

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

RAFAEL LISBOA LOPES

**EFEITO DA HSP70 EXTRACELULAR DE *Mycobacterium tuberculosis* NA
POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS**

Porto Alegre

2013

RAFAEL LISBOA LOPES

**EFEITO DA HSP70EXTRACELULAR DE *Mycobacterium tuberculosis* NA
POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado
ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Profa. Dra. Cristina Bonorino

Co-orientador: Me. Thiago Borges

Porto Alegre

2013

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos inatos de resposta a patógenos pelos macrófagos.....	13
Figura 2 - Síntese de óxido nítrico pelos macrófagos.....	14
Figura 3 - Fenótipos M1 e M2 de macrófagos.....	16

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a minha orientadora, Cristina Bonorino, que, sem seu consentimento e apoio, não estaria no laboratório onde estou hoje, trabalhando na área que mais gosto. Ao meu co-orientador, Thiago Borges, por todos ensinamentos passados, sempre atencioso a sanar todas minhas dúvidas e pelo trabalho em equipe desde o início. Ao Rafael Zanin, que ajudou desde o início da confecção desde trabalho até as últimas correções. A todos colegas dos laboratórios 6, 8 e 31, que, de alguma forma contribuíram para o bom andamento deste trabalho.

A minha família, que sempre me apoiou em meus estudos, sempre acreditando e incentivando, por mais difícil que fosse essa jornada.

RESUMO

Macrófagos são células mieloides que desempenham um papel essencial na inflamação e defesa do hospedeiro. Dependendo do microambiente, macrófagos podem polarizar para diferentes fenótipos. O fenótipo M1, inflamatório, é ativado por IFN- γ e produtos bacterianos, como o LPS. Essas células expressam níveis altos de CD80, CD86, produzem óxido nítrico (NO) e altos níveis de IL-12. Por outro lado, macrófagos M2, os quais são anti-inflamatórios, são ativados por IL-4 e /ou IL-13 e expressam altos níveis de IL-10, CD206 e arginase. Esses macrófagos são importantes em infecções parasitárias, fibrose, cicatrização, além de funções na homeostase para manter a sensibilidade a insulina em adipócitos e funções imunorregulatórias. Em trabalhos anteriores, foi observado que a Hsp70 extracelular teve um papel imunossupressor, tolerizando células do sistema imune inato de pacientes com artrite. Porém, o efeito da Hsp70 sobre macrófagos precisa ser elucidado. Neste estudo, investigamos se a Hsp70 seria capaz de modular macrófagos a um fenótipo M2. Macrófagos murinos diferenciados de medula óssea com GM-CSF (GM-BMMs) ou peritoneais foram incubados sem estímulo algum, com IL-4, LPS ou Hsp70. O tratamento com Hsp70 mostrou um aumento nas células F4/80⁺CD206⁺ em comparação aos outros tratamentos e um padrão similar à IL-4. Além disso, o tratamento de macrófagos com Hsp70 apresentou altos níveis de arginase e IL-10, comparado aos outros tratamentos. Finalmente, os macrófagos tratados com Hsp70 tiveram maior capacidade de promover a progressão tumoral em um modelo alogênico de melanoma em camundongos BALB/c, quando comparados aos controles. Nossos resultados mostram que a Hsp70 polariza macrófagos murinos a um fenótipo “M2-like”.

ABSTRACT

Macrophages are myeloid cells that play an essential role in inflammation and host defense, regulating immune response. Depending on the microenvironment, macrophages can polarize to distinct phenotypes. The M1 phenotype, inflammatory, is activated by IFN- γ and bacterial products and these cells express CD80, CD86, produce NO and are IL-12^{hi}. M2 macrophages, anti-inflammatory, and are activated by IL-4 and/or IL-13, expressing IL-10, CD206 and arginase. This subset of macrophages is important in parasite infections, fibrosis, wound healing and tissue homeostasis, regulating insulin sensitivity and immune regulatory functions. In previous works from our lab and others, it was observed that Hsp70 had an immunosuppressive role, leading to a tolerizing phenotype of innate immune cells of arthritis patients. However, the role of Hsp70 in macrophages needs to be further elucidated. In this study, we investigated whether Hsp70 was able to modulate macrophages to an M2 phenotype. Murine macrophages derived from bone marrow by GM-CSF (GM-BMMs) or peritoneal macrophages were incubated for 24h either without stimulus, IL-4, LPS or Hsp70. Treatment with Hsp70 showed an increase of F4/80⁺CD206⁺ cells in comparison to other treatments in a similar manner to IL-4. In addition, Hsp70-treated macrophages presented higher arginase activity and IL-10 than other treatments. Importantly, Hsp70-treated macrophages were able to promote tumor growth in a model of melanoma in C57BL/6 and BALB/c mice more than other treatments. Our results suggest that Hsp70 polarizes macrophages to the M2-like phenotype.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GM-CSF – fator estimulador de macrófagos e granulócitos

GM-BMM – macrófagos derivados de medula óssea com GM-CSF

BMM – macrófagos derivados de medula óssea

M ϕ – macrófago

TLR –receptor tipo *Toll*

PAMP –Padrão molecular associado ao patógeno

MHC de classe II – Complexo maior de Histocompatibilidade de Classe II

IL-4,IL-6, IL-10, IL-12 e IL- 13 – Interleucina - 4, 6, 10, 12 e 13

IFN- γ – Interferon gama

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

NO – óxido nítrico

iNOs- òxido nítrico induzido sintase

Fizz1 – sinônimo Retnla

YM1 – sinônimo Chi313

Hsp70 – Proteína de choque térmico de 70 kilodáltons

PCR – Reação em cadeia da polimerase

MCP1 – Proteína quimioatrativa de monócito – 1

DC –Célula dendrítica

TGF- β – Fator de crescimento transformador beta

BMDC - Célula dendrítica derivada de medula óssea

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	9
1.1 Macrófagos	11
1.1.1 Origem	11
1.1.2 Função	11
1.1.3 Heterogeneidade	14
1.2 Proteínas de choque térmico	17
1.2.1 Proteínas de choque térmico de 70 kDa (Hsp70)	17
1.2.2 O papel imunomodulador da Hsp70	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3. MANUSCRITO	21
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	48
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1. INTRODUÇÃO GERAL

Macrófagos são células fagocíticas de origem mieloide que possuem funções cruciais no sistema imune. Tais células possuem mais de uma origem, no desenvolvimento, sua primeira fonte vem do saco vitelino, seguindo pela produção no fígado durante a embriogênese e de acordo com o desenvolvimento da medula óssea, o fígado fetal vai perdendo essa função que é substituída pela medula óssea (Wynn, Chawla et al. 2013). Esse tipo celular está presente em virtualmente todos os órgãos do corpo humano e dos demais mamíferos (Wang, Yu et al. 2013). Além disso, são as primeiras células a tentar combater agentes agressores ao organismo o qual residem. De uma maneira geral, essas células possuem a característica de combater agentes agressores tanto com mecanismos inatos, quanto fazendo uma ligação com o sistema imune adaptativo na apresentação de antígeno. Formando assim, uma resposta mais elaborada e direcionada específica contra determinado patógeno.

Macrófagos ativados estão mais aptos a combater micro-organismos invasores, em relação a macrófagos em repouso, visto que, quando ativados, possuem uma maior atividade fagocítica, liberam mais mediadores inflamatórios, além de expressar maior quantidade de MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias em sua membrana celular. Desta forma, com uma maior atividade fagocítica e uma maior expressão dessas moléculas, há uma maior apresentação de antígeno, auxiliando na ativação e diferenciação de linfócitos T CD4⁺ (Kindt, Goldsby et al. 2007).

Fisiologicamente, a ativação de macrófagos ocorre através de moléculas imunogênicas presentes em patógenos, como LPS (Lipopolissacarídeo), PGN (Peptideoglicano). Essas moléculas interagem com TLRs (*Toll like receptors* - Receptores do tipo Toll). Além disso, os macrófagos podem ser modulados pela interação com receptores de citocinas que detectam citocinas liberadas em um microambiente inflamatório. Essa ativação leva a uma sinalização intracelular que, mobiliza fatores de transcrição característicos pró-inflamatórios, culminando na liberação de citocinas que auxiliarão no processo inflamatório (Mosser 2003).

Nas últimas décadas, têm-se explorado um caminho alternativo pelo qual os macrófagos podem ser ativados (Stein, Keshav et al. 1992). Tendo em vista, que existe uma ampla variedade de agentes agressores que podem atingir um organismo vivo, é de

se imaginar que deve haver respostas variáveis pelas células imunes dependendo dos mecanismos que utilizam e características as quais esses agressores possuem. Sabe-se que existe ao menos dois tipos de respostas celulares mediadas por células T auxiliares, conhecidas como Th1 e Th2. Até alguns anos atrás, sabia-se que macrófagos eram ativadas por IFN- γ e produtos bacterianos e que essa ativação levava a produção de citocinas pró-inflamatórias através de fatores de transcrição característicos da resposta inflamatória. Esses macrófagos possuem um importante papel na resposta inflamatória como a fagocitose de debris celulares e atividade antitumoral (Wynn, Chawla et al. 2013). Porém, diversos estudos mostraram que não há somente esta via clássica de ativação de macrófagos, mas também, uma via que ativa macrófagos “alternativamente” através do estímulo por IL-4 e/ou IL-13. Esses macrófagos estão presentes em doenças parasitárias, alergias, possuem atividade pró-tumoral, além de exercer funções metabólicas em relação ao aumento da sensibilidade a insulina e papéis imunorreguladores (Stein, Keshav et al. 1992; Gordon and Taylor 2005; Gordon and Martinez 2010; Sica and Mantovani 2012).

A Hsp70 (*Heatshockprotein 70 kDa*) é uma proteína da família das chaperonas moleculares responsável pelo dobramento de proteínas. Exerce funções importantes no dobramento de proteínas em processo de síntese, além de impedir a agregação proteica e ajudar no redobramento de proteínas que estão sofrendo degradação. A Hsp70 pode ser induzida por choque térmico, radiação ultravioleta, em infecções virais. É uma das proteínas mais conservadas entre as espécies animais e há tempos investiga-se o seu papel na resposta imune (Jolly and Morimoto 2000). Em estudos prévios do nosso grupo, constatou-se que o estímulo de células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDCs) com Hsp70 levou a uma menor expressão de CD86 e MHC de classe II por essas células em relação ao controle (Motta, Schmitz et al. 2007). Em outro estudo do nosso grupo, foi observado que o pré tratamento de células tumorais ou secções de pele de camundongos C57BL/6 com Hsp70 por 1 hora e a subsequente injeção ou transplante, respectivamente, levou a um atraso na rejeição de 7 a 10 dias em relação ao grupo controle (Borges, Porto et al. 2010).

Conhecendo essa imunomodulação exercida pela Hsp70 tanto *in vitro* como *in vivo*, pretendemos investigar o efeito que essa proteína exerce sobre a modulação de fenótipo em macrófagos murinos. Para isso, avaliaremos moléculas de superfície expressas, citocinas liberadas, genes característicos mais expressos e rotas bioquímicas

envolvidas na via clássica e alternativa de ativação de macrófagos para chegarmos ao papel que a Hsp70 tem na modulação dessas células

1.1 Macrófagos

1.1.1 Origem

Macrófagos são células que possuem mais de uma origem. Essas células podem ser derivadas de células tronco hematopoiéticas, podem se originar do saco vitelino na embriogênese ou do fígado a medida que a medula óssea vai desenvolvendo-se em camundongos.

Até estabelecer-se como um macrófago nos tecidos, esta célula passa por diversos estágios de diferenciação na medula óssea. Primeiramente, uma HSC (*Hematopoietic Stem cell* – Célula-tronco Hematopoiética) sofre diferenciações até uma GM-CFU (*Granulocyte Macrophage – colony Forming Unit* – Unidade formadora de colônia de granulócito - macrófago), para então tornar-se uma M-CFU (*Macrophage-colony Forming Unit* – Unidade formadora de colônia de macrófagos), diferencia-se em um monoblasto, depois em pró-monócito até cair na corrente sanguínea e virar um monócito maduro. Em um estado de homeostase corporal, esses monócitos realizam a diapedese para chegar ao tecido específico e sofrer a influência de sinais celulares e de matriz extracelular que levam a heterogeneidade destes macrófagos em cada tecido do organismo (Mosser and Edwards 2008). Esses macrófagos que migram na homeostase corporal a sítios específicos são conhecidos como residentes e estão na epiderme (Células de Langerhans), no fígado (Células de Küpffer), nos ossos (Osteoclasto), no Sistema Nervoso (Células microgliais), nos pulmões (Macrófagos alveolares) e os macrófagos presentes no baço (Wynn, Chawla et al. 2013).

1.1.2 Função

Os macrófagos são células fagocíticas que desempenham papéis importantes na resposta imune inata, além de interligar-se à resposta imune adaptativa. Essas células estão entre os restritos tipos celulares capazes de apresentar antígenos através do MHC

de classe II a células T CD4⁺. Além disso, são uma das primeiras células a chegar aos sítios de inflamação e em infecções (Kindt, Goldsby et al. 2007).

Essas células exercem sua função ajudando a eliminar patógenos, desde a fagocitose de patógenos, passando pela apresentação de antígenos e ativação de células T CD4⁺ até a citotoxicidade mediada por ROS (*Reactive oxygen species*- espécies reativas de oxigênio). Tais células auxiliam na resposta inflamatória, liberando citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-12, TNF- α (Murray and Wynn 2011).

Sua ativação ocorre via componentes microbianos, chamados de PAMPs (*Pathogen-associated molecular pattern* - Padrões moleculares associados a patógenos), como o LPS (*Lipopolysaccharide* - Lipopolissacarídeo), PGN (*Peptidoglycan* - Peptideoglicano), através do engajamento de TLRs, além de poderem ser ativados por citocinas, como IFN- γ , IL-6, via receptores de citocina (Fig.1). Quando ativados, essas células aumentam sua capacidade de fagocitose, aumenta a secreção de mediadores inflamatórios, o que culmina em um maior poder de combater os patógenos invasores do organismo (Mosser 2003).

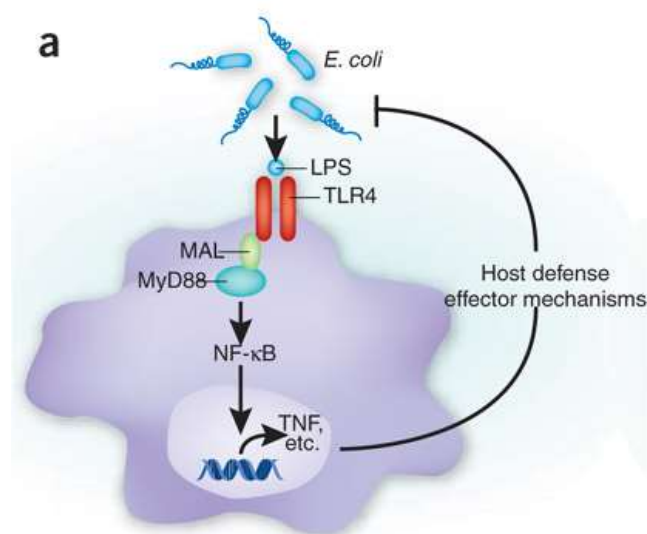
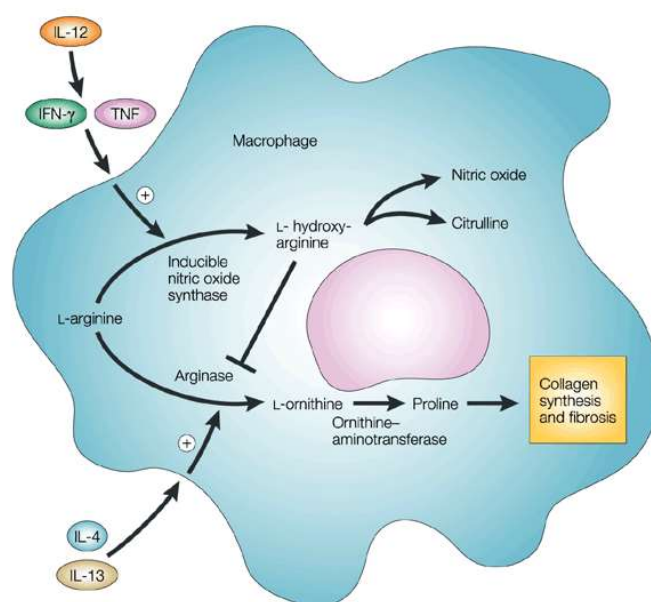


Figura 1. Mecanismos inatos de resposta a patógenos pelos macrófagos. Bactérias Gram-negativas, como *E. coli* secretam LPS, que age sob TLR4. Essa sinalização ocorre via proteínas MAL e MyD88, que levam a expressão de proteínas importantes de defesa do hospedeiro, essenciais na *clearance* de patógenos (retirada de O'Neill, Luke A J, 2008)

A ativação dos macrófagos leva a uma expressão aumentada da enzima *iNOS* (*inducible nitric oxide synthase* - Óxido nítrico sintase induzida), que leva a produção e consequente liberação de óxido nítrico por essas células, o qual possui uma alta atividade contra microorganismos agressores, como bactérias, fungos e protozoários (Stuehr and Marletta 1985; Murray and Wynn 2011; Bogdan, C. 2001) (Fig.2). Outra forma de eliminação de patógenos ocorre via complexos formados por componentes do sistema complemento e complexos antígeno-anticorpo ou célula-anticorpo. A ligação de um componente do sistema complemento ao macrófago leva a fagocitose da célula ou do complexo formado. Além disso, há também a apresentação de antígenos via molécula de superfície MHC de classe II, em que o macrófago fagocita patógenos opsonizados ou não, digere-o, leva ao seu processamento e apresenta os antígenos em sua superfície, que levará a ativação de células T auxiliares, auxiliando na resposta humoral e celular (Kindt, Goldsby et al. 2007).



Nature Reviews | Immunology

Figura 2. Síntese de óxido nítrico pelos macrófagos. O papel fibrinogênico de IL-13, juntamente com IL-4 na expressão de Arginase em macrófagos. Arginase usa L-arginina como substrato para produzir L-ornitina, o que é convertido a prolina pela ornitina-Aminotransferase. Prolina é um aminoácido essencial que está envolvido na produção de colágeno e, por isso, no desenvolvimento da fibrose. A fibrose é inibida em camundongos imunizados com antígenos do ovo e IL-12. Os macrófagos produzem uma

resposta Th1, que previne o desenvolvimento Th2, além de serem estimulados a produzirem *iNOs*, em vez de Arginase. A *iNOs* utiliza L-arginina como substrato para a produção de NO e Citrulina, através do intermediário L-hidroxi-arginina, que pode inibir a enzima Arginase, diminuindo a quantidade de prolina disponível para a síntese de colágeno (retirada de Pearce, Edward J. et al. 2002).

1.1.3 Heterogeneidade

As primeiras observações feitas a respeito da modulação de fenótipo dos macrófagos foram feitas por volta da década de 90, quando constatou-se que macrófagos sob o estímulo de IL-4 inibiam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) a produção de IL-8 e IL-1 β (Martinez, Helming et al. 2009). Até que em 1992, Michael Stein et al. publicaram o trabalho em que mostraram que a IL-4 induz macrófagos inflamatórios a adquirirem um fenótipo ativado alternativamente, distinto daquele clássico ativado por IFN- γ . Esse fenótipo era caracterizado por alta capacidade de depuração de ligantes de manose, reduzida secreção de citocinas pró-inflamatórias, além da presença de mudanças morfológicas nas células (Stein, Keshav et al. 1992).

Após anos de estudos, a ativação alternativa dos macrófagos está mais definida. De acordo como conceito atual, macrófagos ativados classicamente (CaM ϕ – *Classical activated macrophages* – macrófagos ativados classicamente) expressam altos níveis de IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, TNF- α e baixos níveis de IL-10, além da produção de ROS e são células presentes em respostas Th1. Esse fenótipo é ativado por IFN- γ e TNF- α e/ou produtos bacterianos (ex.: LPS) e também é denominado como M1. Já os macrófagos ativados alternativamente expressam altos níveis de IL-10, da enzima arginase, altos níveis dos genes *Chi3l3* (YM1) e *Retnla* (FIZZ1), além da expressão aumentada de receptores tipo galactose, manose (CD206) e *scavengers*; essas células participam de respostas Th2 (Raes, De Baetselier et al. 2002; Raes, Noel et al. 2002; Sica and Mantovani 2012). O fenótipo ativado alternativamente (aaM ϕ – *Alternative activated macrophages* – macrófagos ativados alternativamente) pode ser induzido por IL-4 e/ou IL-13 e é também conhecido como M2 (Mantovani, Sica et al. 2005) (Fig. 3).

O gene *Chi3l3* é membro da família das quitinases, originalmente descrito como um fator quimiotático de eosinófilo produzido por células T CD8. É um gene altamente expresso nos pulmões e baço de camundongos, porém sua função nos macrófagos ainda não está bem elucidada (Noel, Raes et al. 2004; Meera, Daniel, et al. 2003). Já o gene

Retnla foi primeiramente identificado em fluido de lavagem de camundongo com asma experimentalmente induzida e é um membro da família das moléculas secretadas ricas em cisteína, sua função nos macrófagos ainda não é clara também (Noel, Raes et al. 2004; Meera, Daniel, et al. 2003).

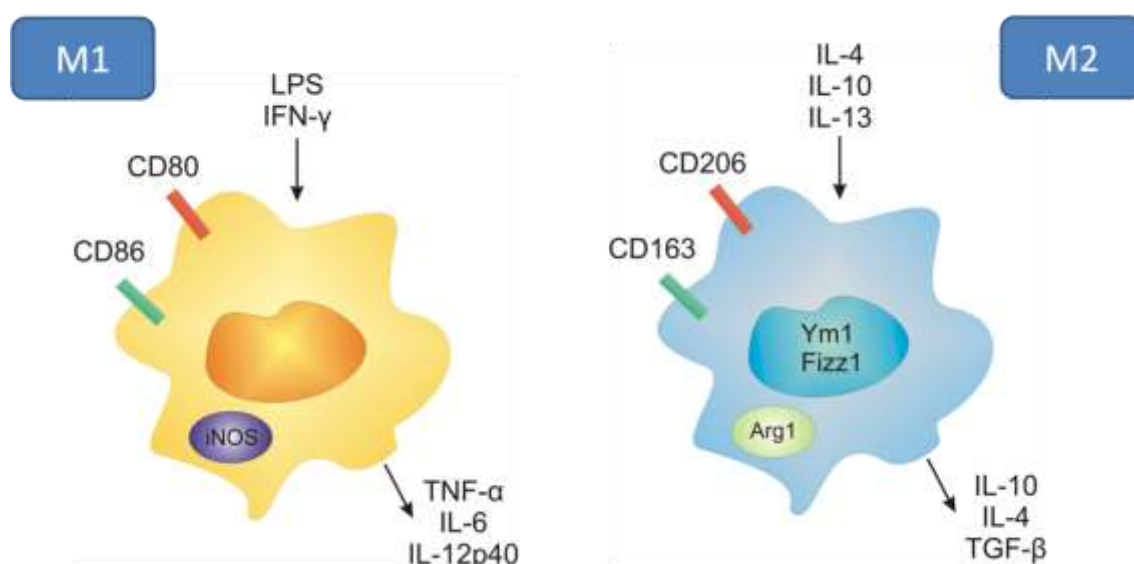


Figura 3. Fenótipos M1 e M2 de macrófagos. Macrófagos são ativados por IFN- γ e/ou LPS que os levam a polarização de fenótipo M1, que caracteriza-se pela maior expressão de moléculas coestimulatórias CD80, CD86, a produção da enzima *iNOS* e a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-12. Por outro lado, a ativação alternativa de macrófagos se dá por IL-4 e/ou IL-13 ou IL-10, que leva a uma maior expressão de CD206, CD163 na membrana, a uma maior produção da enzima arginase no citoplasma e a uma liberação aumentada de IL-4, IL-10, TGF- β . (Figura por Borges, TJ)

Quanto a funcionalidade, macrófagos M1 possuem um importante papel contra patógenos intracelulares e mecanismos antitumorais. Em uma resposta inflamatória contra um patógeno as células NK (*Natural killer*) reagem produzindo IFN- γ transientemente, citocina que em uma resposta adaptativa é produzida por células Th1, o que pode levar os macrófagos a secreção de citocinas pró-inflamatórias, radicais de nitrogênio e oxigênio, levando a uma maior capacidade de eliminação do micro-organismo invasor (Mosser and Edwards 2008). Por outro lado, há uma transição do fenótipo M1 ao M2, quando a infecção torna-se crônica, o que pode proporcionar proteção ao hospedeiro contra uma resposta inflamatória exacerbada (Sica and Mantovani 2012). Em muitas doenças parasitárias os macrófagos sofrem polarização a um fenótipo M2. Em infecções causadas por *Taeniasolium* e *Taenia crassiceps* em humanos, observa-se a polarização de macrófagos a um fenótipo M2 após a fase aguda da doença (>4 semanas). Em infecções por *Schistosoma* os carboidratos dos ovos são os

principais produtos que levam a uma resposta Th2, que pode formar um microambiente favorável ao desenvolvimento de macrófagos M2 (Noel, Raes et al. 2004). Macrófagos ativado alternativamente estão presentes também em alergias, visto que essas propiciam um ambiente Th2, que é propício a polarização de macrófagos. A asma está associada a remodelação tecidual, incluindo a deposição de colágeno e hiperplasia de células caliciformes e os macrófagos M2 estão intimamente envolvidos neste processo (Sica and Mantovani 2012).

1.1.4 Macrófagos e câncer

Em 1863, foi quando pela primeira vez se viu a presença de leucócitos em um tecido canceroso por Rudolph Virchow (Balkwill and Mantovani 2001). Séculos se passaram e os estudos relacionando o papel e as características das células imunes associadas ao câncer continuam incessantes.

Os macrófagos são os leucócitos presentes em maior número na maioria dos tumores (Mantovani, Bottazzi et al. 1992). Essas células, denominadas TAMs (*Tumor associated macrophages* - macrófagos associados a tumores) são recrutadas aos tumores através de quimiocinas. Funcionalmente, os TAMs possui duas vias as quais podem atuar, uma, matando as células tumorais, na outra, podem promover a angiogênese, o crescimento tumoral e a metástase (Balkwill and Mantovani 2001).

Nos estudos iniciais pensava-se que era necessária a presença de células T e NK para o recrutamento de TAMs. Após experimentos de transplante tumoral em hospedeiros com defeitos na imunidade mediada por células T e células NK, mostrou-se que a imunidade específica não é determinante para a infiltração de macrófagos, mas fatores liberados pelas próprias células tumorais são os que fazem o recrutamento celular (Mantovani, Bottazzi et al. 1992).

Ao serem recrutados para os sítios tumorais, os macrófagos recebem estímulos que os levam a adquirir um fenótipo *M2-like*, visto a ausência de IFN- γ e produtos bacterianos e a presença de IL-10, TGF- β secretados por células neoplásicas, fibroblastos e células T reguladoras (Solinas, Germano et al. 2009). Estudos mostram a relação entre fenótipos *M2-like* e o aumento do grau e largura do tumor em pacientes com câncer de mama (Medrek, Ponten et al. 2012), *M2-like* e fibroblastos associados ao tumor com a piora de prognóstico em câncer colorretal (Herrera, Herrera et al. 2013) e

com aumento da progressão tumoral em câncer de próstata(Comito, Giannoni et al. 2013).

1.2 Proteínas de choque térmico

Em 1962, Ferruccio Rittossa observou em seu laboratório nas glândulas salivares de *Drosophila larvae* o aparecimento de *puff* scromossômicos induzidos por calor, após a temperatura da estufa ser elevada acidentalmente por um colega de laboratório (De Maio, Santoro et al. 2012). Posteriormente, esta aparentemente inocente observação, levaria a identificação de genes envolvidos nesse processo e a proteínas induzidas, iniciando assim, uma ampla linha de pesquisa na área de resposta ao choque térmico.

As proteínas de choque térmico (HSPs – *Heat Shock Proteins*) são chaperonas moleculares responsáveis pelo dobramento de proteínas ainda ligadas ao ribossomo ou que já sofreram a síntese e necessitam de um dobramento adequado. São proteínas que exercem sua função tanto em condições fisiológicas normais, como em situações de estresse, auxiliando no redobramento de proteínas que estão em processo de degradação e impedem o agregação proteica. As proteínas de choque térmico estão entre as proteínas mais conservadas entre organismos procarióticos e eucarióticos (Parsell and Lindquist 1993). Todos organismos respondem ao calor produzindo proteínas de choque térmico.

As proteínas de choque térmico são divididas em famílias de acordo com sua similaridade de sequência e peso molecular, sendo elas Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp40, Hsp27, Hsp10, *small Hsps* entre outras(Jolly and Morimoto 2000).

1.2.1 Proteínas de choque térmico de 70 kDa (Hsp70)

A Hsp70 é a proteína mais conservada dentre as espécies, desde as arqueobactéria e plantas até os humanos. A homóloga procariótica possui 50% de identidade de sequência de aminoácidos com a eucariótica, além de a função ser altamente conservada. Essa família de proteínas está presente em diversos

compartimentos celulares, como no citosol, mitocôndria, retículo endoplasmático (Feder and Hofmann 1999).

A Hsp70 age sobre proteínas que estão sendo sintetizadas pelo ribossomo, ou seja, ao mesmo tempo em que a nova proteína está se formando, esta chaperona já está auxiliando no seu dobramento (Alberts, Wilson et al. 2008). A Hsp70 liga-se a sítios hidrofóbicos da proteína em formação e esse processo de dobramento utiliza a energia do ATP. Além disso, essa chaperona é capaz de prevenir a agregação de proteínas e promove o redobramento de proteínas agregadas (Feder and Hofmann 1999).

1.2.2 O papel imunomodulador da Hsp70

A Hsp70 provenientes de diversas fontes vem se mostrando como uma importante proteína na modulação de células imunes inatas (Borges, Wieten et al. 2012). Inicialmente, pode-se citar um estudo feito pelo nosso grupo que mostrou que a Hsp70 de *Mycobacterium tuberculosis* é capaz de inibir a maturação de células dendríticas *in vitro* e inibir a proliferação de linfócitos T *in vitro*. E esse tratamento induziu a produção de IL-10 e não a de TNF- α (Motta, Schmitz et al. 2007). A modulação da Hsp70 extracelular pode ser observada em fatores de transcrição importantes na resposta inflamatória, como C/EBP β e C/EBP δ . Foi observada uma diminuição da expressão desses fatores de transcrição, em relação ao controle, quando células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDCs) foram tratadas com Hsp70. Além disso, a diminuição da expressão desses fatores de transcrição está associada a diminuição da produção de TNF- α , IFN- γ e MCP-1, e esse efeito não ocorre em células derivadas de animais TLR2 e IL-10 nocaute e quando as moléculas ERK e JAK2/STAT3 são bloqueadas (Borges, Lopes et al. 2013). Além disso, a estimulação de células dendríticas derivadas de monócitos humanos com Hsp70 humana e a posterior cultura dessas células com células T, mostrou uma diminuição na proliferação de células T, mesmo na presença de estímulo com IL-2, além uma menor produção de IFN- γ pelos linfócitos (Stocki, Wang et al. 2012). Em outro estudo de modulação de células inatas, foi observado a supressão de PGIA (*proteoglycan-induced arthritis* - artrite induzida por proteoglicano) com o tratamento de camundongos com DCs tratadas com Hsp70 de *Mycobacterium tuberculosis* e de camundongo (Spiering, van der Zee et al.

2013). Além de modular as células do sistema imune inato, um estudo em células sinoviais de pacientes com artrite reumatoide e células mononucleares periféricas do sangue, mostrou a produção de IL-10 por essas células e isso foi acompanhado de uma diminuição de TNF- α (Detanico, Rodrigues et al. 2004). Outro estudo mostrou que a Hsp70 extracelular levou a uma menor produção de IL-6, IL-8 e MCP-1 em fibroblastos de pacientes com artrite, além de inibir a translocação de NF κ B para o núcleo(Luo, Zuo et al. 2008).

Diversos estudos têm abordado a Hsp70 extracelular como uma proteína que modula macrófagos a contribuírem na formação de um ambiente pró-inflamatório (Asea A., Kraeft SK., 2000) . Por outro lado, a Hsp70 intracelular é vista como uma proteína que modula os macrófagos a formarem um microambiente anti-inflamatório (Lee and Repasky 2012). Porém, já é bem documentado, assim como relatado nos estudos citados acima, que um dos grandes contribuintes para esse caráter pró-inflamatório da Hsp70 é a endotoxina contaminante LPS (Lipopolissacarídeo) presente na parede bacteriana de bactérias gram-negativas e é um agonista de TLR4. Sabendo isso, é de suma importância, ter muito cuidado com essa questão, visto que a produção da grande maioria de Hsp70 utilizada nos trabalhos científicos vem de sistemas de proteína recombinante, os quais utilizam bactérias na sua produção (Aida and Pabst 1990).

Assim, procuramos utilizar neste trabalho uma Hsp70 com o mínimo possível de contaminantes, assim como a utilizada nos estudos que provaram sua modulação sobre células dendríticas, células sinoviais e na proliferação de células T. Tendo isso em mente, procuramos avaliar o efeito causado pela estimulação de macrófagos com Hsp70 sob parâmetro de fenótipo celular e funcionalidade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o papel da Hsp70 de *Mycobacterium tuberculosis* quando exposta a macrófagos murinos

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar o efeito da Hsp70 sobre marcadores bioquímicos que distinguem fenótipos de macrófagos, como a enzima arginase e a produção de óxido nítrico;

2.2.2 Avaliar a expressão de genes (Retnla, Chi313) mais expressos caracteristicamente do fenótipo M2;

2.2.3 Avaliar as citocinas liberadas por macrófagos murinos polarizados;

2.2.4 Avaliar a expressão de receptores de superfície celular (CD80, CD86, CD206) em macrófagos estimulados com Hsp70;

2.2.5 Testar o efeito funcional de macrófagos estimulados com Hsp70 em um modelo de melanoma murino.

3. MANUSCRITO

Extracellular heat shock protein 70 from *Mycobacterium tuberculosis* generates tumor-promoting M2-like macrophages

Este manuscrito quando finalizado será submetido ao periódico científico "*PlosOne*".

Extracellular heat shock protein 70 from *Mycobacterium tuberculosis* generates tumor-promoting M2-like macrophages

Rafael L. Lopes^{1†}, Thiago J. Borges^{1,2†}, Nathana G. Pinho¹, Letícia S. Bergamin³, Ana Maria O. Battastini³, Stéfanie Muraro⁴, Felipe D. Machado¹, Ana Paula D. Souza^{4,5}, Rafael F. Zanin^{1,2}, Cristina Bonorino^{1,2*}

¹Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Biomedical Research Institute, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

²Department of Cellular and Molecular Biology, School of Biosciences, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

³ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁴Laboratory of Clinical and Experimental Immunology, Centro Infantil, Biomedical Research Institute, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁵ Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

† The authors equally contributed to this work

Key words: macrophage; anti-inflammatory; Hsp70; M2 phenotype; tumors

***Corresponding author:**

Cristina Bonorino, Cellular and Molecular Biology Department and Biomedical Research Institute. Av. Ipiranga, 6690 - 2nd floor. Porto Alegre, RS, Brazil 90680-001.

Tel: +55 51 3320 3000 ext. 2725, Fax: +55 51 3320 3312

Email: cbonorino@puers.br

Abstract

Macrophages are myeloid cells that play an essential role in inflammation and host defense, regulating immune response. Depending on the microenvironment, macrophages can polarize to distinct phenotypes. The M1 phenotype, inflammatory, is activated by IFN- γ and bacterial products and these cells express CD80, CD86, produce NO and are IL-12^{hi}. M2 macrophages, are anti-inflammatory, and are activated by IL-4 and/or IL-13, expressing IL-10, CD206 and arginase. This subset of macrophages is important in parasite infections, fibrosis, wound healing and tissue homeostasis, regulating insulin sensitivity and immune regulatory functions. In previous works from our lab and others, it was observed that Hsp70 had an immunosuppressive role, leading to a tolerizing phenotype of innate immune cells of arthritis patients. However, the role of Hsp70 in macrophages needs to be further elucidated. In this study, we investigated whether Hsp70 was able to modulate macrophages to an M2 phenotype. Murine macrophages derived from bone marrow by GM-CSF (GM-BMMs) or peritoneal macrophages were incubated for 24h either without stimulus, IL-4, LPS or Hsp70. Treatment with Hsp70 showed an increase of F4/80⁺CD206⁺ cells in comparison to other treatments in a similar manner to IL-4. In addition, Hsp70-treated macrophages presented higher arginase activity and IL-10 than other treatments. Importantly, Hsp70-treated macrophages were able to promote tumor growth in a model of melanoma in BALB/c mice more than other treatments. Our results suggest that Hsp70 polarizes macrophages to the M2-like phenotype.

Introduction

Macrophages (MΦs) are myeloid cells which have an important role during inflammation, resolution, repair and cancer [1]. These cells have a marked phenotypic heterogeneity, which is dependent on the microenvironment conditions. This heterogeneity is evident when macrophages are stimulated with T helper 1 or T helper 2 cytokines. Classically activated macrophages (M1) are activated by Th1 cytokines (IFN- γ) or by bacterial products (e.g. lipopolysaccharide - LPS). They are able to control infections, have a tumoricidal activity and secrete high levels of pro-inflammatory cytokines. Alternatively activated macrophages (M2) are activated by Th2 cytokines (IL-4 and/or IL-13) and have important roles in allergy, parasitic infections and tissue repair. Both phenotypes can be differentiated by surface receptors, transcription factors and cytokines profile produced. M1 macrophages express CD80, CD86, produce NO and secrete pro-inflammatory cytokines like TNF- α , IL-12, IL-6 and IL-1 β . M2 macrophages express CD206, CD163 and they can produce IL-10, TGF- β and arginase [2-6]. In addition, differential M2 macrophage polarization can be defined based on a specific genetic signature as the upregulation of FIZZ1 (also known as Retnla) and Ym1 (also known as Chil3l3) genes [7,8].

In solid tumors, macrophages have the ability to infiltrate tumor microenvironment and modulate T-cell and stroma activity to either promote or inhibit tumor progression [9]. Tumors have evolved to recruit macrophages (tumor associated macrophages - TAMs) and polarize them by factors presented in microenvironment. M1 TAMs exhibiting antitumor activity are found in tumors in remission. In well established and growing cancers, macrophages are biased toward the M2-like phenotype that has tumor-promoting functions [10-13]. In addition, Infiltration of M2 macrophages in tumor sites is correlated with a poor prognosis [14,15].

Extracellular Hsp70 from different sources has been demonstrated to have protective and regulatory roles in different inflammatory disease models as arthritis [16,17], colitis [18], transplants [19] and brain ischemia [20]. These effects were reported to be due to modulation of innate cells as dendritic cells (DCs) [21-23] and monocytes [24] to a tolerogenic state. However, the immune suppressive roles of extracellular Hsp70 in macrophages have to be elucidated. In the present study we investigated whether extracellular Hsp70 (Hsp70) can polarize bone marrow

macrophages differentiated with GM-CSF (GM-BMMs), as well as mature peritoneal macrophages to an alternative activated (M2) phenotype. GM-BMMs treated with Hsp70 upregulated arginase activity, expression of Ym1 and FIZZ1, and IL-10 production in similar levels to M2 M ϕ s polarized with IL-4. Furthermore, these cells presented M2 function in vivo in a murine melanoma model, enhancing tumor growth. Our results indicate that macrophages treated with Hsp70 are functional M2-like cells, and able to promote tumor growth.

Results

Extracellular Hsp70 induces the expression of M2 markers in bone marrow-derived macrophages

To verify the effect of Hsp70 treatment on M ϕ s polarization, we treated GM-BMMs with different concentrations of Hsp70 and compared iNOS and arginase activities with M1 or M2 macrophages polarized with LPS or IL-4, respectively. Macrophages treated with either 30 or 60 μ g/ml of Hsp70 presented iNOS activity in levels comparable to IL-4 and medium treated cells (Fig. 1A). In contrast, Hsp70 treatment increased the activity of arginase in both concentrations tested when compared with medium or LPS (Fig 1B), similarly to M2 macrophages polarized with IL-4 (Fig. 1B). Because we saw no differences between both Hsp70 concentrations that were tested, we used 30 μ g/mL in the following experiments.

Murine polarized macrophages exhibit a distinct gene signature which can be used as polarization-associated markers [25]. The M2 phenotype is associated with the expression of FIZZ1 and Ym1 [7,8]. To evaluate whether Hsp70 can induce these M2 markers, we treated GM-BMMs with LPS, IL-4 and Hsp70 for 24h and then assessed mRNA levels of FIZZ1 and Ym1 by real time PCR. As expected, GM-BMMs elevated the expression of FIZZ1 and Ym1 upon IL-4 stimulus (Fig. 1C). In addition, Hsp70-treated macrophages upregulated their FIZZ1 and Ym1 expression in greater extension than IL-4-treated or control macrophages (Fig. 1C). Altogether, these data demonstrated that the treatment of BMMs with Hsp70 induces the expression of well characterized markers associated with M2 phenotype.

Macrophages release an M2-like cytokine profile upon stimulation with Hsp70

To investigate the profile of released cytokines by macrophages, we analyzed the production of TNF- α , MCP-1, IL-6 and IL-10 upon stimulation with LPS, Hsp70 or IL-4 for 24h (Fig. 2). Treatment of GM-BMMs with LPS led to an increased production of TNF- α when compared to medium, IL-4 and Hsp70 treatments (Fig. 2A). In contrast,

Hsp70 or IL-4-treated M ϕ produced higher levels of IL-10 when compared with LPS or medium (Fig. 2B). MCP-1 production was lower in Hsp70-treated M ϕ s when compared to LPS and IL-4 and similar levels with medium (Fig. 2C). In the same way, IL-6 presented a lower level in the Hsp70 group when compared to LPS, and a similar level to without stimulus and IL-4 treatment (Fig. 2D). Thus, murine macrophages treated with Hsp70 for 24h were able to produce low levels of the cytokines characteristic of inflammatory responses, which are released by M1 macrophages. In contrast, these macrophages were able to produce high levels of IL-10, showing a profile skewed to M2 phenotype.

Regulation of macrophage surface markers by Hsp70 in GM-BMMs

Alternatively activated macrophages present on their cell membrane a specific surface marker, CD206 (the mannose receptor). In contrast, classically activated macrophages express higher levels of CD80 and CD86. To analyze the expression of these surface molecules, we stimulated GM-BMMs with Hsp70 and analyze them for the expression of CD206 and CD80 by flow cytometry. Figure 3A contains representative dot plots of the surface stains analyzed. Hsp70-treated macrophages presented a lower expression of CD80 in comparison with other treatments, as demonstrated by the percentage of F4/80+CD80+ cells and by CD80 MFI (Fig. 3A and C). Treatment with Hsp70 increased the expression of CD206 in comparison to other treatments (Fig. 3B). The percentage of F4/80+CD206+ cells and CD206 MFI confirmed these findings (Fig. 3D). These results indicated that M ϕ s treated with Hsp70 presented a profile of surface molecules consistent with that is observed in alternative activated macrophages.

Extracellular HSP70 induces an M2-like phenotype in peritoneal macrophages

To access the modulatory effects of Hsp70 in M ϕ s from another source, we obtain cells from peritoneum cultured them in presence of IL-4, LPS, Hsp70 or left

unstimulated for 24h. After that, cells were stained for F4/80, CD80, CD86 and CD206. Macrophages treated with Hsp70 showed a lower expression of CD80 and CD86 when compared with medium and LPS (Fig. 4A and B). Also, the levels of M ϕ s positive for CD80 or CD86 were similar in cells treated with IL-4 and Hsp70 (Fig. 4A and B). In contrast, macrophages treated with extracellular Hsp70 showed a higher expression of CD206 than other treatments, including macrophages treated with IL-4 (Fig. 4C). So, extracellular Hsp70 has immune modulatory roles in both BMMs and peritoneal M ϕ s, as observed by the expression of surface markers.

HSP70-treated macrophages promotes melanoma growth in mice

Tumor associated macrophages (TAMs) are important to tumor progression, tolerizing tumor microenvironment and avoiding T-cell antitumor effector responses. To test whether the M2-like macrophages generated by Hsp70 treatment were functional, we tested their ability to promote tumor growth in a murine melanoma model. We co-injected GM-BMMs treated with Hsp70 or LPS with B16F10 cells (I-A^b) in BALB/c mice (I-A^d) and accompanied tumor growth (Fig. 5A). As expected, tumors co-injected with M1 M ϕ s or alone could not develop in BALB/c hosts (Fig. 5B and C). Surprisingly, when B16F10 cells were injected together with Hsp70-polarized macrophages tumors were capable to establish and grown in a extended manner when compared with B16 or B16 + LPS-M ϕ s groups (Fig. 5B). The great difference in tumor growth was macroscopic (Fig. 5C). Altogether, these findings indicated that extracellular Hsp70 was capable to generated M2-like macrophages with tumor promoting properties.

Discussion

Cancer cells have evolved several mechanisms to evade elimination by immune system avoiding tumor growth [26]. Tumor microenvironment is characterized by the infiltration of immunosuppressive cells as Tregs, MDSCs and TAMs with a M2-like phenotype that contribute to tumor immunosurveillance [27]. We have previously shown that tumor cells treatment with extracellular Hsp70 from *M. tuberculosis* can establish tumor growth in an allogeneic tumor model in which we injected BALB/c mice (H-2^d) with B16F10 melanoma cells (H-2^b), increasing infiltration of Tregs at the tumor allograft site in Hsp70-treated animal [19].

In addition to Tregs, macrophages are important to promote tumor progression and enhanced TAMs infiltration is associated with poor prognosis [28,29]. In the present study, we demonstrated that tumor growth was enhanced in murine melanoma model in which cancer cells were co-injected with of M2-like macrophages generated with extracellular Hsp70 (Fig. 5). In accordance with these findings, the co-injection of M2 M ϕ s from bone marrow with mammary carcinoma cells 4T1 increased tumor growth and lung metastasis in mice [30].

Historically, intracellular Hsp70 was associated with immune modulatory roles while its extracellular form with inflammatory effects on macrophages [31]. It was demonstrated that Hsp70 can induce iNOS synthase and NO production in murine and human macrophages [32]. Also, after heat stress macrophages can release membrane-associated Hsp70 capable to induce TNF- α [33]. However, the inflammatory effects induced by Hsp70 seen in macrophages were associated with endotoxin contamination in recombinant protein preparation [34,35].

Hsp70 was reported to be secreted by cancer cells [36]. In addition, its extracellular form was demonstrated to have immune modulatory roles on innate immune cells [37]. Our group reported that extracellular mycobacterial Hsp70 can inhibit maturation of bone marrow derived DCs (BMDCs) and induce de production of IL-10 by these cells [21]. Also, it can downregulate the expression of C/EBP- β and C/EBP- δ transcription factors and inhibits the production of pro-inflammatory cytokines [38]. Chalmin et al. demonstrated that both murine and human Hsp70 associated in exosomes membranes is released from tumor cells and enhances immunosuppressive

functions of MDSCs [39]. These cells are extensively present in tumor-bearing mice and they mediated immune suppression in tumor sites [40].

A member of the small heat shock proteins family - Hsp27 - has its extracellular counterpart also associated with immunosuppressive effects on APCs [41]. Banerjee et al. reported this protein can be released by human breast cancer cells. This extracellular Hsp27 can differentiate human monocytes to macrophages that possess a tolerogenic phenotype, acting in immune escape and tumor growth [42]. So, we believe that extracellular HSPs secreted by cancer cells promote the tolerization of tumor microenvironment by modulating innate cells, avoiding T-cell responsiveness and contributing to tumor growth. It is also possible that extracellular HSPs are being uptake by APCs, its peptides presented in MHC II molecules generating HSP-specific Tregs [43].

We demonstrated that extracellular Hsp70 from *M. tuberculosis* can generated both derived from bone marrow or peritoneal macrophages with M2-like phenotype. I was assessed by the expression of Fizz1 and Ym1 molecule and arginase activity in levels comparable with IL-4 stimulated macrophages. Hsp70 treatments also lead to the production of IL-10 and expression of CD206 surface marker. Finally, the macrophages generated in presence of Hsp70 were capable to promote tumor growth in both allogeneic model of murine melanoma.

Material and Methods

Mice

6 to 10-weeks-old female C57BL/6 mice were purchased from FEPPS (Rio Grande do Sul, BRA). All mice were housed in individual and standard mini-isolators (Techniplast) in an SPF facility (Institute of Biomedical Research – PUCRS) with free access to water and food. All procedures were performed in accordance with the guidelines of the Federation of Brazilian Societies for Experimental Biology and approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEUA-PUCRS) under protocol ID CEUA 12/00316.

Protein purification and LPS extraction

Recombinant Hsp70 of *Mycobacterium tuberculosis* was produced with the construct pET23a(+)/MtbHsp70 in XL1-blue *Escherichia coli* and purified according to Mehlert [44]. To remove LPS, Triton X-114 was used according to the method described in Aida et al. [45]. Contaminating Triton X-114 was removed by incubating overnight with Bio-Beads® (Bio-Rad) at 4°C with agitation, as described in [21]. Protein concentration was determined using Qubit® Protein Assay Kit (Invitrogen) and the Qubit® Fluorometer (Invitrogen).

Macrophages cultures and polarization

Macrophages were grown from bone marrow of C57Bl/6 WT mice. Cells (10^6) were cultured in 24-well plates in serum-free medium AIM-V® (Gibco) with 10 ng/mL of GM-CSF (PeproTech). At day 3, medium was collected and cells were cultured for a further 3 days in the presence of fresh AIM-V with 10 ng/mL of GM-CSF. On the seventh day of culture, the non-adherent cells were separated from adherent cells (macrophages) and stimulated as described below. Flow cytometry analysis demonstrated a purity higher than 90% in GM-BMMs cultures (data not shown).

Peritoneal macrophages were collected by peritoneal cavity wash with 5 mL of sterile serum-free AIM-V medium (Gibco). The cells were washed twice with sterile PBS and suspended in AIM-V, transferred to a 24 multi-well plates and allowed to attach for 30 min. Unattached cells were washed out with medium. The attached cells, mainly peritoneal macrophages, were used for the experiments thereafter. Macrophages were evaluated by microscopic examination of the culture wells after May-Grunwald and Giemsa stains, indicating macrophage purity higher than 80%. Purity was confirmed by flow cytometry, using the F4/80 Ab (data not shown).

The obtained macrophages (from bone marrow or peritoneum) were stimulated for 24 h in serum-free AIM-V with 30 or 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Hsp70 or left unstimulated. For the generation of classically or alternative activated macrophages, cells were stimulated with LPS (30 ng/mL) or IL-4 (40 ng/mL) (both purchase from Peprotech) for 24 h, respectively.

Arginase Assay

Arginase activity in cell lysates was measured based on the conversion of L-arginine to L-ornithine and urea according to the technique described by Corraliza and collaborators [46] with minor modifications. Briefly, cells were lysed for 30 min with 40 μL of PBS 0,1% Triton-X-100. 30 μL of 25 mM Tris-HCl, pH 7.4 and 10 μL of 10 mM MnCl_2 were added and the enzyme was heat-activated for 10 min at 56°C. Similar amounts of samples (40 μL) and 0.5 M L arginine (pH 9.7) were mixed and incubated for 1 h at 37°C. The reaction was stopped by adding 400 μL of H_2SO_4 (96%), H_3PO_4 (85%), H_2O (1/3/7, v/v/v). The urea concentration was measured at 540 nm after the addition of 8 μL of α -isonitropropiophenone 6%, followed by heating at 95°C for 30 min. Values were compared with a standard curve of urea concentration.

Nitrite Assay

Nitrite concentrations were measured using the Greiss reaction [47]. We used the Greiss Reagent Kit for Nitrite Determination (Molecular Probes), according to

manufacturer's instructions. Samples were quantified by spectrophotometry at 540 nm using sodium nitrite as standard.

Flow cytometry

Macrophages were Fc blocked and stained for F4/80 (BM8) from eBioscience; CD80 (16-10A1), CD86 (GL1) from BD Biosciences; and CD206 (MR5D3) from AbDSerotec. Cells were analyzed using FACSCanto II (BD Biosciences) and BD FACSDiva software (BD Biosciences). Data obtained were analyzed using Flowjo software (version 7.6.5, Tree Star).

Total RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from murine macrophages cultures using RNeasy kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. The concentration of the purified total RNA samples was measured using a Qubit® RNA Assay Kit (Invitrogen) and the Qubit® Fluorometer (Invitrogen). We added 50 ng of RNA each cDNA synthesis reaction using the SuperScript-III RT pre-amplification system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). cDNA concentrations were measured using Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen) and the Qubit® Fluorometer (Invitrogen).

Real time PCR

Real time PCR was carried out StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using Platinum® SYBR® Green qPCRSuperMix-UDG (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. The thermal cycling conditions included an initial denaturation for 2 min at 95 °C and 40 cycles consisting of a denaturation step at 95 °C for 15 s, an annealing step at 60 °C for 30 s and an extension step for 1 min at 70 °C. Samples was analyzed in triplicates. The relative mRNA levels were calculated

using the comparative Ct method [48], using the house keeping gene β -microglobulin as a normalizer. Non-treated M ϕ s served as a reference for treated M ϕ s.

Primers sequences we used for β -microglobulin were F: TCCTGGCTCACACTGAATTC and R: CTGCGTGCATAAATTGTATAGCA; for Fizz1 (retnla) F: TCCCAGTGAATACTGATGAGA and R: CACTCTGGATCTCCCAAGA; and for Ym1 (Chi3l3) F: GGGCATACTTTATCCTGAG and R: CCACTGAAGTCATCCATGTC

Cytokines release measurement

Supernatants of cell cultures were analyzed for the presence of TNF, IL-10, MCP-1, IL-6, IL-12p70 and IFN- γ with the CBA Mouse Inflammation kit (BD Biosciences), according to manufacturer's instructions. Samples were analyzed using FACSCanto II (BD Biosciences) and BD FACSDiva software (BD Biosciences). Data obtained were analyzed using FCAP Array software (version 3.0, Soft Flow, Inc.) and expressed in pg/ml.

Tumor and BMMs co-injection

The murine melanoma cell line B16F10 (ATTC CRL-6475) was cultured with DMEM media (Cultilab) supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS) (Cultilab), 1x essentials amino acids (Gibco), 1x vitamins (Gibco) and 55 μ M of β -mercaptoethanol at 37°C with 5% of CO₂ atmosphere.

B16F10 (8×10^5) cells were co-injected with 10^4 of B6 GM-BMMs treated with LPS or Hsp70 as previously described in 100 μ L of serum-free RPMI. Injections were performed subcutaneously in the thigh of male BALB/c or C57Bl/6 mice, after anesthesia with 83 mg/kg of ketamine and 17 mg/kg of xylazine. Mice were photographed and tumor growth was evaluated using a digital caliper (Mitutoyo) in day 8, 10, 12, 14 and 16 post tumor injections. On 16th day after tumor injection, mice were sacrificed, the primary tumor was removed and weighted.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Prism software (version 5.00, Graphpad Software Inc.). The one-way ANOVA test was used to determine differences between groups. Multiple comparisons among levels were checked with Tukey post hoc test. Differences between specific points were determined by a t test. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Acknowledgements

Authors want to thank Taiane Garcia for technical support and Dr. Teresa F. Pais (Instituto de Medicina Molecular, Portugal) for critical reading of the article. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) Grant 11/0903-1, PUCRS and FINEP Grant 01.08.0600-00. R.L.L. is a recipient of PIBIT-CNPq fellowship and T.J.B. is a recipient of a FAPERGS/CAPES fellowship.

Conflict of interest

The authors report no conflicts of interest

Figure legends

Figure 1. Extracellular Hsp70 induces the expression of M2 markers in bone marrow-derived macrophages. Macrophages were treated with 30 μ g/mL or 60 μ g/mL Hsp70 for 24h. **(A)** iNOS activity was determined by nitrite (NO²⁻) accumulation in the supernatant of macrophages. Data show mean \pm S.D. of three independent experiments. (***) p<0.001 indicates difference significant between treated groups and LPS group (2x10⁴ cells) **(B)** Arginase was estimated by measuring the formation of urea from arginine (2x10⁴ cells). Data show mean \pm S.D. of three independent experiments. **(C)** Effect of Hsp70 on FIZZ1 and Ym1 expression in macrophages were quantified by qPCR. The total the amount of FIZZ1 and Ym1 mRNA was normalized to β -microglobulin signals and expressed as 2^{- Δ / Δ CT}. The values represent means \pm SEM of at least three independent experiments. All data were analyzed by one-way ANOVA with Tukey post hoc test.

Figure 2. Macrophages release an M2-like cytokine profile upon stimulation with Hsp70. Macrophages were treated with 30 μ g/mL Hsp70 for 24h. **(A)** TNF- α , **(B)** IL-10, **(C)** MCP-1 and **(D)** IL-6 were measured from supernatant of macrophages cultures by CBA Mouse Inflammation kit (BD Biosciences). The values represent means \pm S.D. of three independent experiments. (**) p<0.01 indicates significant difference between medium group.

Figure 3. Regulation of macrophage surface markers by Hsp70 in GM-BMMs. Flow cytometry analysis of surface **(A)** CD80 and **(B)** CD206 expression in macrophages treated with 30 μ g/mL Hsp70 for 24h. Double positive cells percentage **(C)** (F4/80+CD80+ cells) and Mean Fluorescence Intensity (MFI) of CD80 and **(D)** (F4/80+CD206+ cells) and MFI of CD206 expression. Data are representative of three independent experiments with pooled macrophages from one to two mice per experiment. (**) p<0.01 indicates significant difference between the macrophages exposed to Hsp70 in relation to medium group, the data were analyzed by one-way ANOVA with Tukey post hoc test.

Figure 4. Extracellular HSP70 induces an M2-like phenotype in peritoneal macrophages. Flow cytometry analysis of surface (A) CD80 and (B) CD86 expression in macrophages treated with 30µg/mL Hsp70 for 24h. (C) CD206+ Histogram of macrophages exposed to Hsp70 . All the data were analyzed by one-way ANOVA with Tukey post hoc test.

Figure 5. Hsp70-treated macrophages promote tumor growth. (A) The murine melanoma cell line B16F10 was co-injected with macrophages exposed to 30µg/mL Hsp70 as illustrated in experimental design. (B) The cells were subcutaneously injected into BALB/c mice (4 mice per group) and the tumor volume was measured 8 days later as indicated. (C) Illustrative picture of tumor size. (*) $p < 0.05$ indicates significant difference between the macrophages exposed to Hsp70 in relation to B16 group. The data were analyzed by one-way ANOVA with Tukey post hoc test.

FIGURES

Figure 1

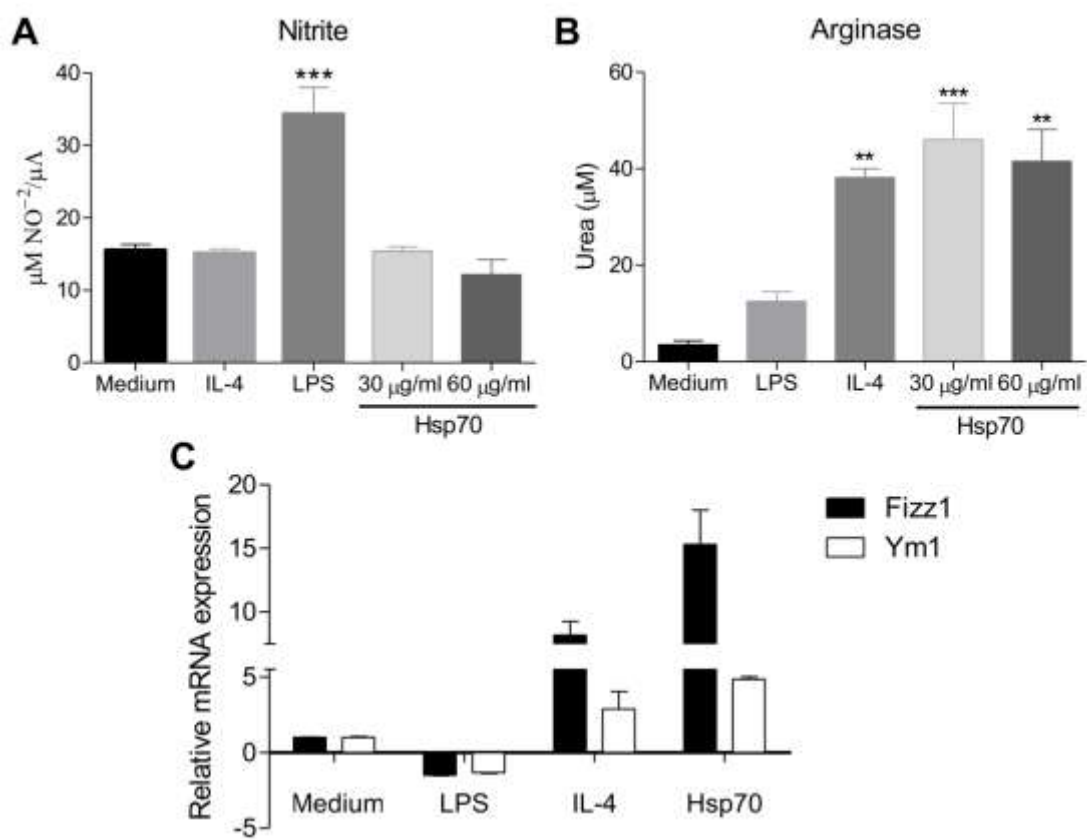


Figure 2

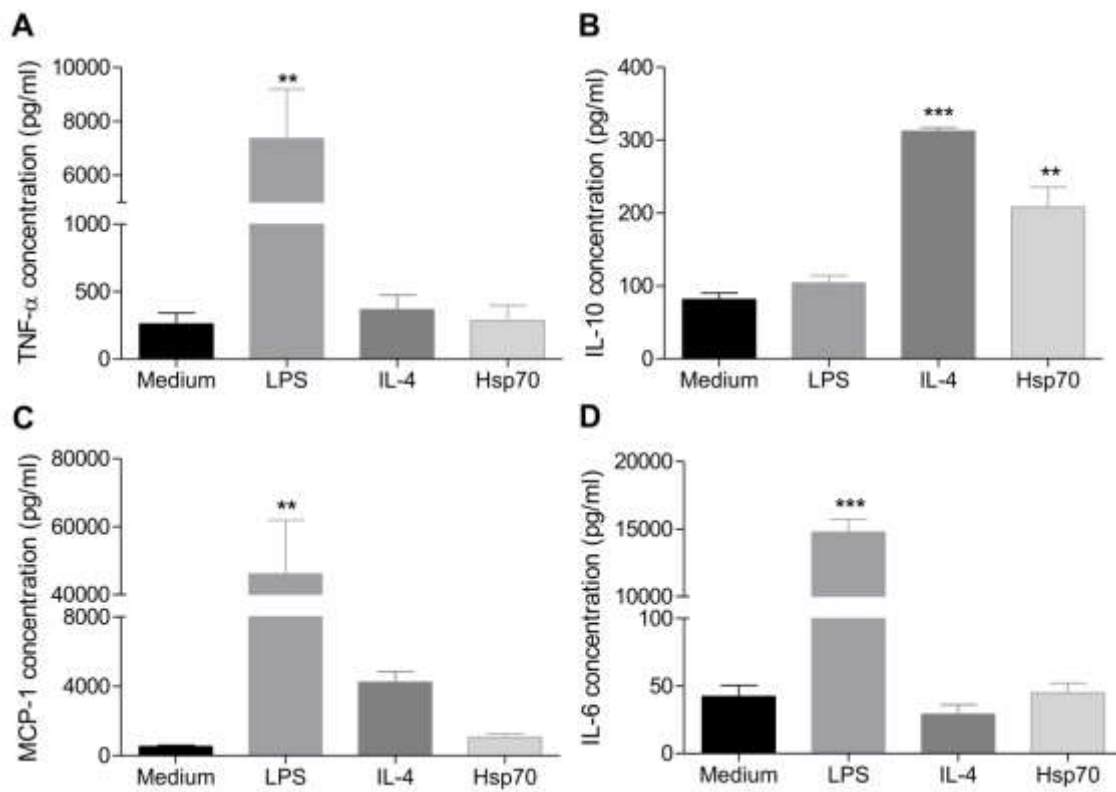


Figure 3

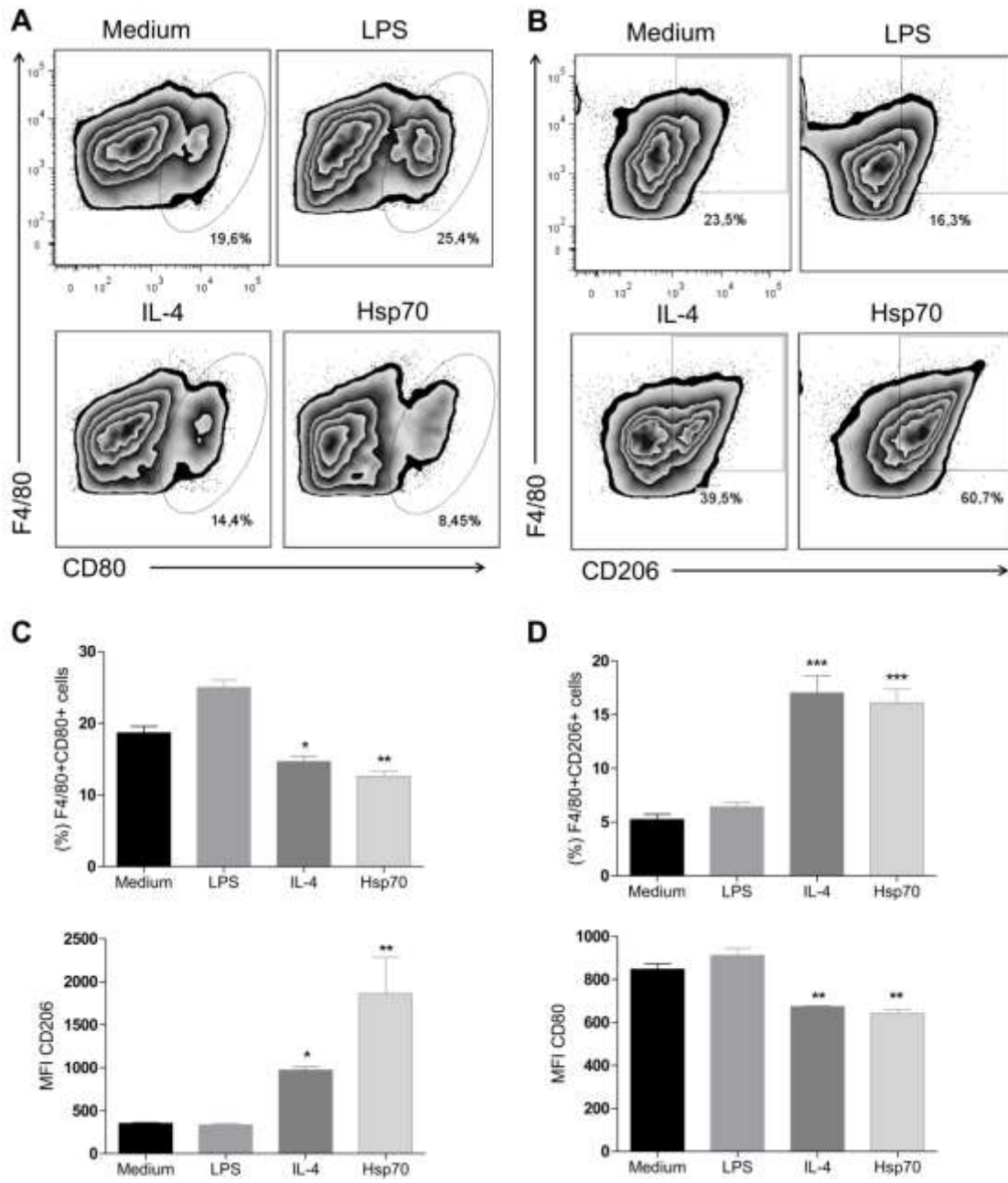


Figure 4

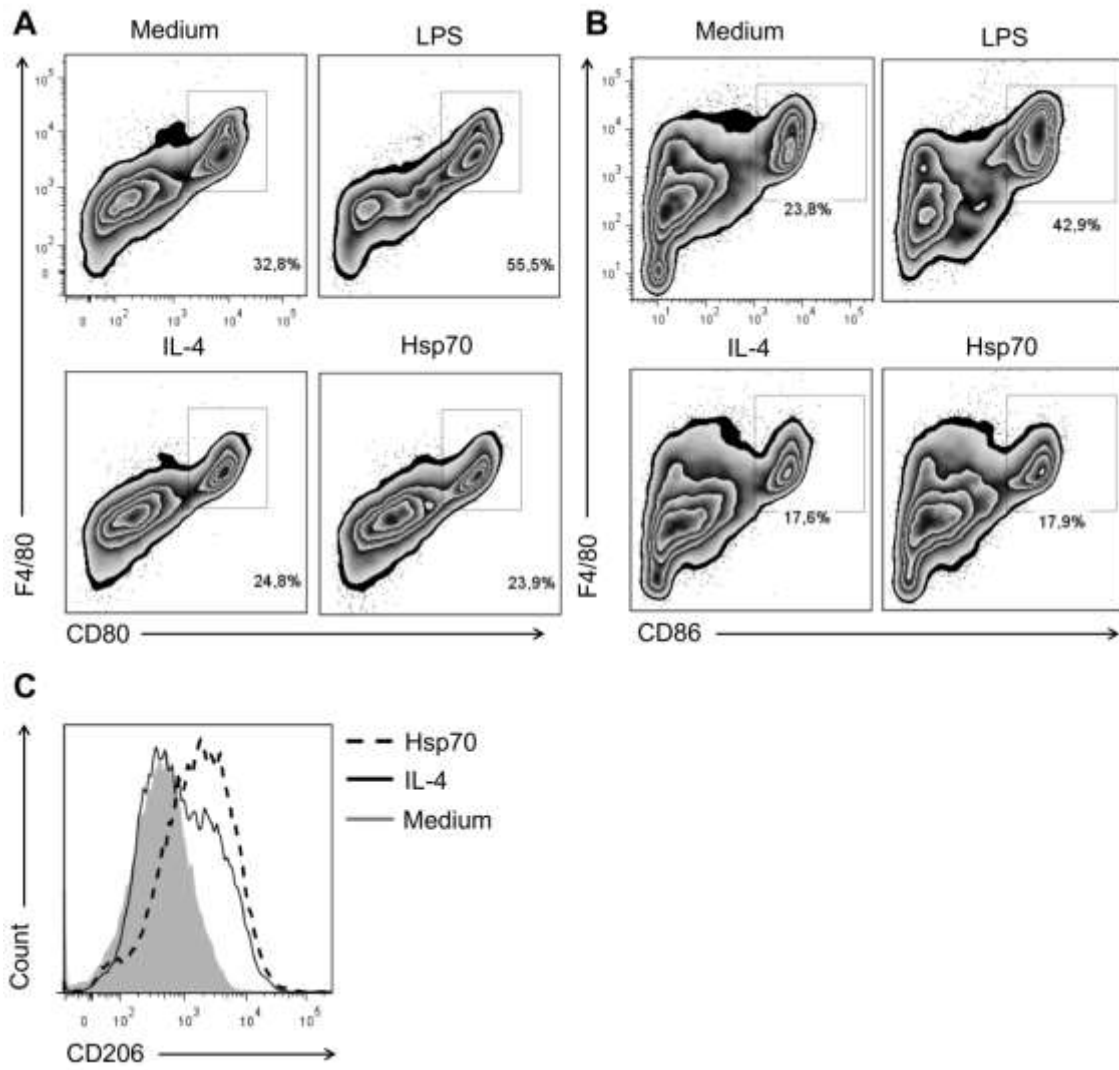
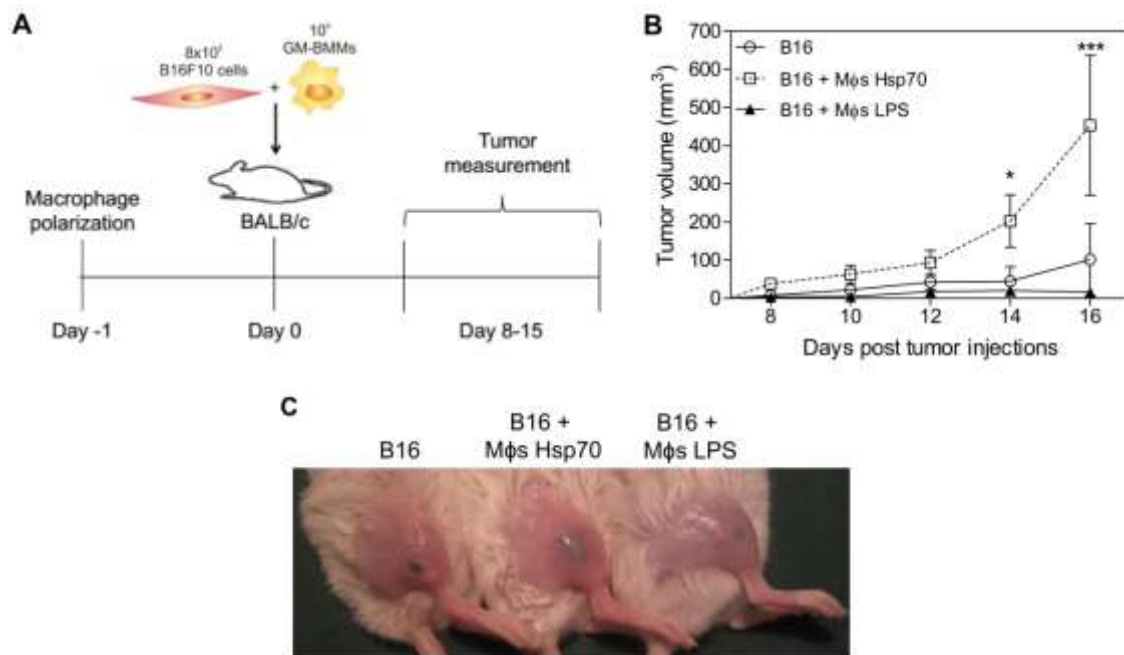


Figure 5



References

1. Sica A, Mantovani A (2012) Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122: 787-795.
2. Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, et al. (2001) Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: Granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *Journal of Immunology* 167: 6533-6544.
3. Chang CI, Liao JC, Kuo L (1998) Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 274: H342-H348.
4. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, et al. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* 25: 677-686.
5. Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology* 3: 23-35.
6. Gordon S, Martinez FO (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32: 593-604.
7. Raes G, De Baetselier P, Noel W, Beschin A, Brombacher F, et al. (2002) Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J LeukocBiol* 71: 597-602.
8. Raes G, Noel W, Beschin A, Brys L, de Baetselier P, et al. (2002) FIZZ1 and Ym as tools to discriminate between differentially activated macrophages. *DevImmunol* 9: 151-159.
9. de Souza AP, Bonorino C (2009) Tumor immunosuppressive environment: effects on tumor-specific and nontumor antigen immune responses. *Expert Rev Anticancer Ther* 9: 1317-1332.
10. Biswas SK, Mantovani A (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology* 11: 889-896.
11. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology* 23: 549-555.
12. Ruffell B, Affara NI, Coussens LM (2012) Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends in Immunology* 33: 119-126.
13. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, et al. (1996) Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Research* 56: 4625-4629.
14. Jensen TO, Schmidt H, Moller HJ, Hoyer M, Maniecki MB, et al. (2009) Macrophage Markers in Serum and Tumor Have Prognostic Impact in American Joint Committee on Cancer Stage I/II Melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 27: 3330-3337.
15. Kawamura K, Komohara Y, Takaishi K, Katabuchi H, Takeya M (2009) Detection of M2 macrophages and colony-stimulating factor 1 expression in serous and mucinous ovarian epithelial tumors. *Pathology International* 59: 300-305.
16. van Eden W, van der Zee R, Prakken B (2005) Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 5: 318-330.
17. Luo X, Zuo X, Mo X, Zhou Y, Xiao X (2011) Treatment with recombinant Hsp72 suppresses collagen-induced arthritis in mice. *Inflammation* 34: 432-439.

18. Tanaka K, Namba T, Arai Y, Fujimoto M, Adachi H, et al. (2007) Genetic evidence for a protective role for heat shock factor 1 and heat shock protein 70 against colitis. *J Biol Chem* 282: 23240-23252.
19. Borges TJ, Porto BN, Teixeira CA, Rodrigues M, Machado FD, et al. (2010) Prolonged survival of allografts induced by mycobacterial Hsp70 is dependent on CD4+CD25+ regulatory T cells. *PLoS One* 5: e14264.
20. Doeppner TR, Kaltwasser B, Fengyan J, Hermann DM, Bahr M (2013) TAT-Hsp70 induces neuroprotection against stroke via anti-inflammatory actions providing appropriate cellular microenvironment for transplantation of neural precursor cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 33: 1778-1788.
21. Motta A, Schmitz C, Rodrigues L, Ribeiro F, Teixeira C, et al. (2007) Mycobacterium tuberculosis heat-shock protein 70 impairs maturation of dendritic cells from bone marrow precursors, induces interleukin-10 production and inhibits T-cell proliferation in vitro. *Immunology* 121: 462-472.
22. Stocki P, Wang XN, Dickinson AM (2012) Inducible Hsp70 reduces T cell responses and stimulatory capacity of monocyte-derived dendritic cells. *J Biol Chem*.
23. Spiering R, van der Zee R, Wagenaar J, van Eden W, Broere F (2012) Mycobacterial and mouse HSP70 have immuno-modulatory effects on dendritic cells. *Cell Stress Chaperones*.
24. Detanico T, Rodrigues L, Sabritto AC, Keisermann M, Bauer ME, et al. (2004) Mycobacterial heat shock protein 70 induces interleukin-10 production: immunomodulation of synovial cell cytokine profile and dendritic cell maturation. *Clin Exp Immunol* 135: 336-342.
25. Mantovani A, Sica A, Locati M (2005) Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23: 344-346.
26. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.
27. de Souza AP, Bonorino C (2012) The immune system: endogenous anticancer mechanism. *Front Biosci (Elite Ed)* 4: 2354-2364.
28. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE (2002) The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 196: 254-265.
29. Pollard JW (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4: 71-78.
30. Cho HJ, Jung JI, Lim do Y, Kwon GT, Her S, et al. (2012) Bone marrow-derived, alternatively activated macrophages enhance solid tumor growth and lung metastasis of mammary carcinoma cells in a Balb/C mouse orthotopic model. *Breast Cancer Res* 14: R81.
31. Lee CT, Repasky EA (2012) Opposing roles for heat and heat shock proteins in macrophage functions during inflammation: a function of cell activation state? *Front Immunol* 3: 140.
32. Panjwani NN, Popova L, Srivastava PK (2002) Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs. *J Immunol* 168: 2997-3003.
33. Vega VL, Rodriguez-Silva M, Frey T, Gehrman M, Diaz JC, et al. (2008) Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. *J Immunol* 180: 4299-4307.

34. Gao B, Tsan MF (2003) Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. *J BiolChem* 278: 174-179.
35. Gao BC, Tsan MF (2004) Induction of cytokines by heat shock proteins and endotoxin in murine macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317: 1149-1154.
36. Mambula SS, Calderwood SK (2006) Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes. *J Immunol* 177: 7849-7857.
37. Borges TJ, Wieten L, van Herwijnen MJ, Broere F, van der Zee R, et al. (2012) The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Front Immunol* 3: 95.
38. Borges TJ, Lopes RL, Pinho NG, Machado FD, Souza AP, et al. (2013) Extracellular Hsp70 inhibits pro-inflammatory cytokine production by IL-10 driven down-regulation of C/EBPbeta and C/EBPdelta. *Int J Hyperthermia*.
39. Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Vincent J, Bruchard M, et al. (2010) Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest* 120: 457-471.
40. Gabrilovich DI, Nagaraj S (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9: 162-174.
41. Miller-Graziano CL, De A, Laudanski K, Herrmann T, Bandyopadhyay S (2008) HSP27: an anti-inflammatory and immunomodulatory stress protein acting to dampen immune function. *Novartis Found Symp* 291: 196-208; discussion 208-111, 221-194.
42. Banerjee S, Lin CF, Skinner KA, Schiffhauer LM, Peacock J, et al. (2011) Heat shock protein 27 differentiates tolerogenic macrophages that may support human breast cancer progression. *Cancer Res* 71: 318-327.
43. van Herwijnen MJ, Wieten L, van der Zee R, van Kooten PJ, Wagenaar-Hilbers JP, et al. (2012) Regulatory T cells that recognize a ubiquitous stress-inducible self-antigen are long-lived suppressors of autoimmune arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 14134-14139.
44. Mehlert A, Young DB (1989) Biochemical and Antigenic Characterization of the Mycobacterium-Tuberculosis 71-Kd Antigen, a Member of the 70-Kd Heat-Shock Protein Family. *Molecular Microbiology* 3: 125-130.
45. Aida Y, Pabst MJ (1990) Removal of Endotoxin from Protein Solutions by Phase-Separation Using Triton X-114. *Journal of Immunological Methods* 132: 191-195.
46. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M (1994) Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 174: 231-235.
47. Stuehr DJ, Nathan CF (1989) Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169: 1543-1555.
48. Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3: 1101-1108.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A ativação alternativa de macrófagos via IL-4 e IL-13 vem sendo muito estudada desde a década de 90 quando primeiramente se propôs a sua existência. Sabemos, a partir desses estudos, que no ambiente tumoral há a modulação de macrófagos recrutados para um fenótipo *M2-like* e que isso ocorre devido a liberação de citocinas como TGF- β , IL-10, entre outros fatores liberados por células T regulatórias, células tumorais. Porém, não está muito clara na literatura a modulação de macrófagos em relação ao fenótipo quando em contato com a Hsp70.

Nosso grupo e outros mostraram que a Hsp70 extracelular pode modular células do sistema imune inato a gerar um ambiente anti-inflamatório, o que é importante em doenças inflamatórias como artrite reumatoide, em transplantes de órgãos, entre outros.

Nosso trabalho mostrou que a Hsp70 extracelular é capaz de modular macrófagos a um fenótipo *M2-like*, tanto no fenótipo quanto de maneira funcional, visto sua visível progressão tumoral em modelo de melanoma murino.

Assim, procuraremos investigar as rotas envolvidas nessa modulação, como o papel da IL-10 e possivelmente receptores do tipo Toll que também podem estar influenciando nesse sistema.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aida, Y. and M. J. Pabst (1990). "Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114." *J Immunol Methods* **132**(2): 191-195.
- Alberts, B., J. H. Wilson, et al. (2008). *Molecular biology of the cell*. New York, Garland Science.
- Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC (2000) "HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine." *Nature Medicine*. **6**(4):435-42.
- Balkwill, F. and A. Mantovani (2001). "Inflammation and cancer: back to Virchow?" *Lancet* **357**(9255): 539-545.
- Bogdan, C. (2001) "Nitric oxide and immune response" *Nature immunology* **2**: 907-916
- Borges, T. J., R. L. Lopes, et al. (2013). "Extracellular Hsp70 inhibits pro-inflammatory cytokine production by IL-10 driven down-regulation of C/EBPbeta and C/EBPdelta." *Int J Hyperthermia* **29**(5): 455-463.
- Borges, T. J., B. N. Porto, et al. (2010). "Prolonged survival of allografts induced by mycobacterial Hsp70 is dependent on CD4+CD25+ regulatory T cells." *PLoS One* **5**(12): e14264.
- Borges, T. J., L. Wieten, et al. (2012). "The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70." *Front Immunol* **3**: 95.
- Comito, G., E. Giannoni, et al. (2013). "Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression." *Oncogene*.
- De Maio, A., M. G. Santoro, et al. (2012). "Ferruccio Ritossa's scientific legacy 50 years after his discovery of the heat shock response: a new view of biology, a new society, and a new journal." *Cell Stress Chaperones* **17**(2): 139-143.
- Detanico, T., L. Rodrigues, et al. (2004). "Mycobacterial heat shock protein 70 induces interleukin-10 production: immunomodulation of synovial cell cytokine profile and dendritic cell maturation." *Clin Exp Immunol* **135**(2): 336-342.
- Feder, M. E. and G. E. Hofmann (1999). "Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology." *Annu Rev Physiol* **61**: 243-282.
- Gordon, S. and F. O. Martinez (2010). "Alternative activation of macrophages: mechanism and functions." *Immunity* **32**(5): 593-604.
- Gordon, S. and P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." *Nat Rev Immunol* **5**(12): 953-964.
- Herrera, M., A. Herrera, et al. (2013). "Cancer-associated fibroblast and M2 macrophage markers together predict outcome in colorectal cancer patients." *Cancer Sci* **104**(4): 437-444.
- Jolly, C. and R. I. Morimoto (2000). "Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death." *J Natl Cancer Inst* **92**(19): 1564-1572.
- Kindt, T. J., R. A. Goldsby, et al. (2007). *Kuby immunology*. New York, W.H. Freeman.
- Lee, C. T. and E. A. Repasky (2012). "Opposing roles for heat and heat shock proteins in macrophage functions during inflammation: a function of cell activation state?" *Front Immunol* **3**: 140.

- Luo, X., X. Zuo, et al. (2008). "Extracellular heat shock protein 70 inhibits tumour necrosis factor-alpha induced proinflammatory mediator production in fibroblast-like synoviocytes." Arthritis Res Ther **10**(2): R41.
- Mantovani, A., B. Bottazzi, et al. (1992). "The origin and function of tumor-associated macrophages." Immunol Today **13**(7): 265-270.
- Mantovani, A., A. Sica, et al. (2005). "Macrophage polarization comes of age." Immunity **23**(4): 344-346.
- Martinez, F. O., L. Helming, et al. (2009). "Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective." Annu Rev Immunol **27**: 451-483.
- Medrek, C., F. Ponten, et al. (2012). "The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients." BMC Cancer **12**: 306.
- Meera G Nair, Daniel W Cochrane, Judith E Allen, Macrophages in chronic type 2 inflammation have a novel phenotype characterized by the abundant expression of Ym1 and Fizz1 that can be partly replicated in vitro, Immunology Letters, **85**: 173-180.
- Mosser, D. M. (2003). "The many faces of macrophage activation." J Leukoc Biol **73**(2): 209-212.
- Mosser, D. M. and J. P. Edwards (2008). "Exploring the full spectrum of macrophage activation." Nat Rev Immunol **8**(12): 958-969.
- Motta, A., C. Schmitz, et al. (2007). "Mycobacterium tuberculosis heat-shock protein 70 impairs maturation of dendritic cells from bone marrow precursors, induces interleukin-10 production and inhibits T-cell proliferation in vitro." Immunology **121**(4): 462-472.
- Murray, P. J. and T. A. Wynn (2011). "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets." Nat Rev Immunol **11**(11): 723-737.
- Noel, W., G. Raes, et al. (2004). "Alternatively activated macrophages during parasite infections." Trends Parasitol **20**(3): 126-133.
- Parsell, D. A. and S. Lindquist (1993). "The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins." Annu Rev Genet **27**: 437-496.
- Raes, G., P. De Baetselier, et al. (2002). "Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages." J Leukoc Biol **71**(4): 597-602.
- Raes, G., W. Noel, et al. (2002). "FIZZ1 and Ym as tools to discriminate between differentially activated macrophages." Dev Immunol **9**(3): 151-159.
- Sica, A. and A. Mantovani (2012). "Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas." J Clin Invest **122**(3): 787-795.
- Solinas, G., G. Germano, et al. (2009). "Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation." J Leukoc Biol **86**(5): 1065-1073.
- Spiering, R., R. van der Zee, et al. (2013). "Mycobacterial and mouse HSP70 have immuno-modulatory effects on dendritic cells." Cell Stress Chaperones **18**(4): 439-446.
- Stein, M., S. Keshav, et al. (1992). "Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation." J Exp Med **176**(1): 287-292.
- Stocki, P., X. N. Wang, et al. (2012). "Inducible heat shock protein 70 reduces T cell responses and stimulatory capacity of monocyte-derived dendritic cells." J Biol Chem **287**(15): 12387-12394.

- Stuehr, D. J. and M. A. Marletta (1985). "Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(22): 7738-7742.
- Wang, C., X. Yu, et al. (2013). "Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum." BMC Immunol **14**: 6.
- Wynn, T. A., A. Chawla, et al. (2013). "Macrophage biology in development, homeostasis and disease." Nature **496**(7446): 445-455.