

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**



**DOTTORATO DI RICERCA IN
FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA
SPERIMENTALE**

INDIRIZZO IN SCIENZE IMMUNOLOGICHE

XIX Ciclo

Coordinatore: Prof. Gianni Marone

TESI DI DOTTORATO

**CARATTERIZZAZIONE DI DUE
SOTTOPOPOLAZIONI DI MACROFAGI
POLMONARI UMANI**

TUTOR

Chiar.mo
Prof. Massimo Triggiani

CANDIDATA

Dott. Virginia Forte

INDICE

Introduzione	pag. 4
Materiali e metodi	pag. 10
Reagenti e Buffers	pag. 10
Isolamento e purificazione di macrofagi polmonari umani	pag. 12
Microscopia ottica e analisi morfometrica	pag. 13
Microscopia elettronica	pag. 14
Analisi di citofluorimetria	pag. 14
Incubazione delle cellule	pag. 15
Saggio proteico e di β -glucuronidasi	pag. 16
Saggio Elisa	pag. 16
Isolamento di mRNA cellulare e RT-PCR	pag. 16
Fosforilazione delle chinasi ERK1/2 e p38	pag. 18
Analisi statistica	pag. 18
Risultati	pag. 20
Caratteristiche morfologiche, morfometriche e biochimiche delle popolazioni di macrofagi umani	pag. 20

Caratterizzazione fenotipica di popolazioni di macrofagi umani	pag. 22
Il rilascio di citochine indotto da LPS in popolazione di macrofagi polmonari umani	pag. 24
Espressione di TLR4, MD-2 e MyD88 nelle popolazioni di macrofagi umani	pag. 26
Attivazione delle chinasi P38 ed ERK1/2 nei macrofagi polmonari umani	pag. 27
Discussione	pag. 29
Bibliografia	pag. 36
Figure	pag. 51
Tabelle	pag. 63

Introduzione

I macrofagi costituiscono i componenti maggiori del sistema dei fagociti mononucleati, (Mononuclear Phagocyte System MPS), ed hanno una distribuzione ubiquitaria in diversi organi e tessuti. Oltre ai macrofagi tissutali, il sistema MPS include i monociti del sangue, le cellule dendritiche, gli osteoclasti, le cellule della microglia nel sistema nervoso centrale, le cellule di Kupffer nel fegato e le cellule di Langherans nella cute. Le cellule del sistema MPS costituiscono la prima linea di difesa nelle infezioni batteriche e virali e svolgono un ruolo primario nell'immunità naturale. Queste cellule sono, inoltre, in grado di regolare la risposta immune e svolgono un ruolo primario nell'induzione e nel mantenimento del processo infiammatorio. Esse originano nel midollo osseo, probabilmente da un precursore mieloide comune $CD34^+$ che da origine ai monociti del sangue. Successivamente, i monociti migrano in diversi tessuti dove si differenziano in cellule specializzate in seguito ad un'esposizione a diversi fattori microambientali. I macrofagi sono presenti virtualmente in tutti gli organi dove giocano un ruolo importante nelle risposte immuni ed infiammatorie locali, nel danno e nella riparazione tissutale, nella clearance delle cellule apoptotiche e nella sorveglianza antineoplastica.

Anche se i macrofagi residenti nei vari tessuti presentano omologie morfologiche e funzionali, numerose evidenze suggeriscono che esiste una profonda eterogeneità all'interno di questa popolazione cellulare.

I macrofagi sono una popolazione cellulare ubiquitaria nell'uomo e sono responsabili di molteplici e fondamentali processi omeostatici, immunologici ed infiammatori (1,2). La distribuzione in diversi organi e tessuti di tali cellule ne determina il ruolo centrale nella risposta ad agenti esterni (ad es. di tipo infettivo), nelle malattie autoimmuni e nel controllo della crescita neoplastica (3-5). Le cellule dendritiche, le cellule di Langerhans della cute, le cellule di Kupffer del fegato e le cellule della microglia nel sistema nervoso centrale (SNC) condividono con i macrofagi tissutali diverse caratteristiche morfologiche, biochimiche e funzionali. Le specifiche caratteristiche funzionali di tali cellule sono: 1) la capacità di fagocitare microrganismi (ruolo chiave nell'immunità innata), 2) la capacità di processare antigeni e di presentarli ai linfociti T (ruolo chiave nell'immunità acquisita), 3) la sintesi di numerose citochine e chemochine in grado di iniziare e/o di amplificare o terminare la reazione infiammatoria, di promuovere il reclutamento di cellule infiammatorie e di modulare la risposta linfocitaria, 4) la capacità di riconoscere e distruggere cellule neoplastiche. Numerose evidenze sperimentali indicano che i macrofagi tissutali e gli altri elementi cellulari specializzati derivino dai monociti circolanti (6).

I monociti maturano nel midollo osseo e raggiungono, attraverso il circolo ematico, i diversi organi dove, attraverso l'esposizione a specifici fattori locali, si differenziano nei diversi tipi cellulari. È opportuno ricordare che una serie di osservazioni sperimentali suggerisce la possibilità che cellule della linea macrofagica possano svilupparsi anche da cellule staminali presenti in tessuti periferici (7,8).

L'ipotesi della eterogeneità dei monociti e dei macrofagi è stata inizialmente prospettata sulla base di osservazioni al microscopio che avevano consentito di evidenziare la varietà morfologica di questi tipi cellulari (6,9,10). Tuttavia soltanto l'impiego di sistemi efficienti per l'isolamento di tali cellule dai tessuti periferici e lo sviluppo di metodiche adeguate per lo studio delle loro funzioni hanno permesso di identificare alcune specificità funzionali di queste cellule (11,12). Molteplici studi condotti negli ultimi anni nell'animale da esperimento hanno evidenziato significative differenze funzionali tra i macrofagi isolati da organi diversi. Ad esempio, i macrofagi alveolari del polmone sintetizzano maggiori quantità di citochine ed hanno una azione tumoricida più efficace rispetto ai macrofagi della cavità peritoneale (13-15). Al contrario, i macrofagi peritoneali hanno una maggiore capacità di fagocitosi, di attivazione del burst respiratorio e di produzione di ossido nitrico rispetto a quelli polmonari (16,17).

I macrofagi isolati dalla milza e dal timo esprimono particolarmente marcatori implicati nella presentazione dell'antigene e nella costimolazione dei linfociti T (HLA di classe II, CD 80 e CD86)(18,19). Queste osservazioni suggeriscono che fattori locali ed il microambiente tessutale (ad es. fattori di crescita, citochine, stimoli esogeni) possano orientare lo sviluppo e la maturazione funzionale dei macrofagi verso l'attività prevalentemente richiesta in un determinato organo (ad es. difesa contro agenti infettivi, inizio o mantenimento di risposte immuni, sorveglianza tumorale). È opportuno sottolineare che la maggior parte delle osservazioni sulla eterogeneità dei macrofagi deriva da studi condotti nell'animale da esperimento.

Questi dati, in molti casi, non sono estrapolabili ai macrofagi umani. Infatti, esistono sostanziali differenze nel profilo di mediatori proinfiammatori, nella espressione di recettori di membrana e nei meccanismi di attivazione dei macrofagi umani e di quelli degli animali da esperimento finora studiati (ratto e cavia) (6,20). Diverse osservazioni eseguite negli ultimi anni indicano un ulteriore livello di eterogeneità dei macrofagi isolati da uno stesso organo. Ad esempio, a livello polmonare, sono state descritte specificità funzionali per i macrofagi residenti nell'interstizio (macrofagi parenchimali) ed a livello alveolare (21-24). I primi possiedono caratteristiche fenotipiche (recettori di membrana) e biochimiche (produzione di citochine) orientate soprattutto verso l'interazione con i linfociti T e verso la sorveglianza anti-tumorale. I secondi presentano caratteristiche

orientate prevalentemente verso la risposta infiammatoria e verso il danno e la riparazione tissutale.

Il polmone umano contiene inoltre una popolazione cellulare altamente differenziata costituita dalle cellule dendritiche (25). Queste cellule sono cellule particolarmente specializzate nella processazione e presentazione di antigeni ai linfociti T (26,27). Le cellule dendritiche si ritiene derivino dagli stessi precursori dei macrofagi tissutali (monociti circolanti), si differenziano negli organi periferici e, una volta incontrato l'antigene, migrano nei linfonodi loco-regionali per iniziare la risposta immune specifica attraverso l'interazione con linfociti T (28-30).

I macrofagi presenti polmonari rappresentano la popolazione maggiormente studiata dal punto di vista sperimentale.

Queste cellule rappresentano la componente cellulare predominante del sistema immunitario a livello dell'apparato respiratorio di MPS. Tuttavia, i macrofagi costituiscono una popolazione eterogenea distribuita all'interno di due compartimenti: i macrofagi alveolari e macrofagi interstiziali. I primi sono maggiormente rappresentati nelle vie aeree (bronchi ed alveoli) i secondi predominano nel tessuto parenchimale. Differenze morfologiche, fenotipiche e funzionali tra queste due sottopopolazioni sono state osservate nei roditori e nell'uomo. Non esistono tuttavia, ancora evidenze sperimentali in favore di tale eterogeneità fenotipica e funzionale nei macrofagi polmonari umani. I macrofagi polmonari producono un ampio spettro di mediatori tra cui enzimi, mediatori

lipidici, radicali liberi dell'ossigeno, citochine e chemiochine. I macrofagi possono essere attivati da una varietà di stimoli che agiscono su specifici recettori di membrana inclusi i recettori dell'istamina. L'attivazione dei recettori dell'istamina modula diverse funzioni dei macrofagi come l'espressione delle molecole di adesione e l'esocitosi. I macrofagi si trovano spesso in stretta vicinanza con i mastociti nelle vie respiratorie dei pazienti asmatici. L'associazione anatomica tra questi due tipi di cellule suggerisce che i macrofagi polmonari possano essere esposti all'istamina rilasciata localmente da mastociti attivati immunologicamente e possano contribuire al mantenimento e all'evoluzione a lungo termine della flogosi allergica. Numerose evidenze dimostrano che l'interazione dell'istamina con i recettori H₁ e H₂ elicitare risposte che sono spesso divergenti, infatti l'attivazione H₁ pare essere prevalentemente stimolatoria mentre la H₂ pare essere inibitoria nella maggioranza dei casi.

Quindi l'espressione relativa dei recettori H₁ e H₂ potrebbe essere un meccanismo per spiegare l'eterogeneità degli effetti dell'istamina sulle cellule infiammatorie ed immunitarie.

In questo studio abbiamo caratterizzato due popolazioni di macrofagi nel polmone umano, esse differiscono per densità, dimensioni, caratteristiche fenotipiche, morfologia e risposta funzionale ad LPS.

Materiali e metodi

Reagenti e Buffers

LPS (LPS; da Escherichia Coli sierotipo 026: B6), Percoll, microsfere usate come marcatori di densità (range: 1.018-1.098), L-glutamina, soluzione antibiotico-antimicotica (10.000 UI/ml penicillina, 10 mg/m streptomina e 25 µ/m amfotericina B), Tryton X-100, fenoltaleina glucuronide, albumina di siero bovino (BSA) e piperazina-N, N'-bis-2-acido etansulfonico (PIPES) (Sigma, St. Louis, MO). RPMI e siero bovino fetale (FCS) (ICN, Costa Mesa, CA). Interferon- γ (IFN- γ) (PeproTech, London, UK). Gli anticorpi monoclonali FITC-coniugati anti-CD4, CD15, CD16, CD36 (Ortho, Amsterdam, The Netherlands). Gli anticorpi monoclonali FITC-coniugati anti CD1c, CD14, CD44, CD45, CD69 e PE-coniugati anti-CD11b, CD11c, CD33, CD56, CD95; CD130, CD154; HLA-DR (Necton Dickinson, San Jose, CA). Gli anticorpi monoclonali FITC-coniugato anti-CD61 e PE-coniugato anti CD42b (DAKO, Glostrup, Denmark). Gli anticorpi monoclonali IgG₁ FITC-coniugati anti CD38, CD63, CD71 e PE-coniugato anti-CD25 (Immunotech, Marseille, France). Gli anticorpi monoclonali FITC-coniugato anti CD35 e PE-coniugato anti CD117 (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL). Gli anticorpi monoclonali FITC-coniugato anti

CD64 e PE-coniugati anti CD13 e CD86 (Caltag, Burlingame, CA). L'anticorpo monoclinale FITC-coniugato anti CD80 (Serotech Oxford, UK).

L'anticorpo monoclinale PE-coniugato anti-CD40 (Ancel, Bayport MN). PAM-1, un anticorpo monocanale anti-recettore mannosio umano è stato gentilmente donato dal Dr. Silvano Sozzani (Università di Brescia, Italia). L'anticorpo di coniglio anti-fosfo-ERK1/2, l'anticorpo di coniglio anti-fosfo-p38 e l'anticorpo di coniglio anti-ERK1/2 sono stati acquistati da Cell Signaling (Nen England Biolabs, Beverly, MA). L'anticorpo di coniglio anti-p38 (C-20) è stato acquistato da Santa Cruz (Santa Cruz, CA). L'anticorpo d'asino coniugato ala per ossidasi anti-Ig di coniglio (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). Tutti gli altri reagenti sono stati acquistati da Carlo Erba (Milano, Italia). Il PIPES buffer è composto da 25 mM piperazina-N,N'-bis-2acido etansulfonico (PIPES) 110 mM NaCl e 5 mM KCL, pH 7.4. Il PCG buffer è composto di PIPES buffer contenente 1 mM CaCl₂ ed 1 g/l D-glucosio, pH 7.4. Il Glicine buffer è composto di 400 mM glicina e 400 mM NaCl, pH 10.3. Il Lysis buffer (LB) per il Western Blot è composto di 20 mM Tris pH 7.5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 2 mM benzamidina, 10 µg/ml leupeptina, 10 mM NaF, 150 mM NaCl 1 mM Na₃VO₄, 1% Nonidet P-40 e 5% glicerolo.

Isolamento e purificazione di macrofagi polmonari umani.

I macrofagi sono stati isolati dal parenchima polmonare di pazienti sottoposti ad intervento di chirurgia toracica per carcinoma polmonare o dal liquido di lavaggio broncoalveolare (BAL) di pazienti con una singola lesione polmonare, in cui il BAL era effettuato nel bronco controlaterale. Il tessuto macroscopicamente sano è stato tagliato accuratamente con le forbici e lavato abbondantemente con PIPES su tessuto Nytex. Gli elementi cellulari dispersi sono stati centrifugati (800 g, 4°C, 10 min) e dopo il lavaggio il pellet cellulare è stato risospeso in PIPES buffer. Il frazionamento dei macrofagi per densità è stato effettuato mediante centrifugazione su gradiente discontinuo di Percoll. Le cellule, sia del parenchima polmonare, che del BAL sono state stratificate in un gradiente di 25 ml contenente 5 ml di differenti diluizioni di Percoll in Pipes con densità di 1.026 1.039, 1.052, 1.065 e 1.078 e centrifugate per 20 minuti (400 g) a 4°C. Le cellule localizzate su ciascuna interfaccia sono state lavate. Ciascuna frazione è stata nuovamente centrifugata separatamente su un secondo gradiente di densità. Alla fine sono state ottenute due popolazioni di macrofagi. Macrofagi a bassa densità (LDM), fluttuanti tra bande di densità di 1.039 e 1.052 e macrofagi ad alta densità (HDM) fluttuanti tra 1.065 e 1.078. Ciascuna frazione cellulare è stata lavata e risospesa (10^6 cell/ml) in RPMI contenete 5% di FCS 2 mM di L-glutamina e 1% di soluzione antibiotica-antimicotica. Le cellule sono state quindi

incubate in piastre da 24 pozzetti a 37°C in 1 atmosfera di CO₂ al 5% e di aria al 95%. Dopo 12 ore il mezzo è stato rimosso e le piastre lavate 3 volte con RPMI.

La purezza delle popolazioni macrofagiche è stata determinata, per ciascun stadio, mediante colorazione con esterasi α -naftil-acetato. I macrofagi sono stati anche separati aggiungendo 9 parti di Percoll (v/v) ed 1 parte (v/v) di 1.5 M NaCl seguita da centrifugazione a 10.000 g per 15 min. Le cellule sono state sospese in PBS (1 ml) e stratificate su un gradiente continuo e centrifugate (20 min, 400 g a 4°C). Le frazioni di 0.5 ml sono state raccolte e le cellule sono state contate per ciascuna frazione. Sono state usate sfere marcatori di densità come standard esterno in un tubo separato.

Microscopia ottica e analisi morfometrica

Il Cytospin degli LDM e HDM è stato preparato mediante centrifugazione di 20.000 cellule su lastre microscopiche usando un Cytospin 3 della Shandom (Shandom Astmoor UK). Le lastre sono state collocate ad asciugare all'aria e colorate con Diff-Quick (Biomap Milan Italy). La morfologia cellulare è stata valutata attraverso microscopia ottica focalizzandosi sull' omogeneità in ciascuna popolazione macrofagica e sulle differenze tra gli LDM e gli HDM.

Per l'analisi morfometrica le cellule sono state misurate da campi microscopici scelti a caso con un sistema di analisi Videoplan

contatore Zeiss accompagnato con un microscopio Zeiss (630x) ed una macchina fotografica elettronica in bianco e nero Grundig FA 184. Lo strumento riproduce in un monitor le immagini cellulari. Le misurazioni sono state fatte come precedentemente descritte (31).

Microscopia elettronica

Le cellule provenienti dalle frazioni LDM e HDM sono state fissate a temperatura ambiente in gluteraldeide al 25% in buffer 0.1 M di HCL-sodio cacodilato, PH 7.3 per 10 minuti e poi fissate in OsO4 1% nello stesso buffer per 20 minuti. Dopo la colorazione in toto con 1% di uranyl-acetato per 1 ora e la deidratazione con etanolo, le cellule sono state incubate in Poy Bed 812. Le sezioni, colorate in Silver Gray, sono state osservate con microscopia elettronica FEI CM10 o FEI tecnai 12G2.

Analisi di citofluorimetria

L'espressione dei marker di superficie è stata analizzata con immunofluorescenza diretta e citometria a flusso in accordo con il seguente protocollo. I macrofagi freschi isolati sono stati sospesi in

PBS a una concentrazione di 5×10^6 /ml. Cinquanta microlitri di sospensione cellulare sono stati incubati (4°C, 20 min) con una quantità saturante di anticorpi per abbassare l'alta autofluorescenza spontanea dell'HDM, i pellet sono stati lavati 2 volte con PBS risospesi in 0.2 ml di soluzione Crystal Violet saturata e incubati per 5 minuti a 22°C. Il software è stato usato per acquisizioni dell'analisi in accordo con una procedura dual-color. I valori sono stati espressi come percentuali di cellule positive e negative.

Il cut-off tra positivo e negativo è stato settato usando un anticorpo di controllo dello stesso isotipo. Le cellule sono state ascritte a positive quando la loro intensità di fluorescenza era più grande rispetto a quella osservata nel 99% delle cellule colorate con controlli negativi. L'intensità di fluorescenza è stata anche analizzata registrando l'intensità di fluorescenza media espressa in unità lineari. La fluorescenza di back ground è stata determinata analizzando gli anticorpi con l'isotipo di controllo.

Incubazione delle cellule

I macrofagi aderenti alle piastre a 24 pozzetti sono stati incubati (6-24 ore, 37°C) in RPMI contenete concentrazioni crescenti di LPS (0.1 a 10µg/ml). Negli esperimenti per la produzione di IL-12 le cellule erano preincubate (37°C, 1 ora) con INF γ (1.000 U/ml) e quindi

stimolate con LPS. Alla fine degli esperimenti il soprannatante è stato rimosso, centrifugato due volte (1.000 g, 4°C, 5 min) e conservato fino a 71 ore a -80°C per la successiva determinazione del rilascio di IL-6, IL-10, IL-12, TNF α . Dopo ogni esperimento un'aliquota di cellule è stata colorata con il Trypan blu per determinare la vitalità cellulare. Le cellule rimanenti nelle piastre sono state lisate con 0.1% di Triton X-100 per la determinazione del contenuto totale di proteine cellulari.

Dosaggio delle proteine e della di β -glucuronidasi

Il contenuto totale di proteine cellulari e di β -glucuronidasi è stato determinato, come descritto in precedenza (32), in aliquote cellulari lisate con 0.1% Triton X 100. La curva standard dell'attività di β -glucuronidasi è stata preparata come standard, la β -glucuronidasi standard tipo H1 da *Helix pomata*.

Dosaggio delle citochine

Il rilascio di IL-6, IL-10, IL-12 e TNF α nel supernatante delle culture macrofagiche è stata misurato in duplicato mediante Elisa, in accordo alle istruzioni de produttore. I range di linearità dei saggi erano tra 6.25 e 200 pg/ml (IL-6), 25 e 800 pg/ml (TNF α) 12.5 e 400 pg/ml (IL-10), 6.25 e 200 pg/ml (IL-12). Dal momento che il numero di

macrofagi può variare in ciascun pozzetto e in differenti esperimenti, i risultati sono stati normalizzati per il contenuto di proteine totali di ciascun campione.

Isolamento di mRNA cellulare e RT-PCR

L'RNA totale è stato estratto dai macrofagi polmonari umani usando il sistema di isolamento di RNA totale SV 96, in accordo con le istruzioni del produttore, e trattate con DNasi e RNasi free.

La trascrizione inversa è stata fatta con 5 mM MgCL₂ un primer di oligod(t)₆ e la trascrittasi inversa MuLV, come da istruzioni del produttore, in un termociclo. Il cDNA è stato normalizzato per la β actina e equivalenti di cDNA ottenuti da popolazioni macrofagiche di polmone umano sono state amplificate per TLR4 (isoforma 1-3) e TLR4 (isoforma 2) usando i primer specifici disegnati in accordo alle sequenze pubblicate. Le sequenze di primer erano TLR4 (isoforme 1-3) da primer a valle 5-AGA ACT GCA GGT GGA TT-3 e primer a monte 5-AAA CTC TGG ATG GGG TTT CC-3 e TLR4 (isoforma 2) primer a valle 5-AGT GAG GAT GAT GCC AGG AT-3 e primer a valle 5-TTC ATG CCA GCT CTG TG-3. I primer specifici per MyD88 e MD-2 sono stati preparati come riportato. Il protocollo di

amplificazione consisteva di 30 cicli organizzati come segue: denaturazione, 1 minuto a 95°C appaiamento, 1 minuto a 54 °C per TLR4 55°C per Myd88 e 56°C per MD-2; allungamento, minuti a 72°C. Un'allungamento finale è stato fatto a 72°C per 10 minuti. I prodotti della PCR insieme con DNA usato come dimensione standard sono stati separati su un gel di agarosio al 2% colorati con etidio bromuro e fotografati. Una PCR quantitativa real-time è stata fatta usando iCycler SYBR Green e i primer TLR4 (1 e 3) e TLR4 (2) come descritto sopra.

Fosforilazione delle chinasi ERK1/2 e p38

La fosforilazione della MAP chinasi è stata fatta come descritto precedentemente (33). I macrofagi purificati sono stati risospesi in PCG buffer. Le cellule (10^6 per campione) sono state incubate (37°C, 1-120 min) con 1 µg/ml di LPS. Alla fine dell'incubazione le reazioni sono state fermate aggiungendo Pipes buffer ghiacciato e i campioni microcentrifugati per 30 secondi. I pellets cellulari sono stati immediatamente lisati in lysis buffer. I lisati cellulari sono stati tenuti in ghiaccio per 20 min e quindi centrifugati per 15 min a 4°C. Il supernatante è stato recuperato come un estratto proteico contenente componenti di cellule lisate senza nuclei e diluito in sample buffer di elettroforesi ESB contenete 5 % 2-ME. Le proteine sono state separate

su di un gel Bis-Tris al 10% e trasferite su una membrana di nitrocellulosa. Dopo l'immersione tutta la notte in TBDT (50 mM tris pH 7.5, 150 mM NaCl e 0.05%) contenente il 4% di BSA le membrane sono state lavate tre volte 10 minuti ciascuna con TBST e quindi blottate a 22°C 2 ore con anticorpi anti-fosfo ERK1/2 o anti-fosfo-p38. Dopo il lavaggio le membrane sono state incubate (22°C, 1 ora) con anticorpi anti immunoglobuline di coniglio coniugati con HRP. Le membrane sono state lavate 4 volte e il legame membrana-anticorpo anti Ig di coniglio è stato visualizzato con detection reagent ECL western blotting e detection film per la luminescenza HyperECL. Sebbene il confronto è stato fatto sulle basi di un ugual numero di cellule e membrane sono state strippate (24 ore a 4°C) con lo stripping buffer e blottate con anticorpi anti ERK1/2 o anticorpi anti p38 per stabilire il contenuto uguale di proteine di ciascun campione.

Analisi statistica

I dati sono stati espressi come media \pm ES del numero di esperimenti indicato. La *p* values è stata determinata usando il *test t di Student*.

Risultati

Caratteristiche morfologiche, morfometriche e biochimiche delle popolazioni di macrofagi umani.

La dispersione meccanica dal tessuto macroscopicamente sano di polmone umano consente di ottenere una popolazione di macrofagi pari a $5.63 \pm 1.01 \times 10^6$ macrofagi per grammo di tessuto con una purezza del $65.4 \pm 2.3\%$ (n=10). La centrifugazione delle cellule disperse dal polmone umano su un gradiente di densità discontinuo evidenziava chiaramente la presenza di due bande di cellule all'interfaccia tra le densità di 1.039 e 1.052 (LDM) e tra 1.065 e 1.078 (HDM) (Figura 1). Una chiara separazione delle due bande di cellule è stata ottenuta in preparazioni polmonari ottenute da 20 donatori diversi. Le due popolazioni cellulari sono ricche di macrofagi (purezza tra 75% e 87%). I macrofagi nelle due popolazioni sono stati ulteriormente purificati (95-97% di purezza) mediante gradiente discontinuo. Centrifugazioni successive su gradiente confermavano che ciascuna popolazione manteneva le proprie caratteristiche di densità. In esperimenti separati i macrofagi polmonari sono stati anche frazionati usando gradienti continui anziché discontinui. La Figura 2 riporta i dati di cinque differenti preparazioni polmonari. Vi è una chiara distribuzione bimodale di macrofagi: una popolazione con densità tra 1.033 e 1.049 (colonna bianca) e un'altra con densità tra 1.062 e 1.087 (colonna nera).

Ciascuna popolazione manteneva le stesse caratteristiche di densità dopo incubazione a 37°C per 24 ore indicando che questa è una caratteristica stabile ed è mantenuta dalle cellule durante le colture a breve termine.

Le analisi di microscopia ottica mostrano che le due popolazioni macrofagiche sono morfologicamente differenti (Fig. 3). Gli LDM presentano un nucleo rotondo ed un citoplasma esteso colorabile poco, è in gran parte occupato da vacuoli. Gli HDM comprendono per la maggior parte cellule piccole con nuclei a ferro di cavallo e citoplasma fortemente basofilo, che alcune volte mostra una chiara area perinucleare di Golgi. Inclusioni di carbone sono evidenti in diverse cellule di entrambe le popolazioni.

In microscopia elettronica, gli HDM mostrano dispersi nel citoplasma granuli elettrondensi, spesso associati ad apparati di Golgi ben sviluppati. (Fig. 4). I granuli corrispondono a lisosomi primari e sono ridotti negli LDM dove sono sostituiti da vacuoli di varia grandezza che occupano l'intero citoplasma. Questi vacuoli contengono piccole vescicole e sono identificabili come lisosomi secondari (Fig 4). Occasionalmente si osserva la fusione di granuli primari con vescicole. Questi dati ultrastrutturali confermano che gli LDM e gli HDM sono morfologicamente differenti e suggeriscono che gli LDM possono rappresentare macrofagi attivati.

La Tabella 1 riporta i parametri morfometrici e biochimici delle due popolazioni macrofagiche. Gli HDM costituiscono la maggioranza ($65.4 \pm 6.5\%$) dei macrofagi isolati dalla digestione

meccanica del tessuto polmonare mentre la rimanente quota ($34.6 \pm 6.5\%$) è rappresentata dagli LDM. Gli LDM hanno un'area cellulare ed un perimetro maggiore rispetto agli HDM. I due subset di macrofagi polmonari hanno contenuto simile di proteine cellulari totali e dell'enzima β glicuronidasi (Tab 1).

I macrofagi purificati dal tessuto polmonare verosimilmente includono cellule che provengono sia dagli alveoli che dall'interstizio. Un precedente report indicava che alcune caratteristiche morfologiche di macrofagi ottenute dalla frazione di lavaggio (alveolari) o dalla digestione enzimatica (interstiziali) dal tessuto polmonare umano potrebbero essere simili a quelle osservate rispettivamente negli LDM e negli HDM (34). Il punto cruciale era pertanto stabilire se gli LDM e gli HDM potessero rappresentare, rispettivamente, macrofagi alveolari ed interstiziali. Per tale motivo, macrofagi umani purificati dal lavaggio broncoalveolare sono stati frazionati attraverso gradienti discontinui. Le preparazioni ottenute da sette BAL di diversi pazienti contenevano $6.03 \pm 0.91 \times 10^6$ macrofagi e mostravano costantemente una separazione tra HDM e LDM (Figura 5).

Tuttavia la distribuzione relativa di macrofagi nel BAL in LDM e HDM era differente rispetto a quella ottenuta dalla dispersione meccanica del tessuto polmonare. La maggior parte dei macrofagi appartenevano, infatti, alla popolazione degli LDM (67%) del totale.

Caratterizzazione fenotipica di popolazioni di macrofagi umani

Per verificare differenze fenotipiche tra HDM e LDM abbiamo esaminato in sei preparazioni l'espressione di diverse molecole di superficie delle due sottopopolazioni macrofagiche. I principali marker dei macrofagi (CD11b, CD11c, CD44, CD71, HLA-DR e il recettore per il mannosio) sono altamente espressi in entrambe e popolazioni (Tab 2). La bassa espressione di CD1a, CD4, CD14 CD56 CD117 indica che la contaminazione da altre cellule (cellule dendritiche, linfociti T, monociti, cellule NK, eosinofili e mastociti) era inferiore al 5%. Interessante è l'osservazione che le due popolazioni mostrano una differente espressione di alcuni rilevanti marker di superficie (Tab 3). In sei diverse preparazioni di macrofagi una piu' alta percentuale di HDM esprimeva CD40, CD45 e CD86, mentre una maggiore espressione di CD63⁺ e CD64⁺ è stata ritrovata sugli LDM. La figura 6 mostra gli skreen rappresentativi della citofluorimetria illustrando l'espressione differente di CD63 (pannello A) maggiormente espressi su LDM e di CD68 (pannello B) maggiormente espresso sugli HDM. Questi risultati indicano che ci sono importanti differenze nell'espressione di molecole di superficie tra le due popolazioni di macrofagi polmonari umani

Il rilascio di citochine indotto da LPS in popolazione di macrofagi polmonari umani

In una serie successiva di esperimenti abbiamo esaminato le risposte delle due sottopopolazioni al lipopolisaccaride (LPS), il maggiore componente proinfiammatorio dei batteri Gram negativi ed uno dei piu' potenti induttori della produzione di citochine da parte dei macrofagi polmonari umani (35). I macrofagi sono stati stimolati con LPS di *E. Coli.* (0.1-10 µg/ml) ed è stato determinato il rilascio di citochine proinfiammatorie (TNF α e IL-6) e immunomodulanti (IL-10 e IL-12). Le figure 7 e 8 mostrano che non ci sono significative differenze nella produzione spontanea di IL-6 e TNF α tra gli LDM e HDM. LPS induce la secrezione, concentrazione-dipendente, di IL-6 (Fig. 7) e TNF α (Fig. 8) dagli HDM e LDM. E' importante, tuttavia, sottolineare che, a tutte le concentrazioni testate, LPS induceva un rilascio di IL-6 e TNF α da HDM significativamente maggiore di quello indotto dagli LDM (Fig 5 B).

Le IL-10 e IL-12 sono le maggiori citochine prodotte dai macrofagi e sono coinvolte nella regolazione delle risposte immuni (36). La figura 9 mostra che non vi sono significative differenze nel rilascio spontaneo di IL-10 tra LDM e HDM (controllo). LPS stimola il rilascio di IL-10 in modo concentrazione dipendente sia dagli LDM che dagli HDM. A tutte le concentrazioni testate LPS induce un rilascio 2-3 volte maggiore di IL-10 dagli HDM piuttosto che dagli LDM.

LPS è uno stimolo efficace per la produzione di IL-12 dai macrofagi polmonari solo quando le cellule sono preincubate con INF γ (36). Anche in queste condizioni sperimentali, i macrofagi polmonari rilasciano quantità di IL-12 molto più basse (in range di pg) rispetto alle altre citochine (Fig 10). LPS induce chiaramente un rilascio, concentrazione dipendente, di IL-12 da HDM mentre è molto meno efficace sugli LDM (Fig 10). Inoltre alle concentrazioni più alte di LPS (1-10 $\mu\text{g/ml}$) il rilascio di IL-12 dagli LDM era molto basso e non era incrementato aumentando le concentrazioni di LPS (superiori a 10 $\mu\text{g/ml}$) (dati non mostrati).

I risultati esposti finora riguardanti il rilascio di citochine sono stati ottenuti stimolando le cellule con LPS per 24 ore per favorire un appropriato confronto tra HDM e LDM. Comunque, precedenti dati del nostro gruppo indicano che le cinetiche di rilascio delle citochine proinfiammatorie IL-6 e TNF α sono più veloci rispetto a quelle delle citochine immunomodulatorie IL-10 e IL-12. Per valutare se le differenze nelle cinetiche di secrezione potrebbero spiegare le differenze osservate nel rilascio di citochine abbiamo osservato il time course di IL-6 e IL-10 secrete da HDM e LDM. Questi esperimenti confermano che il rilascio di IL-6 è maggiore di quello di IL-10 in entrambe le popolazioni (dati non mostrati) e dimostrano che non ci sono significative differenze nella cinetica di rilascio delle citochine tra HDM e LDM.

Espressione di TLR4, MD-2 e MyD88 nelle popolazioni di macrofagi umani.

L'attivazione dei macrofagi in risposta ad LPS è mediata dall'attivazione di specifici recettori definiti Toll-like receptor 4 (TLR4) (37). E' dimostrato che una proteina accessoria, MD-2, è fisicamente associata con TLR4 a formare un complesso attivo TLR4/MD-2 che funziona come coattivatore recettoriale sulla superficie macrofagica (38). La trasduzione del segnale attivata dal complesso LPS- TLR4/MD-2 coinvolge un altro adattatore molecolare MyD88 (39). E' stato dimostrato che una ridotta espressione di TLR4-MD-2 o MyD88 potrebbe ridurre la risposta dei macrofagi ad LPS (40, 41). Abbiamo, pertanto verificato se la differente risposta ad LPS di LDM e HDM fosse dipendente da una diversa espressione di TLR4 MD-2 o MyD88. La figura 11 mostra i prodotti specifici di amplificazione con RT-PCR per la β actina (prima colonna), per TLR4 (seconda e terza colonna), MD-2 (quarta colonna) e MyD88 (quinta colonna) di un esperimento rappresentativo di tre effettuati su campioni di differenti donatori. L'mRNA per TLR4, MD2 e MyD88 era espresso sia negli LDM che negli HDM senza differenze significative tra le due popolazioni. Per valutare meglio l'espressione di TLR4 nelle due popolazioni macrofagiche abbiamo utilizzato una tecnica di RT-PCR quantitativa per identificare le varie isoforme di TLR4. In tre differenti preparazioni di macrofagi polmonari la relativa espressione di varie isoforme di TLR4 in HDM verso LDM era

1.74±0.55 (isoforma 1-3) e 1.59±0.39 rispettivamente. Questi valori non sono statisticamente differenti. Questi risultati dimostrano che le differenze nella produzione di citochine tra HDM e LDM non sono associate a variazioni nell'espressione di TLR4, MD-2 e MyD88.

Attivazione delle chinasi P38 ed ERK1/2 negli HDM e LDM

L'attivazione del complesso TLR4/MD2 da parte di LPS porta all'attivazione di vari pathway di trasduzione. In particolare la trascrizione dei geni delle citochine, indotta da LPS, coinvolge l'attivazione delle chinasi ERK1/2 e della proteina chinasi stress attivata p38, regolate da segnali extracellulari (42). Per verificare l'ipotesi che LPS potesse attivare in maniera differenziale ERK1/2 e/o p38 negli HDM e negli LDM abbiamo stimolato le due popolazioni macrofagiche con LPS (1 µg/ml). La reazione è stata arrestata a vari tempi e gli estratti citosolici sono stati sottoposti a western blot con anticorpi anti-fosfo ERK1/2 o con anticorpi anti-fosfo p38. La figura 12 mostra che LPS induce la fosforilazione di p38 (pannello A) ed ERK 1/2 (pannello B) sia negli HDM che negli LDM. Tuttavia, le cinetiche di fosforilazione di queste chinasi erano significativamente differenti nelle due popolazioni. In tre preparati diversi l'attivazione delle chinasi p38 (pannello A 1° gel) negli HDM era evidente dopo cinque minuti d'incubazione e aveva un picco dopo 30 minuti, mentre negli LDM (pannello A 3° gel) iniziava dopo 30 minuti di incubazione ed aveva un picco dopo 60 minuti. Allo stesso modo il picco di

attivazione della chinasi ERK1/2 avveniva dopo 60 minuti negli HDM (pannello B 2° gel) ma solo dopo 90 minuti negli LDM (pannello B 3° gel).

Ritestando le membrane con anticorpi anti ERK1/2 e anti p 38 (forme non fosforilate) si è confermato un ugual carico di proteine (Fig 12 pannello A e B 2 e 4 gel). Questi risultati indicano che la fosforilazione delle chinasi ERK1/2 e p38 è significativamente ritardata negli LDM rispetto agli HDM.

Discussione

In questo studio abbiamo dimostrato che il polmone umano contiene almeno due sottotipi di macrofagi tissutali che differiscono in morfologia, morfometria, fenotipo e risposta funzionale ad LPS. La densità di distribuzione di macrofagi polmonari è chiaramente bimodale in gradienti continui ed è mantenuta durante colture in vitro a breve termine. L'eterogeneità di densità è stata riportata in varie cellule inclusi i monociti, neutrofili, eosinofili, mastociti, e macrofagi (43). Si ritiene che tali differenze riflettano variazioni nello stato di differenziazione, maturazione o di attivazione. Gli studi di densità sui macrofagi polmonari umani sono stati condotti sia con cellule provenienti dal BAL sia con cellule tissutali ottenute con digestione enzimatica. In questo studio abbiamo utilizzato cellule ottenute per digestione meccanica onde evitare gli effetti possibili del trattamento enzimatico sulle proprietà biochimiche, fenotipiche e funzionali delle cellule. E' noto che il polmone di mammifero contiene almeno due frazioni macrofagiche alveolare ed interstiziale. Gli studi condotti su cellule umane o murine indicano che alcune caratteristiche dei macrofagi alveolari ed interstiziali possono sovrapporsi a quelle degli LDM ed HDM, rispettivamente (44). Tuttavia, numerose osservazioni in questo studio supportano l'ipotesi che LDM e HDM non corrispondano strettamente a macrofagi alveolari ed interstiziali.

I nostri dati sulla distribuzione relativa degli HDM e LDM suggeriscono, comunque, che gli LDM siano preferenzialmente localizzati negli spazi alveolari mentre gli HDM sono maggiormente posizionati nell'interstizio.

Le due popolazioni (LDM e HDM) esprimono alti livelli dei maggiori marker macrofagici quali CD11, CD44, CD71 e HLA-DR e il recettore per il mannosio. L'espressione di CD14 su meno del 5% delle cellule indica che le due popolazioni contengono macrofagi differenziati con una trascurabile contaminazione di monociti. E' interessante sottolineare che gli LDM e gli HDM differiscono nell'espressione di molecole di superficie coinvolte in funzioni macrofagiche rilevanti. Una piu' alta percentuale di LDM esprime l'Fc γ RI (CD64) e CD63, due marker di attivazione cellulare. Al contrario, un maggiore numero di macrofagi nella popolazione HDM esprime CD40 e CD86, molecole che sono principalmente coinvolte nell'interazione con le cellule T.

Studi effettuati sulle popolazioni macrofagiche polmonari nell'uomo e di animali da esperimento hanno condotto all'ipotesi che macrofagi ipodensi, maggiormente localizzati negli spazi alveolari siano cellule in uno stato preattivato e prevalentemente coinvolte nella fagocitosi e nell'infiammazione (45). Al contrario, macrofagi piu' densi sono considerati cellule meno mature, localizzati nell'interstizio e coinvolte principalmente nella regolazione delle cellule T, nella presentazione dell'antigene e nel rimodellamento tissutale (45).

La nostra osservazione che gli LDM esprimono maggiormente marker di attivazione (CD64 e CD63) mentre gli HDM esprimono maggiormente molecole costimolatorie CD40 e CD86 è in linea con questa ipotesi. Queste osservazioni sono anche confermate dai dati ultrastrutturali che mostrano un'abbondanza di lisosomi primari negli HDM e secondari negli LDM.

Uno degli obiettivi di questo studio è stato quello di esplorare la responsività dei due subset di macrofagi alla stimolazione con LPS a cui queste cellule potrebbero essere esposte in vivo. L'LPS, il principale costituente della membrana esterna del Gram negativi, induce la sintesi e la secrezione di citochine da macrofagi e monociti, responsabili delle manifestazioni cliniche dello shock settico e di vari disordini infiammatori cronici (35). In conseguenza del legame a CD14 sulle membrane cellulari di cellule monolitiche, l'LPS è presentato al TLR4, il componente di segnale del complesso recettoriale in presenza delle proteine extracellulari MD-2. Sebbene gli eventi molecolari che comportano il riconoscimento di LPS non sono stati del tutto determinati, la maggior parte delle evidenze suggerisce che LPS si lega al complesso TLR4/MD2/CD14. I nostri dati di citofluorimetria indicano che entrambe le popolazioni di macrofagi esprimono bassi livelli di CD14, il che è in accordo con gli studi precedenti sui macrofagi alveolari umani. Tuttavia entrambe le popolazioni HDM e LDM sintetizzano varie citochine quando vengono attivate da LPS di *E. Coli*.

Questa interessante osservazione puo' essere spiegata in diversi modi:

1) CD14 ed altri recettori non ancora conosciuti possono favorire l'attivazione di TLR4 LPS-indotta. Esistono evidenze che i macrofagi isolati da topi knock-out per CD14 possono essere attivati da batteri Gram negativi attraverso l'attivazione di CD11/CD18 e TLR4 (46). In aggiunta topi con deficit di CD14 mostrano ancora una risposta significativa ad LPS (47). Questi dati indicano che altre molecole possono compensare la mancanza di CD14 e favorire l'attivazione indotta da LPS.

2) Non è possibile escludere la possibilità che la bassa espressione di CD14 possa essere sufficiente a formare un complesso attivo TLR4/MD2/CD14.

3) Una diretta interazione di LPS con il complesso TLR4/MD2 in assenza di CD14 è stata recentemente riportata (40) ed è ipotizzabile che questa interazione potrebbe anche avvenire sui macrofagi polmonari umani.

Sebbene attivati in maniera differente i macrofagi producono diversi profili di citochine. Una originale osservazione del nostro studio è che gli LDM e gli HDM producono differenti quantità di citochine in seguito all'attivazione con lo stesso stimolo. Infatti, gli HDM stimolati con LPS producono livelli significativamente piu' alti di citochine proinfiammatorie (TNF α e IL-6) rispetto agli LDM. Queste differenza è piu' spiccata nel caso di IL-10 e IL-12. Quest'ultima osservazione indica che differenze nell'intensità

piuttosto che nella qualità delle risposte all'LPS è una delle caratteristiche principali dell'eterogeneità dei macrofagi polmonari.

Nel caso di questo studio sono stati esplorati vari meccanismi che potrebbero spiegare la differente produzione di citochine da parte di HDM e LDM in risposta a LPS. La sintesi di citochine ridotta o abolita nei macrofagi attivati da LPS è stata riportata in cellule mancanti del gene per TLR4 (40). Inoltre, MD-2 e la molecola MyD88 sono cruciali per una risposta efficiente ad LPS. I nostri dati mostrano che non c'è differenza nell'espressione delle isoforme di TLR4 MD-2 e MyD88 tra HDM e LDM. Appare pertanto evidente che i cambiamenti nelle trascrizioni di queste molecole non possono essere responsabili per le differenti risposte ad LPS. L'iporesponsività di LDM all' LPS di *E. Coli* potrebbe tuttavia essere mediata dall'espressione difettiva di uno dei diversi trasduttori chiamati in gioco dopo l'arruolamento di TLR4 da parte di LPS. Il segnale attivato a valle nei macrofagi stimolati da LPS include il pathway MAP chinasi ERK1/2 p38 JNK (42). Questi pathway attivano vari fattori nucleari coinvolti nel controllo dell'espressione del gene delle citochine. L'attivazione della chinasi p38 ed ERK1/2 è necessaria per la produzione di citochine dai macrofagi alveolari umani (42). LPS è in grado di attivare ERK1/2 e p38 sia negli HDM che negli LDM. Le cinetiche di attivazione sono tuttavia differenti nelle due popolazioni, in quanto la fosforilazione di entrambe le chinasi è significativamente ritardata negli LDM. Le variazioni cronologiche di attivazione delle MAP chinasi sono state associate con differenze nelle mobilitazioni

dei fattori di trascrizione per le citochine nei macrofagi (48). Le cinetiche dell'attivazione delle MAP chinasi in risposta ad uno stimolo dipende dallo stato di maturazione delle varie linee cellulari e monociti/macrofagi.

Queste osservazioni suggeriscono che l'attivazione delle chinasi ERK1/2 e p38 possa essere modulata a seconda dello stimolo usato e dello stato di maturazione cellulare. Anche se i nostri dati non provano in maniera conclusiva che il ritardo dell'attivazione di MAP chinasi sia responsabile della ridotta produzione di citochine da parte di LDM l'alterazione in queste vie di segnale potrebbe spiegare l'iporesponsività di LDM a LPS. Sebbene l'LPS rivela solo differenze quantitative è possibile che altri stimoli possano rivelare differenze qualitative di risposta tra HDM e LDM. Questa ipotesi è in accordo con alcuni dati pubblicati precedentemente dal nostro gruppo che mostravano che l'istamina induce distinti profili di risposta al calcio nei macrofagi polmonari umani. Questi differenti profili di risposta al calcio potrebbero riflettere sia l'attivazione di diverse popolazioni macrofagiche o differenze qualitative nell'espressione del recettore H₁ per l'istamina sui macrofagi. Questo assume una notevole rilevanza alla luce della presente dimostrazione di due distinte sottopopolazioni di macrofagi polmonari. Ulteriori studi saranno necessari per valutare l'espressione di selettivi recettori per l'istamina nelle due sottopopolazioni di macrofagi polmonari.

L'evidenza che gli HDM e gli LDM differiscono nei parametri di morfologia/morfometria, fenotipo e risposta ad LPS è fortemente a

favore di una reale distinzione tra queste due popolazioni cellulari e dell'esistenza in vivo di differenti subsets di macrofagi con differenti caratteristiche funzionali.

Ulteriori studi sono necessari per stabilire se gli HDM possono diventare LDM in vivo o in vitro.

La possibilità che i macrofagi polmonari possano evolvere da un tipo quiescente (HDM) a una variante attivata (LDM) è particolarmente attraente. Questa maturazione potrebbe generare una popolazione di cellule con fenotipi e funzioni diverse. Le implicazioni cliniche dell'eterogeneità dei macrofagi polmonari non sono conosciute ma i nostri dati suggeriscono che due popolazioni di macrofagi possano partecipare a diverse fasi del processo infiammatorio e delle risposte immuni nel polmone umano.

Bibliografia

1. Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987; 79:319-26.
2. Johnston RB. Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages. *N Engl J Med* 1988; 318:747-52.
3. Adams DaH, TA. The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol* 1984; 2:283-318.
4. Hamilton TaA, DO. Mechanism of macrophage-mediated tumor injury. In: den Otter W R, ET, ed. *Tumor Immunology. Mechanisms, diagnosis, therapy*. Amsterdam: Elsevier, 1987:89-127.
5. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* 1992; 13:265-70.
6. Rutherford MS, Witsell A, Schook LB. Mechanisms generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited. *J Leukoc Biol* 1993; 53:602-18.

7. Sawyer RT, Strausbauch PH, Volkman A. Resident macrophage proliferation in mice depleted of blood monocytes by strontium-89. *Lab Invest* 1982; 46:165-70.
8. Metcalf D, Elliott MJ, Nicola NA. The excess numbers of peritoneal macrophages in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transgenic mice are generated by local proliferation. *J Exp Med* 1992; 175:877-84.
9. Forster O, Landy, M. Heterogeneity of mononuclear phagocytes. New York: Academic Press, 1981:1-82.
10. Witsell AL, Schook LB. Macrophage heterogeneity occurs through a developmental mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:1963-7.
11. Pirami L, Stockinger B, Corradin SB, et al. Mouse macrophage clones immortalized by retroviruses are functionally heterogeneous. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:7543-7.
12. Ricciardi-Castagnoli P, Paglia P. New tools for investigating macrophage differentiation. *Res Immunol* 1992; 143:101-6.
13. Colotta F, Polentarutti N, Bersani L, Poli G, Mantovani A. Rapid killing of actinomycin D-treated tumor cells by mononuclear

phagocytes: characterization of effector cells in mice. *J Leukoc Biol* 1986; 39:205-21.

14. Tachibana K, Chen GJ, Huang DS, Scuderi P, Watson RR. Production of tumor necrosis factor alpha by resident and activated murine macrophages. *J Leukoc Biol* 1992; 51:251-5.

15. Becker S, Warren MK, Haskill S. Colony-stimulating factor-induced monocyte survival and differentiation into macrophages in serum-free cultures. *J Immunol* 1987; 139:3703-9.

16. Caignard A, Martin MS, Hammann A, Martin F. Heterogeneity of the rat macrophage antigenic specificity of resident peritoneal and pleural macrophages. *Cell Mol Biol* 1985; 31:41-7.

17. Leu RW, Leu NR, Shannon BJ, Fast DJ. IFN-gamma differentially modulates the susceptibility of L1210 and P815 tumor targets for macrophage-mediated cytotoxicity. Role of macrophage-target interaction coupled to nitric oxide generation, but independent of tumor necrosis factor production. *J Immunol* 1991; 147:1816-22.

18. Walker WS. Origins of macrophage diversity: functional and phenotypic analysis of cloned populations of mouse splenic macrophages. *Cell Immunol* 1987; 107:417-32.

19. McCormack JM, Sun D, Walker WS. A subset of mouse splenic macrophages can constitutively present alloantigen directly to CD8⁺ T cells. *J Immunol* 1991; 147:421-7.
20. Balter MS, Toews GB, Peters-Golden M. Different patterns of arachidonate metabolism in autologous human blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 1989; 142:602-8.
21. Bar-Eli M, Territo MC, Cline MJ. The progeny of a single progenitor cell can develop characteristics of either a tissue or an alveolar macrophage. *Blood* 1981; 57:95-8.
22. Sorg C. Macrophages in acute and chronic inflammation. *Chest* 1991; 100:173S-175S.
23. Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 1994; 55:410-22.
24. Triggiani M, Oriente A, Seeds MC, Bass DA, Marone G, Chilton FH. Migration of human inflammatory cells into the lung results in the remodeling of arachidonic acid into a triglyceride pool. *J Exp Med* 1995; 182:1181-90.

25. Sozzani S, Sallusto F, Luini W, et al. Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines. *J Immunol* 1995; 155:3292-5.
26. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994; 179:1109-18.
27. Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, et al. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 1998; 161:1083-6.
28. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 1997; 9:10-6.
29. D'Amico G, Bianchi G, Bernasconi S, et al. Adhesion, transendothelial migration, and reverse transmigration of in vitro cultured dendritic cells. *Blood* 1998; 92:207-14.
30. Piemonti L, Monti P, Allavena P, et al. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol* 1999; 162:6473-81.

31. de Rosa G., Vetrani A., Zeppa P., Zabatta A., Barra E., Gentile R., Fulciniti F., Troncone G., di Benedetto G., and L. Palombini 1990. Comparative morphometric analysis of aggressive and ordinary basal cell carcinoma of the skin. *Cancer* 65:544
32. Triggiani M., F. Granata, A. Oriente, V. De Marino, M. Gentile, C. Calabrese, C. Paumbo and G. Marone 2000. Secretory phospholipases A₂ induce β -glucuronidase release and IL- production from human lung macrophages. *J Immunol* 164:4908
33. Triggiani M., F. Granata, A. Oriente, M. Gentile, A. Petraroli, B. Balestrieri, and G. Marone 2002. Secretory phospholipases A₂ induce cytokine release from blood and synovial fluid monocytes. *Eur J Immunol* 32:67
34. Fathi M., A. Johansson, M. lundborg, L. Orre, C. m. Skold, and P. Camner 2001. Functional and morphological differences between human alveolar and interstitial macrophages. *Exp Mol Pathol* 70:77
35. Medzhitov R., and C. Janeway, Jr 2000. Innate immunity. *N Engl J Med* 343:338.
36. Trinchieri G. 1997. Cytokine acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- γ). *Curr Opin Immunol* 9:17

37. Lien E., T. K. Means, H. Heine, A. Yoshimura, S. Kusumoto, K. Fukase, M. J. Fenton, M. Oikawa, N. Qureshi, B. Monks, R. W. Finberg, R. R. Ingalls and D. T. Goenbock 2000. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 105:497
38. Shimazu R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, and M. Kimoto. 1992 MD_2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189:1777
39. Janssens S., and R Beyaert 2002. A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends Biochem Sci* 27:474
40. Qureshi S. T., L. Lariviere, G. Leveque, S. Clermont, K. J. Moore, P. Gros, and D. Malo. 1999 Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 189:615
41. Kawai T., O. Adachi, T. Ogawa; K. Takeda, and S. Akira 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11:115
42. Carter A. B., M. M. Monick, and G. W. Hunninghake 1999. Both Erk and p38 kinase are necessary for cytokine gene transcription. *Am J Respir Cel Mol Biol* 20:751

43. Rutherford M. S., A. Wistell, and L. B. Schook 1993. Mechanism generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited. *J Leukoc Biol* 53:602
44. Wistell A. L., and L. B. Schook 1991. Macrophages heterogeneity occurs through a developmental mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1963
45. Murphy M. A., and H. B. Herscovitz 1984. Heterogeneity among alveolar macrophages in humoral and cell-mediated immune responses: separation of functional subpopulations by density gradient centrifugation on Percoll. *J Leukoc Biol* 35:39
46. Yang H., D. W. Young, F. Gusovsky, and J. C. Chow. 2000 Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll-like receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogenactivated protein kinases and Elk-1. *J Biol Chem* 275-20861
47. Poltorak A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. V. Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Siva, C. Galanos M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B Beutler. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57Bl/10ScCr mice: mutations TLR4 gene. *Science* 282:2085

48. Valledor A. F., M. Comalada, J. Xaus, and A. Celada 2000. The differential time-course of extracellular-regulated kinase activity correlates with the macrophage response toward proliferation or activation. *J Biol Chem* 275:7403

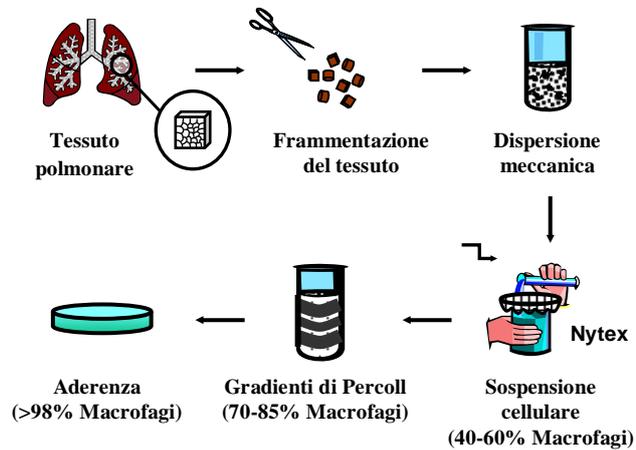


Figura 1: Purificazione dei macrofagi polmonari umani (HLM)

I macrofagi sono stati isolati a partire dal parenchima polmonare di pazienti sottoposti a chirurgia toracica. Il tessuto sano era tagliato in frammenti e sottoposto a ripetuti lavaggi con PIPES su strato di Nytex. La sospensione cellulare (75% a 85%) ottenuta è stata sottoposta a gradiente discontinuo di densità, le cellule sono state quindi incubate a 37°C in piastre di polietilene. Dopo 12 ore, è stato rimosso il mezzo ed i macrofagi aderenti sono stati lavati con RPMI. La percentuale di HLM al termine di questa procedura risultava raggiungere un grado di purezza compresa tra 95% e il 98% come dimostrato dall'analisi citofluorimetrica di CD71/CD14/HLA-DR.

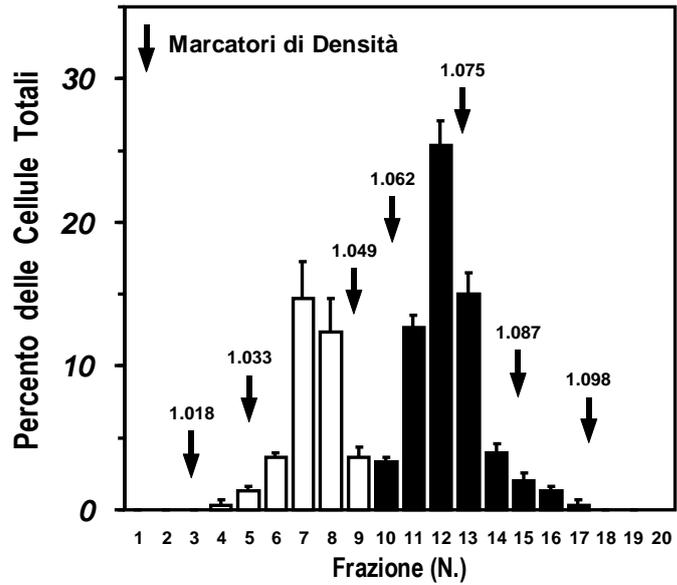
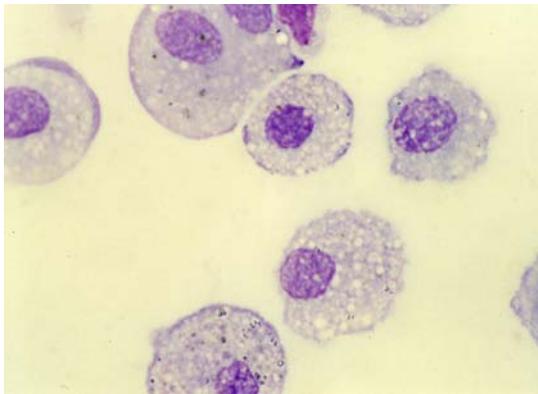


Figura 2: Separazione dei macrofagi polmonari umani isolati dal tessuto su gradiente continuo di densità

Le cellule sono state stratificate su gradiente continuo di Percoll (10 ml) e poi centrifugate (20 min, 22°C, 400 *g*). In un altro tubo sono stati stratificati e centrifugati i marcatori di densità. Al termine sono state prelevate frazioni di Percoll (500 μ l). Le cellule contenute in ciascuna frazione sono state lavate e quindi contate. I risultati rappresentano la media \pm ES della distribuzione delle cellule di sei preparazioni differenti.

**Macrofagi
a Bassa Densità
(LDM)**



**Macrofagi
ad Alta Densità
(HDM)**

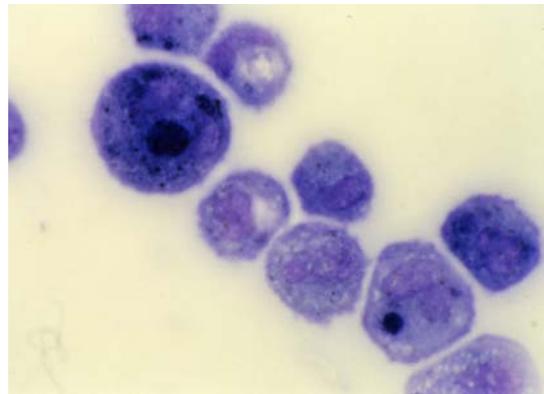


Figura 3: Caratteristiche morfologiche delle due popolazioni di macrofagi polmonari umani.

Immagine al microscopio ottico delle due popolazioni di macrofagi polmonari umani. I macrofagi a bassa densità o LDM (riquadro di sinistra) presentano un'area ed un perimetro maggiori ed un citoplasma più largo e vacuolizzato rispetto ai macrofagi ad alta densità (riquadro di destra).

Le cellule (2×10^4 per ciascuna popolazione) appena isolate sono state centrifugate con una citocentrifuga e successivamente colorate con metodica Diff-Quick.

Le immagini mostrano due campi microscopici rappresentativi di ciascun preparato citologico.

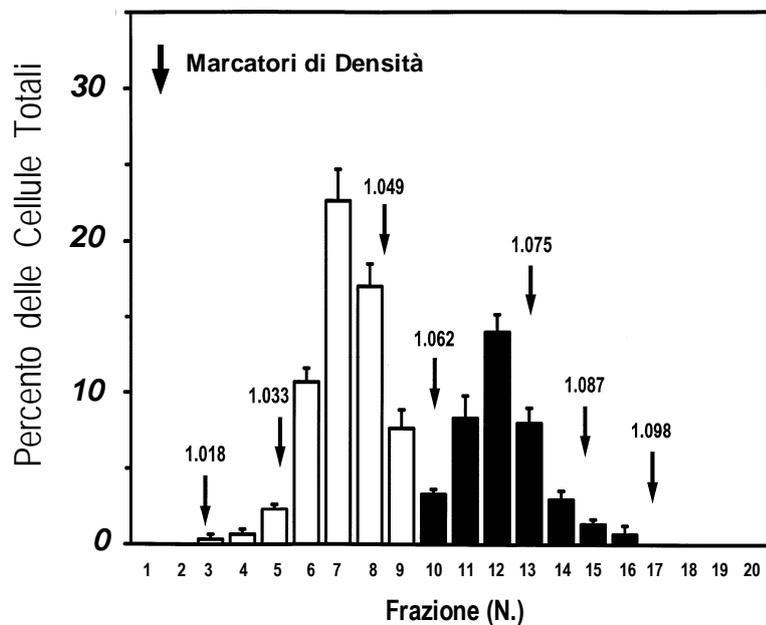


Figura 5: Separazione dei macrofagi polmonari umani isolati dal BAL su gradiente continuo di densità

Le cellule sono state stratificate su gradiente continuo di Percoll (10 ml) e poi centrifugate (20 min, 22°C, 400 g). In un altro tubo sono stati stratificati e centrifugati i marcatori di densità. Al termine sono state prelevate frazioni di Percoll (500 μ l). Le cellule contenute in ciascuna frazione sono state lavate e quindi contate. I risultati rappresentano la media \pm ES della distribuzione delle cellule di sei preparazioni differenti.

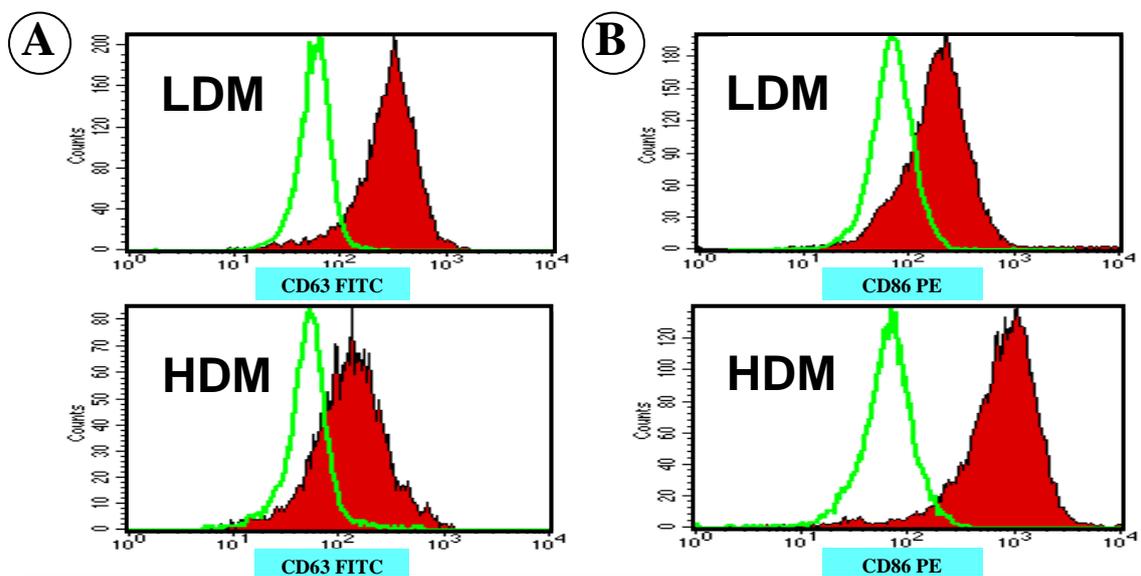


Figura 6: Scansione citofluorimetrica dell'espressione dei marcatori CD63 (pannello A) e CD86 (pannello B) sulle due popolazioni di macrofagi polmonari umani.

Le cellule appena isolate sono state incubate (20 min, 4°C) con una concentrazione ottimale degli anticorpi specifici FITC- o PE-coniugati. L'autofluorescenza spontanea delle cellule è stata ridotta mediante incubazione (5 min, 22°C) in soluzione satura di cristal violetto.

I risultati sono espressi come intensità dell'espressione del marcatore sulle cellule (in rosso) vs. il rispettivo controllo isotipico (in verde).

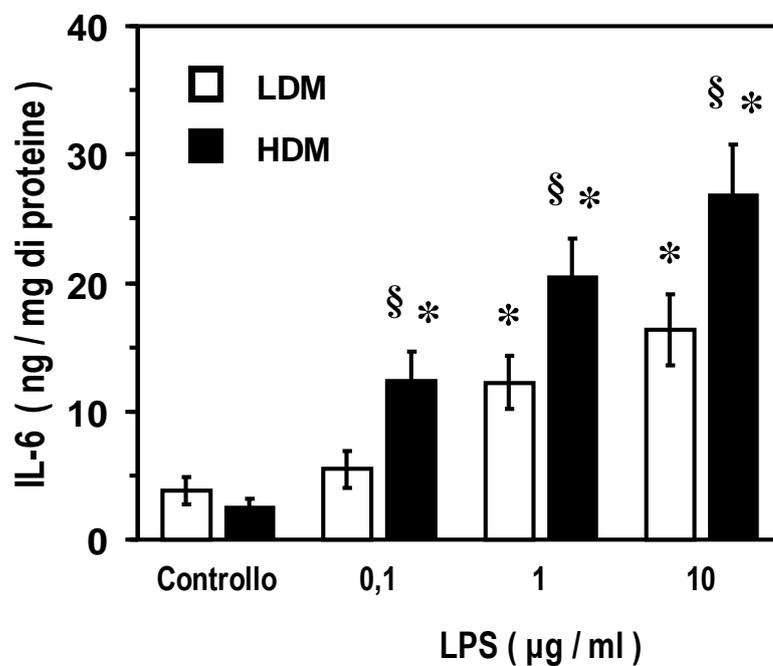


Figura 7: Effetto di concentrazioni crescenti di LPS sulla secrezione di IL-6 dalle due popolazioni di macrofagi polmonari umani.

Le cellule sono state incubate (20 ore, 37°C) con le concentrazioni di LPS riportate. Alla fine dell'incubazione, il soprannatante è stato prelevato e centrifugato (5 min, 4°C, 400 g). La secrezione di IL-6 è stata determinata con procedura ELISA. I valori sono espressi come ng di IL-6/mg di proteine. I risultati sono la media \pm ES di quattro esperimenti differenti.

* p < 0,05 vs. il rispettivo controllo

§ p < 0,05 vs. LDM

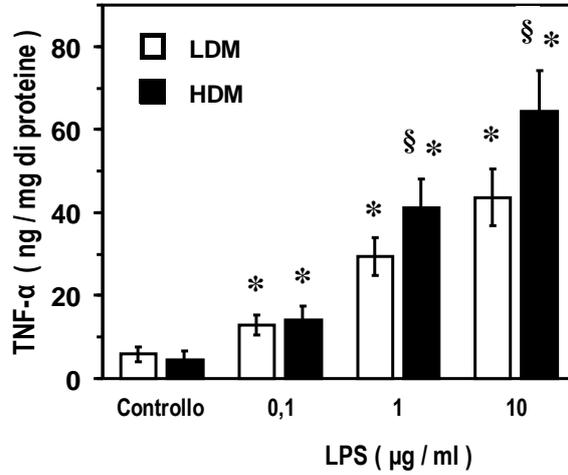


Figura 8: Effetto di concentrazioni crescenti di LPS sulla secrezione di TNF- α dalle due popolazioni di macrofagi polmonari umani. Le cellule sono state incubate (20 ore, 37°C) con le concentrazioni di LPS riportate. Alla fine dell'incubazione, il soprannatante è stato prelevato e centrifugato (5 min, 4°C, 400 g). La secrezione di TNF- α è stata determinata con procedura ELISA. I valori sono espressi come ng di TNF- α /mg di proteine. I risultati sono la media \pm ES di quattro esperimenti differenti.
 * p < 0,05 vs. il rispettivo controllo
 § p < 0,05 vs. LDM

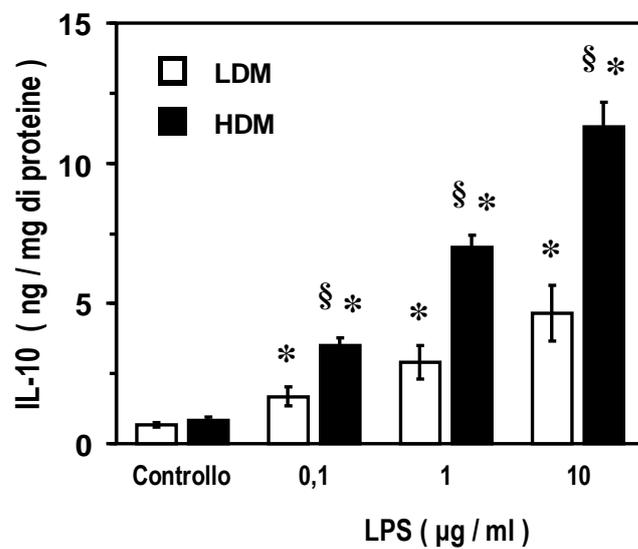


Figura 9: Effetto di concentrazioni crescenti di LPS sulla secrezione di IL-10 dalle due popolazioni di macrofagi polmonari umani.

Le cellule sono state incubate (20 ore, 37°C) con le concentrazioni di LPS riportate. Alla fine dell'incubazione, il soprannatante è stato prelevato e centrifugato (5 min, 4°C, 400 g). La secrezione di IL-10 è stata determinata con procedura ELISA. I valori sono espressi come ng di IL-10/mg di proteine. I risultati sono la media ± ES di quattro esperimenti differenti.

* p < 0,05 vs. il rispettivo controllo

§ p < 0,05 vs. LDM

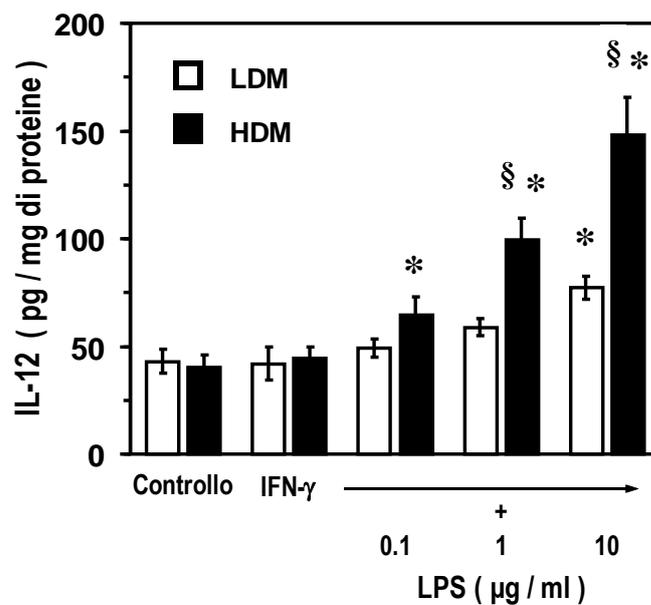


Figura 10: Effetto di concentrazioni crescenti di LPS sulla secrezione di IL-12 dalle due popolazioni di macrofagi polmonari umani.
 Le cellule sono state preincubate (1 ora, 37°C) con IFN- γ e poi sono state stimulate con le concentrazioni di LPS riportate (20 ore, 37°C). Alla fine dell'incubazione, il sopranatante è stato prelevato e centrifugato (5 min, 4°C, 400 g). La secrezione di IL-12 è stata determinata con procedura ELISA. I valori sono espressi come pg di IL-12/mg di proteine. I risultati sono la media \pm ES di quattro esperimenti differenti.
 * $p < 0,05$ vs. il rispettivo controllo
 § $p < 0,05$ vs. LDM

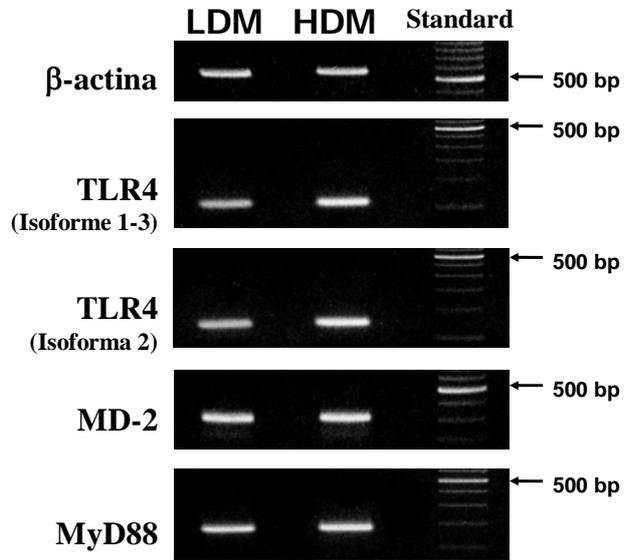


Figura 11: RT-PCR di TLR4 (isoforme 1-3 ed isoforma 2), MD-2 e MyD88 nelle due popolazioni di macrofagi polmonari umani.

Le cellule appena isolate sono state lisate e l'RNA totale estratto dai lisati è stato retrotrascritto. Il cDNA ottenuto, normalizzato per il trascritto della β -actina (prima riga), è stato amplificato per TLR4 (isoforme 1-3 e 2) (seconda e terza riga), MD-2 (quarta riga) e MyD88 (quinta riga) con l'utilizzo di *primers* e protocolli di amplificazione specifici. L'immagine mostra la fotografia dei prodotti della separati su gel di agarosio e colorati con etidio bromuro insieme ad uno standard di DNA di 500 pb (standard).

Tabella 1
Caratteristiche Morfometriche e Biochimiche
delle Popolazioni di Macrofagi Polmonari Umani

<i>Popolazione</i>	<i>Densità</i>	<i>% dei Macrofagi Polmonari Totali*</i>	<i>Area* (µm²)</i>	<i>Contenuto di Proteine* (mg/10⁶ cells)</i>	<i>Contenuto di β-Glucuronidasi* (U/10⁶ cells)[§]</i>
LDM	1,039 < d < 1,052	34,6 ± 6,5**	691,33 ± 79**	0,49 ± 0,07	2,90 ± 0,36
HDM	1,065 < d < 1,078	65,4 ± 6,5	461,72 ± 38	0,52 ± 0,06	2,68 ± 0,42

* I Risultati sono espressi come media ± ES (n=10)

** p < 0,05 vs. HDM

§ 1U di β-glucuronidasi idrolizza 1 µg di fenofaleina/ora dalla fenofaleina-glucuronide (37°C; pH 4,5)

Tabella 2

Espressione di Marcatori di Superficie delle Popolazioni di Macrofagi Polmonari Umani I

<i>> 85% di Cellule Positive</i>	<i>< 5% di Cellule Positive</i>
-------------------------------------	------------------------------------

<i>Denominazione CD</i>	<i>Descrizione</i>	<i>Denominazione CD</i>	<i>Descrizione</i>
CD11c	<i>Integrina $\beta 2$/Gp150</i>	CD1a	<i>Cellule Dendritiche</i>
CD44	<i>Recettore Acido Ialuronico/Pgp-1</i>	CD4	<i>Monociti/Cellule T</i>
CD71	<i>Recettore Transferrina</i>	CD14	<i>Corecettore LPS/Monociti</i>
CD206	<i>Recettore del Mannosio</i>	CD15	<i>Lewis X/Monociti</i>
HLA-DR	MHC di Classe II	CD25	<i>Catena α Recettore IL-2</i>
		CD35	<i>Recettore C3b/Monociti</i>
		CD38	<i>ADP-Ribosil Ciclasi</i>
		CD42b	<i>GpIb/Piastrine</i>
		CD56	<i>NCAM/Cellule NK</i>
		CD61	<i>Integrina $\beta 3$/GpIIIa</i>
		CD69	<i>Eosinofili Attivati</i>
		CD117	<i>c-kit/Mastociti</i>
		CD130	<i>Catena β Recettore IL-6</i>
		CD154	<i>CD-40L</i>

