZONI *et al.*, 2008].

No presente trabalho, analisamos o balanço da produção e da atividade das enzimas iNOS e arginase em macrófagos peritoneais (M ϕ P) residentes ou elicitados e em macrófagos de medula óssea (M ϕ MO) de camundongos da linhagem BALB/c, frente a diferentes doses de LPS, IL-4 ou IFN- γ , bem como após a fagocitose mediada por receptores distintos na superfície dos fagócitos. Uma análise comparativa dos efeitos da fagocitose sobre a produção de iNOS e arginase foi realizada com camundongos C57BL/6.

Corroborando dados da literatura [CUNHA *et al.*, 1994; MODOLELL *et al.*, 1995], observamos que tanto os macrófagos peritoneais como os derivados de medula óssea de camundongos BALB/c foram capazes de produzir NO, de modo dose-dependente, quando tratados com IFN- γ e/ou LPS. Além disso, verificamos que a produção de NO induzida por LPS era inibida pelo tratamento concomitante com IL-4, como já mostrado por outros autores [CORRALIZA *et al.*, 1995; MODOLELL *et al.*, 1995]. Dados da literatura mostram que camundongos da linhagem BALB/c são mais susceptíveis às infecções por patógenos intracelulares, em comparação com camundongos da linhagem C57BL/6. Esse fato é devido a baixa responsividade de macrófagos de camundongos BALB/c a diversos

estímulos inflamatórios, entre os quais o LPS [WATANABE *et al.*, 2004]. No entanto, mesmo camundongos BALB/c são capazes de desenvolver um quadro similar ao choque séptico, com nitrito e nitrato sendo detectados no plasma sanguíneo, após a administração de LPS [CUNHA *et al.*, 1994].

Observamos também que tanto os macrófagos de peritônio quanto os diferenciados de medula óssea de camundongos BALB/c já apresentavam atividade arginase antes mesmo de qualquer estimulação *in vitro*. Contudo, o tratamento com IL-4 foi capaz de induzir o aumento de atividade arginase nessas células. Ao contrário do que é relatado em alguns trabalhos da literatura [RYAN, YOHE & MORRISON, 1980; MILLS *et al.*, 2000], não observamos aumento da atividade arginase nos macrófagos de camundongos BALB/c cultivados com LPS, em qualquer das doses empregadas. Além disso, a IL-4 não foi capaz de induzir aumento na atividade arginase quando os macrófagos foram tratados concomitantemente com LPS, exceto nos M ϕ P residentes. MILLS e colaboradores [2000] observaram que o LPS aumenta a conversão de L-arginina em ornitina/uréia em macrófagos peritoneais residentes de camundongos BALB/c em doses tão pequenas quanto 1 ng/mL, enquanto macrófagos de camundongos C57BL metabolizam L-arginina principalmente pela via da iNOS. Com base nesses resultados, estes autores propuseram o conceito de macrófagos M-1/M-2, para células derivadas de camundongos que fazem respostas do tipo TH1 ou TH2, como os camundongos C57BL e BALB/c, respectivamente. Em nossas mãos, nem macrófagos peritoneais e nem macrófagos diferenciados de células da medula óssea de camundongos BALB/c metabolizaram L-arginina pela via da arginase quando o LPS foi usado como estímulo, em doses que variaram de 1 a 1000 ng/mL. Porém, observamos que os macrófagos de BALB/c eram

capazes de utilizar a L-arginina tanto pela via da iNOS como da arginase quando citocinas típicas de TH1 (IFN- γ) ou TH2 (IL-4) foram empregadas como estímulos, respectivamente. Nossos resultados indicam que os macrófagos de camundongos BALB/c são potencialmente capazes de responder tanto às citocinas TH1 como TH2 se as mesmas estiverem presentes no microambiente. Portanto, as discrepâncias em relação a ativação da via da arginase pelo LPS encontrada neste trabalho podem ser ou a fonte do LPS utilizado ou o background genético do camundongo BALB/c proveniente do CEMIB/UNICAMP – que desde 1987 vem sendo mantido em condições de isolamento reprodutivo, podendo ter gerado uma linhagem peculiar que o CEMIB denomina BALB/c/Uni.

Adicionalmente, testamos os efeitos de fagocitose de zimosan opsonizado, *L. major*, e linfócitos apoptóticos sobre a atividade de arginase e iNOS em PM Φ de camundongos jovens BALB/c e C57BL/6, de modo que diferentes receptores de superfície fossem usados para a internalização das partículas. Zimosan opsonizado, um polissacarídeo insolúvel revestido com C3bi, liga-se a um receptor específico da família integrinas β 2 (CR3, CD11b/CD18) para acionar a reorganização do citoesqueleto (LE CABEC et al., 2002) e ativação de diversas funções celulares importantes, incluindo a fagocitose, produção de superóxido, e quimiotaxia (BABIOR, 1999). Por outro lado, a ligação de células apoptóticas ao receptor de fosfatidilserina em fagócitos estimula a internalização dessas células e secreção simultânea de citocinas imunossupressoras (SOMERSAN e BHARDWAJ, 2001). No entanto, o processo inicial de internalização *Leishmania major* permanece desconhecido, e dados recentes da literatura descartaram o receptor de manose como o caminho pelo qual o parasita entra em macrófagos (AKILOV et al., 2003). No presente trabalho, observamos que nem macrófagos peritoneais de BALB/c nem de

C57BL/6 foram capazes de metabolizar L-arginina pela via da iNOS após fagocitar *L. major*, zimosan opsonizado ou linfócitos apoptóticos. Todavia, macrófagos de camundongos BALB/c apresentaram atividade arginase em níveis mais elevados do que C57BL/6 após a fagocitose de qualquer das partículas empregadas.

O pré-tratamento de células fagocíticas com doses sub-ótimas de IL-4 aumentou a conversão de L-arginina em uréia em fagócitos peritoneais de camundongos BALB/c naïve ou elicitados. O pré-tratamento de macrófagos de camundongos C57BL/6 com IL-4 foi efetivo em aumentar a atividade arginase somente sobre células elicitadas e, apenas para a fagocitose de zimosan opsonizado ou de linfócitos apoptóticos. De qualquer forma, os níveis de atividade arginase foram sempre mais elevados em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c do que em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6. Similarmente, INIESTA e colaboradores [2002] relataram que M ϕ MO de camundongos BALB/c, tratados com citocinas provenientes de TH2 (IL-4, IL-10 e TGF- β), antes da incubação com *L. major*, apresentaram maiores níveis de atividade arginase do que camundongos C57BL/6. Todavia, nós observamos que doses sub-ótimas de IFN- γ também induzem elevação da atividade arginase tanto em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c quanto de C57BL/6, em não conformidade com o modelo M-1/M-2 proposto por MILLS e colaboradores [2000].

O envelhecimento é acompanhado por profundas alterações no sistema imune adaptativo, principalmente no número e funções de células T, que podem contribuir para o aumento da suscetibilidade de indivíduos velhos a doenças autoimunes, tumores e infecções virais [WICK *et al.*, 2000]. As alterações dependentes da idade no sistema imune inato e seus reflexos na saúde de indivíduos velhos são menos estudados. Todavia, tem sido

observado um aumento nas reações inflamatórias no envelhecimento que se correlacionam com condições neurológicas, tais como Doença de Alzheimer e em doenças cardiovasculares como a arteriosclerose [revisto em WICK *et al.*, 2000]. No presente trabalho, avaliamos de modo comparativo a atividade de arginase e iNOS, bem como a produção de citocinas, por macrófagos peritoneais ou derivados de medula óssea de camundongos BALB/c jovens e velhos, estimulados com doses padronizadas de LPS, IFN- γ ou IL-4.

Camundongos BALB/c velhos apresentam um número de células residentes mais elevado no lavado peritoneal que camundongos jovens, indicando um perfil inflamatório basal em cavidades peritoneais de animais velhos. A esse respeito, DE MARTINIS e colaboradores [2005] argumentam em favor de uma atividade inflamatória aumentada em indivíduos velhos em sua hipótese *inflamm-ageing*, que pode ser responsável pelas doenças crônicas instaladas na velhice. Todavia, nós observamos que o LPS e a IL-4 induziram níveis mais elevados de atividade iNOS e arginase, respectivamente, em M ϕ P de camundongos jovens do que nos camundongos velhos. A expressão da arginase também foi mais elevada em macrófagos peritoneais do animal naíve jovem do que no velho, após estimulação com IL-4, mas nos macrófagos elicitados não se observou diferenças na expressão dessa enzima. Por outro lado, os macrófagos diferenciados *in vitro* a partir de precursores da medula óssea de camundongos velhos mostraram níveis mais elevados de atividades iNOS e arginase do que as células provenientes de animais jovens, após estimulação com LPS e IL-4, respectivamente. Contudo, a expressão de arginase não diferiu significativamente em macrófagos diferenciados a partir de células da medula de animais jovens ou velhos, mas a expressão de iNOS induzida por LPS foi mais elevada nas

células provenientes de camundongos velhos. M ϕ P elicitados e M ϕ MO de camundongos jovens e velhos produziram quantidades comparáveis de NO em resposta ao IFN- γ , enquanto macrófagos peritoneais de animais naïve jovens apresentaram níveis de NO um pouco mais elevados do que os macrófagos dos velhos. A literatura é controversa sobre este ponto. Enquanto alguns autores encontraram um aumento na expressão de RNA para iNOS e da atividade enzimática em macrófagos de animais velhos elicitados com tioglicolato [CHEN *et al.*, 1996], outros indicam uma diminuição na produção da enzima em macrófagos de camundongos velhos estimulados com LPS e IFN- γ [KISSIN *et al.*, 1997]. É provável que essas discrepâncias apontadas acima sejam devidas aos diferentes modelos experimentais empregados nos estudos, tais como linhagens murinas distintas, as faixas etárias e estímulos inflamatórios utilizados.

Em relação às atividades iNOS ou arginase em M ϕ MO de camundongos jovens e velhos, a literatura ainda é muito pobre. Este tipo de células tem sido avaliado mais em relação à atividade apresentadora de antígeno e menos em sua resposta aos agentes inflamatórios [PLACKETT *et al.*, 2004] .

Macrófagos peritoneais de camundongos jovens e velhos também demonstraram resultados distintos com relação a produção de citocinas inflamatórias como IL-1 e TNF- α após a estimulação com LPS. Por exemplo, M ϕ P elicitados de camundongos velhos produziram altos níveis de IL-1 α enquanto M ϕ P de camundongos jovens produziram mais TNF- α . Os níveis de IL-10 não foram alterados pelo tratamento com LPS em M ϕ P de animais jovens e velhos, quando comparado ao grupo controle. M ϕ MO apresentaram níveis constitutivos de IL-10 mais elevados que M ϕ P, um resultado que está em concordância com as características imaturas dessas células que, na ausência de estímulos inflamatórios

assumem um perfil tolerogênico [KAH-WAI, JACEK & JACEK, 2006]. Da mesma forma, os níveis de IL-10 em M ϕ MO não foram alterados pela estimulação com LPS ou com o avanço da idade. A única citocina produzida por M ϕ MO após estimulação *in vitro* foi o TNF- α , produzido de maneira dependente da idade. Dados de literatura sobre a produção idade-dependente de IL-1 e o TNF- α por macrófagos humanos apontam outros aspectos além da idade que interferem na produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias. Nesse sentido, há relatos indicando tanto a ocorrência de redução quanto a elevação dos níveis de IL-1 e TNF- α , após estimulação de macrófagos de centenários com LPS, dependendo do seu estado geral de saúde [revisto em BRUUNSGAARD, PEDERSEN & PEDERSEN, 2001]. As diferenças encontradas entre dados de literatura e os resultados do presente trabalho sobre a função de fagócitos em camundongos velhos também podem ser atribuídas à origem das células, duração das culturas e aos estímulos usados nos diferentes estudos.

Contudo, tomados em conjunto, nossos resultados mostram que macrófagos peritoneais de camundongos velhos desenvolvem citocinas pró-inflamatórias em níveis mais elevados do que as células obtidas de animais jovens, o que pode contribuir para a maior susceptibilidade às doenças inflamatórias crônicas na velhice. Por outro lado, os fagócitos de camundongos idosos produziram NO em níveis mais baixos do que os camundongos jovens, o que pode levar à maior susceptibilidade dos indivíduos idosos às infecções microbianas. No entanto, nas condições em que esses animais são mantidos em nosso laboratório, a maioria deles alcança e ultrapassa a idade limite de vida da espécie. Isto porquê, são criados em condições livres de patógenos específicos e com ambiente e alimentação controlados, se assemelhando em sua fisiologia a certas populações humanas centenárias saudáveis.

VII – PRINCIPAIS RESULTADOS E CONCLUSÕES

- Macrófagos peritoneais elicitados ou derivados de precursores da medula óssea de camundongos BALB/c apresentaram níveis basais elevados de arginase.
- O tratamento com IL-4, mas não com LPS, induziu aumento dose-dependente na atividade de arginase em macrófagos peritoneais e derivados de medula óssea.
- LPS e IFN- γ induziram de modo dose-dependente a atividade iNOS em macrófagos peritoneais ou derivados de medula óssea .
- A produção de NO induzida por LPS foi inibida de modo dose-dependente por IL-4 em macrófagos peritoneais naïve ou derivados de precursores da medula óssea, mas não em macrófagos elicitados.
- A produção de arginase induzida por IL-4 foi completamente bloqueada na presença de LPS em macrófagos peritoneais elicitados ou derivados da medula óssea. Em macrófagos naïve, a produção de arginase induzida por IL-4 foi apenas parcialmente inibida pelo LPS.
- A fagocitose de *L. major*, zimosan opsonizado ou linfócitos apoptóticos não induziu a atividade de iNOS em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ou C57BL/6.
- A fagocitose de *Leishmania major* não modificou os níveis de arginase em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c naïve ou elicitados. Porém, o pré-tratamento com doses sub-ótimas de IL-4, LPS ou IFN- γ elevou significativamente os níveis de arginase produzidos por macrófagos elicitados que

fagocitaram *L. major*. Doses sub-ótimas de IL-4 ou IFN- γ elevaram a atividade arginase em macrófagos naïve que fagocitaram *L. major*.

- A fagocitose de partículas de zimosan induziu um aumento significativo nos níveis de arginase em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c naïve ou elicitados; o pré-tratamento com doses sub-ótimas de IL-4 e IFN- γ elevaram significativamente a atividade arginase em macrófagos naïve e a IL-4 elevou a atividade arginase em macrófagos elicitados que fagocitaram zimosan.

- A fagocitose de linfócitos apoptóticos induziu um aumento significativo nos níveis de arginase apenas em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c elicitados; o pré-tratamento com doses sub-ótimas de IL-4 e IFN- γ elevou significativamente a atividade arginase em macrófagos naïve e a IL-4 elevou a atividade arginase em macrófagos elicitados que fagocitaram os linfócitos apoptóticos.

- A fagocitose de *Leishmania major* não modificou os níveis de arginase em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 naïve ou elicitados e nem o pré-tratamento com doses sub-ótimas de IL-4 e IFN- γ alterou esses resultados.

- A fagocitose de partículas de zimosan ou linfócitos apoptóticos, na presença ou ausência de LPS ou IL-4, não induziu um aumento nos níveis de arginase em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 naïve.

- A fagocitose de zimosan e de linfócitos apoptóticos induziu um aumento significativo nos níveis de arginase em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 elicitados; o pré-tratamento com doses sub-ótimas de LPS

ou IL-4 não alterou significativamente a atividade de arginase produzidos por macrófagos elicitados, mas dose sub-ótima de IFN- γ elevou significativamente a atividade de arginase em células que fagocitaram zimosan ou linfócitos apoptóticos.

- A atividade e expressão da arginase induzida por IL-4 foi significativamente mais elevada em macrófagos peritoneais naïve provenientes de animais jovens do que em células de animais velhos.

- A atividade da iNOS induzida por LPS ou IFN- γ também foi significativamente mais elevada em macrófagos peritoneais naïve provenientes de animais jovens. Porém, só foi possível observar a expressão da enzima em macrófagos naïve estimulados com IFN- γ , não se constatando diferenças entre jovens ou velhos.

- A atividade e expressão da arginase induzida por IL-4 foi similar em macrófagos peritoneais elicitados provenientes de animais jovens e velhos;

- A atividade e expressão da iNOS induzida por LPS foi significativamente mais elevada em macrófagos peritoneais elicitados provenientes de animais jovens, mas a estimulação com IFN- γ resultou em atividade e expressão similar em macrófagos peritoneais elicitados de jovens e velhos.

- Em macrófagos imaturos derivados da medula óssea, a atividade arginase induzida por IL-4 foi significativamente mais elevada nas células provenientes de animais velhos, embora a expressão da arginase tenha sido similar nas células provenientes de animais jovens e velhos. Na ausência de estímulo, a expressão de baixos níveis de arginase só foi observada em macrófagos imaturos derivados da medula óssea de animais velhos.

- A atividade da iNOS induzida por LPS também foi significativamente mais elevada nos macrófagos imaturos derivados da medula óssea provenientes de animais velhos; a expressão da iNOS induzida por IFN- γ foi similar nas células imaturas provenientes de animais jovens e velhos; LPS induziu a expressão aumentada de iNOS nas células imaturas de camundongos velhos.

- O LPS induziu a produção de IL-1 α em macrófagos peritoneais naïve ou elicitados, mas essa produção foi significativamente mais elevada nos macrófagos elicitados de camundongos velhos.

- O LPS induziu a produção de TNF- α em macrófagos peritoneais naïve ou elicitados, mas essa produção foi significativamente mais elevada nos macrófagos elicitados de camundongos jovens.

- O LPS não induziu a produção de IL-10 em macrófagos peritoneais naïve ou elicitados de camundongos jovens ou velhos.

- O LPS não induziu a produção de IL-1 α ou IL-10 em macrófagos diferenciados da medula óssea, obtidos nos macrófagos de camundongos jovens ou velhos.

- O LPS induziu a produção de TNF- α em macrófagos diferenciados da medula óssea, mas essa produção foi significativamente mais elevada nos macrófagos de camundongos velhos.

Tomados em conjunto, nossos resultados indicam que a redução de TNF- α e de atividade iNOS em macrófagos teciduais de camundongos velhos poderiam explicar a maior susceptibilidade às infecções na velhice. Por outro lado, camundongos criados em

ambiente livre de patógenos específicos, como os usados neste trabalho, sobrevivem até idade avançada sem sinais de doenças de natureza inflamatória, se assemelhando nesse aspecto a populações humanas centenárias.

VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKILOV OE, KASUBOSKI RE, CARTER CR, MCDOWELL MA. The role of mannose receptor during experimental leishmaniasis. J Leukoc Biol 2007; 81: 1188-1196.

AKIRA S & HEMMI H. Recognition of pathogen-associated molecular by TLR family. Immunology Letters 2003; 85:85-95.

ALEXANDER J & VICKERMAN K. Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. The Journal of Protozoology 1975; 22(4):502-508.

AMES BN & SHIGENAGA MK. Oxidants are a major contributor to aging. Annals New York Academy of Sciences 1992; 663:85-96. 31.

BABIOR BM. NADPH oxidase: an update. Blood 1999; 93: 1464-1476.

BATLOUNI M & RAMIRES JAF. Importância do endotélio na doença arterial coronária e na aterogênese. Arquivos Brasileiros de Cardiologia 1994; 62(4):255-270.

BEVERLEY PCL & GRUBECK-LOEBENSTEIN B. Is immune senescence reversible? Vaccine 2000; 18:1721-1724.

BIANCO ID, BALSINDE J, BELTRAMO DM, CASTAGNA LF, LAND CA & DENNIS EA. Chitosan-induced phospholipase A₂ activation and arachidonic acid mobilization in P388D₁ macrophages. FEBS Letters 2000; 466:292-294.

BLANTZ RC, SATRIANO J, GABBAI F & KELLY C. Biological effects of arginine metabolites. *Acta Physiologica Scandinavica* 2000; 168:21-25.

BOGDAN C & NATHAN C. Modulation of macrophage function by transforming growth factor- β , interleukin 4 and interleukin 10. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1993; 685:713-739.

BOGDAN C, ROLLINGHOFF M & DIEFENBACH A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current Opinion in Immunology* 2000; 12:64-76.

BOGDAN C, VODOVOTZ Y, PAIK J, XIE QW & NATHAN C. Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 1994; 55:227-233.

BOLTZ-NITULESCU G, WILTSCHKE C, HOLZINGER C, FELLINGER A, SCHEINER O, GESSL A & FÖRSTER O. Differentiation of rat bone marrow cells into macrophages under the influence of mouse L929 cell supernatant. *Journal of Leukocyte Biology* 1987; 41:83-91.

BRONTE V, SERAFINI P, MAZZONI A, SEGAL DM & ZANOVELLO P. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends in Immunology* 2003; 24(6):301-305.

BROWN EJ. Adhesive interactions in the immune system. Trends in Cell Biology 1997; 7:289-295.

BRUUNSGAARD H, PEDERSEN M & PEDERSEN BK. Aging and proinflammatory cytokines. Current Opinion in Hematology 2001; 8:131-136.

CATANIA A, AIRAGHI L, MOTTA P, MANFREDI MG, ANNONI G, PETTENATI C
BRAMBILLA F & LIPTON JM. Cytokine antagonists in aged subjects and their relation with cellular immunity. Journal of Gerontology: Biological Sciences 1997; 52A(2):B93-B97.

CHAKRAVARTI B & ABRAHAM GN. Aging and T-cell-mediated immunity. Mechanisms of Ageing Development 1999;108:183-206.

CHANG C-I, LIAO JC & KUO L. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. American Journal Physiology 1998; 274:H342-H348.

CHANG C-I, LIAO JC & KUO L. Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity. Cancer Research 2001; 61:1100-1106.

CHANG KP & DWYER DM. *Leishmania Donovanii* hamster macrophage interactions in vitro: cell entry, intracellular survival, and multiplication of amastigotes. Journal of Experimental Medicine 1978; 147:515-530.

CHEN L-C, PACE JL, RUSSELL SW & MORRISON DC. Altered regulation of inducible nitric oxide synthase expression in macrophages from senescent mice. *Infection and Immunity* 1996; 64(10):4288-4298.

CHRISTOPHERSON KS & BREDT DS. Perspectives series: nitric oxide and nitric oxide synthases. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 100(10):2424-2429.

CHUNG HY, CESARI M, ANTON S, MARZETTI E, GIOVANNINI S, SEO AY, CARTER C, YU BP & LEEUWENBURGH C. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Research Reviews* 2009; 8:18-30.

CORRALIZA IM, CAMPO ML, SOLER G & MODOLELL M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *Journal of Immunological Methods* 1994; 174: 231-235.

CORRALIZA IM, SOLER G, EICHMANN K & MODOLELL M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE₂) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochemical and Biophysical research communications* 1995; 206(2):667-673.

COSTA, EH. Estudo da resposta inflamatória de camundongos: Produção de óxido nítrico e de citocinas no envelhecimento 1998. Dissertação de Mestrado (Biologia-Imunologia)- Universidade Estadual de Campinas.

COX E & HUTTENLOCHER A. Regulation of integrin-mediated adhesion during cell migration. *Microscopy Research and Technique* 1998; 43:412-419.

CUNHA FQ, ASSREUY J, MOSS DW, REES D, LEAL LMC, MONCADA S, CARRIER M, O'DONNELL CA & LIEW FY. Differential induction of nitric oxide synthase in various organs of the mouse during endotoxaemia: role of TNF- α and IL-1- β . *Immunology* 1994; 81:211-215.

CUNHA FQ, MONCADA S & LIEW FY. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon- γ in murine macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1992; 182(3):1155-1159.

DE MARTINIS M, FRANCESCHI C, MONTI D & GINALDI L. Inflamm-ageing and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Letters* 2005; 579:2035-2039.

DING AH, NATHAN CF & STUEHR DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *The Journal of Immunology* 1988; 141(7):2407-2412.

DURANTE W, JOHNSON FK & JOHNSONRA. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2007; 34:906-911.

FADOK VA, VOELKER DR, CAMPBELL PA, COHEN JJ, BRATTON DL & HENSON PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology* 1988; 148(7):2207-2216.

FRASCA D, LANDIN AM, RILEY RL & BLOMBERG BB. Mechanisms for decreased function of B cells in aged mice and humans. *The Journal of Immunology* 2008; 180:2741-2746.

GORDON S & TAYLOR PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology* 2005; 5:953-964.

GORDON S. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology* 2003; 3:23-35.

GREEN LG, WAGNER DA, GLOGOWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK JS & TANNENBAUM SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* 1982; 126:131-138.

GREEN SJ, MELTZER MS, HIBBS JB & NACY CA. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *The Journal of Immunology* 1990; 144(1):278-283.

GREEN SJ, NACY CA & MELTZER MS. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to *leishmania* and other intracellular pathogens. Journal of Leukocyte Biology 1991; 50:93-103.

HANKS, J H. Quantitative aspects of phagocytosis as influenced by number of bacteria and leukocytes. The Journal of Immunology. 1940; 38:159.

HANSSON M, ASEA A, ERSSON U, HERMODSSON S & HELLSTRAND K. Induction of apoptosis in NK cells by monocyte-derived reactive oxygen metabolites. The Journal of Immunology 1996; 156:42-47.

HARRISON DG. Perspectives series: nitric oxide and nitric oxide synthases. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. Journal of Clinical Investigation 1997; 100(9):2153-2157.

HIBBS JB, TAINTOR RR, VAVRIN Z & RACHLIN EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. Biochemical and Biophysical Research Communications 1988; 157(1):87-94.

INABA, K, INABA M, ROMANI N, AYA H, DEGUCHI M, IKEHARA S, MURAMATSU S & STEINMAN R. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. Journal of Experimental Medicine 1992; 176:1693-1702.

- INIESTA V, GÓMEZ-NIETO C, MOLANO I, MOHEDANO A, CARCELÉN J, MIRÓN C, ALONSO C & CORRALIZA I. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunology* 2002; 24:113-118.
- JANEWAY CA Jr. & MEDZHITOV R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 2002; 20:197-216.
- JENKINSON CP, GRODY WW & CEDERBAUM SD. Comparative properties of arginases. *Comparative Biochemistry and Physiology* 1996; 114B(1):107-132.
- KAH-WAI L, JACEK T & JACEK R. Dendritic cells heterogeneity and its role in cancer immunity. *Journal Cancer Research and Therapeutics* 2003; 2(2):35-40.
- KAWAI T & AKIRA S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* 2010; 11(5):373-384.
- KIRKWOOD TBL & KOWALD A. Network theory of aging. *Experimental Gerontology* 1997; 32(4/5):395-399.
- KISSIN E, TOMASI M, MCCARTNEY-FRANCIS N, GIBBS CL & SMITH PD. Age-related decline in murine macrophage production of nitric oxide. *Journal Infectious Diseases* 1997; 175:1004-1007.

- KONARSKA L & TOMASZEWSKI L. Studies on L-arginase in developing rat small intestine, brain, and kidney. I. Ontogenic evolution of arginase isoenzymes. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* 1986; 35:156-169.
- KUMAR H, KAWAI T & AKIRA S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009; 388:621-625.
- KUNG JT, BROOKS SB, JAKWAY JP, LEONARD LL & TALMAGE DW. Suppression of in vitro cytotoxic response by macrophages due to induced arginase. *Journal of Experimental Medicine* 1977; 146:665-672.
- LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685. 30.
- LE CABEC V, CARRENO S, MOISAND A, BORDIER C, MARIDONNEAU-PARINI I. Complement receptor 3 (CD11b/CD18) mediates type I and type II phagocytosis during nonopsonic and opsonic phagocytosis, respectively. *The Journal of Immunology* 2002; 169: 2003-2009.
- LIEW FY, LI Y & MILLOTT S. Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *The Journal of Immunology* 1990; 145(12):4306-4310.

LIEW FY, MILLOTT S, PARKINSON C, PALMER RMJ & MONCADA S. Macrophage killing of *leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. The Journal of Immunology 1990; 144(12):4794-4797.

LORENTE JA, LANDÍN L, RENES E, PABLO R, JORGE P, RÓDENA E & LISTE D. Role of nitric oxide in the hemodynamic changes of sepsis. Critical Care Medicine 1993; 21(5):759-767.

LOWENSTEIN CJ & SNYDER SH. Nitric oxide, a novel biologic Messenger. Cell 1992; 70:705-707.

MACKANESS GB. Cellular resistance to infections. Journal of Experimental Medicine 1962; 116:381-406.

MARLETTA MA, YOON PS, TYENGAR R, LEAF CD & WISHNNOK JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is a intermediate. *Biochemistry* 1988; 27:8706-8711.

MAYER B & HEMMENS B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. Trends in Biochemical Sciences 1997; 22:477-481.

McCANN SM, LICINIO J, WONG M-L, YU WH, KARANTH S & RETTORRI V. The nitric oxide hypothesis of aging. Experimental Gerontology 1998; 33(7/8):813-826.

METCALF D. The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Science* 1985; 229:16-22.

MEZL VA & KNOX WE. Metabolism of arginine in lactating rat mammary gland. *Biochemical Journal* 1977; 164:105-113.

MILLS CD, KINCAID K, ALT JM, HEILMAN MJ & HILL AM. M-1/M-2 Macrophages and the TH1/TH2 Paradigm. *The Journal of Immunology* 2000; 164:6166-6173.

MODELELL M, CORRALIZA IM, LINK F, SOLER G & EICHMANN K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *European Journal Immunology* 1995; 25:1101-1104.

MONCADA S. Adventures in vascular biology: a tale of two mediators. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 2006; 361:735-759.

MORI M & GOTOH T. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 275:715-719.

MORI M, GOTOH T, NAGASAKI A, TAKIGUCHI T & SONOKI T. Regulation of the urea cycle enzyme genes in nitric oxide synthesis. *Journal Inherited Metabolic Disease* 1998; 21(1):59-71.

MORRIS SM Jr. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. Annual Review of Nutrition 2002; 22:87-105.

MULLNER N, LÁZÁR A & HRABAK A. Enhanced utilization and altered metabolism of arginine in inflammatory macrophages caused by raised nitric oxide synthesis. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2002; 34:1080-1090.

MUNDER M, EICHMANN K, MORÁN JM, CENTENO F, SOLER G & MODOLELL M. The Journal of Immunology 1999; 163:3771-3777.

NATHAN C. Perspectives series: nitric oxide and nitric oxide synthases. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? Journal of Clinical Investigation 1997; 100(10):2417-2423.

NATHAN CF & HIBBS JB Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. Current Opinion in Immunology 1991; 3:65-70.

NATHAN CF, BRUKNER LH, SILVERSTEIN SC & COHN ZA. Extracellular cytotoxicity by activated macrophages and granulocytes. I- Pharmacologic triggering of effector cells and the release of hydrogen peroxide. Journal of Experimental Medicine 1979a; 149:84-99.

NATHAN CF, SILVERSTEIN SC, BRUKNER LH & COHN ZA. Extracellular cytotoxicity by activated macrophages and granulocytes. II-Hydrogen peroxide as a mediator of cytotoxicity. *Journal of Experimental Medicine* 1979b; 149:100-113.

NICOLA NA & VADAS M. Hemopoietic colony-stimulating factors. *Immunology Today* 1984; 5(3):76-80.

PAHLAVANI MA, RICHARDSON A. The effect of age on the expression of interleukin-2. *Mechanisms of Ageing Development* 1996; 89:125-154.

PATNAIK SK & PATNAIK R. Tissue-specific differential modulation of arginase and ornithine aminotransferase by hydrocortisone during various developmental stages of the rat. *Biochemistry International* 1989; 18(4):709-719.

PERANZONI E, MARIGO I, DOLCETTI L, UGEL S, SONDA N, TASCHIN E, MANTELLI B, BRONTE V & ZANOVELLO P. Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology. *Immunobiology* 2008; 212:795-812.

PLACKETT TP, BOEHMER ED, FAUNCE DE, & KOVACS EJ. Aging and innate immune cells. *Journal Leukocyte Biology* 2004; 76:291-299.

POREMBSKA Z. Different species of arginase in animal,tissues. *Enzyme* 1973; 15:198-209.

PORPORATTO C, BIANCO ID, RIERA CM & CORREA SG. Chitosan induces different L-arginine metabolic pathways in resting and inflammatory macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 304:266-272.

QUE LG, GEORGE SE, GOTOH T, MORI M & HUANG Y-C T. Effects of arginase isoforms on NO production by nNOS. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 2002; 6(1):1-8.

REIS E SOUSA C. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Current Opinion in Immunology* 2004; 16:21-25.

ROACH TIA, KIDERLEN AF & BLACKWELL JM. Role of inorganic nitrogen oxides and tumor necrosis factor alpha in killing *Leishmania donovani* amastigotes in gamma interferon-lipopolysaccharide-activated macrophages from *Lsh^s* and *Lsh^r* congenic mouse strains. *Infection and Immunity* 1991; 59(11):3935-3944.

RUTSCHMAN R, LANG R, HESSE M, IHLE JN, WYNN TA & M PJ. Cutting edge: stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *The Journal of Immunology* 2001; 166:2173-2177.

RYAN JL, YOHE WB & MORRISON DC. Stimulation of peritoneal cell arginase by bacterial lipopolysaccharides. *American Journal of Pathology* 1980; 99:451-462.

SIEGRIST CA & ASPINALL R. B-cells responses to vaccination at the extremes of age.
Nature Reviews Immunology 2009; 9:185-194.

SIMIONI PU, COSTA EH & TAMASHIRO WMSC. Aging reduces the primary humoral response and the *in vitro* cytokine production in mice. Brazilian Journal Medical and Biological Research 2007; 40:1111-1120.

SOMERSAN S, BHARDWAJ N. Tethering and tickling: a new role for the phosphatidylserine receptor. Journal of Cell Biology 2001; 155: 501-504.

SONOKI T, NAGASAKI A, GOTOH T, TAKIGUXHI M, TAKEYA M, MATSUZAKI H & MORI M. Coinduction of nitric-oxide synthase and arginase I in cultures rat peritoneal macrophages and rat tissues *in vivo* by lipoólysaccharide. The Journal of Biological Chemistry 1997; 272(6):3689-3693.

STUEHR DJ & MARLETTA MA. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon- γ . The Journal of Immunology 1987; 139(2):518-525.

TOWBIN H, STAEHELIN T & GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 1979; 76:4350-4354.

- USAMI Y, OKAMOTO Y, TAKAYAMA T, SHIGEMASA Y & MINAMI S. Chitin and chitosan stimulate canine polymorphonuclear cells to release leukotriene B₄ and prostaglandin E₂. *Journal of Biomedical Materials Research* 1998; 42:517-522.
- VICK G & GRUBECK-LOEBENSTEIN B. The aging immune system: primary and secondary alterations of immune reactivity in the elderly. *Experimental Gerontology* 1997; 32(4/5):401-413.
- WANG WW, JENKINSON CP, CRISCAVAGE JM, KERN RM, ARABOLOS NS, BYRNS RE, CEDERBAUM SD & IGNARRO LJ. Co-induction of arginase and nitric oxide synthase in murine macrophages activated by lipopolysaccharide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995; 210(3):1009-1016.
- WATANABE H, NUMATA K, ITO T, TAKAGI K & MATSUKAWA A. Innate immune response in TH1- and TH2-dominant mouse strains. *Shock* 2004; 22(5): 460-466.
- WICK G, JANSEN-DURR P, BERGER P, BLASKO I & GRUBECK-LOEBENSTEIN B. Diseases of aging. *Vaccine* 2000; 18: 1567-1583.
- WU G & MORRIS SM. Arginine metabolism: nitric oxide beyond. *Biochemical Journal* 1998; 336:1-17.
- ZIMMERMANN N & ROTHENBERG ME. The arginine–arginase balance in asthma and lung inflammation. *European Journal of Pharmacology* 2006; 533:253-2.

IX - ANEXOS

Anexo 1

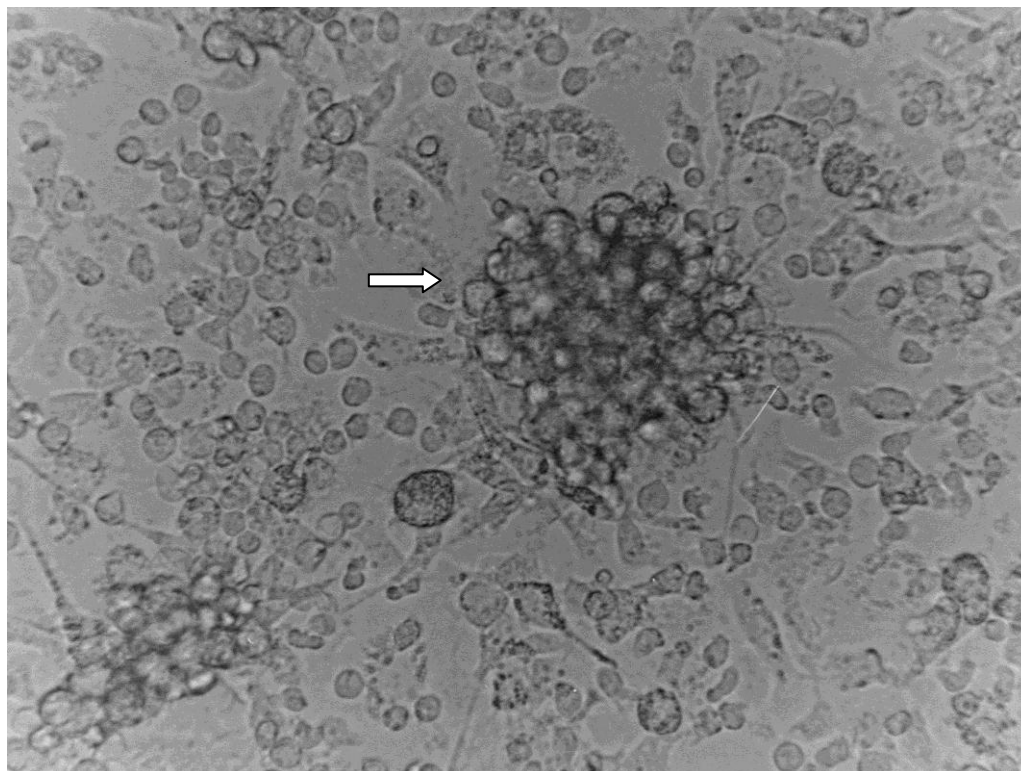
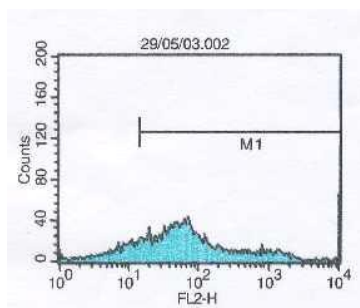


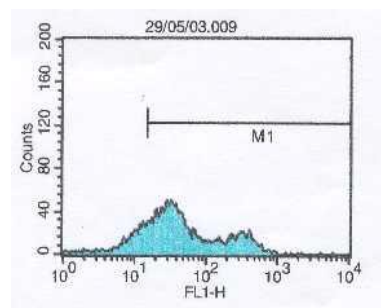
Figura 1. Microscopia ótica de cultura de células precursoras da medula óssea. Células obtidas da medula óssea de camundongos BALB/c, de 8 semanas de idade, foram cultivadas durante 8 dias em placas de Petri na densidade de 8×10^6 células/placa na presença de meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SFB, antibiótico (gentamicina, $50 \mu\text{g/mL}$), 30% de sobrenadante de células L929 e 5% de soro eqüino. Após o oitavo dia de cultivo, as colônias diferenciadas foram removidas através de pipetagens vigorosas, após vinte minutos de incubação das placas com solução salina 0,15 M, em banho de gelo. Aumento de 200x. A seta indica uma colônia de células diferenciadas.

Anexo 2

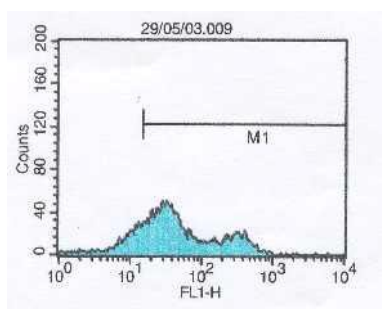
A



B



C



D

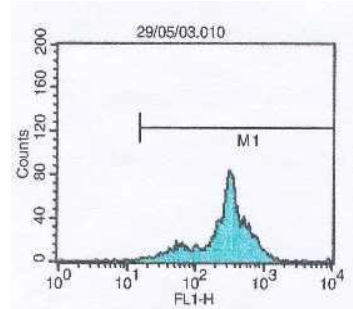
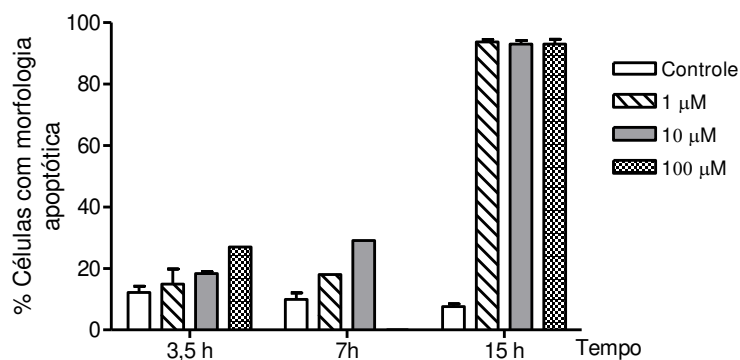


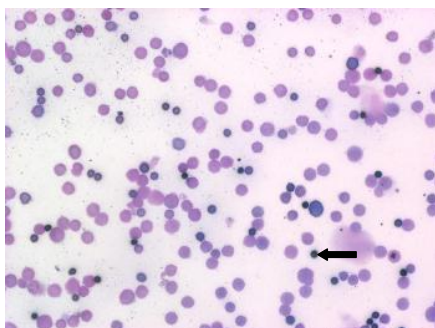
Figura 2. Análise de timócitos por citometria de fluxo. As porcentagens de células $CD3^+$ presentes em suspensões não purificadas de timócitos de camundongos (4 semanas de idade) foram determinadas empregando-se um anticorpo anti- $CD3$ /FITC comercial (A; 83,31%) ou um anticorpo anti- $CD3$ conjugado com FITC em nosso laboratório (B; 81,32%), ambos na concentração de $1\mu\text{g/mL}$. Após a separação dos timócitos em lâ de nylon, as porcentagens de células $CD3^+$ presentes nas suspensões enriquecidas foram de 81,32% (C; com o anti- $CD3$ /FITC a $1\mu\text{g/mL}$) ou de 99,69% (D; com anticorpo anti- $CD3$ /FITC a $10\mu\text{g/mL}$). As análises foram realizadas em citômetro FACSCalibur (Becton & Dickinson), usando o software CellQuest.

Anexo 3

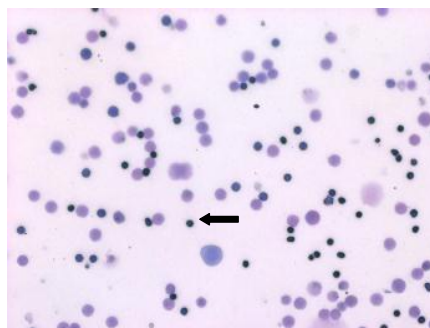
A



B



C



D

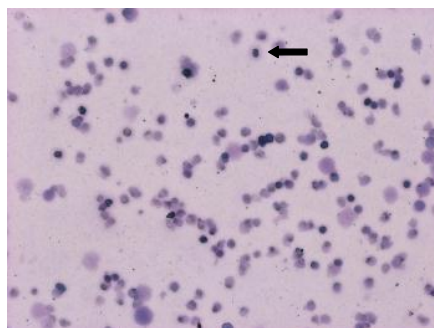


Figura 3. Indução de apoptose em timócitos. Os timócitos obtidos de camundongos com 4 semanas de idade foram tratados com dexametasona (1, 10 e 100 μ M), por períodos de incubação de 3,5, 7 e 15 horas. Após os tratamentos, as células foram examinadas por microscopia ótica, determinando-se as percentagens de células apoptóticas presentes em cada preparação (Painel A). As características morfológicas dos timócitos controles (Painel B) ou tratados com 100 μ M dexametasona, por 3,5 h ou 15 h (Painéis C e D), respectivamente; aumento de 200 x. As setas indicam células apoptóticas.

Anexo 4-Cópia do Protocolo CEEA



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 450-1, sobre "Imunidade e envelhecimento: produção de arginase e sintase de óxido nítrico por macrófagos de camundongos", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro / Carla Aparecida Cecilio, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 18 de outubro de 2002.

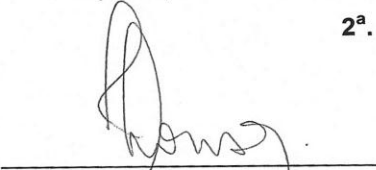
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 450-1, entitled "_____", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on October 18, 2002.

Campinas, 20 de maio de 2008.

2ª. VIA


Profa. Dra. Ana Aparecida Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

Anexo 5-Cópia da Declaração CEUA

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação /tese de Doutorado intitulada "IMUNIDADE E ENVELHECIMENTO: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ARGINASE E SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. _____, Instituição: _____

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 450-1, Instituição: UNICAMP

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Carla Aparecida Cecilio

Aluno: Carla Aparecida Cecilio

Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

Orientador: Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

☒ Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo
Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Anexo 5-Artigo aceito para publicação no periódico Brazilian Journal of Medical and Biological Research

Brazilian Journal of Medical and Biological Research Online Provisional Version
ISSN 0100-879X

This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance.
Fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon.

Aging alters the production of iNOS, arginase and cytokines in murine macrophages

C.A. Cecílio, E.H. Costa, P.U. Simioni, D.L. Gabriel and W.M.S.C. Tamashiro

Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia,
Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

Abstract

The limited amount of information on the primary age-related deficiencies in the innate immune system led us to study the production of inducible nitric oxide synthase (iNOS), arginase, and cytokines in macrophages of young (8 weeks old) and old (72 weeks old) female BALB/c mice. We first evaluated iNOS and arginase inducers on peritoneal (PM Φ) and bone marrow-derived (BMM Φ) macrophages of young mice, and then investigated their effects on macrophages of old mice. Upon stimulation with lipopolysaccharide (LPS), resident and thioglycolate-elicited PM Φ from young mice presented higher iNOS activity than those from old mice (54.4%). However, LPS-stimulated BMM Φ from old mice showed the highest NO levels (50.1%). Identical NO levels were produced by PM Φ and BMM Φ of both young and old mice stimulated with interferon- γ . Arginase activity was higher in resident and elicited PM Φ of young mice stimulated with LPS (48.8 and 32.7%, respectively) and in resident PM Φ stimulated with interleukin (IL)-4 (64%). BMM Φ of old mice, however, showed higher arginase activity after treatment with IL-4 (46.5%). In response to LPS, PM Φ from old mice showed the highest levels of IL-1 α (772.3 $\pm$ 51.9 pg/mL), whereas, those from young mice produced the highest amounts of tumor necrosis factor (TNF)- α (937.2 $\pm$ 132.1 pg/mL). Only TNF- α was expressed in LPS-treated BMM Φ , and cells from old mice showed the highest levels of this cytokine (994.1 $\pm$ 49.42 pg/mL). Overall, these results suggest that macrophages from young and old mice respond differently to inflammatory stimuli, depending on the source and maturity of the cell donors.

Key words: Aging; iNOS; Arginase; Cytokines; Murine macrophages; Inflammatory stimuli

Introduction

Aging is accompanied by a reduced efficiency of the immune system, thus compromising the general health of older individuals (1-3). Although the age-dependent changes in the adaptive immune system are well documented, changes in the innate immune system have been poorly described. However, the interdependency of the adaptive and innate immune systems is becoming increasingly clear, since they appear to cooperate at various levels to ensure an efficient immune response against microbes and tumor cells (4). Thus, the malfunctions in one aspect of immunity may severely hinder the functioning of the whole immune system, especially in the elderly.

Cells of the immune system deal efficiently with microbes by producing antimicrobial molecules, as well as free radicals (for a review, see Ref. 5). Nitric oxide (NO) is a toxic gas produced by the action of the enzyme family nitric oxide synthase (NOS), which converts L-arginine to citrulline and NO (6,7). Cytokines such as interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), as well as bacterial lipopolysaccharide (LPS), are responsible for the expression of an inducible form of NOS (iNOS) and the generation of large amounts of NO in neutrophils and macrophages (8-12). Under certain circumstances, NO reacts with superoxide anion to form peroxynitrite, a potent oxidizing molecule that

Correspondence: W.M.S.C. Tamashiro, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, UNICAMP, Caixa Postal 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brasil. Fax: +55-19-3521-6276. E-mail: wirlatam@unicamp.br

Received September 10, 2010. Accepted May 13, 2011. Available online.

contributes to tissue injury during inflammatory processes (13).

Arginase also metabolizes L-arginine to ornithine and urea; it exists in two forms, arginase 1 and 2 (Arg 1 and Arg 2) (14-16). These arginase isoforms differ in terms of tissue distribution, subcellular localization, immunologic cross-reactivity, and physiologic functions. During early developmental stages, Arg 1 is expressed predominantly in the peripheral nervous system, the digestive system and in tissue leukocytes, whereas Arg 2 is found only in the intestines (16). Cytosolic Arg 1 is involved in ammonia degradation in the urea cycle, and its absence in deficient patients leads to hyperammonemia. Arg 2, on the other hand, is a mitochondrial isoform and is mainly involved in ornithine biosynthesis, with its absence not resulting in any phenotypic deficiency (17). The arginases are also involved in the generation of polyamines, e.g., putrescine, spermidine, and spermine, which are important for the regulation of cell proliferation, cell differentiation, and cell death (15,18).

Macrophages may be able to express both arginase isoforms in response to LPS, although the literature is controversial in this regard (19,20). Another way of inducing arginase production is the stimulation of macrophages with Th2 cytokines such as interleukin-4 (IL-4), IL-10, and IL-13. These murine macrophages up-regulate the expression of Arg 1, but not that of Arg 2 (21). On the other hand, inflammatory cytokines such as IFN- γ and TNF- α , alone or in combination with LPS, are able to induce iNOS. It has been suggested that the production of iNOS is usually accompanied by arginase expression, and that this arginase may contribute to buffering the overproduction of toxic NO (17). However, it is unclear whether this balance is maintained with aging. In the present study, we analyzed iNOS and arginase activities, as well as cytokine production, in macrophages from young and old mice submitted to different stimuli. Our results suggest that significant changes take place in macrophages of old mice, depending on the source and maturity of the cell donors.

Material and Methods

Animals

Four-week-old female BALB/c and C57BL/6 mice were supplied by the Multi-Institutional Center for Biological Investigation (CEMIB) of the State University of Campinas (UNICAMP). Mice were housed under specific pathogen-free conditions in the animal facilities of the Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biology, UNICAMP, and were provided with autoclaved food and water *ad libitum*. Both mouse strains were used at 8 weeks of age. Seventy-two-week-old BALB/c mice were also used. The study was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation (Protocol No. 450-1).

Reagents

LPS from *Escherichia coli* and thioglycolate medium were purchased from Difco Laboratories (USA); RPMI 1640, HEPES, Hank's balanced salt solution (HBSS) containing Ca^{2+} and Mg^{2+} (H6648), 2-mercaptoethanol, L-arginine, urea, sulfanilamide, *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride, Triton-X, aprotinin, antipain, and α -isonitrosopropiophenone (ISPF) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (USA); IL-4 and IFN- γ were purchased from R&D (USA) and from Genzyme (USA), respectively.

Cells

Macrophages were isolated from the peritoneal cavity of naive ($N = 15$) or thioglycolate-treated mice ($N = 5$), as described elsewhere (22). Peritoneal cells were cultured at a density of 2×10^5 cells in 96-well plates, 1×10^6 cells in 24-well plates or 5×10^6 cells in 6-well plates in RPMI-1640 medium containing 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS; Brazil) for 2 h at 37°C in 5% CO_2 . Non-adherent cells were washed out, and adherent cells were cultured in the presence of appropriate stimuli as indicated below.

Bone marrow-derived macrophages were differentiated from precursor cells in a modification of the procedure described by Munder et al. (21). Briefly, bone marrow cells were obtained by flushing the femurs of mice ($N = 5$). They were cultured in 6-well plastic plates at a density of 5×10^6 cells/well, in 3 mL RPMI-1640 medium containing 10% heat inactivated FCS, 5% horse serum, and a 30% (v/v) concentration of L929 fibroblast culture supernatants, as a source of colony stimulating factors (CSFs) to drive cell differentiation. On day 4, the plates were swirled vigorously, and 2.5 mL of the medium was discarded and replaced with fresh CSF-containing medium. The adherent cells were harvested on day 8 with cold saline, sedimented by centrifugation and then cultured at a density of 2×10^5 in 200 μL medium in 96-well plates, of 1×10^6 in 1 mL medium in 24-well plates or of 5×10^6 in 3 mL medium in 6-well plates.

The strain of *Leishmania major* was supplied by Dr. Fernando de Queiróz Cunha (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Brazil) and grown in our laboratory by passages at 5-7-day intervals in an Iscove medium containing 10 mM HEPES, 2 g/L sodium bicarbonate, 25 mg/L gentamicin and 20% FCS. For the phagocytosis assays, the promastigotes (stationary phase) were collected from culture flasks, transferred to centrifuge tubes and centrifuged at 200 *g* for 20 min.

The pellet was resuspended in incomplete RPMI medium and the parasites were pelleted at 200 g for 20 min. The final sediment was suspended in complete RPMI and counted in a Neubauer chamber, and the suspension was adjusted to 3×10^6 forms/mL.

Thymocytes of BALB/c or C57BL/6 mice were treated with dexamethasone to induce apoptosis as described by Fadok et al. (23). Briefly, the thymuses were collected aseptically and placed on sterile Petri dishes containing incomplete RPMI. The organs were macerated and the suspension obtained was filtered through a sieve to separate cell debris. After centrifugation of 200 g for 10 min, cells were resuspended in a culture medium. An aliquot of the suspension was labeled with anti-CD3 (clone 2C11)-fluorescein for analysis by flow cytometry (FACScalibur, USA), and 81-99.7% of CD3⁺ cells were detected in three separate preparations. Cells were plated onto 6-well culture plates (Corning) at a density of 2×10^7 cells in 3 mL/well RPMI containing 10% FCS, 50 mL/L gentamicin and 10 μ M dexamethasone, and incubated at 37°C in a humidified incubator with a 5% CO₂ atmosphere for 15 to 18 h. Apoptotic cells were then collected from culture plates by gentle pipetting, centrifuged at 200 g for 10 min, resuspended in culture medium, and adjusted to a concentration of 5×10^6 cells/mL.

Zymosan was prepared from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. Briefly, 5 mg baker's yeast (Fleischmann's Yeast; Fermix, Brazil) was transferred to a glass flask, which was filled with 150 mL sterile 0.15 M saline, and heated in a water bath at 100°C (Dubnoff bath; Marconi, Brazil) for 1 h. Aliquots of 50 mL were separated and filtered through a funnel with sterile gauze, and centrifuged several times at 200 g for 10 min until the supernatants became clear. The particles were resuspended in 0.15 M saline, adjusted to a concentration of 2×10^9 /mL and kept at -20°C until use. A 2-mL aliquot of the standard zymosan suspension was added to 200 μ L normal rabbit serum and incubated for 15 min at 37°C with occasional shaking. The reaction was stopped by reducing the temperature on an ice bath and by diluting the suspension in cold 0.15 M saline. After centrifugation at 200 g for 5 min at 4°C, the supernatant was discarded. Then, the zymosan was washed again in cold 0.15 M saline and the sediment was resuspended in 2 mL HBSS (Sigma). The suspension was adjusted to a concentration of 10^8 cells/mL.

Cell cultures for the evaluation of NO production, arginase activity and cytokines

Peritoneal (PM Φ) and bone-marrow-derived (BMM Φ) macrophages were cultured for 48 h in the presence of LPS (1 to 1000 ng/mL), IFN- γ (0.5 to 50 IU/mL) and IL-4 (0.1 to 10 ng/mL), alone or in combination. The supernatants were then harvested for the determination of NO and cytokine production. Cell extracts were used to measure arginase activity as described below. In some experiments, adherent cell monolayers were cultured simultaneously in the presence of IL-4 and LPS, as indicated in the figures.

NO production and arginase activity were also analyzed in PM Φ harvested from the peritoneal cavities of BALB/c and C57BL/6 mice, and cultured in the presence or absence of LPS, IL-4 and IFN- γ after the phagocytosis of *L. major*, apoptotic lymphocytes and zymosan. Briefly, adherent cells from the peritoneal cavity of mice were seeded at a density of 1×10^6 cells/mL in 24-well plates and cultured for 18 h with suboptimal doses of LPS (100 ng/mL), IL-4 (4 ng/mL) or IFN- γ (5 IU/mL). After washing the cultures to remove the stimulus, opsonized zymosan (5×10^6), apoptotic lymphocytes (5×10^6) or promastigotes of *L. major* (3×10^6) were added to culture wells and the plates were incubated for 3 h at 37°C in a CO₂ incubator. After this period, free particles were removed by washing with incomplete medium, and cultures were re-incubated in complete RPMI medium for 48 h in a CO₂ incubator. After this period, the supernatants were collected for the determination of nitrite, and macrophage monolayers were prepared to obtain cell extracts for the determination of arginase activity by conversion of L-arginine to urea.

Measurement of NO

NO was measured as nitrite in the supernatants of macrophage cultures using the Griess reagent, as described elsewhere (10). Briefly, each 50- μ L aliquot was mixed with 50 μ L 1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride, and 2.5% H₃PO₄. Absorbance was measured at 540 nm in a microplate reader (Multiskan II, MS, Lab-system, Finland), and the concentration of nitrite in the samples was determined by comparison with a standard curve of sodium nitrite (5 to 320 μ M).

Determination of arginase activity

Arginase activity was measured in cell lysates in the presence of urea, which is a conversion product of L-arginine, according to the procedure described by Corraliza et al. (24), with some modifications. Briefly, cells in 96-well flat-bottomed plastic plates were incubated with 50 μ L/well lysis solution (0.1% Triton X-100 solution containing 5 μ g aprotinin and 5 μ g antipain) in a shaker, for 30 min, at room temperature. Then, 50 μ L 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 2 mM MnCl₂ was added to each lysate, and the enzyme was activated by heating the plates for 10 min at 56°C. The lysates were transferred to centrifuge tubes (25 μ L/tube) containing 25 μ L 0.5 M L-arginine, pH 9.7, and substrate hydrolysis was

performed by incubating the tubes for 60 min at 37°C. The reaction was stopped with 400 μ L H₂SO₄ (96%)/H₃PO₄ (85%)/H₂O (1/3/7, v/v/v). Then, 25 μ L 9% α -isonitrosopropiophenone (dissolved in 100% ethanol) was added to the tubes, which were heated for 30 min at 95°C. After cooling, 50 μ L of each reaction mixture was transferred to microplates in triplicate, and absorbance was measured at 540 nm with an ELISA reader (Multiskan II, MS). The concentration of urea was determined by comparison with a standard curve of 1.5 to 300 μ g/mL urea.

Cytokine determination

The levels of IL-1 α (Quantikine M murine; R&D Systems; test sensitivity, 5 pg/mL), IL-10 (Pharmingen, USA; test sensitivity, 30 pg/mL) and TNF- α (DUO SET ELISA Kit; R&D Systems, Inc.; test sensitivity, 62.5 pg/mL) were measured in macrophage supernatants according to manufacturer instructions. Absorbance was read at 450 nm, with the wavelength of 540 nm used for correction.

Statistical analysis

Data were analyzed with the GraphPad Prism software using the Student *t*-test to compare two groups. One-way ANOVA followed by the Bonferroni test was used for the comparison of more than two groups. Statistical significance was set at *P* < 0.05.

Results

iNOS and arginase activities in PM Φ and BMM Φ of young BALB/c mice

The peritoneal and bone marrow-derived macrophages were cultured for 48 h with LPS, IFN- γ and IL-4, alone or in combination. iNOS activity was measured on the basis of nitrite accumulation in the culture supernatants, and arginase activity was determined by measuring arginine-derived urea in the cell extracts.

LPS and IFN- γ induced nitrite accumulation in the culture supernatants of naive and elicited PM Φ in a dose-dependent manner (Figure 1, Panels A and B, respectively). Arginase activity was already present in the non-stimulated macrophages, since extracts obtained from these cells, which had been cultured in the absence of stimuli, were able to convert L-arginine to urea (Figure 1, Panels C and D). The addition of IL-4 to peritoneal macrophage cultures increased arginase expression in a dose-dependent manner, as observed by the increase in urea conversion rates in these extracts (Figure 1, Panel C), whereas no such results were obtained with the addition of LPS or IFN- γ (Figure 1, Panel D).

BMM Φ cultured in the presence of LPS or IFN- γ also produced elevated levels of NO (Figure 1, Panel E). The exposure of these macrophages to IL-4 also resulted in the elevation of their arginase activity (Figure 1, Panel F).

The treatment of cell monolayers with IL-4 simultaneously with LPS significantly reduced the production of NO in PM Φ of naive mice but not of elicited mice (Figure 2, Panel A). Conversely, treatment with IL-4 partially reversed the inhibitory effect of LPS on arginase activity observed in elicited PM Φ (Figure 2, Panel B). Treatment with IL-4 significantly reduced the LPS-induced NO production in BMM Φ (Figure 2, Panel C), but had no effect on arginase activity when added to the cultures concomitantly with LPS (Figure 2, Panel D).

Effects of phagocytosis on iNOS and arginase activities in peritoneal macrophages of young mice

To investigate the role of phagocytosis in arginase activity and NO production, adherent cells from BALB/c and C57BL/6 mice were treated with three different kinds of particles: *L. major*, C3b opsonized zymosan and apoptotic lymphocytes. Figure 3 illustrates the results obtained in these experiments. Phagocytosis of zymosan particles resulted in an elevation of arginase activity in peritoneal macrophage lysates of both naive and elicited BALB/c mice (Figure 3, Panels B and H, respectively), as well as those from elicited C57BL/6 mice (Figure 3, Panel K). The phagocytosis of apoptotic lymphocytes also increased arginase activity in elicited PM Φ of both BALB/c and C57BL/6 mice, but not in those of naive mice (Figure 3, Panels I and L, respectively). Treatment with *L. major* did not alter the arginase levels in adherent cells of either BALB/c (Figure 3, Panels A and G) or C57BL/6 mice (Figure 3, Panels D and J).

The pretreatment of adherent peritoneal cells with a suboptimal dose of IL-4 before the addition of phagocytic stimuli resulted in a more marked effect on arginase activity in PM Φ lysates obtained from BALB/c mice (Figure 3, Panels A, B, C and G, H, I), whereas such pretreatment had no effect on arginase activity in those from C57BL/6 mice. Conversely, pretreatment with a suboptimal dose of IFN- γ resulted in more elevated arginase activity in PM Φ lysates obtained from C57BL/6 after phagocytosis of zymosan and apoptotic lymphocytes (Figure 3, Panels K and L). NO production was not observed in macrophage supernatants after phagocytosis of the particles used here.

iNOS and arginase activity in peritoneal and bone marrow-derived macrophages of old BALB/c mice

iNOS and arginase activities were investigated comparatively in PM Φ and BMM Φ from both old (72 weeks of age)

and young (8 weeks of age) BALB/c mice. Figure 4 illustrates the results obtained in these experiments. PM Φ from naive old mice exhibited a diminished production of NO in response to both LPS and IFN- γ (Figure 4, Panel A), and lower arginase activity after treatment with LPS and IL-4 (Figure 4, Panel B) than did those from young mice. Thyoglycolate-elicited PM Φ isolated from old mice also revealed slightly lower NO production following stimulation with LPS than did those from young mice. IFN- γ induced similar levels of NO in elicited PM Φ of both young and old mice (Figure 4, Panel A). The arginase activity in response to IL-4 increased equally in both naive and thyoglycolate-elicited PM Φ of young mice (Figure 4, Panel B), and basal levels of arginase activity were observed in naive PM Φ of old mice stimulated with IL-4. BMM Φ obtained from both young and old mice were equally capable of producing NO in response to IFN- γ , but old mice were more responsive to LPS (Figure 4, Panel C). Arginase activity was elevated only in BMM Φ from old mice stimulated with IL-4 (Figure 4, Panel D).

Cytokine production

IL-1, IL-10 and TNF- α were measured by ELISA in supernatants of PM Φ and BMM Φ obtained from both young and old BALB/c mice, cultured in the presence of LPS. As depicted in Figure 5, peritoneal macrophages from both naive and elicited mice were capable of producing IL-1 and TNF- α when stimulated by LPS. However, elicited PM Φ from older mice showed a more elevated production of IL-1 (Figure 5, Panel A), whereas those from younger mice produced more TNF- α (Figure 5, Panel B). The production of IL-10, on the other hand, was not affected by LPS stimulation, independent of the age of the mice (Figure 5, Panel C).

Stimulation of BMM Φ with LPS led to production of only TNF- α , with macrophages from aged mice showing the highest levels of this cytokine (Figure 5, Panel E). As shown in Panel D, IL-1 was not produced by BMM Φ .

Discussion

Aging is accompanied by profound alterations of the adaptive immune system, mainly in the number and function of T cells, and these alterations have been linked to an increased susceptibility of older people to the development of autoimmune diseases, tumors and viral infections (2). In contrast, age-dependent alterations of the innate immune system have received less attention in the literature. However, an age-associated low-grade elevation in the concentrations of circulating inflammatory markers such as cytokines and their receptors, chemokines, or acute phase proteins has been observed (25). This state, also called "Inflamm-aging" (26), correlates with neurological conditions such as Alzheimer's disease and various cardiovascular diseases such as atherosclerosis (for a review, see Ref. 2).

In the present study, we analyzed the production of iNOS and arginase enzymes in PM Φ and BMM Φ from young and old BALB/c mice, as well as cytokine production by these cells. Initially, we evaluated the most favorable conditions for the induction of iNOS and arginase activity in PM Φ and BMM Φ from young mice stimulated with LPS, either alone or in combination with IFN- γ or IL-4. NO accumulated in a dose-dependent manner in both types of macrophages treated with LPS+IFN- γ , whereas arginase activity increased only in IL-4-stimulated cells. Moreover, IL-4 inhibited the NO production induced by LPS, thus confirming reports in the literature (24,27-28). LPS, however, did not increase arginase activity in either type of macrophages obtained from BALB/c mice, nor was IL-4 capable of reversing the inhibition of arginase activity induced by LPS. Our results partially contradict those reported by Mills et al. (29), who showed that LPS increased the metabolism of L-arginine to ornithine/urea in resident PM Φ from BALB/c mice at doses as low as 1 ng/mL, whereas macrophages from C57BL/6 mice metabolized L-arginine mainly via iNOS. In the present study, however, neither resident nor elicited PM Φ or BMM Φ from BALB/c mice significantly elevated the conversion rate of L-arginine to urea when LPS was used at doses from 1 to 1000 ng/mL. However, the concept of M-2 macrophages proposed by Mills et al. (29) is still applicable to BALB/c macrophages because of the clear contrasting effects of TH1 and TH2 cytokines on L-arginine metabolism in the macrophages of these mice.

Moreover, we tested the effects of phagocytosis on both arginase and iNOS activity in PM Φ from young BALB/c and C57BL/6 mice. Adherent cells were incubated with opsonized zymosan, *L. major*, and apoptotic lymphocytes, so that different surface receptors would be used for the internalization of the particles. Opsonized zymosan, a complement C3bi-coated insoluble polysaccharide, binds to its specific receptor of the β 2 integrin family (CR3, CD11b/CD18) to trigger cytoskeletal reorganization (30) and the activation of many important cell functions, including phagocytosis, superoxide production, and chemotaxis (31). On the other hand, binding of apoptotic cells to the phosphatidylserine receptor on phagocytes stimulates cell internalization and simultaneous secretion of immunosuppressive cytokines (32). However, the initial process of *Leishmania* internalization remains unknown, and recent literature data have ruled out the mannose receptor as the way by which the parasite enters the macrophages (33). In the present study, we observed that NO was not produced in any of these situations; hence, we concluded that BALB/c and C57BL/6 PM Φ are unable to metabolize L-arginine via iNOS following phagocytosis of such different particles, even in the presence of suboptimal doses of LPS.

or IFN- γ . Arginase activity, however, was affected by phagocytosis and was dependent on the type of stimuli and strain of macrophage donors. In this regard, macrophages from BALB/c showed higher arginase activity after phagocytosis than those from C57BL/6 mice. Pretreatment with suboptimal doses of IL-4 increased the conversion of L-arginine to urea in both naive and elicited BALB/c phagocytic cells, whereas for C57BL/6 macrophages, such treatment was only effective for elicited cells and for the phagocytosis of opsonized zymosan and apoptotic lymphocytes. Similarly, Iñiesta et al. (18) reported that BMM Φ from BALB/c mice treated with TH2 type cytokines (IL-4, IL-10, and TGF- β) before incubation with *L. major* presented higher levels of arginase activity than did C57BL/6 mice. Surprisingly, the suboptimal doses of IFN- γ induced an increase in arginase activity in the PM Φ of both BALB/c and C57BL/6 mice that phagocytized opsonized zymosan and apoptotic lymphocytes.

The cellularity in peritoneal washings from old BALB/c mice was higher than that observed in younger ones (data not shown). However, the adherent cells of young mice showed greater responses to LPS than those of older mice, as indicated by the amounts of NO and TNF- α measured in the cultures. On the other hand, BMM Φ from old mice exposed to LPS showed the highest levels of iNOS. In contrast, when the stimulus was IFN- γ , the differences as a function of age and of macrophage source were no longer observed. The responses to the anti-inflammatory cytokine IL-4 followed the same pattern as described for LPS, with the younger cells presenting the more elevated levels of arginase activity. Our results are similar to those reported by Kissin et al. (34) since stimulation of PM Φ with LPS led to a decrease in iNOS activity in older mice. Chen et al. (35), however, reported an increase in iNOS expression in older mice stimulated with LPS. Such discrepancies may be related to the specific experimental model, including factors such as mouse lineage, age range studied and inflammatory stimuli used. Moreover, the literature comparing iNOS and arginase activity in BMM Φ from young and old mice is very limited; such cells have been subjected to more studies involving their antigen-presenting activity, than their response to inflammatory agents (36).

Age also proved to be critical for the production of inflammatory cytokines by PM Φ stimulated with LPS. Cells elicited from older mice produced larger amounts of the pro-inflammatory IL-1 α , whereas those from younger mice produced more TNF- α . IL-10 levels of older and younger mice were not changed by LPS treatment in PM Φ or BMM Φ . However, macrophages differentiated *in vitro* presented more elevated constitutive levels of IL-10 than those from the peritoneum, a characteristic that agrees with the tolerant profile of these immature cells (37). The only pro-inflammatory cytokine produced by BMM Φ in response to LPS was TNF- α , with the older mice producing more than the younger ones. Although some studies have shown an elevation of inflammatory markers in older individuals that correlate with age-related diseases and increased risk of mortality, literature data are inconclusive about this matter in both animal models and human subjects, with some reports showing an age-associated decrease in IL-1 and TNF- α levels and others suggesting an elevation of pro- and anti-inflammatory cytokines after LPS stimulation of macrophages (for a review, see Ref. 38).

The results obtained in the present study indicate that the responses of macrophages from young and old animals may vary according to the microenvironment and to the stimuli to which they are subjected, without necessarily displaying a constitutive inflammatory profile. However, we also speculate that the changes in innate immunity observed here may contribute to the damages associated with the aging process.

Acknowledgments

Research supported by FAPESP (#2003/03289-8).

References

1. Panda A, Arjona A, Sapey E, Bai F, Fikrig E, Montgomery RR, Lord JM, et al. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol* 2009; 30: 325-333.
2. Kovacs EJ, Palmer JL, Fortin CF, Fulop T Jr, Goldstein DR, Linton PJ. Aging and innate immunity in the mouse: impact of intrinsic and extrinsic factors. *Trends Immunol* 2009; 30: 319-324.
3. Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol*. 2010; 22:507-513.
4. Reis e Sousa C. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 21-25.
5. Green SJ, Nacy CA, Meltzer MS. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogens. *J Leukoc Biol* 1991; 50: 93-103.
6. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 1709-1715.
7. Moncada S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med* 1999; 92: 164-169.
8. Stuehr DJ, Marletta MA. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon-gamma. *J Immunol* 1987; 139: 518-525.
9. Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is

- an intermediate. *Biochemistry* 1988; 27: 8706-8711.
10. Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB Jr, Nacy CA. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol* 1990; 144: 278-283.
 11. Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RM, Moncada S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* 1990; 144: 4794-4797.
 12. Roach TI, Kiderlen AF, Blackwell JM. Role of inorganic nitrogen oxides and tumor necrosis factor alpha in killing *Leishmania donovani* amastigotes in gamma interferon-lipopolysaccharide-activated macrophages from Lshs and Lshr congenic mouse strains. *Infect Immun* 1991; 59: 3935-3944.
 13. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 64-76.
 14. Morris SM Jr. Regulation of enzymes of urea and arginine synthesis. *Annu Rev Nutr* 1992; 12: 81-101.
 15. Blantz RC, Satriano J, Gabbai F, Kelly C. Biological effects of arginine metabolites. *Acta Physiol Scand* 2000; 168: 21-25.
 16. Yu H, Iyer RK, Yoo PK, Kern RM, Grody WW, Cederbaum SD. Arginase expression in mouse embryonic development. *Mech Dev* 2002; 115: 151-155.
 17. Cederbaum SD, Yu H, Grody WW, Kern RM, Yoo P, Iyer RK. Arginases I and II: do their functions overlap? *Mol Genet Metab* 2004; 81 (Suppl 1): S38-S44.
 18. Iniesta V, Gomez-Nieto LC, Molano I, Mohedano A, Carcelen J, Miron C, et al. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol* 2002; 24: 113-118.
 19. Morris SM Jr, Kepka-Lenhart D, Chen LC. Differential regulation of arginases and inducible nitric oxide synthase in murine macrophage cells. *Am J Physiol* 1998; 275: E740-E747.
 20. Sonoki T, Nagasaki A, Gotoh T, Takiguchi M, Takeya M, Matsuzaki H, et al. Coinduction of nitric-oxide synthase and arginase I in cultured rat peritoneal macrophages and rat tissues *in vivo* by lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 1997; 272: 3689-3693.
 21. Munder M, Eichmann K, Moran JM, Centeno F, Soler G, Modolell M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 1999; 163: 3771-3777.
 22. Cecilio CA, Costa EH, Ucelli P, Chaves CA, Toffoli MC, Flores CA, et al. The neutrophil migration induced by tumour necrosis factor alpha in mice is unaffected by glucocorticoids. *Mediators Inflamm* 1997; 6: 46-52.
 23. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; 148: 2207-2216.
 24. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 1994; 174: 231-235.
 25. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 908: 244-254.
 26. De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Lett* 2005; 579: 2035-2039.
 27. Corraliza IM, Soler G, Eichmann K, Modolell M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 206: 667-673.
 28. Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol* 1995; 25: 1101-1104.
 29. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 2000; 164: 6166-6173.
 30. Le Cabec V, Carreno S, Moisand A, Bordier C, Maridonneau-Parini I. Complement receptor 3 (CD11b/CD18) mediates type I and type II phagocytosis during nonopsonic and opsonic phagocytosis, respectively. *J Immunol* 2002; 169: 2003-2009.
 31. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999; 93: 1464-1476.
 32. Somersan S, Bhardwaj N. Tethering and tickling: a new role for the phosphatidylserine receptor. *J Cell Biol* 2001; 155: 501-504.
 33. Akilov OE, Kasuboski RE, Carter CR, McDowell MA. The role of mannose receptor during experimental leishmaniasis. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 1188-1196.
 34. Kissin E, Tomasi M, Cartney-Francis N, Gibbs CL, Smith PD. Age-related decline in murine macrophage production of nitric oxide. *J Infect Dis* 1997; 175: 1004-1007.
 35. Chen LC, Pace JL, Russell SW, Morrison DC. Altered regulation of inducible nitric oxide synthase expression in macrophages from senescent mice. *Infect Immun* 1996; 64: 4288-4298.
 36. Plackett TP, Boehmer ED, Faunce DE, Kovacs EJ. Aging and innate immune cells. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 291-299.
 37. Lin KW, Jacek T, Jacek R. Dendritic cells heterogeneity and its role in cancer immunity. *J Cancer Res Ther* 2006; 2: 35-40.
 38. Bruunsgaard H, Pedersen M, Pedersen BK. Aging and proinflammatory cytokines. *Curr Opin Hematol* 2001; 8: 131-136.

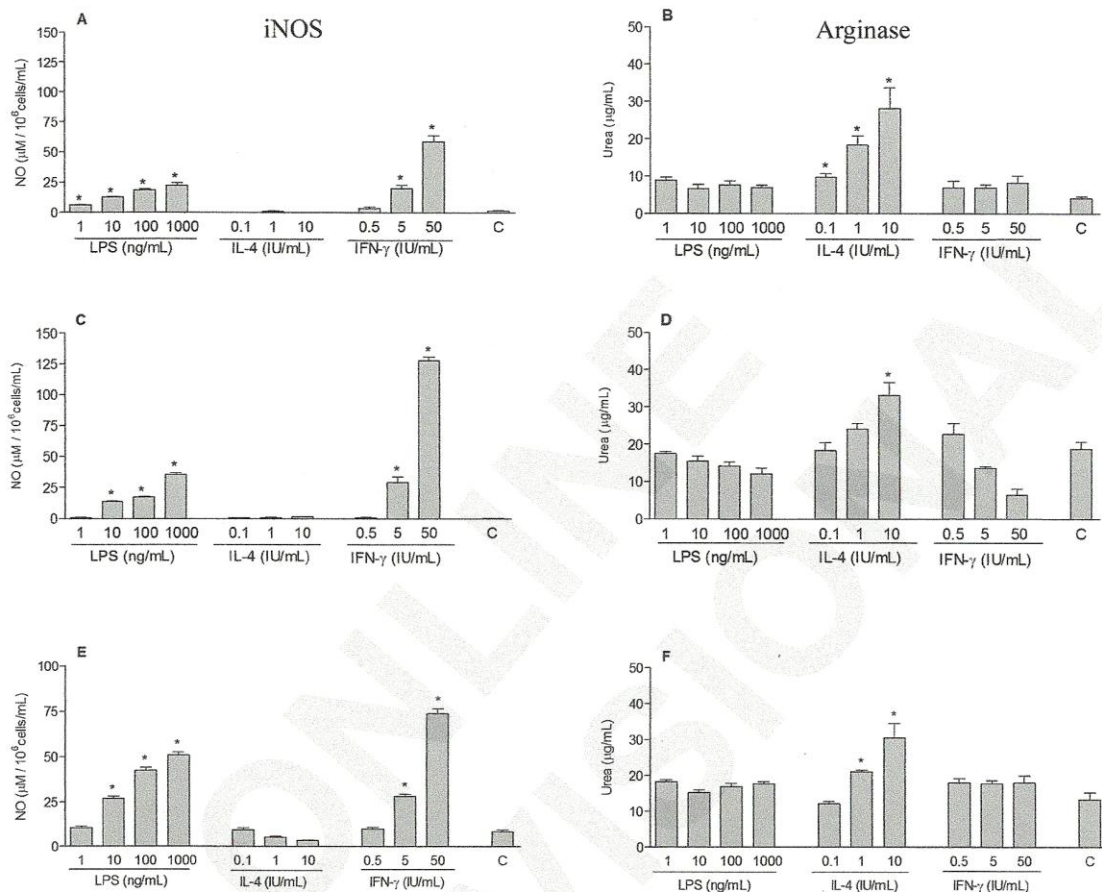


Figure 1. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and arginase activities in macrophages of young BALB/c mice: effects of lipopolysaccharide (LPS), interleukin-4 (IL-4) and interferon-γ (IFN-γ). *A* and *B*, Peritoneal macrophages from naive mice; *C* and *D*, peritoneal macrophages from thioglycolate-elicited mice; *E* and *F*, bone marrow-derived macrophages. Adherent cells from 6 mice per group were incubated in the presence of LPS (1, 10, 100, and 1000 ng/mL), IL-4 (0.1, 1, and 10 IU/mL) or IFN-γ (0.5, 5, and 50 IU/mL) for 48 h; all studies were conducted in triplicate. Cells of control groups (C) were incubated in the absence of stimuli. Nitrite was measured in the culture supernatants using Griess reagent, and arginase activity was determined in cell lysates on the basis of the amounts of urea produced from L-arginine. Bars indicate the means $\pm$ SEM of nitrite (Panels A, C, and E) and urea (Panels B, D, and F) levels in three independent experiments. * $P \leq 0.05$ compared to control (Student *t*-test).

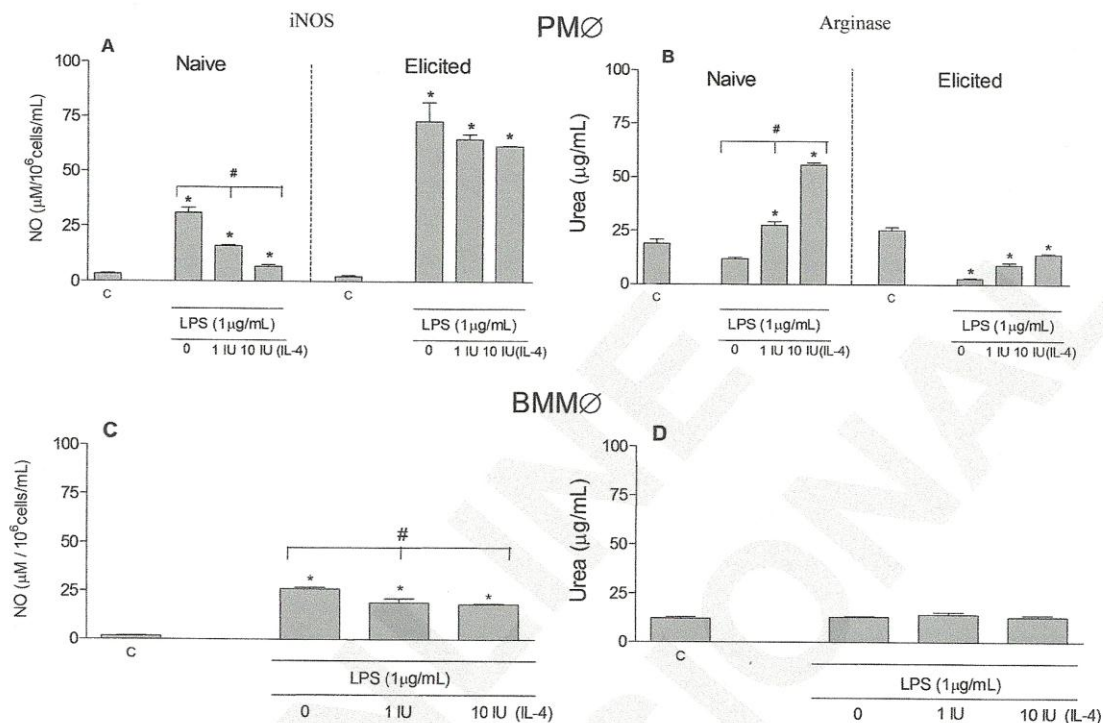


Figure 2. Effects of IL-4 on LPS-induced inducible nitric oxide synthase (iNOS) and arginase activities in macrophages of young BALB/c mice (N = ___ per group). Naive and elicited peritoneal macrophages (PMΦ) and bone marrow-derived macrophages (BMMΦ) from young BALB/c mice were incubated with lipopolysaccharide (LPS; 1 µg/mL) in the presence or absence of interleukin-4 (IL-4; 1 or 10 IU/mL) for 48 h, at 37°C, in 5% CO₂. Cells of the control groups (C) were incubated in the absence of stimuli. Nitrite was measured in the culture supernatants using Griess reagent, and arginase activity was determined in cell lysates based on the amounts of urea produced from L-arginine. All studies were conducted in triplicate. Bars indicate the means ± SEM of nitrite (Panels A, B) and urea (Panels C, D) levels in three independent experiments. *P ≤ 0.05 (comparison was carried out by the Student *t*-test) and #P ≤ 0.05 (comparison was carried out by ANOVA followed by the Bonferroni post-test).

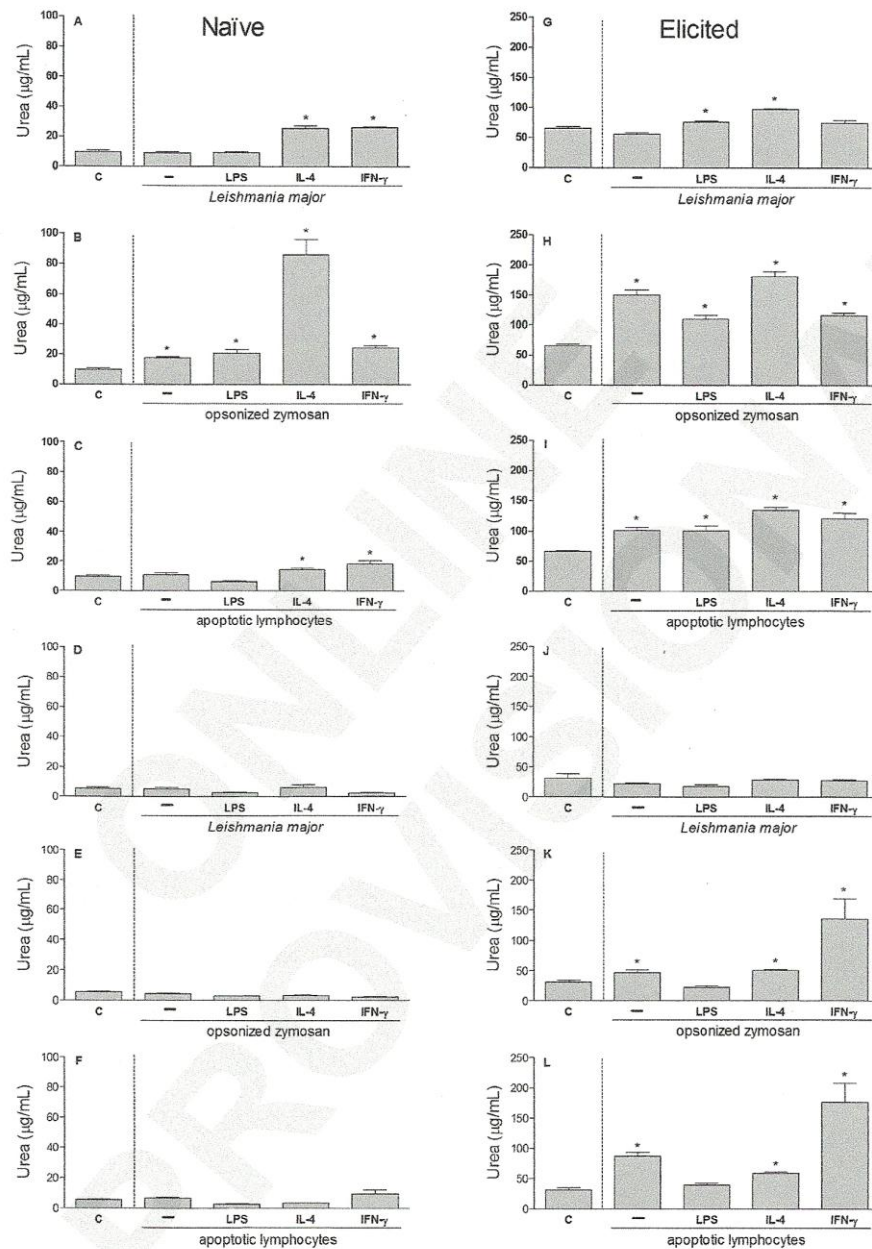


Figure 3. Effects of phagocytosis on arginase activity in peritoneal macrophages of mice (N = __ per group). A, B, C, Naïve BALB/c mice; D, E, F, naïve C57BL/6 mice; G, H, I, elicited BALB/c mice; J, K, L, elicited C57BL/6 mice. Adherent peritoneal cells were incubated with lipopolysaccharide (LPS; 100 ng/mL), interleukin-4 (IL-4; 4 IU/mL) or interferon- γ (IFN- γ , 5 IU/mL) for 18 h, at 37°C, in 5% CO₂. Cells of the control groups (C) were incubated in the absence of stimuli. After removal of the stimuli, cells were incubated with *Leishmania major* (3×10^6 cells/mL), C3b opsonized zymosan (5×10^6 yeast/mL) or apoptotic lymphocytes (5×10^6 cells/mL) for 3 h. Particles were then removed by washing, and the plates were re-incubated for 48 h. Arginase activity was determined in cell lysates on the basis of the amount of urea produced from L-arginine. All studies were conducted in triplicate. Bars indicate the means $\pm$ SEM of urea levels obtained in three independent experiments. *P $\leq$ 0.05 compared to control (Student t-test).

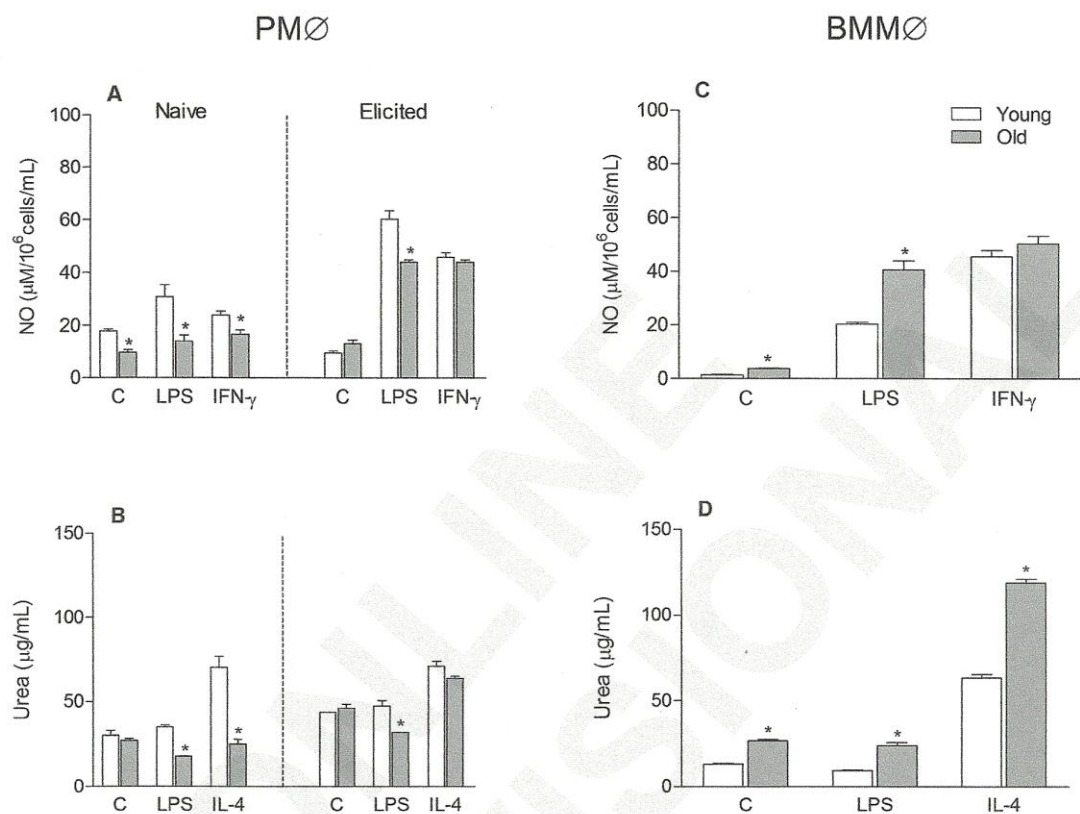


Figure 4. Aging affects inducible nitric oxide synthase (iNOS) and arginase activities in macrophages of BALB/c mice (N = __ per group). Naive mice (N = 14) were the source of naive peritoneal macrophages and bone marrow-derived macrophages. Elicited macrophages were obtained from mice (N = 6) injected 4 days previously with thioglycolate medium. Young and old mice were used at the ages of 8 and 72 weeks, respectively. Adherent cells were cultured in the presence of lipopolysaccharide (LPS; 1 $\mu\text{g/mL}$), interleukin-4 (IL-4; 40 IU/mL) or interferon- γ (IFN- γ ; 50 IU/mL) for 48 h at 37°C, in 5% CO₂. Cells of the control groups (C) were incubated in the absence of stimuli. Nitrite was measured in the culture supernatants using a Griess reagent, and arginase activity was determined in cell lysates based on the amounts of urea converted from L-arginine. All studies were conducted in triplicate. Bars indicate the means $\pm$ SEM of nitrite (Panels A, C) or urea (Panels B, D) levels in three independent experiments. * $P \leq 0.05$ compared to control (Student *t*-test).

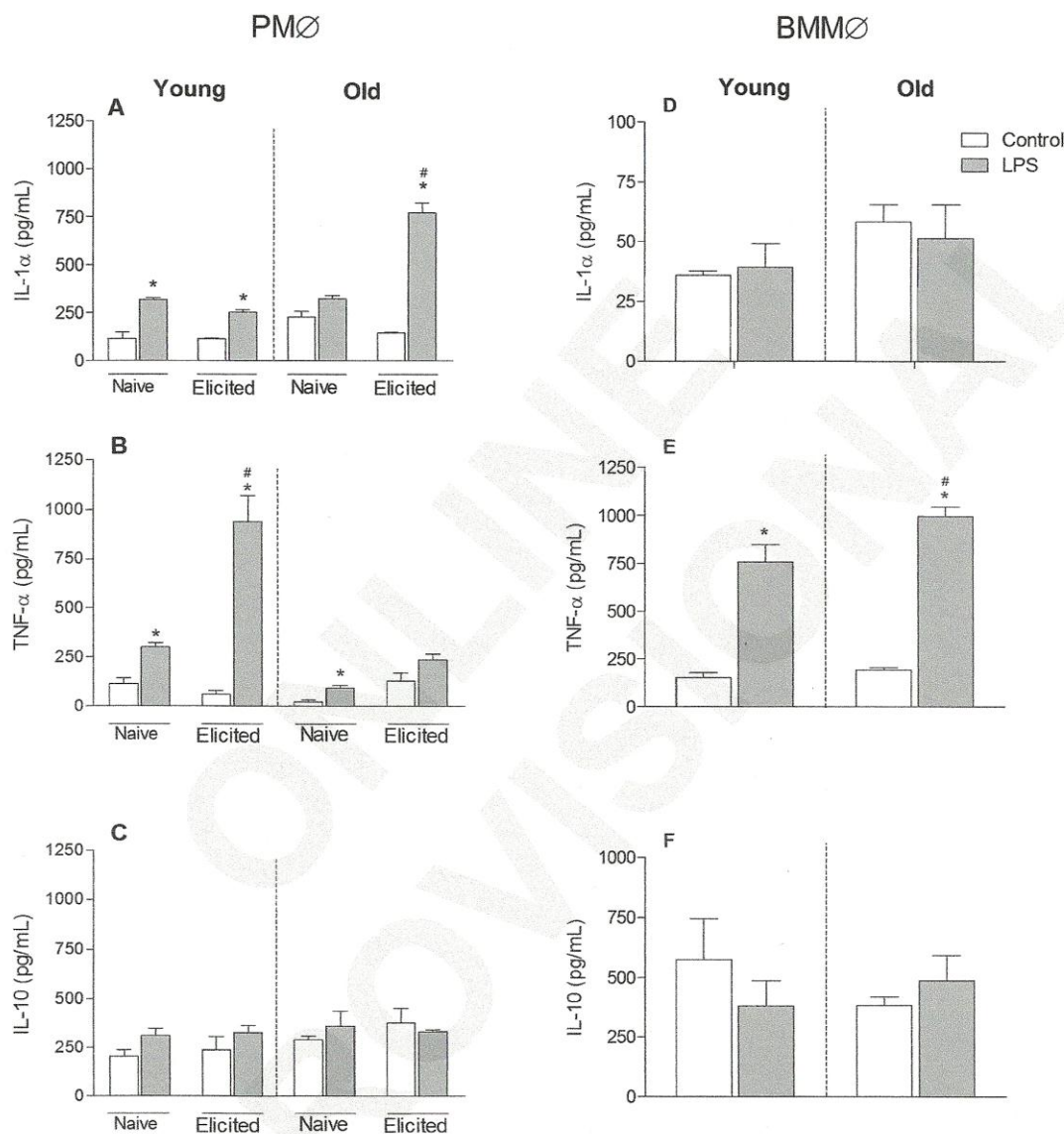


Figure 5. Aging affects cytokine production in peritoneal macrophages and bone marrow-derived macrophages of BALB/c mice (N = ___ per group). Naive and thioglycolate-elicited peritoneal macrophages (panels A, B, and C) and bone marrow-derived macrophages (panels D, E, and F) from young and old mice were prepared and cultured as described in the legend to Figure 4. The culture supernatants were used for the detection of interleukin-1 α (IL-1 α ; Quantikine M murine; test sensitivity, 5 pg/mL), tumor necrosis factor- α (TNF- α ; Duo Set ELISA Kit; test sensitivity, 62.5 pg/mL) and interleukin-10 (IL-10; Pharmingen; test sensitivity, 30 pg/mL). All studies were conducted in triplicate. Bars indicate the means $\pm$ SEM of the respective cytokines detected in three independent experiments. *P $\leq$ 0.05 compared to control (Student *t*-test).