

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Padronização da diferenciação *in vitro* e a ativação clássica ou alternativa da linhagem de células humanas U937 em macrófagos

Daiane Huppes

Porto Alegre, 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Padronização da diferenciação *in vitro* e a ativação clássica ou alternativa da linhagem de células humanas U937 em macrófagos

Daiane Huppes

Orientador: Prof.Dr. Fábio Klamt

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina:
Ciências Médicas, UFRGS, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, 2013

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**Porto Alegre, 2013****FICHA CATALOGRÁFICA:****CIP - Catalogação na Publicação**

Huppés, Daiane

Padronização da diferenciação in vitro e a ativação clássica ou alternativa da linhagem de células humanas U937 em macrófagos / Daiane Huppés. -- 2013. 76 f.

Orientador: Fábio Klamt.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Ativação e Polarização de Macrófagos. 2. Macrófagos e Fisiologia. 3. Macrófagos e Patologias. 4. Cultura de linhagem de células humanas in vitro. I. Klamt, Fábio, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICATÓRIA

*Dedico essa dissertação aos **Meus tesouros: Pai e Mãe**. Eles me proporcionaram uma vida digna para crescer, acreditando que tudo é possível, desde que sejamos honestos, íntegros de caráter e tendo a convicção de que desistir nunca seja uma ação contínua em nossas vidas; que sonhar e concretizar os sonhos só dependerá de nossa vontade.*

AGRADECIMENTOS

A UFRGS, que desde a graduação continua me proporcionando conhecimento e crescimento contínuo.

Aos colegas do mestrado e do laboratório 24 da Bioquímica.

Ao meu Orientador, Fábio, que aceitou me orientar numa época difícil, em que deveria conciliar trabalho e estudos. Obrigada pela confiança, pelos ensinamentos, pelas palavras amigas.

Aos colegas de trabalho do Instituto de Cardiologia, pelas trocas de horários, pelas folgas, pela compreensão e apoio.

Aos amigos, familiares e, meu irmão Matheus. Obrigada por entenderem a minha ausência e pela torcida; pude sentir cada um de vocês ao meu lado, me dando forças em cada dia de saudade.

Ao meu namorado Thiago, que sempre acreditou em mim e me apoiou. Que abdicou de alguns finais de semana por meus estudos, obrigada pelo carinho e serenidade nesta etapa final e estressante do mestrado. Obrigada por proporcionar momentos de muita alegria. Você é especial.

Aos meus pais, exemplo de superação. Obrigada pela vida, amizade, estudo, ensinamentos, por me deixarem sair de casa, confiarem em mim e sonharem junto comigo. Quero ser motivo de orgulho pra vocês sempre... Pai, Mãe, obrigada por ser meu alicerce e refúgio. Sem vocês não sou nada... Amo vocês!

Obrigada a Deus, por ter me dado saúde e coragem, ter me colocado no lugar certo e ao lado de pessoas maravilhosas, obrigada por todos os dias. Obrigada aos meus anjos, em especial, meu Vô Staudt, por me guiarem no caminho certo.

“Pouco importa o julgamento dos outros. Os seres são tão contraditórios que é impossível atender às suas demandas, satisfazê-los. Tenha em mente, simplesmente, ser autêntico e verdadeiro...”

(Dalai Lama)

RESUMO

Introdução: Macrófagos de fenótipo M1 (ativação clássica) e M2 (ativação alternativa) estão relacionados com diversos processos patológicos como o câncer, a aterosclerose e doenças neurodegenerativas. No microambiente tumoral, os macrófagos associados ao tumor (TAM) têm atuação controversa na progressão da doença. Um modelo *in vitro* pode servir para avaliar a influência dessa alteração fenotípica em diversas patologias. A linhagem celular monocítica humana U937, sob estímulo de PMA (do inglês, *Phorbol 12-myristate 13-acetate*), se diferencia em macrófagos típicos. Estes adquirem fenótipos M1 e M2 quando estimulados, respectivamente, por LPS/IFN- γ e IL-4. **Objetivo:** Estabelecer um modelo *in vitro* para o estudo do papel dos macrófagos e seu envolvimento na progressão de doenças, bem como, sua caracterização fenotípica nesses eventos. Para tal, utilizamos: a) meta-análise de dois conjuntos de dados de micro-arranjos para avaliar os genes relacionados e b) análise de marcadores de diferenciação celular, taxa de adesão, alterações morfológicas e níveis de espécies reativas. **Métodos:** Cultura Celular: Linhagem celular humana U937, cultivada com meio de cultura RPMI 1640 e tratada com 10nM de PMA, por 12, 24, 48 e 72 horas. Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio: Células U937 diferenciadas e indiferenciadas incubadas com a sonda DCF para avaliar a formação de espécies reativas, medida fluorescência por 1h. Ensaio de MTT e Adesão Celular: Células U937 diferenciadas e indiferenciadas foram incubadas com solução de MTT por 1h, para análise da viabilidade celular, foi medida absorvância em 560nm e índice de adesão por método de SRB. Produção de óxido Nítrico: Quantificado pelo método de Griess, a 540nm. Análise Morfológica por meio de Imagens das Células: Imagens obtidas

após tempos de tratamento com PMA em 0, 12, 24, 48 e 72 horas. Bioinformática: a) obtidos dois conjuntos de dados de micro-arranjos do Gene Expression Omnibus (GEO) - GSE5099 e GSE15038; b) criamos redes de genes para o fenótipo M1 e M2, com ferramenta on-line STRING e software MEDUSA; c) rede de genes e informações dos micro-arranjos foram combinados e plotados em gráficos de acordo com a sua topologia, com software ViaComplex. **Resultados**: As imagens mostraram alteração morfológica característica da célula monocítica U937 (célula proliferativa) para macrófago (célula aderida na placa), quando tratadas com PMA. Quanto aos níveis de espécies reativas formadas e a taxa de aderência medida, foi maior nas células tratadas, no decorrer do tempo de tratamento. A taxa de proliferação da célula controle U937 aumentou com o tempo, enquanto que, observamos uma diminuição na proliferação das células tratadas com PMA. A análise bioinformática mostrou um aumento na expressão, tratadas x controle, de genes do fenótipo M1 e M2, nas células U937 diferenciadas por PMA e polarizadas com LPS/IFN gama e IL-4, respectivamente. O fenótipo M1 mostrou aumento na formação de ER e de NO quando tratado com LPS + IFN-gamacombinados. Houve uma diminuição de NO no fenótipo M2 quando ativadas por IL-4. **Conclusão**: Nosso trabalho descreve um método válido de diferenciação macrofágica da linhagem humana U937 e a possibilidade de sua polarização ao fenótipo M1 e M2 quando estimulada com PMA e posteriormente com LPS/IFN gama e IL-4, respectivamente. A compreensão das relações entre as alterações fenotípicas dos macrófagos e do microambiente gerado é importante para o desenvolvimento de pesquisas para combater/atenuar a agressividade das patologias.

Palavras chave: U937, macrófagos, protocolo de diferenciação, ativação clássica, ativação alternativa, M1/M2.

ABSTRACT

Introduction: *In vitro* model of macrophages ($M\Phi$) can be used to evaluate the influence of these cells in human pathologies. **Objective:** To establish an *in vitro* model to study macrophages and its evaluating M1/M2 polarization. **Methods:** The human U937 cell line was grown in medium RPMI 1640 and differentiated into functional macrophages by 10 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-treatment, with M1 or M2 phenotypes with LPS/IFN γ and IL-4, respectively. Reactive Oxygen Species (ROS) (time course of DCF oxidation), nitric oxide (NO) (Griess method), cell proliferation (MTT assay) and adherence (SRB method), and change in cellular morphology were determined. Moreover, two microarray data sets from Gene Expression Omnibus (GEO) (GSE5099 and GSE15038) were used to analyze differential M1/M2 gene expression with the online bioinformatics tools STRING, MEDUSA and Via Complex. **Results:** Time course experiments (0, 24, 48 and 72h) showed decreased cell proliferation with increase in morphological changes, cell adherence and ROS generation in PMA-treated U937 cells compatible with the acquisition of a macrophage-*like* phenotype. Bioinformatics approach showed increased expression in M1/M2 genes by PMA-treatment. 24h of LPS/IFN γ -treatment induced increased NO, ROS, and the expression of M1 genes (classical activation $M\Phi$), while 24h IL-4-treatment induced the expression of M2genes (alternative activation $M\Phi$). **Conclusion:** This simple human macrophage-*like* differentiation and M1/M2 activation protocol could be used *in vitro* to establish the role of these cells in human pathologies.

Keywords: U937 cells, macrophages, differentiation protocol, classical activation, alternative activation, M1/M2.

LISTA DE TABELAS:

TABLE 1 pág 67
Gene list used to evaluate macrophages (*Mφ*) M1/M2 phenotypes.

LISTA DE FIGURAS:

Fig A pág 24

Indutores e propriedades funcionais selecionadas de diferentes populações de macrófagos polarizados. Macrófagos polarizados e propriedades funcionais diferentes em resposta aos sinais derivados do microambiente.

Fig B pág 25

Macrófagos M1 e M2, os extremos de um contínuo. Propriedades essenciais da população de macrófagos polarizados.

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO:

Fig 1 pág 73

Activation of U937 human cells line in macrophages with PMA treatment;

Fig 2 pág 74

U937 cells differentiated with PMA and activated M1 phenotype under the stimulus of IFN- γ , LPS and LPS + IFN- γ and M2 phenotype with IL-4

Fig 3 pág 75

Analysis of the expression of bioinformatics data set GSE15038, wherein the cell line U937 was differentiated into macrophage with PMA for 32h and after treated with IFN- γ + LPS and with IL-4

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
CSF	Fator estimulador de colônia
DCF	Diclorofluoresceína
ER	Espécies reativas
ERO/ROS	Espécies reativas de oxigênio
GEO	Do ingles, Gene Expression Omnibus
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LDL	Lipopoliproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Macrófago de ativação clássica
M2	Macrófago de ativação alternativa
MTT	Teste de Viabilidade Celular
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PKC	Proteína cinase C
PMA	Do inglês, <i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
SMF	Sistema monocítico fagocitário
SNC	Sistema nervoso central
TAM	Do inglês, <i>Tumor associated macrophages</i>

TGF- β	Fator de transformação do crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Macrófagos	21
2.2 Macrófagos M1 e M2	22
2.3 Linhagem de Células Humanas U937	26
2.4 PMA	27
2.5 Quimiocinas	28
2.6 Arginase	30
2.7 Macrófagos e Fisiologia	31
2.8 Macrófagos e Patologias	33
2.8.1 Câncer	33
2.8.2 Macrófagos no Microambiente Tumoral	34
2.8.3 Aterosclerose	36
2.8.4 Doenças Neurodegenerativas	38
3 JUSTIFICATIVA	41
4 OBJETIVOS	42
4.1 Objetivo principal	42
4.2 Objetivos secundários	42
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO	43
6 ARTIGO EM INGLÊS	52
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
8 FINANCIAMENTO	78

1. INTRODUÇÃO

Os fagócitos mononucleares compreendem uma família de células que possuem precursores hematopoiéticos comuns e são distribuídos da corrente sanguínea para os tecidos do organismo. Nos tecidos, os macrófagos amadurecem, adaptam-se ao microambiente e se diferenciam em vários tipos celulares, como por exemplo, a célula de Kupffer no fígado, a microglia no sistema nervoso central (SNC), que executam funções específicas de vigilância, tróficas e imunológicas¹.

Os fagócitos mononucleares tem importância crucial para a defesa imune do hospedeiro². Os monócitos emigram dos vasos sanguíneos em resposta a insultos antigênicos e então, se diferenciam nos tecidos em macrófagos e células dendríticas³.

Os macrófagos são células fundamentalmente fagocíticas que exercem um papel importante no reconhecimento e eliminação dos patógenos, bem como na remoção de células senescentes em processo de morte celular. São células ativamente endocíticas e degradam antígenos, mas podem expressar peptídeos em resposta aos linfócitos T sensibilizados nas respostas imunes secundárias.

Macrófagos são células de grandes dimensões, ricos em lisossomas, extremamente heterogêneas na expressão de seus genes e de suas atividades celulares, com papéis benéficos ou destrutivos na homeostasia dos tecidos e na defesa do hospedeiro. Pelo seu variado repertório de receptores na membrana plasmática e das respostas secretoras, os macrófagos interagem com outros leucócitos e com células não hematopoiéticas em todos os tecidos, regulando, dessa forma, as imunidades inata e adquirida.

Os macrófagos são considerados fagócitos profissionais das células apoptóticas. Uma variedade de fatores solúveis liberados no meio em que ocorre a apoptose tem papel de auxiliar na opsonização dessas células por meio da criação de pontes entre a célula e o fagócito. A consequência da interação da célula apoptótica com o fagócito mononuclear é a criação de um microambiente que facilita uma eficiente limpeza das células apoptóticas do meio⁴.

Os macrófagos podem ser ativados de duas formas:

a) A via de ativação clássica, caracterizada por alta capacidade de apresentar antígeno, alta produção de interleucinas (IL) 12 e 23 e consequente ativação polarizada da resposta tipo I, alta produção de intermediários tóxicos como óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ERO). Há referência para essa ativação clássica, como macrófagos chamados M1⁵. Sugere-se que essa via estimule à macrófagos efetores potentes que eliminam microrganismos e células tumorais ou doentes e produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias.

b) A via de ativação alternativa dos macrófagos é caracterizada pela ativação/modulação dos macrófagos por meio das IL-4 e IL-13^{5, 6}. Os macrófagos ativados alternativamente são chamados macrófagos M2, orientados a remodelamento e reparo tissular, resistência a parasitas, regulação da imunidade e promoção tumoral⁷. Estes perdem, portanto, seu potencial pró-inflamatório. As células M2 têm reduzidos níveis de citocinas inflamatórias e secretam grandes quantidades de moléculas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF-beta².

Conforme literatura estudada, podemos mencionar que: o macrófago M1, que é ativado por meio de IFN-gama e LPS, apresenta como marcador do fenótipo alta produção de IL-1 e IL-12 e baixa produção de IL-10. Apresenta ainda alta produção

de ON e ERO. Já para a ativação alternativa, estimulada pelas IL-4 e 13, podemos perceber alta produção de IL-10 e alta atividade de arginase, além da baixa produção de IL-12.

Os macrófagos impedem o extravasamento de conteúdo intracelular e o consequente efeito pró-inflamatório na vizinhança⁸ e atuam em processos de involução fisiológica, como de alguns órgãos, por exemplo, o útero após o parto.

Existem também os macrófagos residentes, os quais se distribuem por todo organismos, como células maduras. Dependendo da localização e função o macrófago pode adquirir forma específica diferenciada. Podemos citar: células de Kupffer no fígado, macrófagos do estroma na medula óssea, macrófagos da polpa vermelha/branca no baço, macrófagos tímicos no timo, da lâmina própria no intestino, alveolares nos pulmões, microglia no cérebro, células de Langerhans na pele, ovário e testículo no trato reprodutivo, osteoclastos nos ossos, etc¹.

Os macrófagos também estão relacionados a processos patológicos, como por exemplo, no câncer, na aterosclerose e em doenças neurodegenerativas.

Macrófagos isolados de sítios tumorais têm sido relatados como defeituosos em sua função citotóxica (fagocítica) atuando como suporte para o crescimento tumoral^{8,9}. Tem sido recentemente sugerido que os macrófagos associados ao tumor (TAM) podem exibir atividades pró-tumorais como efeito anti-inflamatório, imunossupressão, fatores tróficos de crescimento e sobrevivência, fatores pró-angiogênicos, propriedades pré-metastáticas^{4, 10, 11}.

O câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de novos casos de câncer,

atingindo principalmente países de baixas e médias rendas (INCA)¹². No Brasil, além do câncer, ocorrem aproximadamente um milhão de internações por doenças cardiovasculares por ano (como aterosclerose), com profundas repercussões na força de trabalho e com óbvio prejuízo e custo social, trata-se, portanto, de um grave problema de saúde pública¹³.

Como resultado do aumento da expectativa de vida, a incidência de câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas diagnosticados na população estão aumentando cada vez mais. Aterosclerose e doenças cardiovasculares são as maiores causas de mortalidade nos Estados Unidos e Europa¹⁴. No SNC, além dos macrófagos residentes, neutrófilos e macrófagos derivados de monócitos podem induzir neurodegeneração¹⁵⁻¹⁷. Existem fortes evidências na literatura de que a inflamação no SNC está envolvida na patogênese de doenças neurodegenerativas agudas e crônicas, incluindo doenças de Parkinson, Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica, trauma cerebral e de medula espinhal e acidente vascular encefálico¹⁸.

Pretendemos com esse trabalho mostrar a importância do modelo *in vitro*, como um modelo simples e fidedigno da ativação dos macrófagos como *drive* para estudos posteriores, auxiliando assim a pesquisa básica. Assim, servirá como base científica para posterior seguimento em estudos mais elaborados utilizando uma linhagem humana de monócitos (U937). Como ponto positivo, mencionamos a linhagem humana, mimetizando o que realmente acontece nos humanos. Como limitação, está a necessidade posterior de estudos *in vivo*, para melhor compreensão do ambiente como um todo de determinada doença. Outro ponto de destaque é a importância dos macrófagos em vários processos fisiológicos e também patológico no organismo humano, respectivamente, os macrófagos

residentes (fígado, pulmão, cérebro, etc.) e os macrófagos presentes em sítios doentes como no câncer, na aterosclerose, etc. Assim, pretendemos, com isso, fornecer suporte para estudos posteriores que busquem maior profundidade e abrangência nesta área de conhecimento.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. MACRÓFAGOS

Macrófagos são células de grandes dimensões do tecido conjuntivo, ricos em lisossomas, que fagocitam elementos estranhos ao corpo. Os macrófagos derivam dos monócitos circulantes do sangue e de células conjuntivas ou endoteliais, auxiliando na defesa do organismo contra infecções. Os fagócitos mononucleares tem importância crucial para a defesa imune do hospedeiro². Os monócitos emigram dos vasos sanguíneos em resposta a insultos antigênicos e, se diferenciam nos tecidos em macrófagos e células dendríticas³.

Macrófagos têm características de afinidade e de cooperação com os linfócitos T e B, possuindo duas grandes funções na resposta imune: a fagocitose e destruição do microrganismo.

Os macrófagos são elementos chaves no remodelamento e no reparo dos tecidos e na resistência contra patógenos⁷. Esses macrófagos divergem em suas funções de acordo com a ativação, em resposta às citocinas e outros sinais, sendo participantes importantes na resolução da inflamação e na cicatrização de feridas².

Em virtude do efeito anti-inflamatório e possível papel em efeito trófico e processos de reparo, muitos autores têm proposto que a ativação alternativa dos macrófagos pode contribuir para uma gama de processos inflamatórios e não inflamatórios na saúde e na doença, incluindo tolerância de feto alogênico, reparos (como de ferida e de SNC, por exemplo), aterosclerose, interação tumor/estroma/hospedeiro¹⁹.

2.2. MACRÓFAGOS M1 E M2

Os macrófagos podem se modificar, por meio de diferentes estímulos liberados no meio tecidual e então, se diferenciar em macrófagos com diferentes funções: chamados de macrófagos M1 e de macrófagos M2, conforme literatura revisada.

A via de ativação clássica dos macrófagos é caracterizada por: alta capacidade de apresentar antígeno, alta produção de IL-12 e IL-23 e consequente ativação polarizada da resposta tipo I, alta produção de intermediários tóxicos como óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio. Há referência para essa ativação, como macrófagos chamados M1⁵. Sugere-se que essa via leva a ativação de macrófagos efetores potentes que eliminam microrganismos e células tumorais e produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias. Estes, portanto, são macrófagos pró-inflamatórios e promovem resistência do organismo ao tumor. A indução da ativação clássica (Polarização M1) é induzida por interferon gama (IFN-gama) com ou sem lipopolisacarídeo (LPS), com fator de necrose tumoral (TNF) e fator estimulador de colônia granulócito/monócito^{6, 20}.

A resposta dos macrófagos a microorganismos, células cancerígenas e citocinas do hospedeiro é a liberação de produtos inflamatórios, microbicidas e tumoricidas². Células M1 exercem atividades anti-proliferativa e citotóxica, resultado em parte da sua capacidade de produzir NO, ERO e citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 e IL-6)². O macrófago ativado M1 medeia a resistência aos patógenos intracelulares, destruição de tecidos e, resistência anti-tumor⁷.

A via de ativação alternativa de macrófagos é caracterizada pela ativação/modulação destes por meio de IL-4 e IL-13^{5, 6}. Essas, além de simples inibidores da ativação clássica dos macrófagos, levam para a segunda via de ativação. A via alternativa tem a característica de macrófagos com cascata da arginase ativada e predominante, sintonia com a inibição da resposta inflamatória, limpeza de detritos, promoção de angiogênese, remodelação e reparo de tecidos⁵. Os macrófagos polarizados em M2 são, geralmente, orientados ao remodelamento e reparo tissular, resistência a parasitas, regulação da imunidade e promoção tumoral⁷. Esses então são macrófagos anti-inflamatórios com a proposta característica de promoção do tumor.

As células M2 têm reduzidos níveis de citocinas inflamatórias e secretam grandes quantidades de moléculas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF-beta². Os macrófagos M2 ainda exercem função imunossupressora seletiva e inibem a proliferação das células-T². Esses macrófagos ainda são produtores de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o qual é ativador da angiogênese, ativando a tumorigênese⁶.

Os macrófagos M2, em indivíduos saudáveis, estão presentes na placenta, pulmão e sítios imunes privilegiados, como também em doenças inflamatórias

crônicas como artrite reumatoide, aterosclerose e psoríase, assim sugerindo que M2 protege órgão e redondeza tecidual contra resposta imune prejudicial ao organismo². Esses macrófagos também produzem níveis aumentados de fatores envolvidos em remodelamento tissular².

Abaixo segue a figura A, que ilustra as vias de ativação:

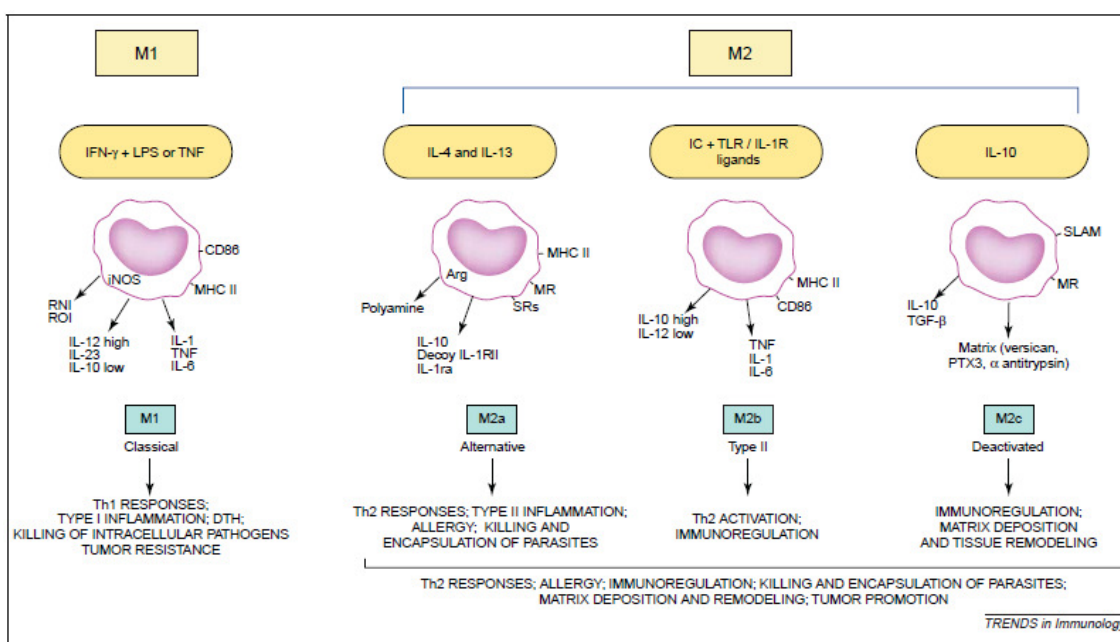


Figura A. Indutores e propriedades funcionais selecionadas de diferentes populações de macrófagos polarizados. Macrófagos polarizados e propriedades funcionais diferentes em resposta aos sinais derivados do microambiente. Macrófagos expostos a IFN-gama e LPS levam a polarização M1, enquanto macrófagos M2 são, em geral, mais propensos a atividades imunomoduladoras e pró-tumoral. Em particular, macrófagos M2 são ativados por IL-4, IL-13 e IL-10. Abreviaturas: DTH (delayed-type hypersensitivity), IC (imunocomplexos), IFN-gama (interferon gama), iNOS (óxido nítrico sintase induzida), LPS (lipopolissacarídeo), MR (receptor de manose), RNI (intermediário reativo de nitrogênio), ROI (intermediário reativo de oxigênio). Adaptado de Mantovani et al, *TRENDS in Immunology* Vol. 25 N° 12, December 2004.

A produção de diferentes citocinas é a característica fundamental dos macrófagos polarizados (M1 e M2). O fenótipo M1 tem alta de produção de IL-12 e

baixa de IL-10, enquanto que o fenótipo M2 tem alta produção de IL-10 e baixa de IL-12⁵.

Abaixo segue a figura B, com detalhes das citocinas e outras substâncias produzidas:

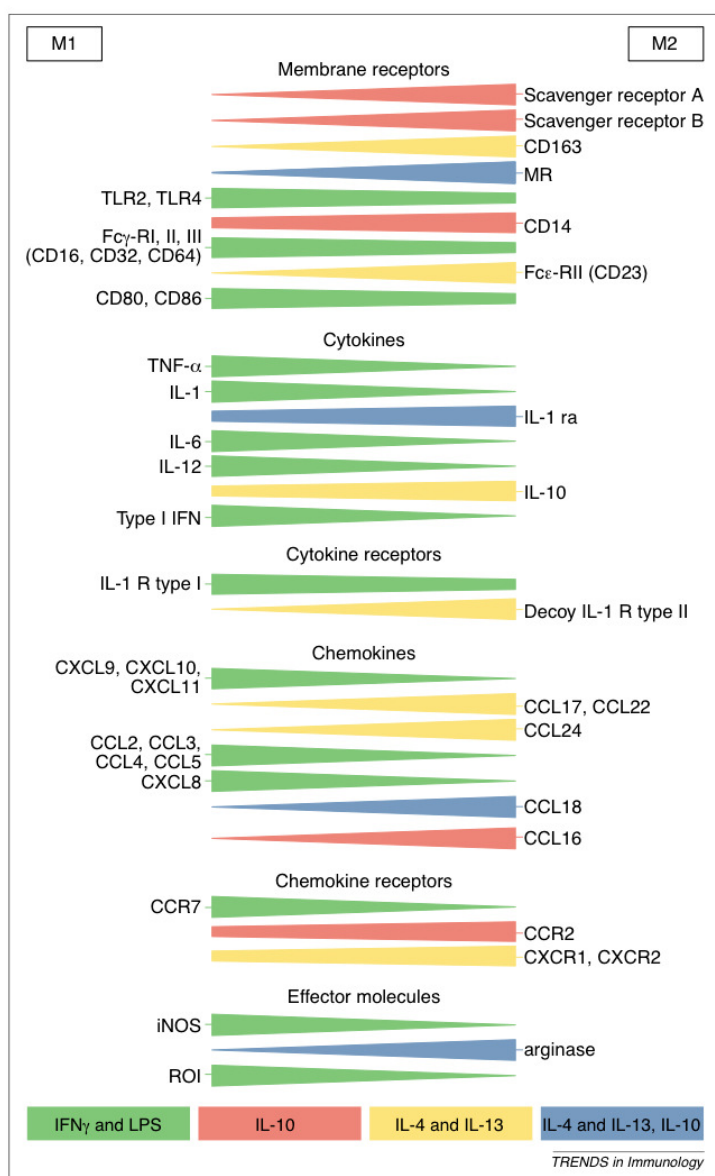


Figura B. Macrófagos M1 e M2, os extremos de um contínuo. Propriedades essenciais da população de macrófagos polarizados estão mostradas. Para as células M1, em verde, moléculas induzidas por IFN-gama e LPS. Para células M2, em azul, moléculas induzidas por IL-4, IL-10 e IL-13. Macrófagos expostos aos sinais de ativação clássica, IFN-gama e LPS, expressam receptores de opsonização, enquanto macrófagos do tipo M2 são

caracterizados por níveis abundantes de receptores não opsônicos. Componentes pró e anti-inflamatórios do sistema da IL-1 são coordenadamente regulados por sinais que polarizam macrófagos na direção tipo 1 ou tipo 2 (M1 ou M2). Adaptado de Mantovani et al, TRENDS in Immunology Vol. 23 No.11 November 2002.

Embora os macrófagos devidamente ativados sejam capazes de eliminar de maneira bem efetiva as células tumorais, atualmente seu papel no tumor é geralmente relacionado ao suporte para o crescimento e progressão do mesmo²¹.

Macrófagos isolados de sítios tumorais têm sido relatados como defeituosos na sua função citotóxica (M1) para o tumor (fagocitar) sendo suporte para o crescimento do mesmo^{10, 22}. As atividades pró-tumorais que os macrófagos associados ao tumor (TAM), quando ativados para M2, podem exibir, como efeito anti-inflamatório, imunossupressão, fatores tróficos de crescimento e sobrevivência, fatores pró-angiogênicos, propriedades pré-metastáticas, tem sido extensivamente revisadas nos últimos anos^{11, 23, 24}.

2.3. LINHAGEM DE CÉLULAS HUMANAS U937

A linhagem de células monocíticas humana U937, derivada de fluido pleural de pacientes com linfoma histiocítico difuso, serve como um modelo para diferenciação monócito-macrófago²⁵. Essa linhagem normalmente cresce em suspensão no meio de cultura e tem uma superfície lisa²⁵.

Alguns trabalhos já utilizam essa linhagem de célula como célula proliferativa (célula tumoral), como por exemplo, o trabalho que utilizou um glicosídeo cardíaco e avaliou o efeito desta linhagem²⁶; o estudo sobre regulação do volume celular²⁷. Inicialmente, esta linhagem de células foi o foco de estudos para delinear a natureza

da sua transformação neoplásica e as condições sob as quais a sua malignidade pudesse ser revertida²⁸. Tempos depois, uma variedade de substâncias, exógenas e endógenas, foram identificadas como capazes de atingir uma inibição mielomonocítica específica da divisão celular, com isso, caracterizou-se a perda de capacidade proliferativa dessas células U937, acompanhada por uma série de transformações fenotípicas²⁸. Atualmente, a célula U937 é utilizada como um modelo ideal para estudar as mudanças em eventos intracelulares que acontecem durante a diferenciação celular de monócito para macrófagos²⁸.

Outros estudos mostram o poder de transformação e adesão dessa linhagem humana quando diferenciada o que ocorreu por diferentes métodos, aproximando-se então de células como os macrófagos. Por exemplo: o estudo de adesão e proliferação com tratamentos de PMA e dexametasona²⁹; a diferenciação da linhagem U937 em macrófagos²⁵. Assim como alguns trabalhos já mencionados que utilizam de diversos modos este poder de diferenciação, estamos utilizando essa linhagem humana como modelo de diferenciação de monócito para macrófagos, por meio da ativação utilizando PMA. Desse modo, propomos a criação de um protocolo padrão de diferenciação de células U937 que sirva como base para outros trabalhos utilizando essa mesma linha de pesquisa.

2.4. PMA

PMA, do inglês, *Phorbol 12-myristate 13-acetate*, é um ativador específico dos grupos A e B da proteína cinase C (PKC), quando entre 1-100 nM. Ésteres de forbol como o PMA, afetam as PKCs por mimetizar o diacilglicerol, que é um ligante natural

e ativador desta enzima. Esse composto é também amplamente utilizado em pesquisas de câncer e de cultura de tecidos.

A linhagem de células humanas U937 mostra diferentes alterações fenotípicas e funcionais em presença de PMA³⁰. Exposta ao PMA, a célula monocítica é induzida a se diferenciar em macrófago²⁵. Entre as mudanças incluem-se: perda do potencial proliferativo, aquisição de aderência e de funções efetoras, que são características de macrófagos ativados. A linhagem humana U937 em tratamento com o PMA mostra alterações em suas características morfológicas como: aumento no tamanho da célula, diminuição na razão núcleo/citoplasma, citoplasma pálido, com grânulos mais proeminentes e um maior grau de vacuolização no citoplasma²⁵.

Assim, as células dessa linhagem humana, em presença de PMA, são um potencial modelo *in vitro* para o estudo da ativação de monócitos em macrófagos⁵.

2.5. QUIMIOCINAS

As quimiocinas fazem parte de uma família especializada de citocinas, que atuam como potentes mediadores ou reguladores da inflamação, pela habilidade de recrutar e ativar subpopulações específicas de leucócitos. As quimiocinas são uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas que estimulam o movimento dos leucócitos e regulam a migração destes do sangue para os tecidos, são citocinas quimiotáticas, além de estimular a produção de novas citocinas e auxiliar em diferenciações celulares. As quimiocinas envolvidas em reações inflamatórias são produzidas por leucócitos ou células residentes do local da inflamação, em

resposta a estímulos externos, e as quimiocinas que regulam o tráfego celular por meio dos tecidos são produzidas constitutivamente por várias células nestes tecidos³¹.

Quimiocinas constituem uma superfamília de pequenas proteínas com papel crucial em reações imunes e inflamatórias^{32, 33}. Citocinas e microorganismos afetam profundamente a função dos fagócitos mononucleares⁵.

Citocina é um termo genérico empregado para designar um extenso grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes. Constituem um grupo de fatores extracelulares que podem ser produzidos por diversas células, como monócitos, macrófagos, linfócitos e outras células que não sejam linfóides. Todas as citocinas são pequenas proteínas ou peptídeos, algumas contendo moléculas de açúcar ligadas (glicoproteínas). As diferentes citocinas podem ser enquadradas em diversas categorias: interferons (IFN), interleucinas (IL), fator estimulador de colônias (CSF), fator de necrose tumoral (TNF-alfa e TNF-beta), e fator de transformação de crescimento (TGF-beta)³¹.

As citocinas tem função de regular a duração e intensidade das respostas específicas e recrutar células efetoras para as áreas onde se desenvolvem respostas e induzir a geração e maturação de novas células a partir de precursores³¹.

Interferon gama sozinho ou junto com produtos microbiológicos como lipopolissacarídeos (LPS) ou de outras citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF), é a principal citocina de ativação de macrófagos e tem funções críticas na imunidade contra micro-organismos intracelulares^{31, 34}. Isso têm papel importante na

ativação clássica dos macrófagos. Os interferons aumentam a capacidade dos macrófagos de eliminar células tumorais, vírus e bactérias e estão também envolvidos no controle de proliferação, diferenciação e resposta das células B e T.

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina presente na parede celular de bactérias gram-negativas, sendo liberado quando as bactérias morrem estimulando muitas respostas imunológicas naturais, incluindo secreção de citocinas, indução de atividades antimicrobianas dos macrófagos, e a expressão de moléculas de adesão de leucócitos no endotélio³¹.

As IL-4 e -13 contribuem para a forma alternativa de ativação de macrófagos, e suprimem a ativação clássica inibindo, assim, a defesa contra micro-organismos intracelulares³¹, levando a um fenótipo anti-inflamatório e reparador tecidual.

Durante a infecção, a quimiotaxia é um importante evento para o recrutamento de células para o sítio de inflamação. As primeiras células a chegar ao parênquima lesado são os neutrófilos e, subsequentemente, os macrófagos teciduais³⁵.

Tem sido mantida a hipótese de que os TAM são originados dos monócitos circulantes e que os quimio atraentes derivados do tumor (citocinas e outros) tem um papel chave nesse recrutamento de monócitos³⁶.

2.6. ARGINASE

Macrófagos alternativamente ativados expressam uma grande quantidade da enzima arginase. A arginase é uma enzima que utiliza o substrato L-arginina para a produção de ornitina, favorecendo a proliferação celular e a síntese de colágeno.

O metabolismo de arginina é caracterizado por níveis elevados de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em macrófagos M1, enquanto que a via da arginase predomina nas células M2, com geração de ornitina e poliaminas³⁷.

A atividade de arginase dos macrófagos recentemente ganhou mais espaço. Altos níveis de arginase-I podem promover o crescimento tumoral sob diversos aspectos: i) aumentando a produção de L-ornitina e putressina levando a um aumento da proliferação de células cancerígenas^{2, 38}; ii) redução da produção de NO por iNOS levando a uma diminuição da cito toxicidade^{2, 38}; iii) supressão da atividade antitumoral da célula-T^{2, 38}.

2.7. MACRÓFAGOS E FISILOGIA

Os macrófagos são reconhecidos como as células de limpeza do organismo. Em estágio avançado de uma reação inflamatória, por exemplo, os macrófagos podem acumular-se nos focos inflamatórios, quando englobam e digerem os detritos das células destruídas, as proteínas estranhas, os eritrócitos e mesmo outras células com potencial fagocítico como os neutrófilos. Os macrófagos também fagocitam células senescentes do organismo. Outra importante função dos macrófagos relaciona-se com a sua capacidade de produzir e secretar mais de cinquenta substâncias biologicamente ativas. Algumas são enzimas hidrolíticas que degradam componentes do tecido conjuntivo, outras são citocinas que afetam vários tipos celulares e também mediadoras da inflamação, tais como proteínas do complemento e prostaglandinas^{1, 31}.

Macrófagos participam da imunidade inata, servindo como células fagocíticas. Estas células precursoras são sintetizadas e liberadas na medula óssea e na circulação sanguínea como monócitos. Ao migrarem para vários tecidos, os monócitos se diferenciam em macrófagos teciduais.

Nos tecidos, monócitos maduros se diferenciam em vários tipos de macrófagos em variadas localizações anatômicas³⁹. O processo de migração de monócitos, pela corrente sanguínea, para outros tecidos, permite a diferenciação em macrófagos residentes⁴⁰. Macrófagos de diferentes tecidos são conhecidos por diferir em relação às funções desenvolvidas^{41, 42}. Macrófagos obtidos de organismos normais, ou seja, não infectados e sem inflamação são denominados residentes, apresentando capacidade mínima de destruir microrganismos, secretando proteases em baixa quantidade, e pouca capacidade para responder a citocinas⁴³⁻⁴⁵. Embora os monócitos e macrófagos residentes sejam fagócitos efetivos, podem ser facilmente ativados de forma que suas funções sejam significativamente potencializadas⁴⁶.

Os macrófagos são os responsáveis pelo sistema monocítico fagocitário (SMF), pois originam-se da maturação de monócitos sanguíneos. Existem células que são morfológicamente diferentes dos macrófagos, mas tem a mesma função e provém dos monócitos da mesma forma. Conhecidos como macrófagos específicos de cada tecido/órgão no organismo, dentre eles: monócito sanguíneo - circulante no sangue; Microglia - SNC; células de Kupffer - fígado; macrófagos alveolares - pulmão; células dendríticas - região subcortical dos linfonodos; mesângio intraglomerular - glomérulo de Malpighi renal; macrófagos sinusais do baço -

cordões de Biliroth da polpa vermelha do baço; macrófagos das serosas - peritônio, pericárdio e pleura; células de Langehans – pele⁴⁷⁻⁴⁹.

2.8. MACRÓFAGOS E PATOLOGIAS

Apesar da sua enorme importância fisiológica, acredita-se que macrófagos podem causar lesão em tecidos normais durante diversas condições patológicas, entre as quais a doença de Gaucher, artrite reumatóide, tuberculose, malária cerebral, AIDS, aterosclerose e trauma da medula espinhal e do cérebro^{50, 51}.

O pressuposto que consolida esta ideia é que macrófagos possuem um grande número de enzimas extremamente lesivas dentro de seus lisossomas (por exemplo, proteases neutras, metaloproteinases e elastases) e estas enzimas podem ser liberadas para o parênquima tecidual intacto durante a atividade destas células, causando degradação de colágeno, elastina e fibrina¹⁸. Macrófagos podem liberar citocinas inflamatórias (por exemplo, TNF-alfa), radicais livres (como o radical hidroxil) e NO, os quais podem mediar a lesão tecidual relacionada à resposta inflamatória^{51, 52}.

2.8.1. CÂNCER

Câncer é uma doença progressiva, ocorrendo em uma série de passos bem definidos, tipicamente decorrente de mutações em células proliferativas, por ativação (em oncogenes) e/ou desativação (genes supressores de tumor)⁵³.

Os tumores não podem ser considerados como uma massa homogênea de células mutantes de crescimento independente, mas sim, como um microambiente no qual existe uma comunicação diversa entre os constituintes malignos e não malignos (estroma)².

As células tumorais usam diversos mecanismos para invadir a matriz extracelular e para produzir metástase em diferentes órgãos⁵⁴. A interação entre as células tumorais e as células do estroma no microambiente tumoral tem um importante papel no crescimento do tumor e de metástase, onde os macrófagos são células estromais mais proeminentes desta interação²⁰.

Os macrófagos são essenciais no processo de inflamação relacionado ao tumor⁵⁵⁻⁵⁸. Em muitos tipos de tumores tem sido observada uma correlação entre o aumento no número e/ou densidade dos macrófagos e prognóstico ruim⁵⁹⁻⁶¹. Os macrófagos secretam uma variedade de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e enzimas que regulam o crescimento do tumor, a angiogênese, a invasão e as metástases⁶².

2.8.2. MACRÓFAGOS NO MICROAMBIENTE TUMORAL

Os macrófagos associados ao tumor (TAM) são macrófagos que fazem parte do microambiente em torno da massa tumoral, e estão situados no interior ou próximo ao tumor, sendo componente chave do microambiente tumoral⁶³. Sinais derivados do câncer e de células do hospedeiro geralmente guiam a função dos TAM para M2 polarizado, como modo propulsor do tumor⁶³.

O microambiente tumoral consiste em uma mistura de células residentes como os fibroblastos e células migratórias hematopoiéticas, dos quais os macrófagos estão em maior número².

Quanto a biologia tumoral, sabe-se que tumores sólidos apresentam alta densidade de células em apoptose (ou morte celular programada) e infiltração de macrófagos (TAM – do inglês, *tumor associated macrophages*) em seu parênquima¹⁰.

O microambiente tumoral tem sido considerado um importante alvo para terapias anticâncer. Microambiente tumoral envolve diversos tipos celulares, não tumorais, essenciais para o tumor, como, por exemplo, os vasos sanguíneos necessários para a vascularização do tumor. O tumor, mais do que uma massa de células transformadas, é um microambiente tecidual, com características semelhantes a um ambiente inflamatório ou um tecido em regeneração.

Na biologia dos tumores, a perda de células em doenças malignas é um componente muito significativo da dinâmica tumoral e a apoptose é um processo comum em alto grau de malignidade, no qual altos índices de apoptose geralmente refletem em prognóstico ruim⁶⁴. Além disso, achados do nosso grupo de pesquisa mostram que as células apoptóticas do tumor podem, autonomamente, produzir fatores que promovem o crescimento desta população celular⁶⁵.

Os macrófagos associados ao tumor, tipo M2, são famosos por sua atividade pró-tumoral ao invés da função antitumoral^{36, 66}. Talvez, a mais conhecida atividade pró-tumoral dos TAM seja a angiogênese⁶⁵. Além disso, essas células podem ativar efeitos anti-inflamatórios, ativar imunossupressão, liberar fatores de crescimento e

sobrevivência, remodelar a matriz do microambiente e ainda, liberar fatores metastáticos⁶⁵.

Embora existam evidências sugerindo um papel pró-tumoral dos TAM, os mecanismos de conversão entre fenótipos (M1 e M2) e o papel destes no desfecho (prognóstico) ainda não está bem estabelecido. Sendo assim, o modelo *in vitro* proposto nesse trabalho pode auxiliar no estabelecimento de condições básicas de pesquisa para o entendimento e encaminhamento a estudos mimetizando realmente a condição humana.

2.8.3. ATEROSCLEROSE

Aterosclerose é uma doença inflamatória crônica multifatorial, lenta e progressiva, caracterizada pela formação de ateroma no interior dos vasos sanguíneos. Os ateromas são placas, compostas especialmente por lipídeos e tecido fibroso, que se formam na parede dos vasos. Levam progressivamente à diminuição da luz do vaso, podendo chegar à obstrução total do mesmo. A aterosclerose em geral é fatal quando afeta as artérias do coração ou do cérebro, órgãos esses, que resistem apenas poucos minutos sem oxigênio. Os macrófagos são os responsáveis pela fagocitose das lipoproteínas que penetram na parede dos vasos sanguíneos, levando ao ateroma. A aterosclerose tem como principais consequências o infarto do miocárdio, a isquemia cerebral e o aneurisma aórtico⁶⁷.

O acúmulo da lipoproteína de baixa densidade (LDL) no compartimento plasmático pode ocorrer em virtude de uma dieta rica em gorduras, da síntese endógena de colesterol ou mesmo pela diminuição do catabolismo da LDL pelo

fígado, causado por um defeito genético que promove deficiência na expressão ou na função dos seus receptores, resultando na hipercolesterolemia⁶⁸. No entanto, estes fatores genéticos estabelecem uma complexa interação com os de natureza ambiental, ligados principalmente com a dieta, que determinam a concentração da LDL no plasma⁶⁹.

A aterosclerose é caracterizada pelo acúmulo de depósitos de colesterol/LDL nos macrófagos em artérias de grande e médio porte. Essa deposição leva a uma proliferação de certos tipos de células no interior da parede arterial que, gradualmente, diminui sua luz e impede o fluxo de sangue por eles³⁵. A magnitude deste problema é tão grande que a aterosclerose reivindica mais vidas do que todos os tipos de câncer combinados e, os custos econômicos são então consideráveis³⁵.

Os radicais são capazes de reagir com o chamado lipídio de baixa densidade, ou o mau colesterol, que circula no sangue. Essa gordura alterada pelo oxigênio recruta células imunológicas, os macrófagos, que fazem um serviço de limpeza no organismo, engolindo uma molécula de colesterol atrás da outra. Essas células, contudo, são convocadas para recuperar eventuais lesões na parede dos vasos e, essas, muitas vezes rompem, espalhando o conteúdo intracelular oxidado no local da lesão. Isso atrai macrófagos para o sítio, provocando acúmulo de colesterol na parede do vaso, impedindo o fluxo de sangue pelo vaso (aterosclerose)⁷⁰⁻⁷².

A captação de LDL pelo seu receptor inicia-se com a interação da lipoproteína com os receptores presentes em fossas revestidas (*coated pits*) de clatrina. O conjunto LDL-receptor é englobado, funde-se ao lisossomo, sendo o receptor reciclado e o colesterol liberado para o citoplasma. Esse colesterol induz a *down*

regulation dos receptores para LDL, garantindo menor aporte e prevenindo o acúmulo deste colesterol⁷⁰⁻⁷².

Quando LDL é captada por receptores *scavengers* de macrófagos, não ocorre a retroalimentação negativa, de modo que quantidades de lipídeo se acumulam, convertendo o macrófago em uma célula espumosa, que é precursora de placas de ateroma. A oxidação da LDL ocorre pelos mesmos mecanismos produtores de radicais livres usados como bactericidas. A LDL oxidada exerce efeito imunológico, recrutando monócitos que são convertidos a macrófagos que se tornam residentes nesta que será uma nova estria gordurosa. A remoção da LDL pelos receptores *scavengers* resulta em acúmulo de colesterol e formação de células espumosas. Além disso, LDL oxidada é citotóxica, causando disfunção do endotélio vascular, alterando seus mecanismos vasodilatadores e anticoagulantes. A necrose de células espumosas e o aparecimento de fibroblastos e células musculares lisas levam ao surgimento de uma estrutura que contém cristais de colesterol intra e extracelular, células necróticas e fibras musculares lisas em proliferação. Lesão essa que provoca espessamento da parede do vaso, diminuindo sua luz, que é revestida por uma capa fibrótica, onde se encontram o endotélio lesado e trombos⁷⁰⁻⁷².

Assim, pelo fato de os macrófagos estarem tão intimamente associados a aterosclerose, torna-se também importante seu estudo nesta linha, seguimento que pode ser facilitado pelo estabelecimento de um modelo padrão de ativação dos macrófagos, possibilitando estudos direcionados a essa doença em específico.

2.8.4. DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

O sistema nervoso é responsável pela maioria das funções de controle em um organismo, coordenando e regulando as atividades corporais. O neurônio é a unidade funcional deste sistema.

A morte celular programada faz parte de diversos processos vitais, como o desenvolvimento embrionário, o controle de tumores e a regulação de populações de células do sistema imune. Alterações nos genes responsáveis pelos sistemas de autodestruição podem ser desastrosas. Por ser indispensável à vida, a morte da célula deve seguir um plano meticuloso, uma vez que um distúrbio de sua regulação (tanto o excesso quanto a insuficiência) pode provocar uma variedade de doenças³⁵.

Os microglíocitos ou microglia são as menores células da neuroglia. Pode-se dizer que são os macrófagos residentes no SNC. Possuem elevado poder fagocitário e representam uma variedade de macrófagos que atuam na defesa do sistema nervoso central. A microglia é capaz de reconhecer e fagocitar antígenos, aderindo proteínas dos mesmos na sua membrana citoplasmática, e apresenta estas proteínas a outras células de defesa. Da microglia fazem parte as células endimárias e as células de Schwann.

Existem fortes evidências na literatura de que a inflamação no SNC está envolvida na patogênese de doenças neurodegenerativas agudas e crônicas, incluindo doenças de Parkinson, Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica, trauma do cérebro e medula espinhal e acidente vascular encefálico⁷³. A neurodegeneração mediada por inflamação envolve ativação de macrófagos residentes no encéfalo (microglia), que liberam fatores neurotóxicos e pró-inflamatórios, incluindo citocinas, radicais livres, óxido nítrico e eicosanóides que podem lesar neurônios e células gliais⁷³.

A literatura mostra que, embora os mecanismos inflamatórios participem dos fenômenos de reparação tecidual, também, estão envolvidos em processos de degeneração secundária em doenças agudas e crônicas do SNC⁷⁴.

Salientando a necessidade da busca de novas terapias e métodos de prevenção, que possam prevenir ou tratar doenças neurológicas hoje incuráveis. Por isso, damos ênfase á importância do estudo de um modelo básico, *in vitro*, utilizando células humanas, que possa subsidiar outros trabalhos, tendo esses dados como princípio.

3. JUSTIFICATIVA

Essa dissertação apresenta uma característica multidisciplinar e interinstitucional que contribui para o avanço no conhecimento básico dos mecanismos envolvidos entre macrófagos e patologias. Uma vez demonstrada a importância dos macrófagos em relação a diversas patologias humanas, como o câncer, a aterosclerose e doenças neurodegenerativas, buscamos estabelecer as melhores condições para a diferenciação e polarização de macrófagos humanos, para serem utilizados como modelo *in vitro*, auxiliando em estudos posteriores mais elaborados e de maior abrangência.

4. OBJETIVOS

4.1 PRINCIPAL

Estabelecer as melhores condições de diferenciação celular para um modelo *in vitro*, com células de linhagem humana U937, caracterizando a diferenciação dessas em macrófagos-*like* e sua posterior polarização até os fenótipos M1 e M2.

4.2 SECUNDÁRIOS

- a. Estabelecer as melhores condições experimentais para a diferenciação da linhagem de células humana U937 em macrófagos com tratamento com PMA;
- b. Avaliar: marcadores de proliferação e adesão celular, mudanças morfológicas da cultura *in vitro* e produção de ERO;
- c. Estabelecer as melhores condições experimentais para a polarização dos macrófagos em fenótipos M1 e M2, pelo tratamento com IFN-gama + LPS e IL-4, respectivamente;
- d. Avaliar, por meio de ferramentas de bioinformática, as redes de genes envolvidos em cada um dos fenótipos, M1 e M2.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Roitt I, Brostoff J, Male D. *IMUNOLOGIA*, Sexta Edição. Barueri SP: Editora Manole Ltda, 2003.
2. Ginderachter Jo A Van, Movahedi K, Ghassabeh GH, Meerschaut S, Beschin A, Raes G, et al. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology*.2006; 211: 487-501.
3. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol*. 2005; 5:953-964.
4. Gregory CD, Devitt A. The macrophage and the apoptotic cell: an innate immune interaction viewed simplistically? *Immunology*. 2004; 113, 1-14.
5. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*.2004; 25:677–686.
6. Ohri CM, Shikotra A, Green RH, Walter DA, Bradding P. Macrophages within NSCLC tumor islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. *Eur. Respir. J* 2009; 33:118-126.
7. Mantovani A. Orchestration of macrophage polarization. *Blood*.2009; 114: 3135-3136.
8. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nature Rev Immunology*. 2002; 2: 965-975
9. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. 2006; 124: 263-266.

10. Klein E, Mantovani A. Action of natural killer cells and macrophages in cancer. *Curr.Opin.Immunol.*1993; 5:714.
11. Sica A, Larghi P, Mancino A, et al. Macrophage polarization in tumour progression. *SeminCancerBiol* 2008; 18: 349–355
12. INCA - <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=2> (acessado 15/12/2012).
13. VASCULAR.MED - <http://www.vascular.med.br/doencas-aterosclerose.php> (acessado 18/01/2013).
14. Mitra S, Deshmukh A, Sachdeva R, Lu J, Mehta JL. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy. *The American Journal of the Medical Sciences.*2011; 342:135-142.
15. Popovich PG, Guan Z, Wei P, Huitinga I, Rooijen Van N, Stokes BT. Depletion of Hematogenous Macrophages Promotes Partial Hindlimb Recovery and Neuroanatomical Repair after Experimental Spinal Cord Injury. *Experimental Neurology.*1999; 158:351-365.
16. Popovich PG, Hickey WF. Bone Marrow Chimeric Rats Reveals the Unique Distribution of Resident and Recruited Macrophages in the Contused Rat Spinal Cord. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.*2001; 60:676-685.
17. Popovich PG, Guan Z, Mcgaughy V, Fischer L, Hickey WF, Basso DM. The Neuropathological and Behavioral Consequences of Intraspinal Microglial/Macrophage Activation. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.*2002; 61:623-633.

18. Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in Neurodegenerative Disease - a Double Edged Sword. *Neuron*.2002; 35:419-432.
19. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nature*.2003; 3:23-35.
20. Ma J, Liu L, Che G, Yu N, Dai F, You Z. The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC Cancer*.2010; 10:112.
21. Gregory CD, Pound JD. Cell death in the neighborhood: direct microenvironmental effects of apoptosis in normal and neoplastic tissues. *Journal of Pathology*.2011; 223:177-194.
22. Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW. Tumor-induced immune vc dysfunction: the macrophage connection. *J. Leukocyte Biol*. 1998; 64:275.
23. Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity*.2005; 23:344–346.
24. Hyung-Joo K and Doo-Sik K. Production of nuclease activity in U937 cells by phorbol 12-myristate 13-acetate and lipopolysaccharide. *J. of Biochemistry and Molecular Biol*. 2003; 36:520-523.
25. Hattori T, Pack M, Bougnoux P, Chang ZL, Hoffman T, Interferon-induced Differentiation of U937 Cells. *The Journal of Clinical Investigation*.1983; 72:237-244.
26. Couzzo F, Raciti M, Bertelli L, Parente R, Di Renzo Livia. Pro-death and pro-survival properties of ouabain in U937 lymphoma derived cells. *Journal of experimental and clinical cancer research*.2012; 31:95.
27. Yurinskaya VE, Moshkov AV, Wibberley VW, Lang F, Modelb MA, Vereninov AA. Dual Response of Human Leukemia U937 Cells to Hypertonic

Shrinkage: Initial Regulatory Volume Increase (RVI) and Delayed Apoptotic Volume Decrease (AVD). *Cell PhysiolBiochem*. 2012; 30:964-973.

28. Harris P and Raiph P. Human Leukemic Models of Myelomonocytic Development: A Review of the HL-60 and U937 Cell Lines. *Journal of Leukocyte Biology*.1985; 37:407-422.

29. Liu D, Chen XY, Xiong RP, Ning YL, Li P, Peng Y, et al. Dexamethasone inhibits U937 cell adhesion via the down regulation of ROCK1 activity. *BiochimicaPolonica*. 2012; 4:557-560.

30. Hass R, Bartels H, Topley N, Hadam M, Kohler L, Goppelt-Strube M, et al. TPA-induced differentiation and adhesion of U937 cells: changes in ultrastructure, cytoskeletal organization and expression of cell surface antigens. *Eur. J. Cell Biol*. 1989; 48:282-293.

31. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *IMUNOLOGIA CELULAR E MOLECULAR*, Sétima Edição. Rio de Janeiro RJ: Editora ElsevierLtda, 2011.

32. Rollings BJ. Chemokines. *Blood*.1997; 90:909-928.

33. Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol.Today*.1999; 20:254-257.

34. Hamilton TA. Molecular basis of macrophage activation: from gene expression to phenotypic diversity. *The Macrophage*.2002; 73-102.

35. Stocker R and KeaneyJFJr. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2004; 84:1381–1478.

36. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today*. 1992; 13:265–270.

37. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*. 2002; 11:549-555.
38. Chang C, Liao J, Kuo L. Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity. *Cancer Res*. 2001; 61:1100-1106.
39. Harmon BG, Glisson JR, Nunnally JC. Turkey macrophage and heterophil bactericidal activity against *Pasteurella multocida*. *Avian Dis*. 1992; 36:986-91.
40. Qureshi MA, Dietert RR, Burleson GR, Dean J, Munson A. Bacterial uptake and killing by macrophages. In: *Methods in immunotoxicology*. 1995; 119-31.
41. Qureshi MA, Miller L, Lillehoj HS, Ficken MD. Establishment and characterization of a chicken mononuclear cell line. *Vet Immunol Immunopath*. 1990; 26:237-50.
42. Beug H, Kirchbach A, Doderlein G, Conscience JF, Graf T. Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell*. 1979; 18:375-90.
43. Qureshi MA, Marsh JA, Dietert RR, Sung YJ, Nicholas-Bolnet C, Petite JN. Profiles of chicken macrophage effector functions. *Poult Sci*. 1994; 73:1027-34.
44. Hussain I, Qureshi MA. The expression and regulation of inducible nitric oxide synthase gene differ in macrophages from chickens of different genetic background. *Vet Immunol Immunopathol*. 1998; 61:317-29.
45. Bombara CJ, Taylor RL Jr. Signal transduction events in chicken interleukin-1 production. *Poult Sci*. 1991; 70:1372-80.

46. Cieszynski JA, Qureshi MA, Taylor RL Jr. Calcium role in chicken IL-1 secretion. *PoultSci*. 1999; 78:70-4.
47. Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit JE. FUNDAMENTOS EM HEMATOLOGIA, Quinta edição. Porto Alegre RS: Artmed, 2008.
48. Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD. IMUNOBIOLOGIA: O SISTEMA IMUNOBIOLOGICO NA SAÚDE E NA DOENÇA, Quarta edição. Porto Alegre: Artmed, 2000.
49. Rapaport SI. HEMATOLOGIA: INTRODUÇÃO, Segunda edição. São Paulo: Editora Roca, 1990.
50. Abbas AK, Janewa CYJR. Immunology: Improving on Nature in the Twenty-First Century. *Cell*. 2000; 100:129-138.
51. Gordon S. Macrophage Function Disorders. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2001; 1:1-11.
52. Hermann GE, Rogers RC, Bresnahan JC, Beattie MS. Tumor Necrosis Factor-Alpha Induces Cfos and Strongly Potentiates Glutamate-Mediated Cell Death in the Rat Spinal Cord. *Neurobiology of Disease*. 2001; 8:590-599.
53. Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: Potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist*. 2004; 9: 361-377.
54. Castellana D, Zobairi F, Martinez MC, Panaro MA, Mitolo V, Freyssinet JM, et al. Membrane microvesicles as actors in the establishment of a favorable prostatic tumoral niche: a role for activated fibroblasts and CX3CL1–CX3CR1 axis. *Cancer Res*. 2009; 69:785-793.

55. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*.2008; 454:436-444.
56. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*.2010; 141:39-51.
57. Biswas SK and Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* 2010; 11:889-896.
58. Mantovani A and Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr.Opin.Immunol.*2010; 22:231-237.
59. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *Pathol.* 2002; 196:254-265.
60. Kurahara H, Shinchi H, Mataka Y, Maemura K, Noma H, Kubo F, et al. Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *J Surg Res.* 2011; 167: e211-e219.
61. Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2010; 362:875-885.
62. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments.*Cancer Res.* 2006; 66:605-612.
63. Mantovani A, Germano G, Marchesi F, Locatelli M, Biswas S. Cancer-promoting tumor-associated macrophages: New vistas and open questions. *Eur. J. Immunol.* 2011; 41:2470-2525.

64. Gregory CD, Devitt A, Debatin KM, Fulda S, Wiley VCH, Verlag GmbH, et al. Apoptotic cell clearance by macrophages: relevance to tumor pathogenesis. *Apoptosis and Cancer Therapy*.2006; 647–668.
65. Gregory CD, Pound JD. Microenvironmental influences of apoptosis in vivo and in vitro. *Apoptosis*.2010; 15:1029–1049.
66. Cohn ZA. The macrophage—versatile element of inflammation. *The Harvey lectures, Series 77*. Academic Press.1983; 63–80.
67. Camacho CRC, Melicio LAD, Soares ÂMVC. Atherosclerosis, an inflammatory response.*ArqCiêncSaúde*. 2007; 14:41-48.
68. Thompson GR, Soutar AK, Spengel FA, Jadhav A, Gavigan SJ, Myant NB. Defects of receptor-mediated low density lipoprotein catabolism in homozygous familial hypercholesterolemia and hypothyroidism in vivo.*ProcNatlAcadSci*. 1981; 78:2591-5.
69. Santos RD. III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *ArqBrasCardiol*. 2001; 77:1-48.
70. <http://portaldocoracao.uol.com.br/doencas-cardiovasculares.php?id=3> (acessado 11/01/2013).
71. <http://www.mega21.com.br/artigo/250-Reacoes-prejudiciais-dos-radicais-livres.htm> (acessado 11/01/2013).
72. <http://www.geocities.com/bioquimicaplicada/Aterosclerose.htm> (acessado 07/12/2012).
73. Wyss-Cora YT, Mucke L. Inflammation in Neurodegenerative Disease -a Double Edged Sword. *Neuron*.2002; 35:419-432.

74. Lima RR, Costa AMR, Souza RD, Leal WG. Inflammation in Neurodegenerative Disease. *Revista Paraense de Medicina*. 2007; V21 (2).
75. Kurabayashi A, Furihata M, Matsumoto M, Hayashi H, Ohtsuki Y. Distribution of tumor-infiltrating dendritic cells in human non-small cell lung carcinoma in relation to apoptosis. *Pathology International*. 2004; 54:302-310.
76. Singhal S, Vachani A, Antin-Ozerkis D, Kaiser LR, Albelda SM. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review. *Clin Cancer Res*. 2005; 10:1158-1178.
77. Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, et al. Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell*. 2004; 14:277–287.
78. Henson PM, Hume DA. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends Immunol*. 2006; 27:244–250.
79. Ravichandran KS, Lorenz U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nature Rev Immunol*. 2007; 7:964–974.
80. Elliott MR, Ravichandran KS. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol*. 2010; 189:1059–1070.
81. Chang GH, Barbaro NM, Pieper RO. Phosphatidylserine dependent phagocytosis of apoptotic glioma cells by normal human microglia, astrocytes, and glioma cells. *NeuroOncol*. 2000; 2:174–183.

6. ARTIGO EM INGLÊS

O artigo será submetido à Revista Biochimica et Biophysica Acta (BBA).

ARTICLE***In vitro* differentiation of the human histiocytic lymphoma U937 cell line into macrophages-*like* and their M1/M2 polarization**

Daiane Huppes¹, Matheus Becker Freitas^{2,3,4}, Marco Antônio De Bastiani^{2,3,4}, Fábio Klamt^{1,2,3,4*}.

¹Graduate Program in Medicine: Medical Science, UFRGS, Porto Alegre (RS), Brazil;

²Department of Biochemistry, ICBS/UFRGS, Porto Alegre (RS), Brazil;

³National Institutes for Science & Technology - Translational Medicine (INCT-TM), Porto Alegre (RS), Brazil;

⁴Rede Gaúcha de Estresse Oxidativo e Sinalização Celular (FAPERGS), Porto Alegre (RS), Brazil;

*Corresponding author: Prof. Fábio Klamt, Ph.D. Departamento de Bioquímica, ICBS/UFRGS. Rua Ramiro Barcelos 2600, Porto Alegre (RS) Brasil 90035-003, phone: +55 51 3308-5556; FAX: +55 51 3308-5535; e-mail: 00025267@ufrgs.br

Article submitted to the Biochimica et Biophysica Acta (BBA).

ABSTRACT

Introduction: *In vitro* model of macrophages ($M\Phi$) can be used to evaluate the influence of these cells in human pathologies. **Objective:** To establish an *in vitro* model to study macrophages and it' evaluating their M1/M2 polarization. **Methods:** The human U937 cell line was grown in medium RPMI 1640 and differentiated into functional macrophages by 10 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-treatment, with M1 or M2 phenotypes with LPS/IFN γ and IL-4, respectively. Reactive Oxygen Species (ROS) (time course of DCF oxidation), nitric oxide (NO) (Griess method), cell proliferation (MTT assay) and adherence (SRB method), and change in cellular morphology were determined. Moreover, two microarray data sets from Gene Expression Omnibus (GEO) (GSE5099 and GSE15038) were used to analyze differential M1/M2 gene expression with the online bioinformatics tools STRING, MEDUSA and Via Complex. **Results:** Time course experiments (0, 24, 48 and 72h) showed decreased cell proliferation with increase in morphological changes, cell adherence and ROS generation in PMA-treated U937 cells compatible with the acquisition of a macrophage-*like* phenotype. Bioinformatics approach showed increased expression in M1/M2 genes by PMA-treatment. 24h of LPS/IFN γ -treatment induced increased NO, ROS, and the expression of M1 genes (classical activation $M\Phi$), while 24h IL-4-treatment induced the expression of M2genes (alternative activation $M\Phi$). **Conclusion:** This simple human macrophage-*like* differentiation and M1/M2 activation protocol could be used *in vitro* to establish the role of these cells in human pathologies.

Keywords: U937 cells, macrophages, differentiation protocol, classical activation, alternative activation, M1/M2.

1- Introduction

Mononuclear phagocytes are of crucial importance for host immune defenses. Monocytes emigrate from blood vessels in response to antigenic insults, and differentiate in the tissues into macrophages (M Φ) and dendritic cells (DCs) [1]. Macrophages are best well known for initiating an effective innate immune response against microbes [2]. Macrophages heterogeneity is well recognized [3]. It arises as macrophages differentiate from monocyte precursors, and is determined by the genetic background as well as by specific tissue-related and immune-related stimuli [1, 4].

The best characterized macrophages response to microbial molecules, cancer cells and host cytokines is the release of inflammatory/microbicidal/tumoricidal products. This is the *classical activation*, and occurs with IFN γ and TNF stimuli [3]. These macrophages are called M1 and they typically produce high levels of IL-12 and low levels of IL-10. In addition, these cells exert anti-proliferative/pro-inflammatory/cytotoxic activities, resulting partly from their ability to secrete reactive nitrogen and oxygen species [5, 6]. Distinct mediators have been reported to inhibit the development of M1 and impart anti-inflammatory properties on macrophages, which were collectively termed *alternatively activated* (M2): Th2 cytokines, such as IL-4 and IL-13; deactivating cytokines, such as IL-10 and TGF- β [7, 8]. Gordon and colleagues proposed to restrict the definition of alternative activation to IL-4 and/or IL-

13 elicited macrophages [9]. After, was used a high production of IL-10 and low production of IL-12 as a unifying theme to label macrophage with the more generic name M2 [10]. Other well reports differences between M1 and M2 are situated at the level of cytokine and chemokine secretion. M1 produce high amounts of pro-inflammatory and Th1-steering cytokines, including IL-12, IL-23, TNF, IL-6 and Type I IFN, while M2 are more prominent producers of the anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β [3].

A common progenitor gives rise to tissue macrophages, myeloid dendritic cells (DCs) and osteoclasts. Once distributed through the blood stream, monocytes constitutively enter all tissue compartments of the body. Resident macrophages populations in different organs, such as Kupffer cells (liver), alveolar macrophages (lung) and microglia (central nervous system, CNS), adapt to their local microenvironment. The signals that are responsible for tissue-specific phenotypes of macrophage include surface and secretory products of neighboring cells and extracellular matrix [9]. Cytokines and microbial products profoundly and differentially affect the function of mononuclear phagocytes [10].

In view of their anti-inflammatory effects and possible role in trophic and repair processes, several authors have proposed that alternatively activated macrophages might contribute to a range of inflammatory and non-inflammatory processes in health and disease. These might include tolerance of the allogeneic fetus, repair (including in the central nervous system, CNS), atherosclerosis and tumor-host-stroma interactions [9].

Here, we describe a simple protocol for *in vitro* differentiate the human histiocytic lymphoma U937 cell line into macrophages-*like* cells and their M1/M2

polarization, which can help in future studies to establish the roles of these cells in relationship with to human pathologies.

2- Materials and methods

CELL CULTURE AND CHEMICALS: Exponentially growing human histiocytic lymphoma U937 cells were maintained in RPMI 1640 medium (Invitrogen®) containing 10% fetal bovine serum (FBS), 1 µg/mL of amphotericin B and 50 µg/L of garamycin at 37°C in a humidified atmosphere of 5% of CO₂, and treated with 10 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in 24 well plates at a density of 10⁵ cells/well for 0, 24, 48 and 72 hours. Chemical were obtained from Sigma® Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), except when indicated.

REACTIVE OXIGEN SPECIES GENERATION: The probe DCF-DA (2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) reacts with reactive oxygen species emitting fluorescence and was used to determine intracellular generation of ROS. U937 cells were seeded in 96-well plates and grown for 48h. Then, culture medium was removed and 100 µM DCF-DA in serum-free medium was added. Later, cells were washed and rinsed with sterile PBS. The fluorescence was monitored for 1 h in a 96-wells plate reader (Spectra Max GEMINI XPS, Molecular Devices, USA) (ex./em. 485/520 nm).

MTT ASSAY AND CELL ADHERENCE: Undifferentiated and differentiated U937 cells were incubated with a solution of MTT 0.5 mg/mL for 1h. The absorbance

was measured using a wavelength of 560 nm. Adherences were calculated using the sulforhodamine B (SRB) method.

NITRIC OXIDE PRODUCTION: Griess method was used to quantify the production of nitric oxide (NO). Briefly, 20 μ l of Griess reagent was added, and the remaining concentration of nitrite was determined at 540 nm. As nitrite is the only stable final product of the autoxidation of NO in aqueous solution, only nitrite was measured by the Griess reaction. The results were expressed as a percentage of the generated nitrite, using sodium nitrite as a standard.

CELL IMAGES: Phase contrast images of proliferative and PMA-treated U937 cells were obtained under a light microscope (Nikon ECLIPSE TE300) with a digital camera (Nikon DXM1200C) after 0, 24, 48 and 72h of treatment.

BIOINFORMATICS: Transcript expression profile of U937 cells was extracted from the Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) (GSE5099 and GSE15038). U937 cells were profiled with their genome-wide gene expression patterns using Affymetrix HG-U133A chips. After the gene selection, the network was built utilizing the Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) version 9.0 (<http://string-db.org/>). All genes collected served as entry for the database and filtered for “experiments”, “medium confidence”, plus one layer of interaction. The resultant network is presented in figure 3A. For the gene expression analysis we utilized the ViaComplex software version 1.0 [11]. The main advantage of this program is that it is able to distribute a given quantity

(quantitative or qualitative data) onto gene/protein interaction networks. To do this, ViaComplex overlaps functional information (*e.g.* microarray data) with interaction information (supplied by the gene network built). We utilized statistical analysis available in the ViaComplex package, which estimates the relative expression level of Groups of Functionally Associated Genes (GFAGs) and is describe elsewhere [12]. Briefly, to obtain a quantitative parameter that characterizes the functional state of each Group of Functionally Associated Genes (GFAG) in the sample, ViaComplex measures the information content using Shannon's entropy.

STATISTICAL ANALYSIS: Data were expressed as mean \pm standard deviation of at least 3 independent experiments performed in triplicate ($n = 3$). The "t" test was used to analyze differences between control/treated. Multiple comparisons were performed using ANOVA, with a minimum significance of $p < .05$. The statistical analyzes and graphics were performed using GraphPad[®] program (San Diego, CA, USA, version 5.0.).

3- Results

Our results show that the exponentially growing human histiocytic lymphoma U937 cells have retained the capacity to response to inducers (treatments) of differentiation with cessation of growth and appearance of a more mature, differentiated, macrophages phenotype [13]. To prove that the phorbol 12-myristate 13-acetate treatment of the U937 cells induces monocyte/macrophage differentiation, we first determine the efficiency of transformation of U937 cells to macrophages by

treatment with PMA when compared with controls (Figure 1). Thus we can see that treatment with PMA, as compared to control (untreated) cells, was effective since it shows a halt in cell growth as a function of time, which is characteristic of human U937 cells. The treated cells lose proliferative potential and become mature effector cells. These cells had showed also increased in the production of RS over time. The production of reactive species is an important effector function of macrophages and is a characteristic of maturation [14]. In other experiments we can see the capacity of these treated cells to adhere in the bottom of culture plates. In nature cells U937, the growth was in suspension, and the cells showed a typical spherical shape. When treated with PMA, the most readily observable maturational changes were morphological. The cells adhered to the plate and emitted extension, showing that PMA really inhibited and modified the growth of the human line U937 [15].

After the activation monocyte-macrophage, we left for the activation of different phenotypes of the macrophage, M1 and M2 (Figure 2). In these experiments, we saw that the classical activation with IFN, LPS, and both combined was better and more effective when combined LPS and IFN treatments. It was demonstrated that the production of NO and ROS, markers for mature effector cells such as pro-inflammatory macrophages, were higher than when the combination treatment was separately. On the other hand, alternative activation was just only with IL-4, which was not as effective as the previous treatment. However, we can see a drop in production of NO in the treated cells compared with control cells showing that these cells really showed M2 phenotype that lose their potential effector and become less toxic. Therefore, they have an anti-inflammatory profile [10].

To make analysis of genes involved in the activation of monocytes and macrophages in the different phenotypes M1 and M2, we used the bioinformatics approach. Through database available in websites, we did a meta-analysis of genes as enzymes, cytokines and others proteins involved with macrophages maturation and polarization, to enhance the understanding of these different activations. These genes are listed on table 1.

With the bioinformatics approach we analyzed several genes involved in the activation of monocytes to macrophages and macrophage to different phenotypes M1 and M2 (Figure 3). Network association of genes expressed in phenotypes M1 and also M2 - based on the literature studied previously - shows two opposite poles, clearing the idea that each phenotype is proper and with very different characteristics: M1 is pro-inflammatory and M2 is anti-inflammatory, among other characteristics of opposition. U937 cells treated with PMA demonstrated an increase in both M1 and M2 gene expression network. When analyzed the expression of genes/control in cells with IFN + LPS treatment they have increase in the activity (gene expression level) just in M1 network, confirming the efficacy of our protocol with the classical activation. When the treatment is with IL-4, the expression of genes/control to the M1 genes has a decrease and the activated genes were on other side, demonstrated that is alternatively activation (M2 activation).

4- Discussion

Mononuclear phagocytes are amongst the most versatile cell types of the immune system, able to adapt a continuum of activation states in response to

environmental signals. M1-polarized macrophages mediate resistance to intracellular pathogens, tissue destruction, and anti-tumor resistance. In contrast, M2-polarized cells come in different flavors and are generally oriented to tissue remodeling and repair, resistance to parasites, immunoregulation, and tumor promotion [16]. M2 macrophages have been traditionally thought of as being the predominant macrophage phenotype in solid tumors (Macrophages associated tumor - TAM) [10].

Mononuclear phagocytes are versatile, plastic cells that respond to environmental influences with the expression of distinct transcriptional programs and functions. Like show the genes in the table 1, together with figure 3, is possible to perhaps this capacity to macrophage transform in M1 or M2 phenotypes, in according to the situation and localization of them (according with the environmental). It is possible that one side of genes is activated, transformed to M1 polarization by the classical activation. In other hand, if others side of genes are activated by means stimuli, the alternative activation is turn on and the M2 polarization macrophage came up.

Plasticity is a hallmark of the mononuclear phagocyte system [10]. The U937 human cell line provides an ideal model for studying the changes in intracellular events that take place during differentiation. These cells proliferate autonomously; however, they have the capacity to response to inducers of differentiation with cessation of growth and appearance of a more mature phenotype [17], see the figure 1. One of these is the PMA, which show to be efficient for the differentiation here and in other studies.

This *in vitro* model is reliable with what happened in real situations. With this study, we can continue bigger trials in different areas and different pathologies with

the expectation to understand the microenvironment of macrophages and other cells. However, these hypotheses of macrophages activation merits further research in future. Such knowledge is essential for understanding the dynamic changes those macrophages shown in a range of physiological and pathological situations.

The *in vitro* model has advantages over the *in vivo* models for example. The primary culture of macrophages varies considerably and cannot mimic the same effect on each culture realized. The *in vitro* model is reproducible up because the cell line (like U937 human line) is very specific and stable. There are several patterns in the literature for this human lineage differentiation, with various substances, different times and different doses. With this pattern of differentiation presented here, with phorbol 12-myristate 13-acetate treatment, we demonstrate a simple model assemble, easy to understand and practical to be used as a basis for further studies involving analysis of macrophages in various diseases, such as the already mentioned: cancer, atherosclerosis, neurodegenerative diseases.

Moreover, the discovery of pathways within the mononuclear phagocyte, responsible for promiscuous activation phenotype may be an important challenge for the future.

5- Conclusion

The main conclusion of this work is that our simple protocol is efficient to induce a macrophages-*like* differentiation of the human histiocytic lymphoma U937 cell line and their M1/M2 polarization. The limitation of this work was in the M2

differentiation. We will pretend to evaluate IL-4 plus IL-13 to potentiate this activation and demonstrate more significant results.

6- References

1. S. Gordon, P.R. Taylor, Monocyte and macrophage heterogeneity, *Nat. Rev. Immunol.* 5 (2005) 953-964.
2. P.R. Taylor, L. Martinez-Pomares, M. Stacey, H.H. Lin, G.D. Brown, S. Gordon, Macrophage receptors and immune recognition, *Annu. Rev. Immunol.* 23 (2005) 901-944.
3. J. A. van Ginderachter, K. Movahedi, G.H. Ghassabeh, S. Meerschaut, A. Beschin, G. Raes, P. de Baetselier, Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the best of both worlds for tumor promotion, *Immunobiology* 211 (2006) 487-501.
4. C.D. Mills, K. Kincaid, J.M. Alt, M.J. Heilman, A.M. Hill, M1/M2 macrophage and the Th1/Th2 paradigm, *J Immunol.* 164 (2000) 6166-6173.
5. B. Bonnotte, N. Larmonier, N. Favre, A. Fromentin, M.Moutet, M. Martin, S. Gurbuxani, E. Solary, B. Chauffert, F. Martin, Identification of tumor-infiltrating macrophages as the killers of tumor cells after immunization in a rat model system, *J Immunol.* 167 (2001) 5077-5083.
6. B. Mytar, M. Siedlar, M. Woloszyn, I. Ruggiero, J. Pryjma, M. Zembala, Induction of reactive oxygen intermediates in human monocytes by tumor cells and their role in spontaneous monocyte cytotoxicity, *Br. J. Cancer* 79 (1999) 737-743.

7. S. Goerdts, C.E. Orfanos, Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells, *Immunity* 10 (1999) 137-142.
8. M.J. Gough, A.A. Melcher, A. Ahmed, M.R. Crittenden, D.S. Riddle, E. Linardakis, A.N. Ruchatz, L.M. Emiliusen, R.G. Vile, Macrophages orchestrate the immune response to tumor cell death, *Cancer Res* 61 (2001) 7240-7247.
9. S. Gordon, Alternative activation of macrophages, *Nature* 3 (2003) 23-35.
10. A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, M. Locati, The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization, *Trends in immunology* 25 (2004) 677–686.
11. C. Castro and J. Rybarczyk, ViaComplex FAQ, last modification, mar 2009, version 1.0.
12. C. Castro, J. Rybarczyk, R. Almeida, ViaComplex V.1.0, Software for Landscape Analysis of Genome Maintenance Mechanisms, 2007.
13. C. Sundstrom, K. Nilsson, Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U937), *Int. J. Cancer* 17 (1976) 565-577.
14. P. Harris, P. Ralph, Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines, *J Leukoc Biol.* 37 (1985) 407-22.
15. T. Hattori, M. Pack, P. Bougnoux, Z.L. Chang, T. Hoffman, Interferon-induced Differentiation of U937 Cells, *The Journal of Clinical Investigation* 72 (1983) 237-244.
16. A. Mantovani, M. Locati, Orchestration of macrophage polarization, *Blood* 15 (2009) 3134-3136.

17. K. Hyung-Joo, K. Doo-Sik, Production of nuclease activity in U937 cells by phorbol 12-myristate 13-acetate and lipopolysaccharide, *J. of Biochemistry and Molecular Biol.* 36 (2003) 520-523.

TABLE 1:

TABLE 1: Gene list used to evaluate macrophages (*Mφ*) M1/M2 phenotypes.

<i>Gene symbol</i>	<i>Mφ phenotype – Gene function/class</i>
	<i>M1 - Enzymes</i>
<i>MMP9</i>	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
<i>MMP7</i>	matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine) butyrobetaine (gamma), 2-oxoglutarate dioxygenase (gamma-butyrobetaine hydroxylase) 1
<i>BBOX1</i>	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1
<i>HSD11B1</i>	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1
<i>PGCP</i>	carboxypeptidase Q
<i>PFKFB3</i>	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3
<i>OAS2</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa
<i>GAD1</i>	glutamate decarboxylase 1 (brain, 67kDa)
<i>SPHK1</i>	sphingosine kinase 1
<i>AK3</i>	adenylate kinase 3
<i>OASL</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like
<i>TPSAB1</i>	tryptase alpha/beta 1
<i>NAMPT</i>	nicotinamide phosphoribosyltransferase
<i>SGK1</i>	serum/glucocorticoid regulated kinase 1
<i>PFKP</i>	phosphofructokinase, platelet
<i>TYMP</i>	thymidine phosphorylase
<i>IDO1</i>	indoleamine 2,3-dioxygenase 1
<i>PTP4A3</i>	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 3
<i>CHI3L2</i>	chitinase 3-like 2
	<i>M1 – Receptors</i>
<i>ARNT2</i>	aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2
<i>LPAR1</i>	lysophosphatidic acid receptor 1
<i>IL-15RA</i>	interleukin 15 receptor, alpha
<i>CSF1R</i>	colony stimulating factor 1 receptor
<i>CCR7</i>	chemokine (C-C motif) receptor 7
<i>NCR3</i>	natural cytotoxicity triggering receptor 3
<i>TNFRSF10B</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
<i>IL-7R</i>	interleukin 7 receptor
<i>IL-2RA</i>	interleukin 2 receptor, alpha
<i>FAS</i>	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
	<i>M1 – Cytokines</i>
<i>IL-15</i>	interleukin 15
<i>IL-12B</i>	interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)
<i>IL-6</i>	interleukin 6 (interferon, beta 2)
<i>TNF</i>	tumor necrosis factor

	<i>M1 – Transcription factors</i>
<i>NCF1</i>	neutrophil cytosolic factor 1
<i>ATF3</i>	activating transcription factor 3
<i>KLF2</i>	Kruppel-like factor 2 (lung)
<i>GADD45G</i>	growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma
<i>IRF7</i>	interferon regulatory factor 7
<i>IRF1</i>	interferon regulatory factor 7
<i>HESX1</i>	HESX homeobox 1
<i>ID3</i>	inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein
	<i>M1 – Proteins</i>
<i>CXCL11</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 11
<i>SLC7A5</i>	solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 5
<i>CXCL10</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
<i>PLA1A</i>	phospholipase A1 member A
<i>PI16</i>	peptidase inhibitor 16
<i>MS4A7</i>	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7
<i>CCL3</i>	chemokine (C-C motif) ligand 3
<i>CCL5</i>	chemokine (C-C motif) ligand 3
<i>SLC31A2</i>	solute carrier family 31 (copper transporters), member 2
<i>SPP1</i>	secreted phosphoprotein 1
<i>BMP2</i>	bone morphogenetic protein 2
<i>BCL2A1</i>	BCL2-related protein A1
<i>PSMA2</i>	proteasome (macropain) subunit, alpha type, 2
<i>PSMB9</i>	proteasome (macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2)
<i>APOL2</i>	apolipoprotein L, 2
<i>APOL3</i>	apolipoprotein L, 3
<i>TNFSF10</i>	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
<i>CDKN1A</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) regulator of G-protein signaling 1
<i>RGS1</i>	
<i>APOL1</i>	apolipoprotein L, 1
<i>APOL6</i>	apolipoprotein L, 6
<i>IER3</i>	immediate early response 3
<i>SPRY2</i>	sprouty homolog 2 (Drosophila)
<i>INHBA</i>	inhibin, beta A
<i>PSME2</i>	proteasome (macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)
<i>CTNND2</i>	catenin (cadherin-associated protein), delta 2
<i>CXCL9</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 9
<i>ZFP36L1</i>	ZFP36 ring finger protein-like 1
<i>CCL20</i>	chemokine (C-C motif) ligand 20
<i>BCL6</i>	B-cell CLL/lymphoma 6
<i>PTX3</i>	pentraxin 3, long
<i>CCL19</i>	chemokine (C-C motif) ligand 19
<i>ELAVL4</i>	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 4
<i>BIRC3</i>	baculoviral IAP repeat containing 3

<i>CCL15</i>	chemokine (C-C motif) ligand 15
<i>CDH13</i>	cadherin 13, H-cadherin (heart)
<i>GNG10</i>	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 10
<i>IGFBP4</i>	insulin-like growth factor binding protein 4
<i>VCAN</i>	versican
<i>APOL1</i>	apolipoprotein L, 1
<i>MB</i>	myoglobin
<i>MMRN1</i>	multimerin 1
<i>TSPAN7</i>	tetraspanin 7
<i>EDN1</i>	endothelin 1
<i>C13orf18</i>	KIAA0226-like
<i>A2M</i>	alpha-2-macroglobulin
<i>PDGFA</i>	platelet-derived growth factor alpha polypeptide
<i>FAIM3</i>	Fas apoptotic inhibitory molecule 3
<i>XAF1</i>	XIAP associated factor 1

M2 - Enzymes

<i>ADK</i>	adenosinekinase
<i>CA2</i>	carbonicanhydrase II
<i>HS3ST2</i>	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 2
<i>HS3ST1</i>	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1
<i>CERK</i>	ceramidekinase
<i>LIPA</i>	lipase A, lysosomalacid, cholesterolsterase
<i>LTA4H</i>	leukotriene A4 hydrolase
<i>TPST2</i>	tyrosylproteinsulfotransferase 2
<i>HNMT</i>	histamine N-methyltransferase
<i>ARG2</i>	arginase, type II
<i>HEXB</i>	hexosaminidase B (beta polypeptide)
<i>ALOX15</i>	arachidonate 15-lipoxygenase
<i>CTSC</i>	cathepsin C

M2 - Receptors

<i>IL1R2</i>	interleukin 1 receptor, type II
<i>FCER2</i>	Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23)
<i>SCARB1</i>	scavenger receptor class B, member 1
<i>MRC1</i>	mannose receptor, C type 1
<i>TGFBR2</i>	transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)
<i>SCARA3</i>	scavenger receptor class A, member 3
<i>MSR1</i>	macrophage scavenger receptor 1
<i>CXCR4</i>	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
<i>HRH1</i>	histamine receptor H1
<i>P2RY13</i>	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 13
<i>P2RY14</i>	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14
<i>TLR5</i>	toll-like receptor 5
<i>CD36</i>	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
<i>CCR2</i>	chemokine (C-C motif) receptor 2

	<i>M2 - Cytokines</i>
<i>IL-10</i>	interleukin 10
<i>TGFBI</i>	transforming growth factor, beta 1
	<i>M2 – Proteins</i>
<i>CLEC4M</i>	C-type lectin domain family 4, member M
<i>SLC38A6</i>	solute carrier family 38, member 6
<i>FGL2</i>	fibrinogen-like 2
<i>FN1</i>	fibronectin 1
<i>SLCO2B1</i>	solute carrier organic anion transporter family, 2B1
<i>GAS7</i>	growth arrest-specific 7
<i>CLEC7A</i>	C-type lectin domain family 7, member A
<i>EGR2</i>	early growth response 2
<i>CD163</i>	CD163 molecule
<i>CLEC10A</i>	C-type lectin domain family 10, member A
<i>CCL27</i>	chemokine (C-C motif) ligand 27
<i>CCL24</i>	chemokine (C-C motif) ligand 24
<i>CCL22</i>	chemokine (C-C motif) ligand 22
<i>CCL23</i>	chemokine (C-C motif) ligand 23
<i>SLC4A7</i>	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7
<i>MS4A6A</i>	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, 6A
<i>MS4A4A</i>	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, 4A
<i>MAF</i>	v-mafmusculoaponeuroticfibrosarcomaoncogenehomolog (avian)
<i>IGF1</i>	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
<i>CCL16</i>	chemokine (C-C motif) ligand 16
<i>CCL18</i>	chemokine (C-C motif) ligand 18
<i>CCL17</i>	chemokine (C-C motif) ligand 17
<i>CCL13</i>	chemokine (C-C motif) ligand 13
<i>CHN2</i>	chimerin 2
<i>CD302</i>	CD302 molecule
<i>CD14</i>	CD14 molecule

Gene symbol and approved name according HGNC (HUGO gene nomenclature committee).

LEGEND OF THE FIGURES:

Fig 1: Activation of U937 human cells line in macrophages with PMA treatment; (A) Rate of cell proliferation was measured by MTT assay at 0, 24, 48 and 72 hours; (B) Level of reactive species produced were measured by DCF assay at 0, 24, 48 and 72h; (C) Cellular images were obtained after the application of the differentiation protocol with 0, 12, 24, 48 and 72h; (D) Relative adhesion rate were measured by SRB assay at 24, 48 and 72 hours.

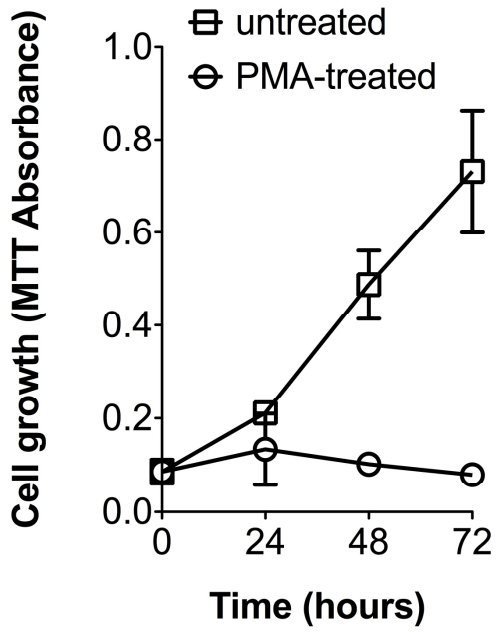
Fig 2: U937 cells differentiated with PMA and activated M1 phenotype under the stimulus of IFN- γ , LPS and LPS + IFN- γ and M2 phenotype with IL-4; (A) Quantification of reactive species (ER) in M1 macrophages using the DCF method; (B) Measurement of NO production (μ M) in macrophage phenotype M1. (C) Quantification of NO production (μ M) in macrophage phenotype M2.

Fig 3: Analysis of the expression of bioinformatics data set GSE15038, wherein the cell line U937 was differentiated into macrophage with PMA for 32h and after treated with IFN- γ + LPS and with IL-4; (A) Association networks of genes expressed in the phenotypes M1 + M2 - based on literature - constructed using the online tool STRING; (B) Activated genes in phenotypes M1 + M2; (C) Analysis of gene expression/ctrl when the treatment is with IFN- γ + LPS (M1 phenotype); (D) Analysis of gene expression/ctrl when the treatment is with IL-4 (M2 phenotype). The X and Y axes represent normal values based on the network topology (ctrl). The

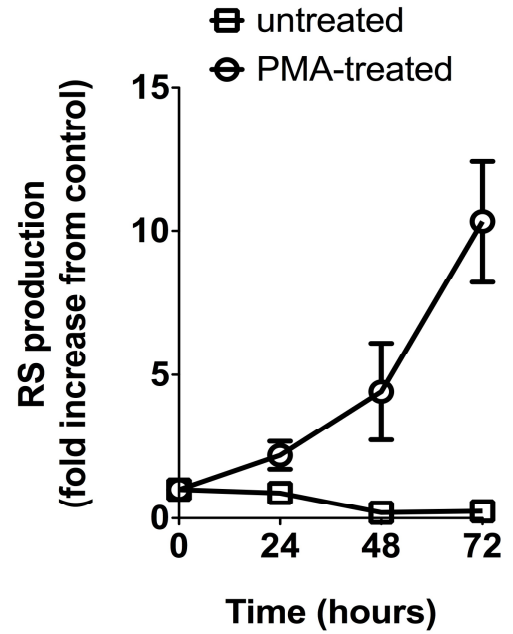
color gradient Z axis represents the increase (more orange/red) or decrease (more blue) of gene expression relative to a control.

FIGURES:

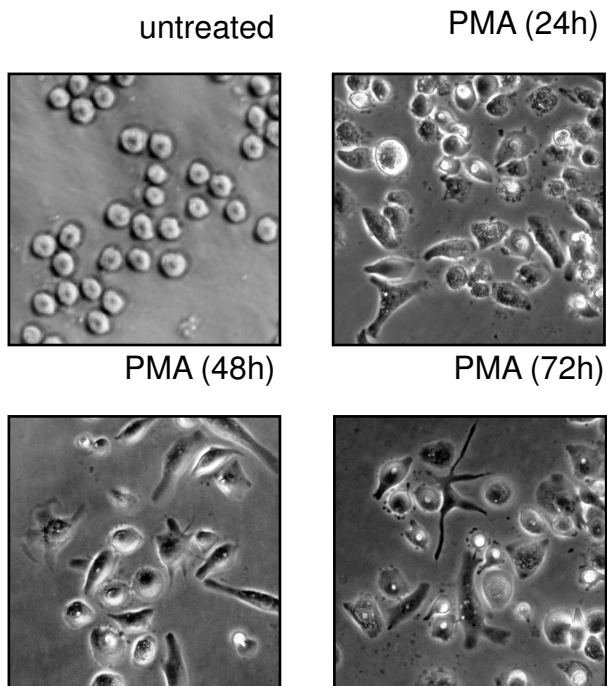
A)



B)



C)



D)

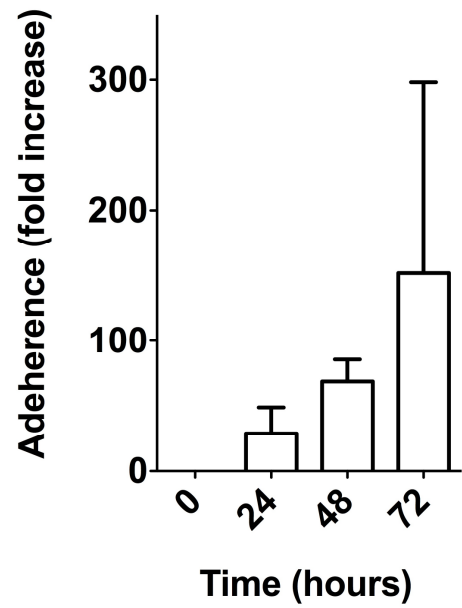
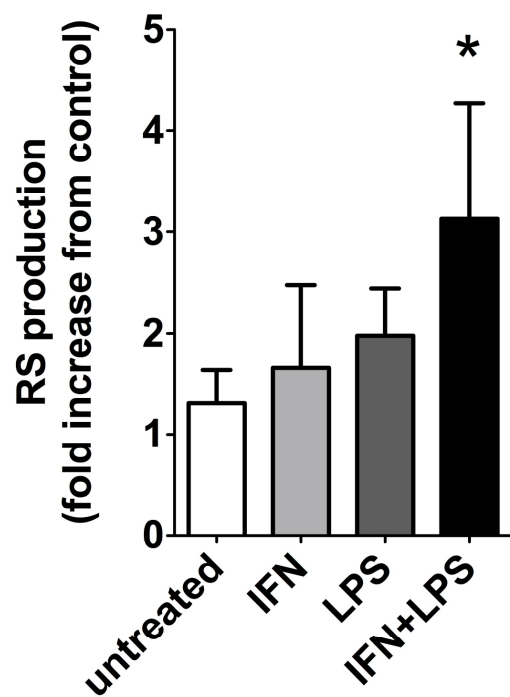
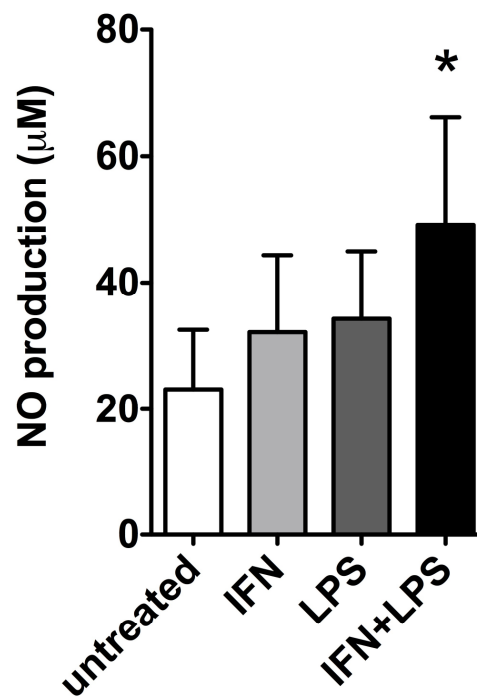


Figure 1

A)



B)



C)

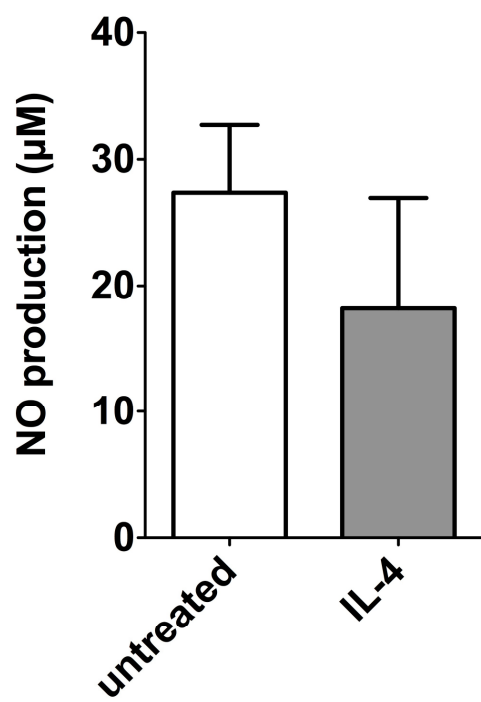
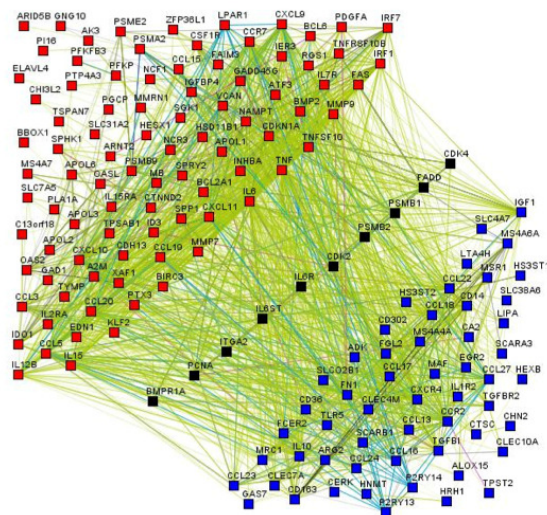
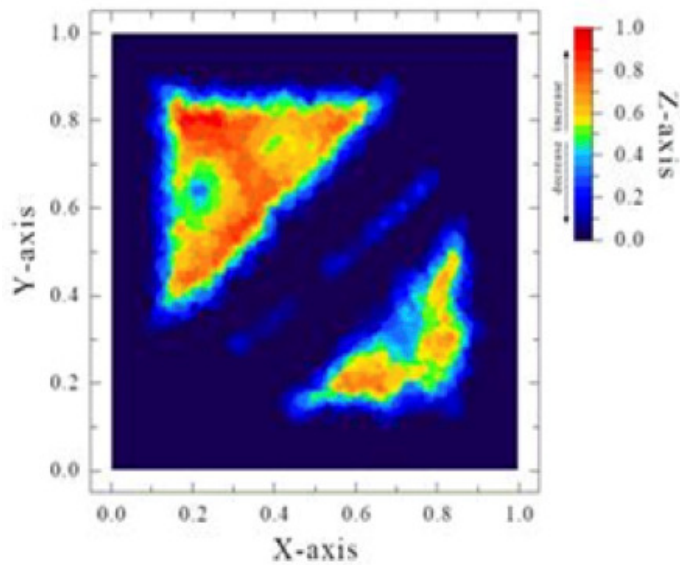
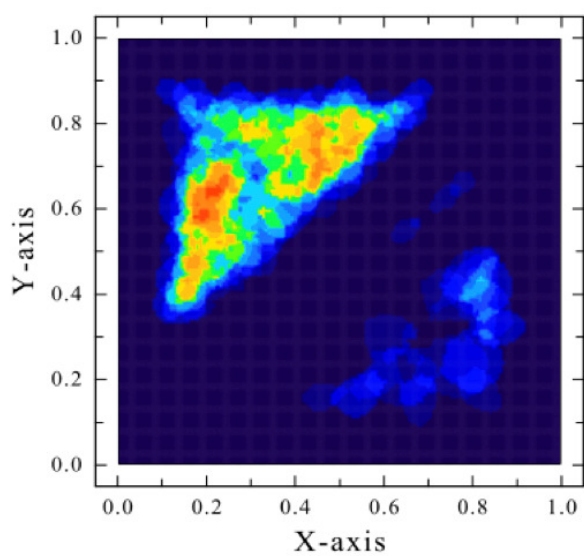


Figure 2

A) M1/M2 network



B) PMA-treated

C) IFN γ + LPS

D) IL-4

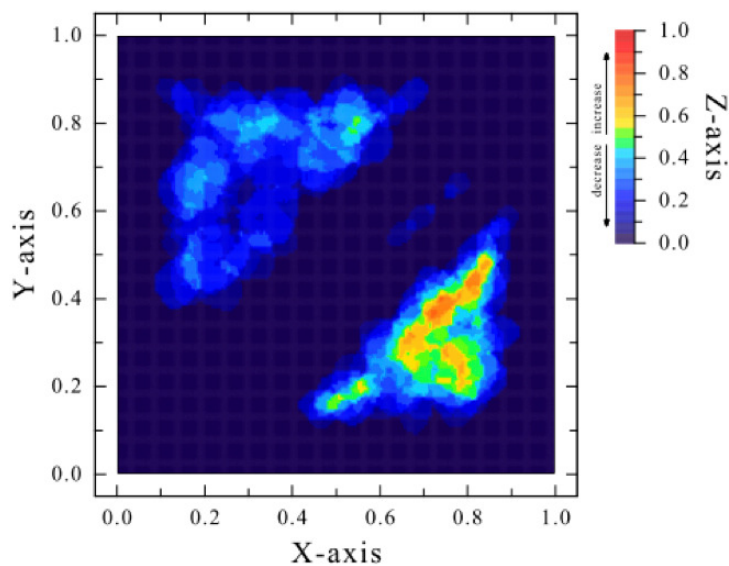


Figure 3

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme demonstrado nesse trabalho, confirmamos que é possível utilizar o modelo *in vitro* de diferenciação das células da linhagem humana U937 de célula monocítica para macrófagos e sugerimos o protocolo proposto como base para o desenvolvimento de estudos seguintes, conforme resultados obtidos.

Os fagócitos mononucleares são células versáteis, células plásticas que respondem às influências ambientais com a expressão de diferentes programas de transcrição e funções. A plasticidade é uma característica do sistema mononuclear fagocitário⁵.

Uma interessante aplicação dessa linhagem de células reside em seu uso para o estudo de citocinas e modificadores de resposta biológica. Tem sido observado que a inibição de crescimento, muitas vezes, indica aquisição de marcadores de diferenciação²⁸. Como já mencionado, essas células são muito utilizadas mesmo na sua forma de proliferação, contudo, sabe-se que por meio da ativação estas células tornam-se mais próximas a macrófagos verdadeiros, tornando o estudo mais fidedigno.

Sendo assim, a linhagem celular humana U937 fornece um modelo ideal para estudar mudanças em eventos intracelulares que ocorrem durante a diferenciação. Estas células proliferam de forma autônoma, no entanto, elas também têm a capacidade de responder aos indutores de diferenciação com cessação do crescimento e apresentação de um fenótipo mais maduro²⁵.

Os macrófagos têm uma complexa dupla função, no que se refere a sua atividade real fagocítica e seus efeitos em diversas patogenias, conforme estudos revisados. Os Macrófagos ativados pela via clássica, M1, têm atividade fagocítica e

pró-inflamatória, enquanto que os macrófagos ativados alternativamente, M2, têm características que favorecem o crescimento e desenvolvimento de patologias como câncer, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, etc.

Os mecanismos de defesa do hospedeiro têm um importante papel no desenvolvimento de patologias, inibindo ou estimulando tumores, por exemplo⁷⁵. Neste sistema imune, podemos mencionar a capacidade de macrófagos em destruir as células defeituosas de modo eficaz.

Sabe-se também que os macrófagos M2 estão presentes em maior número em tumores sólidos⁶. A progressão do tumor também se intensifica na presença dos macrófagos com fenótipo M2 devido ao fato desses ativarem a angiogênese no tecido tumoral pela produção de VEGF⁶. A alta expressão de VEGF prediz a um prognóstico ruim, conforme estudo prévio⁷⁶.

A limpeza das células do meio é fundamental para a tolerância imunológica e, reciprocamente, uma falha nesse processo contribui para a patogênese de inflamação crônica e doenças^{4, 8, 21, 65, 77-81}.

O modelo *in vitro* aqui proposto mimetiza o processo fisiológico dos macrófagos ativados e polarizados em diversas situações. A partir deste estudo, podem ser propostos novos estudos, também em diferentes áreas, com a expectativa de entender o microambiente de macrófagos e outras células. A hipótese de que a ativação de macrófagos este envolvida em várias situações fisiológicas e patológicas não pode ser desconsiderada, sendo necessários novos estudos abordando esse tema para dar continuidade ao conhecimento aqui adquirido.

8. FINANCIAMENTO

MCT/CNPq Universal, PRONEX/FAPERGS, MCT/CNPq INCT-TM.

