

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA DE PURIFICAÇÃO DE MONÓCITOS COMO  
MODELO DE CULTURA CELULAR PARA ESTUDO DA DIFERENCIAÇÃO *IN*  
*VITRO* DE MACRÓFAGOS

MARIANA MIGLIORINI PARISI

Orientadora: Prof. Dra. Florencia Maria Barbé-Tuana

Co-Orientadora: Prof. Dra. Fátima Costa Rodrigues Guma

Porto Alegre, 2014

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA DE PURIFICAÇÃO DE MONÓCITOS COMO  
MODELO DE CULTURA CELULAR PARA ESTUDO DA DIFERENCIAÇÃO *IN*  
*VITRO* DE MACRÓFAGOS

MARIANA MIGLIORINI PARISI

Orientadora: Prof. Dra. Florencia Maria Barbé-Tuana

Co-Orientadora: Prof. Dra. Fátima Costa Rodrigues Guma

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas ICBS – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.**

Porto Alegre

2014

### CIP - Catalogação na Publicação

Parisi, Mariana Migliorini

Padronização de técnica de purificação de monócitos como modelo de cultura celular para estudo da diferenciação in vitro de macrófagos / Mariana Migliorini Parisi. -- 2014.

79 f.

Orientadora: Florencia María Barbé-Tuana.

Coorientadora: Fátima Costa Rodrigues Guma.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. monócitos. 2. macrófagos. 3. diferenciação. 4. purificação. I. Barbé-Tuana, Florencia María, orient. II. Costa Rodrigues Guma, Fátima, coorient. III. Título.

*“[...] Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito, não sou o que deveria ser, não sei o que irei ser, mas, graças a Deus, não sou o que eu era.[...]”*

*Martin Luther King*

## AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas são também responsáveis pela conclusão desta dissertação, as quais me auxiliaram tanto cientificamente como emocionalmente. A elas, gostaria de agradecer sinceramente.

Em primeiro lugar, agradeço minha orientadora, a professora Dra. Florencia Maria Barbé-Tuana, a quem tenho grande admiração e respeito. Obrigada por ter me aceitado como orientanda, por ter atenciosamente me ensinado todas técnicas aqui executadas, por acreditar no meu potencial e me incentivar a sempre querer mais. Tu és meu exemplo de competência, entusiasmo e ética. Enfim, obrigada por sempre ter sido muito mais do que uma orientadora.

Agradeço a minha co-orientadora, professora Dra. Fátima Guma, a quem eu devo a oportunidade de fazer parte do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Obrigada por ter me aceitado como aluna do laboratório 21, por ter me incluído em seus projetos, por sempre ser uma orientadora presente e amiga.

Agradeço com todo meu amor aos meus pais, Airton e Maria de Lourdes, a quem sou eternamente grata pelo amor e carinho a mim dedicados. Obrigada por serem tão bons pra mim, por sempre me incentivarem a ir mais longe, por vibrarem a cada conquista, por sempre estarem por perto, mesmo estando longe e, também, pelo apoio financeiro. Agradeço com igual carinho as minha irmãs, Jordana e Vitória, que são meu porto seguro, me dão força, escutam meus desabafos, me incentivam e torcem por mim. Eu só cheguei até aqui porque vocês foram meus alicerces.

Agradeço a todos meus colegas dos laboratórios 21 e 310, os quais fizeram com que esses dois anos fossem mais leves e divertidos. Obrigada pelas trocas de conhecimento, conversas, risadas, e pelos “chimas”. A Silvia e o Léo por sempre estarem dispostos a ajudar e ensinar, principalmente na época em que entrei no

laboratório e precisei muito deles. A Gabi, Lucas, Léo, Moema, Pri e Fran por serem muito mais que colegas e por terem compartilhado comigo muitos momentos bons. A Gabi agradeço também pela ajuda nos experimentos e pela paciência em me ajudar com as imagens e estatística deste trabalho.

Agradeço a minha família em Porto Alegre, Cassi e Amanda, por serem amigas pra toda hora, por dividirem os sonhos e as angústias comigo, por suportarem meus defeitos, por entenderem tão bem o que é estar na pós-graduação. Obrigada por tudo!

Agradeço a minha amigas da vida toda, Piti e Silvia, pelos conselhos e pela força, quando as coisas não pareciam fazer sentido.

Agradeço ao professor Dr. Fábio Klamt e seu aluno Matheus Becker pela linhagem de células U937, M-CSF e pelas discussões sobre macrófagos.

Agradeço ao professor Dr. Jarbas Rodrigues Oliveira e seu aluno Leonardo Pedrazza pela análise de TGF- $\beta$ .

Agradeço ao laboratório de Imunologia do Incor-USP, principalmente na pessoa da Dra. Verônica Coelho, pelos reagentes e sugestões.

Agradeço aos indivíduos participantes desta pesquisa pela disponibilidade.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Bioquímica pelos auxílios prestados.

Agradeço a UFRGS e ao Departamento de Bioquímica pela formação de qualidade.

Agradeço ao CNPQ e a CAPES pela bolsa de estudo e financiamento deste projeto.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE TABELAS .....	xiii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Sistema Fagocítico Mononuclear.....	2
1.2. Monócitos .....	3
1.3. Macrófagos .....	7
1.3.1 Ativação Clássica de Macrófagos (Macrófagos M1).....	11
1.3.2 Ativação Alternativa de Macrófagos (Macrófagos M2).....	12
1.4. Modelos de cultura celular para pesquisa envolvendo macrófagos .....	14
1.4.1 Diferenciação <i>in vitro</i> de macrófagos.....	15
2. OBJETIVOS .....	18
2.1. Objetivo Geral .....	18
2.2. Objetivos Específicos .....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. Sujeitos da pesquisa e amostra biológica .....	19
3.2. Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)...	19
3.3. Purificação de monócitos por aderência ao plástico (AP) .....	20
3.4. Purificação de monócitos por seleção positiva (SP).....	20
3.5. Cultura celular e diferenciação dos macrófagos .....	21
3.6. Imunofenotipagem.....	22

3.7. Extração de RNA, transcrição reversa e PCR em tempo Real.....	23
3.8. Secreção de quimiocinas e TGF- $\beta$ .....	24
3.9. Fagocitose.....	25
3.10. Análises estatísticas .....	25
4. RESULTADOS .....	27
4.1. Pureza celular dos monócitos purificados .....	27
4.2. Morfologia Celular dos macrófagos M1 e M2 .....	28
4.3. Modulação dos marcadores de superfície na diferenciação de monócitos a macrófagos .....	30
4.4. Expressão de citocinas inflamatórias e reguladoras em macrófagos M1 e M2.....	33
4.5. Secreção de quimiocinas e TGF- $\beta$ em macrófagos M1 e M2.....	35
4.6. Atividade fagocítica em macrófagos M1 e M2.....	37
5. DISCUSSÃO .....	39
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	52
REFERÊNCIAS.....	53
ANEXOS .....	59



## RESUMO

Monócitos são células hematopoiéticas com função na imunidade inata e adquirida. De acordo com o estímulo que recebem, podem se diferenciar em macrófagos e potencializar suas funções efetoras, modulando a resposta imune e participando de vários processos fisiológicos e patológicos. Os macrófagos são muito heterogêneos e capazes de assumir diferentes fenótipos em resposta aos estímulos que recebem do microambiente. Em um ambiente governado por interferon gama (IFN- $\gamma$ ), se diferenciam em células com aumentada capacidade de apresentação de antígenos e síntese de citocinas pró-inflamatórias (macrófagos M1). Por outro lado, quando são estimulados por interleucina-4 (IL-4), eles se diferenciam em um fenótipo antagonista com atividade de reparo (macrófagos M2). Dada a importância destas células no sistema imune, é necessário desenvolver e otimizar técnicas que sirvam de ferramentas para estudar a diferenciação de macrófagos em seus perfis fenotípicos bem como seu papel em doenças humanas. Assim, o objetivo deste estudo foi padronizar e comparar dois diferentes protocolos de isolamento de monócitos descritos na literatura e analisar seu impacto sobre a diferenciação de macrófagos. Isolamos monócitos do sangue periférico de cinco indivíduos saudáveis pelas técnicas de aderência e seleção positiva. Os monócitos foram diferenciados a macrófagos com suplementação de M-CSF. Depois da indução aos perfis M1 e M2, avaliamos marcadores de superfície celular, expressão de mRNA de citocinas, secreção de quimiocinas e fagocitose. Observamos que os métodos utilizados para isolar monócitos possuem diferentes purezas, mas que monócitos isolados por ambos métodos foram capazes de ser diferenciados a macrófagos em seus perfis M1 e M2. Análises de citometria de fluxo mostraram que há uma diminuição da expressão de CD14, principalmente em macrófagos M2, e manutenção (M2) ou aumento (M1) da expressão de HLA-DR. Monócitos (CD80<sup>-</sup>CD86<sup>high</sup>) induzidos aos fenótipo M1 são caracterizados pela regulação positiva de CD80 e regulação negativa de CD86 (CD80<sup>++</sup>CD86<sup>+</sup>). O perfil M2 foi caracterizado pela expressão de CD206<sup>high</sup> e ausência de CD163<sup>-</sup> (CD206<sup>high</sup>CD163<sup>-</sup>). A expressão do mRNA revelou que IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foram marcadores de M1 e TGF- $\beta$  e CCL18 foram marcadores de M2. Além disso, quimiocinas inflamatórias como CXCL9, CXCL10 e CCL5 foram significativamente aumentadas em macrófagos M1. Macrófagos M1 e M2 são ativos e funcionais como demonstrado no ensaio de fagocitose. Embora ambos métodos utilizados para isolar monócitos tiveram purezas diferentes, ambas técnicas forneceram monócitos capazes de serem diferenciados a macrófagos.

Palavras-chave: monócitos, macrófagos M1, macrófagos M2, aderência ao plástico, seleção positiva

## ABSTRACT

Monocytes are hematopoietic cells with a major role in innate and adaptive immunity. According to the stimulus they receive, they can differentiate into macrophages and enhance effector functions by modulating the immune response and participating in various physiological and pathophysiological processes. Macrophages are very heterogeneous and are able to assume different phenotypes in response to the different stimuli they receive from the microenvironment. In a proinflammatory milieu ruled by interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), they differentiate into cells with increased capacity to present antigens and synthesis of proinflammatory cytokines (M1 macrophages). On the other hand, when they are stimulated with interleukin 4 (IL-4), they differentiate into an antagonist phenotype with repair activity (M2 macrophages). Given the importance of these cells in the immune system, it is necessary to develop and optimize techniques that serve as useful tools for studying the differentiation of macrophages in their different phenotypic profiles as well as their roles in human diseases. In this regard, the aim of this study was to standardize and compare two different human monocyte isolation protocols described in the literature and analyze their impact on macrophage differentiation. We isolated peripheral blood monocytes from five healthy subjects by the adherence technique and positive selection. Monocytes were differentiated into macrophages with M-CSF supplementation. After M1 or M2 induction, we evaluated cell surface markers, mRNA cytokine expression, chemokine secretion and phagocytosis. We found that the methods used to isolate monocytes have different purities, but monocytes isolated from both methods were able to differentiate into the M1 and M2 profile. The monocyte and macrophage flow cytometry analysis demonstrated that CD14 decreased expression, mainly in M2 macrophages, and maintained (M2) or increased (M1) the HLA-DR expression. Monocytes (CD80<sup>-</sup>CD86<sup>high</sup>) induced to an M1 phenotype were characterized by upregulation of CD80 and down regulation of CD86. (CD80<sup>++</sup>CD86<sup>+</sup>) The M2 profile was characterized by the expression of CD206<sup>high</sup> and absence of CD163<sup>-</sup> (CD206<sup>high</sup>CD163<sup>-</sup>). The mRNA expression revealed that IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were M1 markers and TGF- $\beta$  and CCL18 were M2 markers. Further more, inflammatory chemokines as CXCL9, CXCL10 and CCL5 were significantly increased in M1 macrophages. M1 and M2 macrophages were active and functional as shown in the phagocytic assay. Although methods used for the isolation of monocytes yielded different purities, both techniques provided monocytes able to differentiate to macrophages.

Key-Words: monocytes, M1 macrophages, M2 macrophages, adherence technique, positive selection.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b><math>\beta</math>-2-M</b>	$\beta$ -2-Microglobulina
<b>AP</b>	Aderência ao plástico
<b>APC</b>	Alofococianina
<b>B7.1</b>	Molécula coestimulatória (CD80)
<b>B7.2</b>	Molécula coestimulatória (CD86)
<b>CCL</b>	Ligante de quimiocina CC
<b>CCR</b>	Receptor de quimiocina
<b>CD</b>	Marcadores de diferenciação de superfície celular
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>Csf-1R</b>	Receptor de M-CSF
<b>CXCL</b>	Ligante de quimiocina CXC
<b>DC</b>	Célula dendrítica
<b><i>DC-Sign</i></b>	Proteína de DC (CD209)
<b><i>Dectin-1</i></b>	Receptor de lectina tipo C
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>D-PBS</b>	Solução tamponada com fosfato de Dulbecco
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>FACS</b>	Citometria de Fluxo
<b>FITC</b>	Fluoresceína
<b>GM-CSF</b>	Fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>HL-60</b>	Células de leucemia pró-mielocíticas humanas
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama

<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IRF</b>	Fator regulador de interferon
<b>JAK</b>	Cinase Janus
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>M1</b>	Ativação clássica de macrófagos
<b>M2</b>	Ativação alternativa de macrófagos
<b>M-CSF</b>	Fator estimulador de colônias de macrófagos
<b>MFI</b>	Mediana da Intensidade de Fluorescência
<b>MHC-II</b>	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II (HLA-DR)
<b>MO</b>	Medula óssea
<b>MRC1</b>	Receptor de manose tipo 1 (CD206)
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>PBMC</b>	Células mononucleares do sangue periférico
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PerCP</b>	Peridinina-clorofila-proteína
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RPMI</b>	Meio de cultura para células
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SFM</b>	Sistema fagocítico mononuclear
<b>SN</b>	Seleção negativa
<b>SP</b>	Seleção positiva
<b>SRCR</b>	Receptores de sequestro ricos em cisteína (CD163)
<b>STAT</b>	Transdutores de Sinais e Ativadores da Transcrição

<b>TAM</b>	Macrófagos associados a tumores
<b>TCD4</b>	Linfócito T CD4 auxiliar
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de crescimento tumoral beta
<b>TL</b>	Tampão de Lavagem
<b>TLR</b>	Receptores tipo <i>Toll</i>
<b>THP-1</b>	Linhagem humana de células de leucemia monocítica aguda
<b>TH1</b>	Linfócito T auxiliar tipo 1
<b>TH2</b>	Linfócito T auxiliar tipo 2
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de transformação do crescimento beta
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>U937</b>	Linhagem humana de células monocíticas U937

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Células do Sistema Fagocítico Mononuclear .....	4
<b>Figura 2</b> Visão geral da diferenciação de macrófagos .....	9
<b>Figura 3</b> Pureza celular das técnicas de isolamento de monócitos .....	27
<b>Figura 4</b> Morfologia dos macrófagos .....	29
<b>Figura 5</b> Modulação de marcadores de superfície M1 .....	31
<b>Figura 6</b> Modulação de marcadores de superfície M2 .....	32
<b>Figura 7</b> Expressão gênica de citocinas em macrófagos M1 e M2 .....	34
<b>Figura 8</b> Secreção de quimiocinas e TGF- $\beta$ em macrófagos M1 e M2 .....	36
<b>Figura 9</b> Fagocitose em macrófagos M1 e M2 .....	38

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Genes e iniciadores utilizados no PCR em tempo real .....	24
<b>Tabela 2</b> Marcadores específicos de macrófagos M1 e M2 obtidos neste trabalho .....	49

## 1 INTRODUÇÃO

A atividade dos macrófagos ou fagócitos mononucleares foi primeiramente descrita por Elie Metchnikoff em 1884 (Dale et al. 2008). Metchnikoff observou microscopicamente o processo de englobamento e digestão de partículas sólidas o qual caracterizou como fagocitose em organismos multicelulares primitivos como esponjas marinhas. Posteriormente suas observações foram confirmadas em organismos superiores. Pelas descobertas do papel dos macrófagos na imunidade inata, Elie Metchnikoff foi condecorado com o prêmio Nobel em Medicina e Fisiologia em 1908 e é considerado o pai da imunologia (Tauber 2003; Pollard 2009).

Embora os macrófagos sejam conhecidos pelo seu papel no sistema imune inato e adquirido, na distinção do próprio e não próprio, eles também participam de importantes mecanismos tróficos durante o desenvolvimento (Pollard 2009). Em condições fisiológicas, os macrófagos são células chaves na manutenção da integridade do organismo, participando de forma ativa na homeostase celular e no desenvolvimento de tecidos (Pollard 2009), na morfogênese, angiogênese (Newman e Hughes 2012), remodelação óssea (Marks et al. 1992) e geração de tecido adiposo (Levine et al. 1998).

Por outro lado, já está descrito que os macrófagos também estimulam a instalação de processos patogênicos como diversos tipos de câncer, podendo resultar na potencialização da doença ao invés de participar dos mecanismos de remissão (Biswas e Mantovani 2010; Becker et al. 2014). Seu papel também tem sido associado a outras doenças como a formação de placas ateroscleróticas (Mestas e Ley 2008), infecção pelo HIV (Jambo et al. 2014), tuberculose (Fan et al. 2013), doença obstrutiva crônica (Berenson et al. 2013) e obesidade (Weisberg et al.



2003), entre outras. Nos últimos anos, grandes avanços tem sido alcançados no tratamento dessas doenças. Contudo, ainda não existe cura para todas elas, e apesar de inúmeros esforços, os mecanismos envolvidos nas diferentes fisiopatologias ainda não são bem compreendidos.

Os modelos animais murinos têm sido extremamente utilizados para desenvolver e testar hipóteses experimentais na área de imunologia. Entretanto, apesar de camundongos e humanos conter genomas altamente conservados (menos de 1% de genes homólogos ausentes em ambas as espécies), existe diferenças significativas no desenvolvimento do sistema imune, na ativação e na resposta aos desafios, tanto na imunidade inata com adquirida (Mestas e Hughes 2004).

Por este motivo, escolhemos trabalhar com um modelo experimental de cultura celular primária de monócitos humanos e explorar sua separação, purificação e diferenciação a macrófagos com diferentes perfis de ação, para posteriormente utilizá-los como plataforma de estudo de diferentes doenças de origem imunológica.

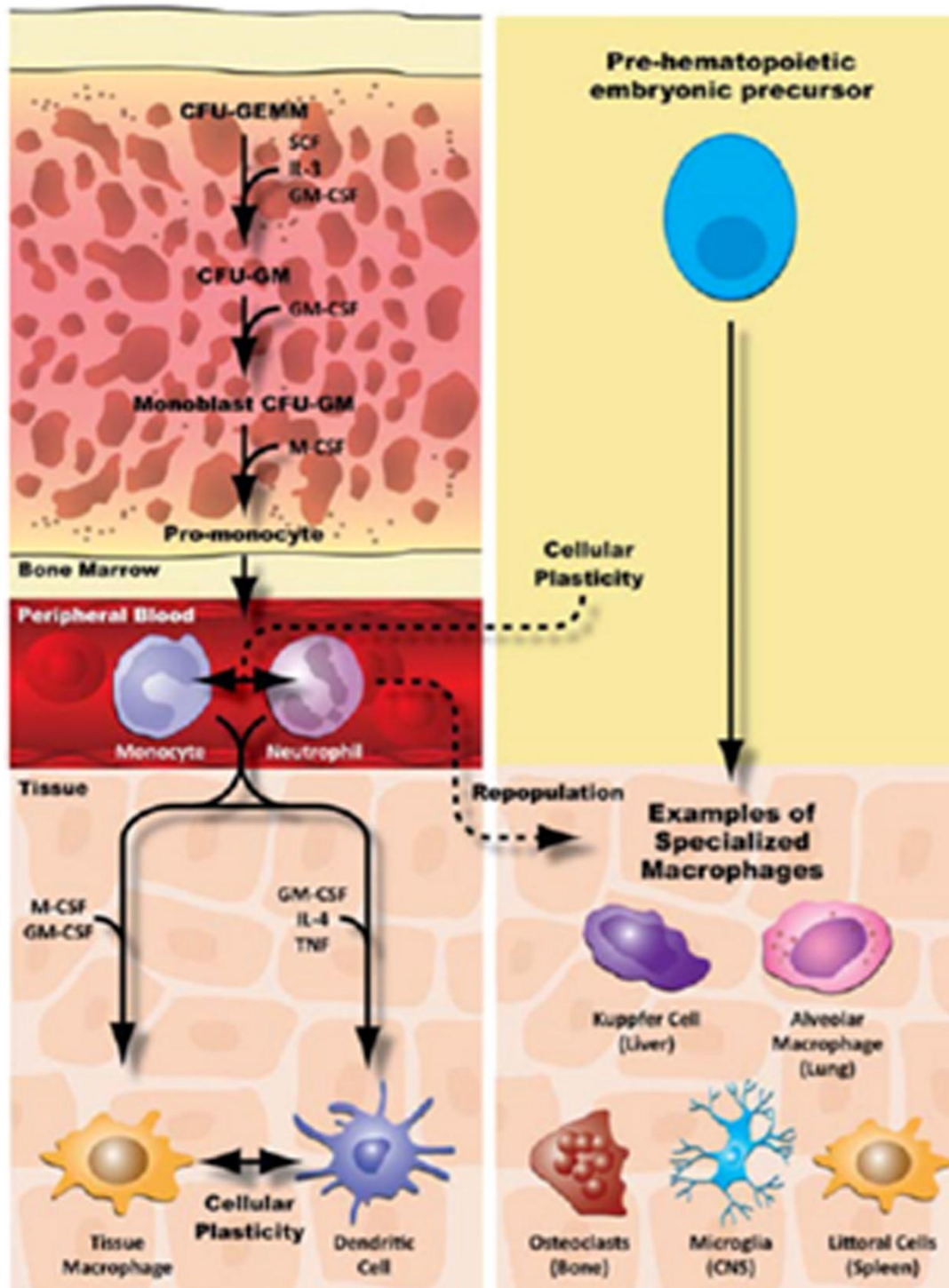
### **1.1 Sistema fagocítico mononuclear (SFM)**

O SFM está composto por uma família de células que compreende progenitores de medula óssea (MO), monócitos presentes no sangue e macrófagos e células dendríticas (DC) presentes em quase todos os tecidos. São um conjunto diverso de células circulantes que medeiam a resposta imune inata e adaptativa e, por isso, são recrutados a sítios específicos após dano tecidual, infecção ou tumores (Geissmann et al. 2010). Independente do tecido no qual se encontram, as células do SFM compartilham as seguintes características: morfologia estrelada com intensa

atividade enzimática, expressão de algumas enzimas marcadoras, captação não específica de partículas de látex ou colóides e receptores específicos para mediar a endocitose. Entretanto, nenhuma dessas características permite definir de forma específica o tipo de monócito/macrófago (Hume 2006).

## **1.2 Monócitos**

O aumento crescente de marcadores de superfície definidos por anticorpos monoclonais permitiu a classificação do SFM. Os monócitos são uma população heterogênea, originados na medula óssea (MO) a partir de um progenitor mieloide comum CD34<sup>+</sup>, que também é precursor de DC (Figura 1) (Hunter et al. 2009).



**Figura 1:** Células do SFM. Primeiramente, antes de o feto possuir uma MO funcional, os macrófagos são originados na embriogênese. As células responsáveis pelo desenvolvimento dos macrófagos fetais não foram identificadas, mas acredita-se que se originam do fígado fetal. A partir do momento em que a hematopoiese é ativada na MO, monócitos são produzidos em resposta a citocinas e fatores de crescimento e migram para a circulação periférica. Uma vez na circulação, os monócitos podem migrar aos tecidos e se diferenciarem em macrófagos teciduais ou DC. O microambiente tecidual prediz o tipo de macrófagos especializado que o monócito irá se diferenciar (Hunter et al. 2009).

O desenvolvimento dos monócitos na MO depende da ligação do fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF) ao seu receptor, Csf-1R (CD115). O CD115 é um receptor de crescimento hematopoiético que é expresso em monócitos, macrófagos, DC e seus precursores (Auffray et al. 2009). Estudos já demonstraram a importância da interação M-Csf/CsfR, pois camundongos deficientes em Csf-1R apresentam um número diminuído de monócitos circulantes (Wiktor-Jedrzejczak e Gordon 1996; Dai et al. 2002).

Após sua diferenciação e maturação na MO, os monócitos são liberados para a corrente sanguínea onde correspondem em torno de 10% do total de leucócitos circulantes em indivíduos saudáveis. Permanecem na circulação por aproximadamente três dias e então, migram para os tecidos periféricos. Monócitos que permanecem no sangue por períodos maiores tornam-se senescentes e são removidos pelas células endoteliais no baço (Heidenreich 1999; Auffray et al. 2009).

Uma das principais características de monócitos é a expressão do receptor de endotoxina ou LPS, denominado CD14. O CD14 é uma glicoproteína de membrana de 50 a 55 kDa ancorada na superfície celular por um resíduo glicosil-fosfatidilinositol que atua como receptor de lipossacarídeo (LPS). Embora o CD14 seja altamente expresso em monócitos e macrófagos, ele também é expresso em baixa quantidade em neutrófilos e DC mieloides. Ainda, uma pequena população de monócitos, com atividade pró-inflamatória, expressa um receptor de alta afinidade para imunoglobulina G (IgG) e proteína C Reativa, denominado CD16 (Heidenreich 1999).

No ano de 2008, durante a reunião da União Internacional das Sociedades de Imunologia (IUIS) realizada na Itália, os pesquisadores definiram a nomenclatura de monócitos. Assim, dividiram essas células em três populações de acordo com

sua expressão de CD14 e CD16. Aproximadamente 90% dos monócitos em indivíduos saudáveis pertencem a “população clássica”, a qual expressa altos níveis de CD14 e não expressa CD16 (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>). No entanto, existem duas populações menores de monócitos chamadas “intermediária” e “não-clássica”, as quais expressam CD16 com altos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) ou baixos níveis de CD14 (CD14<sup>low/+</sup>CD16<sup>++</sup>), respectivamente. Assim, as populações CD16 positivas ocorrem em 5 a 10% dos monócitos circulantes (Ziegler-Heitbrock 2000; Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Diferenças entre essas populações já foram demonstradas em alguns estudos, sendo que a população clássica de monócitos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) possui maior atividade fagocítica, expressa altos níveis do receptor de quimiocinas CCR2, baixos níveis do receptor CX3CR1 e produz maior quantidade de Interleucina-10 (IL-10) do que o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 (IL-1), em resposta ao LPS, em relação as demais populações. Ao contrário, os monócitos CD14<sup>+/low</sup>CD16<sup>++</sup> expressam altos níveis de CX3CR1 e baixos níveis de CCR2 e produzem TNF- $\alpha$  em resposta a estímulo de LPS, sendo conhecidos, desta forma, como monócitos pró-inflamatórios (Auffray et al. 2009).

Outra característica marcante dos monócitos é a capacidade de apresentação de antígenos, o que faz com que essa célula, em humanos, expresse altos níveis do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II (HLA-DR). Ainda, sabe-se que os monócitos podem ser diferenciados dos polimorfonucleares (neutrófilos), células NK e dos linfócitos T e B por não expressarem CD15, Nkp-46, CD3 e CD19 (Auffray et al. 2009).

A diferenciação das células precursoras a monócitos é acompanhada pela parada do ciclo celular. Enquanto as células progenitoras mielóides se diferenciam e proliferam em resposta ao M-CSF, as células terminalmente diferenciadas tornam-se

não proliferativas, apesar de continuarem sensíveis a sinalização deste fator de crescimento (Auffray et al. 2009). No entanto, alguns pesquisadores tem sugerido que os monócitos durante diferenciação com M-CSF e ao fator estimulante de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), podem também ser induzidos a proliferação, pois a diferenciação com estes fatores seria acompanhada pela regulação positiva de genes envolvidos na ciclo celular (Martinez et al. 2006). Ainda, sabe-se que monócitos cultivados “*in vitro*” na ausência de suplementação de soro ou citocinas entram espontaneamente em apoptose, a qual pode ser revertida pelo acréscimo destes fatores ao meio de cultivo (Heidenreich 1999).

Os monócitos são células com diversas funções bem estabelecidas, principalmente por serem mediadores entre a resposta imune inata e adaptativa. Como dito anteriormente, desempenham um importante papel na homeostase, principalmente por removerem células apoptóticas e compostos tóxicos. Também produzem um vasto painel de moléculas efetoras envolvidas na defesa contra micro-organismos e no processo inflamatório de diversas doenças (Auffray et al. 2009). No entanto, sua função predominante é servir como fonte de macrófagos teciduais em doenças como infecções, aterosclerose, doença de Alzheimer e tumores, entre outras (Gordon e Martinez 2010).

### **1.3 Macrófagos**

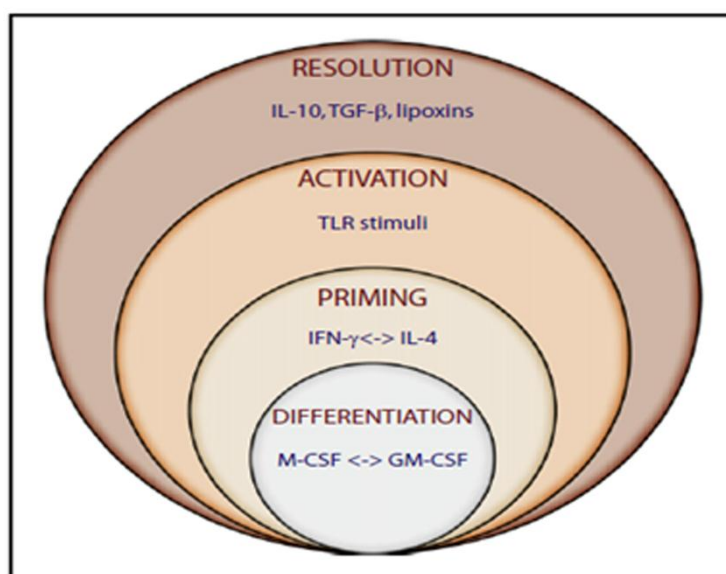
Em resposta a fatores de crescimento específicos, os monócitos entram nos tecidos e se diferenciam em macrófagos residentes, os quais são caracterizados por baixo consumo de oxigênio e baixa síntese de proteínas e citocinas. Os macrófagos residentes estão presentes constitutivamente em diversos órgãos como fígado,

baço, pulmão e cérebro, mesmo na ausência de infecções ou injúrias. Nos diferentes órgãos, eles podem ter características distintas quanto a sua morfologia e fenótipo. Os macrófagos residentes são responsáveis por manter a homeostase tecidual, principalmente pela remoção de corpos apoptóticos e pela fagocitose de microorganismos invasores (Hunter et al. 2009; Gordon e Martinez 2010; Murray e Wynn 2011).

A inflamação tecidual resulta na ativação dos macrófagos residentes, que por sua vez aumentam a produção de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios. Concomitante a isso, o contexto da inflamação faz com que a produção de monócitos na MO aumente, bem como sua quimiotaxia da circulação para os sítios de injúria ou infecção, onde tornam-se macrófagos ativados, contribuindo para a inflamação aguda e crônica, tanto local quanto sistêmica (Randolph et al. 2008; Gordon e Martinez 2010).

O desenvolvimento dos macrófagos completamente ativados pode ser didaticamente dividido em etapas sucessivas (Figura 2). Na primeira fase, os monócitos recrutados para o sítio de infecção são diferenciados em macrófagos, o que geralmente ocorre pelo estímulo de fatores de crescimento, como o M-CSF e o GM-CSF. Durante o seu recrutamento contínuo, ou quimiotaxia, os macrófagos são expostos a várias concentrações de diversos mediadores oriundos do processo fisiopatológico no qual estão envolvidos, o que os induz a uma segunda fase, denominada "*priming*" induzida por citocinas. Estes estímulos, por si só, não são muitos exacerbados, mas modulam o potencial inflamatório dos macrófagos e sua resposta a outros estímulos. Durante a terceira fase de ativação, os macrófagos alcançam um fenótipo funcional maduro em resposta a estímulos microbianos ou opsônicos, tais como complexos de anticorpos e LPS. Se o macrófago sobrevive ao

processo inflamatório, passa a fase referida como desativação ou resolução. Nesta fase, o potencial inflamatório é desativado e o macrófago sofre alterações funcionais que lhe conferem capacidade de limpeza e reparação. As citocinas secretadas em maior proporção nesta fase são, principalmente, a IL-10 e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) (Gordon e Martinez 2010).



**Figura 2:** Visão geral da diferenciação de macrófagos. A diferenciação de monócitos a macrófagos ocorre pelo estímulo de M-CSF ou GM-CSF. Em seguida, o macrófagos são polarizados por citocinas secretadas pelo microambiente em que estão inseridos e ativados por estímulos bacterianos ou opsônicos. Ao final do processo inflamatório, o macrófago é desativado por citocinas anti-inflamatórias, para que ocorra a resolução da inflamação (Gordon e Martinez 2010).

Os macrófagos são células com grande heterogeneidade fenotípica e, desta forma, podem estar envolvidos em diversas atividades. Já é consenso na literatura que muitas das atividades dos macrófagos podem ser de natureza oposta. Assim, os macrófagos podem ter atividades pró-inflamatória ou anti-inflamatória, imunogênica ou tolerogênica, de destruição tecidual ou de reparo tecidual. Neste sentido, há um grande número de fatores que contribuem para a diversidade de funções dos macrófagos, incluindo os efeitos sinérgicos e antagonistas de diferentes citocinas,



quimiocinas, hormônios (incluindo adrenérgicos e colinérgicos), receptores do tipo toll (TLR) e outros ligantes endógenos de histamina, integrinas e células apoptóticas. Desta forma, a plasticidade fenotípica é a maior característica dos fagócitos mononucleares e diferentes estados de diferenciação podem ser observados (Randolph et al. 2008; Cassetta et al. 2011).

Embora vários estudos venham sendo desenvolvidos, não há um consenso geral entre os pesquisadores nos marcadores que definem cada tipo de macrófago, como suas subpopulações podem ser melhor classificadas e, ainda, se macrófagos e DC são linhagens distintas ou simples variantes de uma mesma linhagem (Murray e Wynn 2011). Além disso, permanece sem explicação como os vários fenótipos de macrófagos induzidos por citocinas e outros estímulos se relacionam com específicos programas transcricionais e mudanças epigenéticas e como estes fatores podem corresponder a heterogeneidade da linhagem de macrófagos (Broichhausen et al. 2012).

Paralela a polarização de linfócitos auxiliares (TCD4<sup>+</sup>) em linfócitos T auxiliares do tipo 1 (TH1) e linfócitos T auxiliares do tipo 2 (TH2), muitos trabalhos tem utilizado os termos “ativação clássica de macrófagos” denominados também M1 e “ativação alternativa de macrófagos” denominados também M2 para classificar os macrófagos em dois dos seus mais conhecidos fenótipos (Gordon e Taylor 2005; Martinez et al. 2008; Biswas e Mantovani 2010; Gordon e Martinez 2010). Dessa forma, os macrófagos M2, induzidos por citocinas TH2 como IL-4 diferem da ativação clássica mediada por (IFN- $\gamma$ ) (Stein et al. 1992; Gordon 2003; Gordon e Martinez 2010).

### 1.3.1 Ativação Clássica de Macrófagos (Macrófagos M1)

Os macrófagos classicamente ativados ou M1, são induzidos por interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), sozinho ou em conjunto com estímulos bacterianos como LPS. Também já foram descritos macrófagos do tipo M1 induzidos com TNF- $\alpha$  e GM-CSF (Martinez et al. 2006; Ambarus et al. 2012; Jaguin et al. 2013).

Os macrófagos M1 são caracterizados pela alta expressão de citocinas inflamatórias como interleucina-12 (IL-12), interleucina-23 (IL-23), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e TNF- $\alpha$  e baixa expressão de IL-10 e TGF- $\beta$ . Ainda, produzem altos níveis de espécies reativas de oxigênio e intermediários do nitrogênio (Nathan et al. 1984; Martinez et al. 2006). Sabe-se também que o IFN- $\gamma$  regula a síntese de quimiocinas como a CCL2, CCL5, CXL9, CXCL10 e CXL10 (Mantovani et al. 2004). Além disso, marcadores de membrana como CD80 e CD86 são considerados clássicos do perfil M1 (Ambarus et al. 2012).

O IFN- $\gamma$  atua nos macrófagos através da ativação da sinalização JAK-STAT. Neste sentido, os receptores de IFN- $\gamma$  estimulados direcionam a fosforilação da JAK, e consequente dimerização de STAT1, que se liga em regiões alvo do genoma e ativa a transcrição de genes como MHC-II, IL-12, entre outros, promovendo assim uma resposta pró-inflamatória pelos macrófagos. Estudos com macrófagos de camundongos nocautes para STAT1 mostraram a dependência de STAT-1 para a sinalização de IFN- $\gamma$  (Lawrence e Natoli 2011). Ainda, o fator de transcrição IRF5 é essencial para uma polarização M1, ativando genes como IL-12 e reprimindo a transcrição de IL-10 (Krausgruber et al. 2011; Weiss et al. 2013).

Sua principal função é induzir respostas do tipo TH1, sendo que são conhecidos por estarem relacionados com a produção de citocinas inflamatórias,

resistência a patógenos e destruição tecidual (Martinez et al. 2008), mediando a resistência contra tumores e micro-organismos intracelulares (Martinez et al. 2006).

### **1.3.2 Ativação Alternativa de Macrófagos (Macrófagos M2)**

Siamon Gordon e seus colaboradores descreveram, pela primeira vez, a ativação alternativa de macrófagos em 1992, o qual foi induzido pelo estímulo de interleucina-4 (IL-4) (Stein et al. 1992). Mais tarde, outros pesquisadores descreveram macrófagos com perfil M2 obtidos “*in vitro*” após outros estímulos, como combinações de imunocomplexos, IL-10 e glicocorticoides (Buechler et al. 2000).

Atualmente, os macrófagos polarizados no perfil M2 são divididos em três grupos: M2a, M2b, M2c. O primeiro deles é induzido por IL-4 ou interleucina-13 (IL-13) enquanto o M2b é estimulado por imunocomplexos e o M2c é conhecido como macrófagos desativados, um grupo heterogêneo de macrófagos anti-inflamatórios gerados após a exposição a estímulos diversos como IL-10, glicocorticóides e IL-21 (Martinez et al. 2008; Gordon e Martinez 2010; Cassetta et al. 2011).

Atualmente, macrófagos M2 podem ser identificados e caracterizados por grupos de receptores celulares e fatores intracelulares que são induzidos pela exposição a IL-4 e IL-13. Uma das principais características de macrófagos M2 murinos é a indução da expressão da enzima arginase, que confere a estas células potencial de converter arginina em poliaminas e hidróxiprolina, mecanismo envolvido na produção de matriz extracelular (Fleming e Mosser 2011). No entanto, alguns estudos tem relatado uma expressão gênica diferencial nos macrófagos M2 entre

espécies diferentes (humanos e camundongos). Por exemplo, a IL-4 não é capaz de induzir arginase-1, Fizz-1, MMP-1 e Ym1 em humanos (Brys et al. 2005; Martinez et al. 2006; Van Dyken e Locksley 2013)

Os macrófagos M2 em resposta a IL-4 e/ou IL-13 podem diminuir o processo inflamatório pela produção de fatores anti-inflamatórios como o TGF- $\beta$ , IL-10, gerando antagonistas do receptor de IL-1, promovendo a remoção de corpos apoptóticos, promovendo angiogênese e reparo tecidual (Gordon e Martinez 2010). Ainda, apresentam altos níveis de quimiocinas como CCL13, CCL14, CCL17, CCL23 e CCL18, e não produzem CCL11. Eles também demonstram níveis aumentados de fibronectina, relacionada com a migração e adesão celular, coagulação sanguínea e metástase (Martinez et al. 2006; Biswas e Mantovani 2010).

A sinalização de IL-4 leva a uma superexpressão de alguns receptores de eliminação que são capazes de se ligar a uma diversidade de moléculas exógenas, como o receptor de manose 1 (MRC1, CD206), o receptor de lectina tipo C (*Dectin-1*) e a proteína de DC *DC-Sign* (CD209) (Gordon 2003; Gordon e Martinez 2010). Por outro lado, a IL-4 promove uma regulação negativa da família de receptores de sequestro ricos em cisteínas (SRCR, CD163) (Ritter et al. 1999; Buechler et al. 2000; Ambarus et al. 2012)

Já foi demonstrado que macrófagos M2 podem suprimir o perfil inflamatório de macrófagos M1 circunjacentes. Este efeito inibitório foi obtido pela incubação de macrófagos M1 em meio de cultura condicionado de macrófagos M2 e resultaram em uma produção diminuída de moléculas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , CCL2 e CCL3 (Lovren et al. 2010).

Atualmente, os pesquisadores tem relacionado os macrófagos M2 com uma variedade de processos patológicos e fisiopatológicos, como homeostase,

inflamação, reparo, aterosclerose, transplante, funções metabólicas e malignidade (Gordon 2003; Gordon e Martinez 2010; Cassetta et al. 2011).

#### **1.4 Modelos de cultura celular de macrófagos para pesquisas biomédicas**

Tendo em vista a importância do sistema monocítico-macrofágico no sistema imune, vários modelos celulares para o estudo da biologia dos macrófagos tem sido utilizados (Eligini et al. 2013; Erbel et al. 2013; Puerta-Guardo et al. 2013; Montoya-Rodriguez et al. 2014; Pantic et al. 2014; Preuss et al. 2014).

Muitos pesquisadores utilizam modelos murinos para pesquisa envolvendo macrófagos, no entanto, esta não parece ser a melhor abordagem, pois apresenta várias deficiências. Em primeiro lugar, a proporção do número de células das diferentes populações de leucócitos no sangue periférico de camundongos difere significativamente daquela encontrada em humanos. Soma-se a isso a existência de uma expressão gênica diferencial entre os monócitos murinos e humanos, sendo que vários marcadores utilizados para identificar monócitos e macrófagos murinos não existem em células mieloides humanas. Estes fatos sugerem que os monócitos possam assumir funções distintas em cada uma destas espécies. Portanto, extrapolar dados obtidos em monócitos/macrófagos murinos para aplicação em humanos não parece ser o ideal (Erbel et al. 2013).

Uma opção a utilização de modelo murino são as linhagens representativas de monócitos humanos, como HL-60, THP-1 e U937(Daigneault et al. 2010; Kaszuba-Zwoinska et al. 2012; Neu et al. 2013; Zamani et al. 2013). Estas linhagens são utilizadas em diferentes graus de diferenciação como modelo de funcionalidade de macrófagos e são facilmente cultiváveis. No entanto, elas podem apresentar

consideráveis diferenças fenotípicas quando comparadas a macrófagos teciduais humanos, além de não representarem de maneira adequada a grande heterogeneidade e plasticidade características dos macrófagos. (Daigneault et al. 2010; Erbel et al. 2013; Neu et al. 2013).

Assim, para aumentar o entendimento da heterogeneidade e diferenciação de macrófagos, o padrão-ouro é a utilização de modelos celulares de cultura primária de macrófagos humanos. Neste sentido, obter macrófagos teciduais tem se mostrado uma técnica difícil ao passo que afeta consideravelmente a viabilidade celular e fornece número limitado de células (Eligini et al., 2012), dificultando experimentos que necessitam de grande número celular. Além disso, para o isolamento dos macrófagos é necessário realizar procedimentos invasivos como biópsias e lavados (Daigneault et al. 2010). Desta forma, atualmente, macrófagos diferenciados “*in vitro*” a partir de monócitos periféricos são aceitos como um bom modelo de macrófagos teciduais, embora também apresentem limitações quanto ao rendimento celular (Eligini et al. 2013; Erbel et al. 2013).

#### **1.4.1 Diferenciação *in vitro* de monócitos a macrófagos**

Vários métodos tem sido descritos para fracionar as subpopulações de leucócitos. Contudo, dois são principalmente encontrados para isolar os monócitos a partir do sangue periférico. O primeiro método explora a expressão diferencial de marcadores de superfície, tanto por seleção positiva (SP) como negativa (SN). A segunda abordagem explora a característica de aderência dos monócitos (Zhou et al. 2012).

O método de SP utiliza um anticorpo monoclonal produzido contra um antígeno de superfície, nesse caso o CD14, acoplado a uma micropartícula magnética. Dessa forma para atingir a separação dos monócitos a partir da população de leucócitos, a suspensão celular é passada através de uma minicoluna sob a ação de um campo magnético, onde as células marcadas com as partículas magnéticas contra o antígeno CD14 são retidas. A purificação de monócitos por coluna magnética é hoje considerada o padrão ouro para o isolamento de monócitos pela sua alta pureza (>95%) (Zhou et al. 2012; Erbel et al. 2013). Entretanto, além de requerer reagentes de alto custo, existe primeiramente a suspeita de que a ligação do anticorpo ao receptor de LPS possa afetar a diferenciação dos monócitos a macrófagos M1 por interferir na ligação CD14/LPS. Mais ainda, existe a discussão sobre a possibilidade da ligação de um fator exógeno, como a micropartícula, representar *per se* um ativador dos monócitos. (Zhou et al. 2012).

Por outro lado, o método de aderência ao plástico (AP) seleciona os monócitos por sua característica de aderência a substratos artificiais, como o plástico. No entanto, a pureza deste método geralmente é inferior ao método de seleção positiva e assim, os monócitos podem ser cultivados na presença de linfócitos autólogos, que podem interferir na diferenciação dos macrófagos pela interação célula-célula ou pela secreção de citocinas e fatores de crescimento (Zhou et al. 2012; Eligini et al. 2013).

Independente do método utilizado, uma vez que os monócitos estejam purificados, vários protocolos de diferenciação a macrófagos e polarização aos fenótipos M1 e M2 tem sido descritos. Nesses protocolos, utilizam-se fatores como M-CSF ou GM-CSF para a diferenciação de monócitos em macrófagos e posteriormente citocinas como INF- $\gamma$  e IL-4 para polarização ao perfil M1 e M2,

respectivamente (Lovren et al. 2010; Buttari et al. 2013; Eligini et al. 2013; Jaguin et al. 2013). Neste sentido, estudos mostraram que a polarização M1 é associada a uma mudança mais acentuada no transcriptoma do que a polarização M2, em macrófagos diferenciados com M-CSF (Martinez et al. 2006; Bhattacharjee et al. 2013). Este menor efeito da IL-4 ocorre devido ao fato que de o M-CSF por si só direciona a diferenciação dos macrófagos a um perfil com propriedades mais anti-inflamatórias (Martinez et al. 2006) (Martínez, 2006). Este achado corrobora outros artigos que comparam as propriedades M1 e M2 aos macrófagos diferenciados com GM-CSF e M-CSF, respectivamente (Buttari et al. 2013; Jaguin et al. 2013).

Desta forma, com o intuito de padronizar um modelo de cultura primária de monócitos para diferenciação a macrófagos em nosso laboratório, escolhemos trabalhar com os dois métodos de purificação de monócitos mais citados na literatura, e elegemos um protocolo de diferenciação a ser testado. Assim, estabelecemos um modelo de cultura primária de monócitos que permite o estudo dos macrófagos derivados de monócitos humanos sob condições que resultam em diferentes fenótipos de polarização. Em última instancia, poderemos utilizar esse modelo em trabalhos que pesquisem a biologia dos macrófagos e sua relevância em potencial em diferentes doenças humanas.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Padronizar um modelo '*in vitro*' de diferenciação de monócitos humanos a macrófagos, com a finalidade de obter ferramentas em nosso laboratório para o estudo da biologia dos macrófagos em diferentes contextos fisiológicos e patológicos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Isolar monócitos do sangue venoso periférico de indivíduos saudáveis através de duas técnicas de purificação já descritas na literatura e comparar sua pureza final;
- Diferenciar monócitos purificados através de diferentes técnicas de isolamento em macrófagos nos seus fenótipos M1 e M2;
- Avaliar a diferenciação dos macrófagos em seus perfis M1 e M2 através da morfologia, de marcadores de membrana, expressão gênica de citocinas e secreção de quimiocinas;
- Avaliar se os macrófagos diferenciados se mantêm como células ativas e funcionais através da análise da atividade fagocítica.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Sujeitos da pesquisa e amostra biológica**

Foram incluídos neste trabalho 5 indivíduos saudáveis (sem históricos de doença crônica e valores de hemograma normais), com idades entre 24 e 39 anos, 4 do sexo feminino e 1 do sexo masculino. Sessenta mililitros de sangue venoso periférico foram colhidos de cada indivíduo por punção venosa em dois tempos distintos. Os participantes concordaram em participar do estudo, leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A). Este trabalho é a primeira parte de um projeto aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Anexo B), denominado “Papel dos monócitos na manutenção do estado de tolerância operacional em transplante renal humano dependente de TGF-beta” (Apêndice B). Logo após a coleta de cada indivíduo, o sangue foi processado no laboratório 21 do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

#### **3.2 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)**

O sangue colhido dos pacientes foi dispensado em tubos de 50mL contendo o anticoagulante EDTA e homogeneizado por inversão. Em seguida, este sangue foi gentilmente colocado em tubos de 15 mL contendo fase de HISTOPAQUE®-1077 (d= 1,077, Sigma Aldrich) na razão de 1:2 e então, centrifugado a 400xg por 30 minutos em *NO BRAKE*. Após a centrifugação, as PBMC foram coletadas, ressuspendidas e lavadas com DPBS por três vezes, em três velocidades

decrecentes de centrifugação (1.500 RPM, 1.300 RPM e 1.100 RPM) para remoção das plaquetas. Em seguida, a concentração e viabilidade celular foi determinada pela contagem em hemocítômetro com Corante Vital Azul Tripan. Uma parte das PBMC (aproximadamente  $1 \times 10^6$  células) foi utilizada para imunofenotipagem por citometria de fluxo (FACS) (descrito a seguir).

### **3.3 Purificação de monócitos por aderência ao plástico (AP)**

A purificação dos monócitos por AP foi realizada pela incubação das PBMC em meio de cultura RPMI-1640 (Invitrogen, Califórnia, USA), suplementado com 10% de SFB (Invitrogen, Califórnia), 200 mg/mL de L-glutamina (Invitrogen, Califórnia), 100 U/mL penicilina e 100 mg/mL estreptomicina (Invitrogen, Califórnia), denominado meio RPMI 10%, em câmara úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 2 horas de incubação, o cultivo foi gentilmente lavado por cinco vezes com DPBS para remoção das células não aderentes. As células aderentes foram consideradas monócitos e cultivadas para diferenciação a macrófagos. Um poço da placa de cultura foi utilizado para a suave remoção com espátula, das células aderentes (Zhou et al. 2012). Estas foram marcadas com anticorpo contra CD14-FITC para a determinação da pureza celular por FACS.

### **3.4 Purificação dos monócitos por Seleção Positiva (SP)**

Para purificar os monócitos através da técnica de SP, as PBMC foram primeiramente incubadas com o anticorpo monoclonal CD14 conjugado a

micropartículas magnéticas em tampão de lavagem (TL) (PBS, 0,5% BSA, 0,5M EDTA) (CD14, Miltenyc Biotec, Germany) por 15 minutos a 4°C. Após a incubação com o anticorpo, as células foram lavadas e ressuspendidas em TL e passadas através de uma minicoluna magnética (MACS® Cell Separation Columns, Miltenyi Biotec) para separação das células CD14<sup>+</sup>. Assim, as células CD14<sup>+</sup> ficam retidas na coluna ao passo que a fração de células CD14<sup>-</sup> atravessa a coluna. Após o término da passagem das células, a minicoluna foi lavada três vezes com TL e as células aderidas (CD14<sup>+</sup>) foram removidas por pressão, com auxílio de um embolo. Ao final do procedimento, uma parte das células purificadas (aproximadamente 5x10<sup>4</sup>) foi marcada com anti-CD14-FITC (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) (descrito a seguir) para avaliação da pureza celular. O restante das células foi cultivado com o protocolo de diferenciação a macrófagos.

### **3.5 Cultura celular e diferenciação dos macrófagos**

Os monócitos isolados por ambos métodos descritos foram cultivados em meio RPMI 10% SFB, em câmara úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Para a diferenciação a macrófagos, os monócitos foram incubados em RPMI 10% suplementado com M-SCF (50 ng/mL, Peprotech, USA) por 7 dias. Para a polarização ao perfil M1, os macrófagos previamente diferenciados com M-CSF foram incubados em RPMI10% suplementado com IFN- $\gamma$  (20 ng/mL, Peprotech) e LPS (100 ng/ml, Sigma-Aldrich, USA). Para a polarização ao perfil M2, os macrófagos foram incubados em RPMI 10% suplementado com IL-4 (20 ng/mL, Peprotech), ambos por mais 18 horas (protocolo adaptado de (Solinas et al. 2010; Ambarus et al. 2012)).

Após a diferenciação e polarização dos macrófagos, o sobrenadante da cultura foi coletado e armazenado a -80°C para a análise da secreção de quimiocinas. Uma porção dos macrófagos foi armazenada em TRIZOL (Sigma, USA) a -80 °C para posterior análise molecular de mRNA. Outra porção dos macrófagos foi removida suavemente com espátula para realização de imunofenotipagem por citometria de fluxo. Ao mesmo tempo, em uma placa de 24 poços, os macrófagos diferenciados foram utilizados para avaliação da atividade fagocítica.

### **3.6 Imunofenotipagem**

As análises da pureza celular dos monócitos isolados foi realizada pela marcação dos mesmos com anti-CD14-FITC (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA). Para a análise de marcadores de maturação celular, os PBMC e os macrófagos derivados de monócitos foram marcados com anticorpos anti-CD14-FITC, anti-CD80-PE, anti-86-PerCP, anti-HLA-DR-APC (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) para a avaliação do perfil M1 e com anti-CD14-FITC, anti-CD163-PE, anti-206-PeCY-5, anti-HLA-DR-APC (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA) para a avaliação do perfil M2.

As células foram bloqueadas em tampão de FACS (PBS suplementado com 0,5% BSA) por 15 minutos e incubadas com os anticorpos apropriados (1:10) por 30 minutos no gelo e no escuro. As células foram então lavadas e ressuspendidas em 500µL do tampão de FACS. A aquisição das amostras foi realizada no aparelho FACScalibur™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems). A compensação dos fluoróforos foi realizada com os mesmos populações celulares a serem analisados, com marcações únicas de cada fluoróforo. Nas PBMC, foram adquiridos 10.000

eventos na região correspondente aos monócitos no gráfico de tamanho e granulosidade. Nos macrófagos diferenciados, foram adquiridos 10.000 eventos na região correspondente a células viáveis no gráfico citado. A análise dos dados obtidos foi realizada através do programa *CellQuest Pro™* (BD Biosciences, San José, Califórnia, USA).

### **3.7 Extração de RNA, transcrição reversa e PCR em tempo Real**

A extração de RNA dos macrófagos M1 e M2 foi realizada pela incubação das células com TRIZOL (Sigma, USA) e posterior adição de clorofórmio. O RNA presente na fase aquosa foi precipitado com álcool isopropílico, lavado com etanol 70% e ressuspendido em água tratada com DEPC (0,01%). O RNA foi quantificado no equipamento BioPhotometer Plus (Eppendorf, USA). A síntese de cDNA foi realizada a partir da mesma concentração de RNA para cada amostra (1.2 µg), com a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen, Califórnia, USA).

As sequências gênicas de interesse foram obtidas em bases de dados ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) e [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Pares de iniciadores específicos para cada gene de interesse foram desenhados utilizando o programa de computação IDT Design Software (Integrated DNA technologies Inc., USA). Os genes e iniciadores estão especificados na tabela 1.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento *Step One Plus Real-Time Cycler* (Applied-Biosystem, New York, NY, USA) em triplicata, com o kit comercial *Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG* (Invitrogen, Califórnia, USA). A especificidade de cada reação foi confirmada utilizando-se a análise das curvas de dissociação ao final de cada corrida. Todos os resultados

foram analisados pelo método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Schmittgen e Livak 2008). Como calibrador endógeno foi utilizado o gene da  $\beta$ -2-Microglobulina.

Tabela 1: Genes e iniciadores utilizados no PCR em tempo real

Gene	Acesso*	Iniciadores		Produto
		<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>	
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	NM_000576.2	TGGCCCTAAACAGATGAAGTG	GAAGGTGCTCAGGTCATTCTC	199 pb
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	NM_000594.3	TCTCTCTAATCAGCCCTCTGG	GCTTGAGGGTTTGCTACAAC	94 pb
<b>IL-10</b>	NM_000572.2	CTTCCCTGTGAAAACAAGAGC	TGTCATGTAGGCTTCTATGTAGGTG	132 pb
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	NM_000660.5	AACAATTCCTGGCGATACCTC	GTAGTGAACCCGTTGATGTCC	197 pb
<b>CCL18</b>	NM_002988.2	ATTCTGAAACCAGCCCCCAG	CTGGGCATAGCAGATGGGAC	258 pb
<b><math>\beta</math>-2M</b>	NM_004048.2	TGCTGTCTCCATGTTTGAT	TCTCTGCTCCCCACCTCTA	86 pb

\*Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

### 3.8 Secreção de quimiocinas e TGF- $\beta$

A secreção das quimiocinas CXCL8/IL-8, CCL5/Rantes, CXCL-9/MIG, e CXCL10/IP-10 no sobrenadante da cultura dos macrófagos M1 e M2 foi realizada através do kit *BD™ Cytometric Bead Array Human Chemokine Kit* (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram adquiridos em citômetro FACScalibur™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA) e analisados no programa FCAP Array v1.0.1 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA). As concentrações finais de cada analíto foram calculadas a partir de curvas padrão. Os resultados foram

expressos em pg/mL. O limite de detecção para CXCL8/IL-8 é 0,2 pg/mL, CCL5/Rantes é 1.0 pg/mL, CXCL-9/MIG é 2,5 pg/mL e CXCL10/IP-10 é 2.8 pg/mL.

A secreção de TGF- $\beta$  foi realizada por imunoenensaio enzimatico (ELISA) com o kit para detecção de TGF- $\beta$ 1 *DuoSet ELISA Development System* (R&D Systems) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em pg/mL. O limite de detecção do kit é 15,4 pg/mL.

### **3.9 Fagocitose**

A capacidade de fagocitose dos macrófagos diferenciados aos perfis M1 e M2 foi avaliada pela incubação das células com microesferas de poliestireno fluorescentes (*FluoSpheres® Fluorescent Microspheres*, Molecular Probes) na razão de 1:50 (microesferas/células) por 18 horas. Como controle negativo de fagocitose foi realizado o mesmo experimento incubado a 4°C. Após 18h, os monócitos foram gentilmente removidos da placa com espátula e a porcentagem partículas fluorescentes internalizadas pelas células foi quantificada em citômêtro FACScalibur™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA). A análise dos dados obtidos foi realizada através do programa *CellQuest Pro™* (BD Biosciences, San José, Califórnia, USA).

### **3.10 Análise Estatística**

Dados não paramétricos foram avaliados pelo teste Kruskal-Wallis seguido de teste Dun ou pelo teste de Mann-Whitney e expressos pela mediana. Dados paramétricos foram analisados por ANOVA de uma via seguida de teste Tukey ou

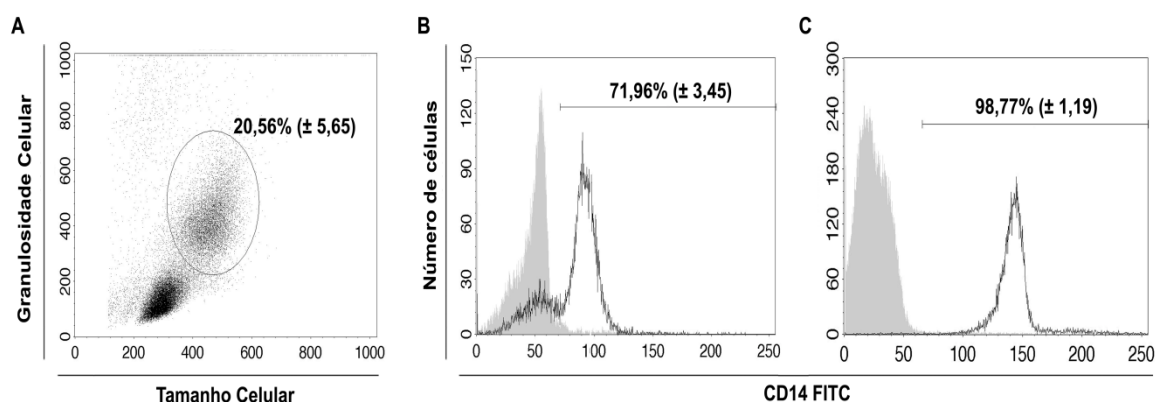


pelo Teste T e foram expressos pela média±desvio padrão. Resultados significativamente diferentes foram representados por \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ . As análises foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prisma 5 para Windows (versão 5.01, San Diego, USA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Pureza Celular

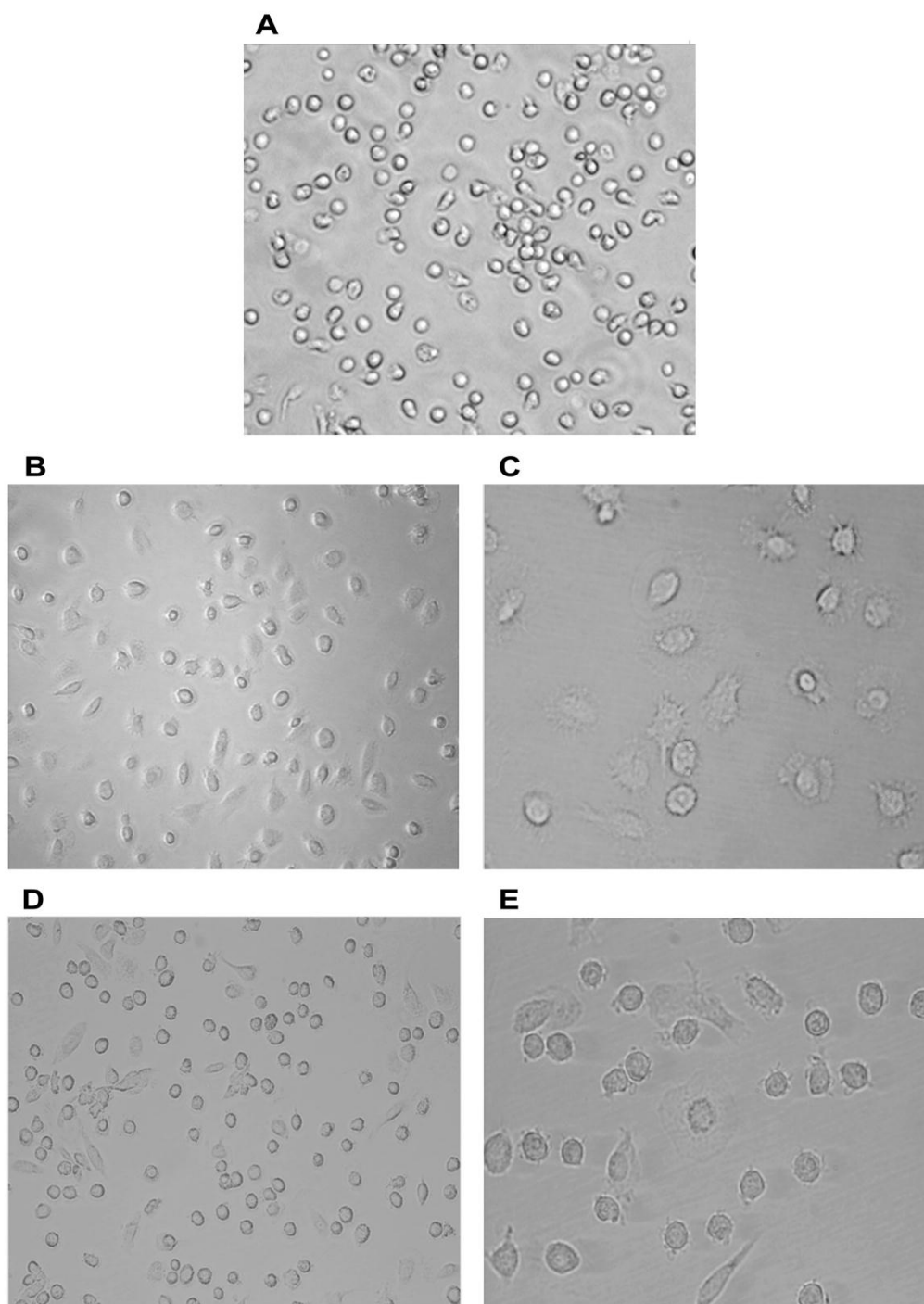
Utilizando os protocolos descritos anteriormente, isolamos monócitos do sangue periférico de 5 indivíduos saudáveis. Primeiramente, isolamos as PBMC, sendo que rotineiramente observamos um rendimento de aproximadamente  $0,85 \times 10^6$  células/mL. Do total de PBMCs isoladas, 20,56% ( $\pm 5,65$ ) fazia parte da população de monócitos pela análise em gráfico de pontos de tamanho por granulosidade (Figura 3A). Em relação à pureza, analisamos a expressão de CD14 nas células obtidas após cada método de isolamento. Como esperado, observamos uma pureza significativamente maior na SP (figura 3C) em relação a AP (figura 3B), 98,77 ( $\pm 1,19$ ) versus 71,96% ( $\pm 3,45$ ), respectivamente. A viabilidade celular do método por isolamento foi rotineiramente maior que 95%. Não avaliamos a viabilidade celular no método de aderência, pois após a finalização da técnica os monócitos já estão aderidos, e sua remoção utilizando a espátula diminuiu significativamente a viabilidade, não refletindo a viabilidade real.



**Figura 3:** Pureza celular das técnicas de isolamento de monócitos. (A) Gráfico de pontos representativo do tamanho e granulosidade celular das PBMC após isolamento em gradiente de *Ficoll-Hypaque*, em destaque (círculo) a população de monócitos. (B,C) Histogramas representativos de 5 experimentos independentes mostrando a pureza de monócitos isolados pelos métodos de AP e SP, respectivamente, diferença estatística entre as purezas estaticamente diferente avaliado por teste T ( $p < 0,001$ ), Traço preenchido: controle negativo, traço preto: intensidade de marcação com anti-CD14.

## **4.2 Morfologia celular**

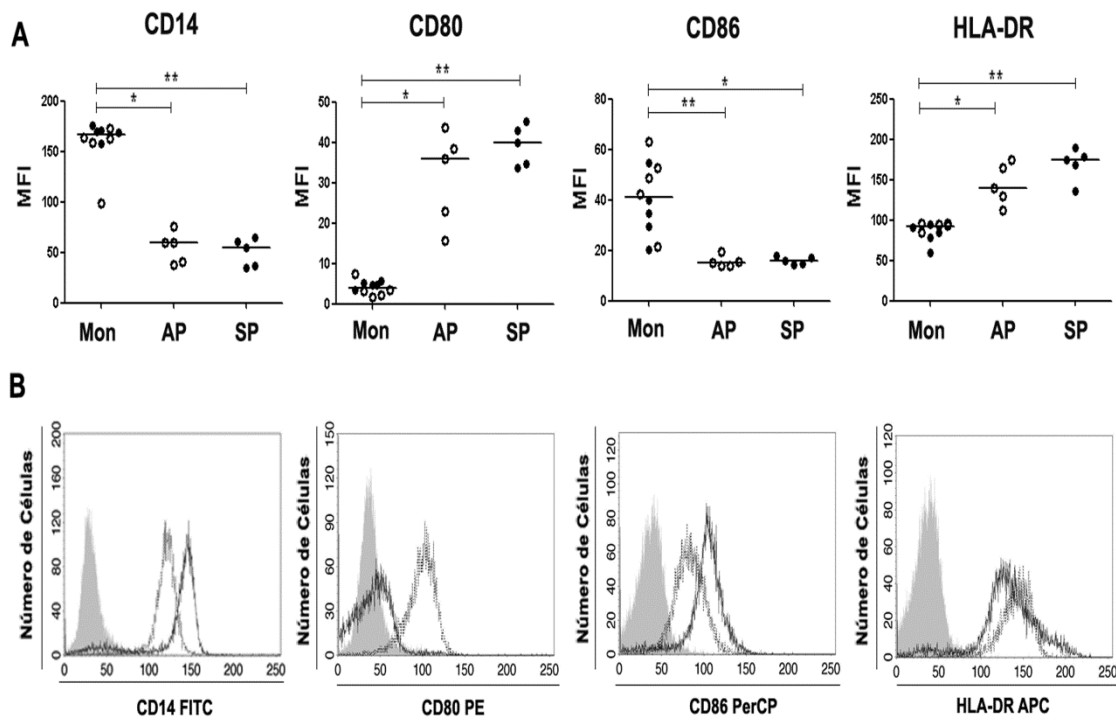
Os monócitos apresentam-se como células mononucleares de formato arredondado e em suspensão (Figura 4A). Aproximadamente após uma hora em cultura, os monócitos começam a se aderir à matriz. A diferenciação de monócitos a macrófagos é acompanhada pela redução da razão núcleo citoplasma, sendo que há um aumento visível do volume citoplasmático. Ao término de 8 dias, adquirem formato pavimentoso (espraiado) ou formato de fuso (Figuras 4B,4C,4D,4E).



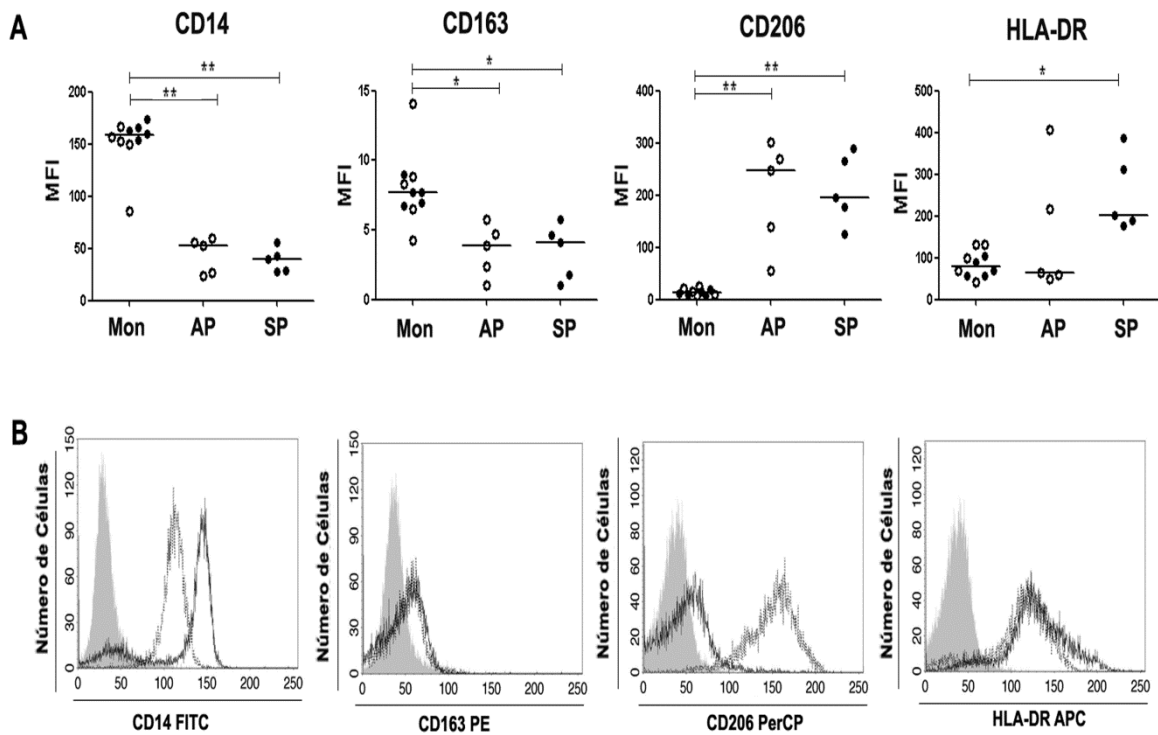
**Figura 4:** Morfologia dos macrófagos. (A) Imagem representativa de monócitos isolados por SP antes de aderirem a placa. (B,C) Imagens representativas de macrófagos diferenciados por 7 dias com M-CSF mais 18 horas com INF- $\gamma$  e LPS, aumento de 100 e 400 vezes, respectivamente. (D,E) Imagens representativas de macrófagos diferenciados por 7 dias com M-CSF mais 18 horas com IL-4, aumento de 100 e 400 vezes, respectivamente.

### **4.3 Modulação dos marcadores de superfície na diferenciação de monócitos a macrófagos**

A imunofenotipagem com os marcadores já citados foi realizada tanto em monócitos isolados por ambos os métodos, AP e SP, como em macrófagos diferenciados. Após 8 dias em cultura, observamos uma modulação negativa do marcador CD14, tanto em macrófagos M1 (figura 5) como em M2 (figura 6), e uma modulação positiva de HLA-DR apenas em macrófagos M1 e macrófagos M2 obtidos em cultura de SP (figura 5). As condições específicas de polarização ao perfil M1 também modularam as moléculas coestimulatórias CD80 e CD86, demonstrando que monócitos são CD80<sup>-</sup> e CD86<sup>high</sup> e macrófagos M1 são CD80<sup>high</sup> e CD86<sup>+</sup> (figura 5). Já as condições específicas de polarização ao perfil M2 modularam os receptores CD163 e CD206, demonstrando que monócitos são CD206<sup>low</sup> e CD163<sup>low</sup> e macrófagos M2 (induzidos por IL-4) são CD206<sup>high</sup> e CD163<sup>-</sup> (figura 6). Não houve diferença na maturação destes marcadores entre os métodos utilizados para isolar os macrófagos.



**Figura 5:** Modulação de marcadores de superfície M1. (A) Marcadores de superfície analisados em monócitos e macrófagos por citometria de fluxo; os gráficos representam a mediana de intensidade fluorescência (MFI) de 5 experimentos independentes, diferenças significativas avaliadas pelo Teste de Kruskal-Wallis, \* $p < 0,05$ . \*\* $p < 0,01$ . Mon: monócitos, AP: Aderência ao plástico, SP: Seleção Positiva. (B) Histogramas representativos de uma cultura AP mostrando os marcadores de superfície do perfil M1 obtidos por FCAS. Traço preenchido: controle negativo, traço preto: monócitos, traço cinza: macrófagos diferenciados “in vitro”.

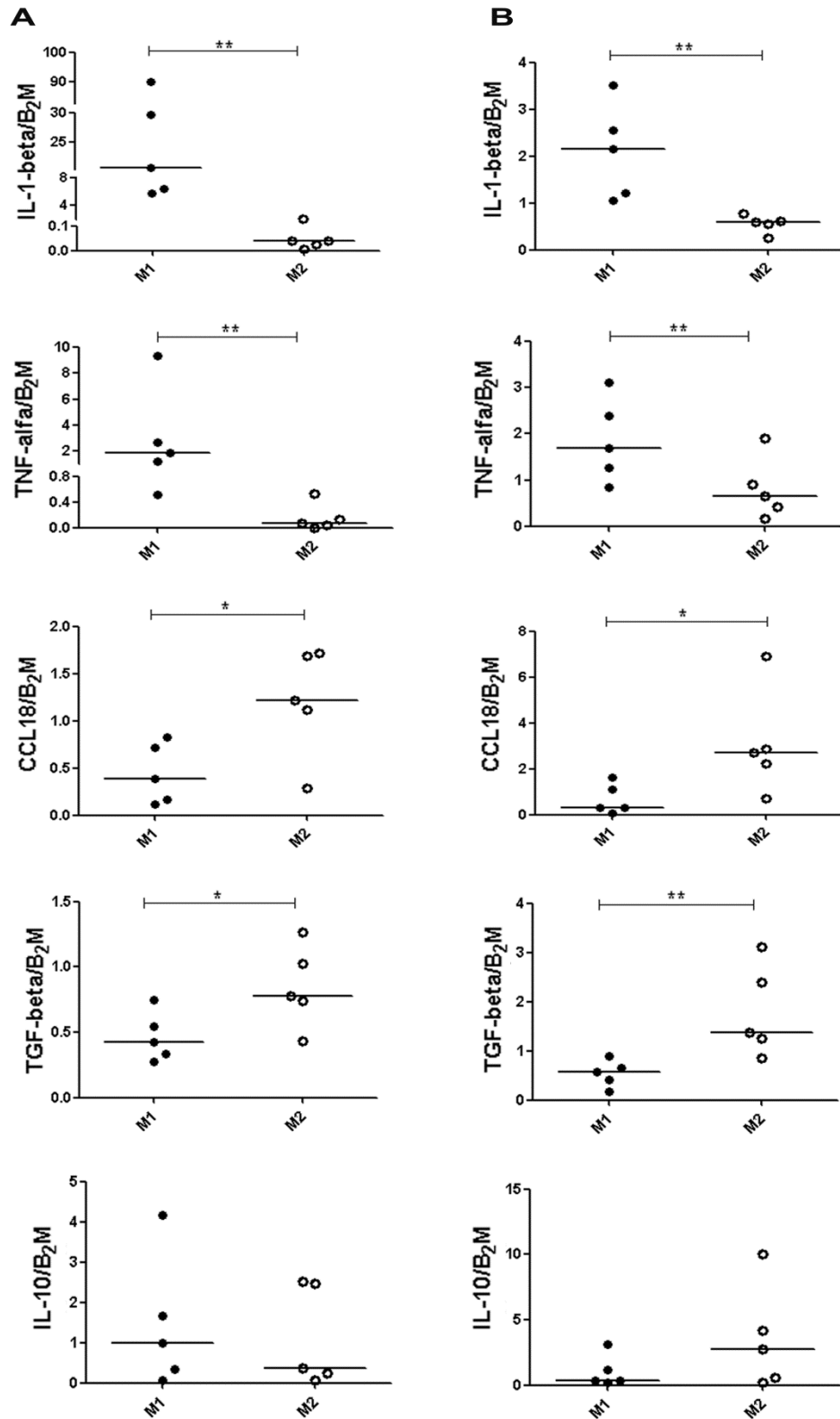


**Figura 6:** Modulação de marcadores de superfície M2. (A) Marcadores de superfície analisados em monócitos e macrófagos por citometria de fluxo; os gráficos representam a mediana de intensidade fluorescência (MFI) de 5 experimentos independentes, diferenças significativas avaliadas pelo Teste de Kruskal-Wallis, \* $p < 0,05$ . \*\* $p < 0,01$ , Mon: monócitos, AP: Aderência ao plástico, SP: Seleção Positiva. (B) Histogramas representativos de uma cultura AP mostrando os marcadores de superfície do perfil M2 obtidos por FACS. Traço preenchido: controle negativo, traço preto: monócitos, traço cinza: macrófagos diferenciados “in vitro”.

#### **4.4 Expressão de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras em macrófagos M1 e M2**

Em seguida, avaliamos o perfil de expressão de transcrição (mRNA) de algumas citocinas tradicionalmente consideradas típicas de macrófagos M1 e M2. Observamos que o tratamento com IFN- $\gamma$ +LPS aumentou de forma significativa a expressão das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em macrófagos M1 em relação aos macrófagos M2. Como esperado, também observamos que essa diferença foi mais acentuada em macrófagos diferenciados na cultura de monócitos obtida pelo método AP. Em relação às citocinas reguladoras, observamos que a expressão de CCL18 e TGF- $\beta$  foi significativamente maior em macrófagos M2 em relação a macrófagos M1 em ambas culturas. Entretanto e para nossa surpresa, a expressão de IL-10 não apresentou diferença significativa entre M1 e M2 em nenhuma das culturas.



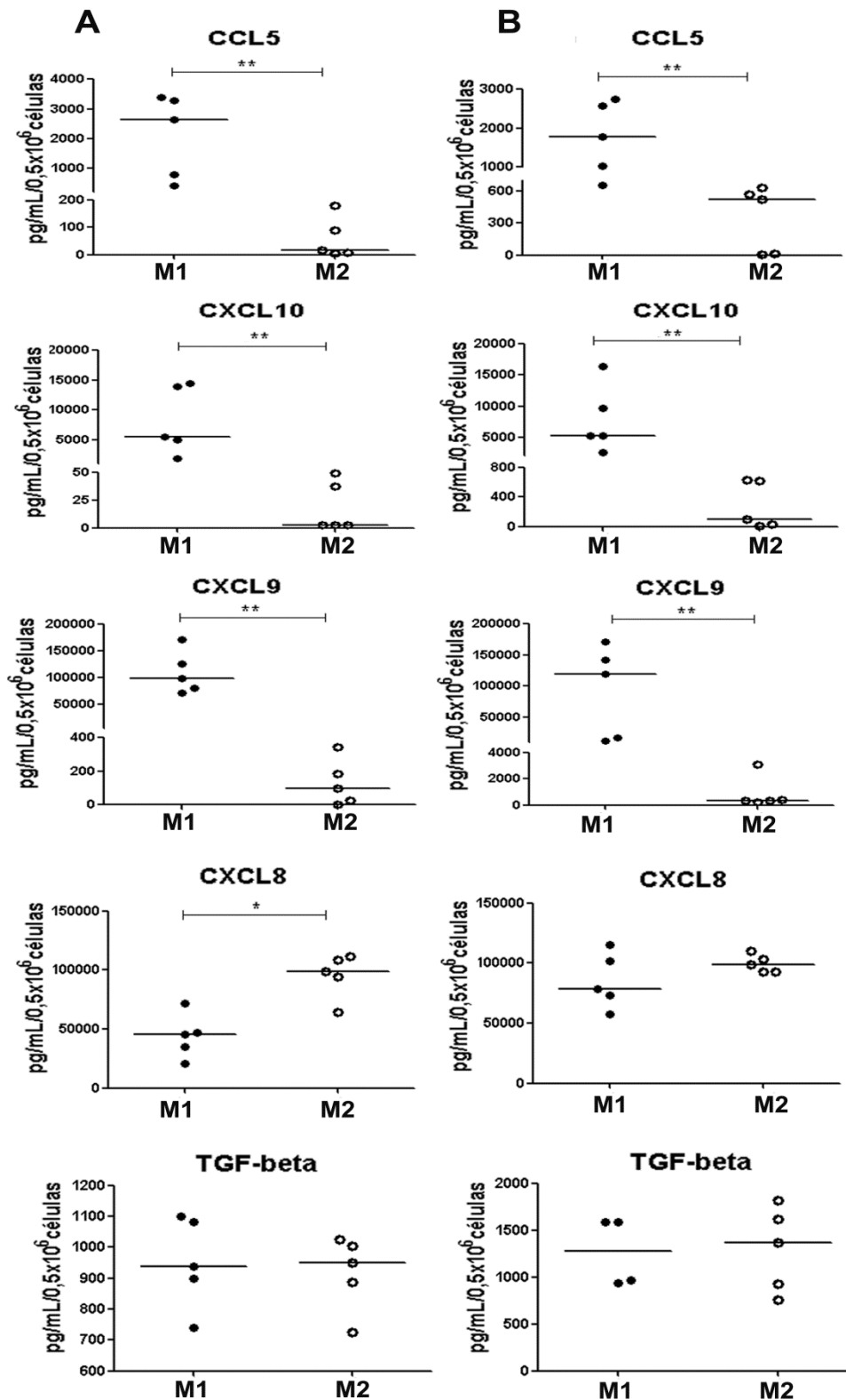


**Figura 7:** Expressão gênica de citocinas em macrófagos M1 e M2. (A) Expressão gênica de citocinas em macrófagos de cultura obtida por AP. (b) Expressão gênica de citocinas em macrófagos de cultura obtida por SP. Gráficos representam a mediana da expressão relativa dos genes de interesse em relação a  $\beta$ -2-microglubulina; diferenças significativas avaliadas pelo Teste de Mann-Whitney, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

#### **4.5 Secreção de quimiocinas e TGF- $\beta$ em macrófagos M1 e M2**

Posteriormente, avaliamos como estava o perfil de secreção de algumas quimiocinas importantes no tráfego leucocitário e que são tradicionalmente consideradas típicas de macrófagos M1. Observamos que o tratamento com LPS e INF- $\gamma$  aumentou de forma significativa a expressão das quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CCL5 em macrófagos M1 em relação aos macrófagos M2. Por outro lado, a secreção de CXCL8 não apresentou diferença significativa em cultura de macrófagos obtidas por SP, mas foi significativamente maior em macrófagos M2 em relação a macrófagos M1 em culturas obtidas por AP (figura 9).

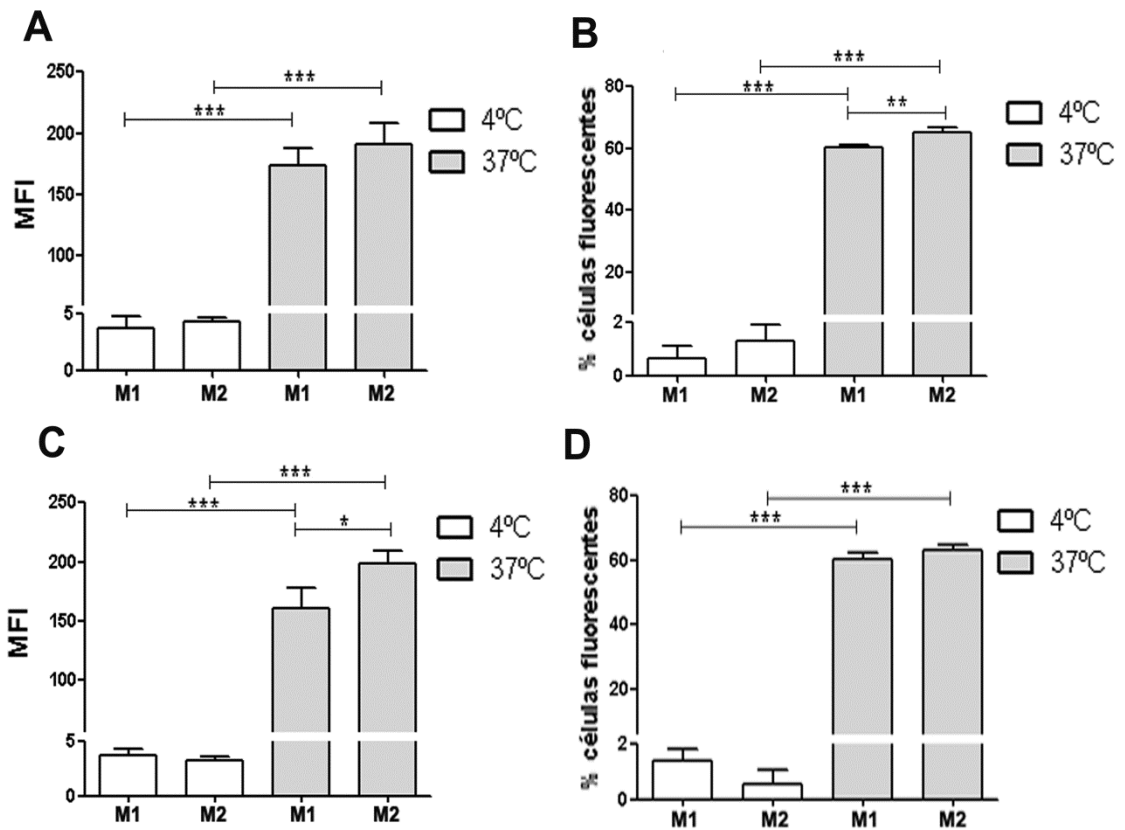
Surpreendentemente, não houve diferença na secreção de TGF- $\beta$  entre macrófagos M1 e M2 em ambas culturas, apesar de termos encontrado diferenças na expressão de mRNA (figura 9).



**Figura 8:** Secreção de quimiocinas e TGF- $\beta$  em macrófagos M1 e M2. (A) Secreção de quimiocinas e TGF- $\beta$  em macrófagos de cultura obtida por AP. (b) Secreção de quimiocinas e TGF- $\beta$  em macrófagos de cultura obtida por SP. Gráficos representam a mediana da secreção em pg/mL; diferenças significativas avaliadas pelo Teste de Mann-Whitney, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

#### **4.6 Atividade fagocítica em macrófagos M1 e M2**

Para avaliar se o tempo em cultura e a diferenciação de monócitos a macrófagos não afetou a funcionalidade das células, avaliamos uma das suas principais características, a atividade fagocítica. Observamos que houve diferença significativa entre as taxas de fagocitose a 37°C e os controles negativos a 4°C pelos dois métodos de isolamento. Observamos também que células do perfil M2 possuem maior atividade fagocítica em relação ao perfil M1. Na técnica de AP, os macrófagos M2 tiveram uma porcentagem de células que realizaram fagocitose significativamente maior em relação a M1 (figura 9B), além de que os macrófagos M2 mostraram uma tendência a englobar mais partículas do que macrófagos M1 (figura 9A). Em relação a técnica de SP, não houve diferença significativa entre a porcentagem de células que realizaram fagocitose (figura 9D), no entanto, macrófagos M2 mostraram englobar significativamente mais partículas do que macrófagos M1 (figura 9C).



**Figura 9:** Fagocitose em macrófagos M1 e M2. (A) Atividade fagocítica expressa por MFI em macrófagos M1 e M2 em cultura obtida pela técnica de AP. (B) Atividade fagocítica expressa por % de células emitindo fluorescência em macrófagos M1 e M2 em cultura obtida pela técnica de AP (C) Atividade fagocítica expressa por MFI em macrófagos M1 e M2 em cultura obtida pela técnica de SP. (D) Atividade fagocítica expressa por % de células emitindo fluorescência em macrófagos M1 e M2 em cultura obtida pela técnica de SP; diferenças significativas avaliadas por ANOVA de uma via seguida de teste Tukey, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

## 5 DISCUSSÃO

Os macrófagos são uma população de células notoriamente heterogênea e com grande plasticidade. Suas funções dependem do sítio anatômico ou tecido residente e de sinais do microambiente ao qual estão expostos. Os macrófagos exercem diferentes ações e podem coordenar a quimioatração, proliferação e recrutamento de células pró-inflamatórias do sistema imune e assim montar um microambiente pró-inflamatório em resposta a uma grande variedade de estímulos. Por outro lado, os macrófagos também exercem um papel crítico na resolução de processos inflamatórios modulando a resposta imune no sentido de reverter o processo inflamatório (Randolph et al. 2008; Cassetta et al. 2011).

Neste âmbito, compreender como diferentes contextos fisiopatológicos dirigem a diferenciação e ação dos macrófagos e como estes macrófagos diferenciados estão envolvidos com a progressão ou remissão das diferentes doenças torna-se necessário. A possibilidade de explorar novos métodos para induzir, modular e expandir *ex vivo* diferentes fenótipos de macrófagos com ações antagonistas, nos permitirá utilizá-los como modelo experimental de cultura para a compreensão da sua biologia. Mais importante, o entendimento da cultura e modulação dos macrófagos poderá ser explorado como estratégia pré-clínica de imunoterapia celular (Martinez et al. 2008; Gordon e Martinez 2010; Broichhausen et al. 2012).

O processamento e isolamento das frações celulares do sangue total é um procedimento importante no estudo dos monócitos/macrófagos tanto na pesquisa básica como na aplicada. Embora alguns estudos possam ser desenvolvidos em populações celulares heterogêneas, trabalhar com populações celulares purificadas parece ser essencial para determinar a contribuição específica de cada tipo celular na

patogênese das doenças (Zhou et al. 2012; Beliakova-Bethell et al. 2013). Assim, alguns métodos de fracionamento dos elementos do sangue, incluindo monócitos, já estão descritos e estabelecidos na literatura (Almeida et al. 2001; Ambarus et al. 2012; Zhou et al. 2012; Beliakova-Bethell et al. 2013; Neu et al. 2013). No entanto, apesar destes protocolos serem amplamente utilizados, um método ideal que combine simplicidade, baixo custo, alta pureza e alto rendimento ainda não existe. Por este motivo, otimizar estes métodos e analisar seu custo-benefício ainda é necessário.

Em primeiro lugar, a eficiente purificação dos monócitos a partir de um volume pré-determinado de sangue venoso periférico é um procedimento crítico, principalmente pelo fato de que há uma baixa concentração fisiológica de monócitos na corrente circulatória (em torno de 3 a 10% do total de leucócitos) (Heidenreich 1999).

Uma segunda limitação em potencial durante o procedimento de isolamento celular é o possível efeito de ativação inespecífica das células desejadas. Por exemplo, a técnica de isolamento por SP emprega anticorpos contra antígenos de superfície expressos nas células de interesse, no nosso caso o antígeno de superfície CD14. Desta forma, a ligação do anticorpo ao seu receptor na membrana plasmática poderia desencadear a ativação de vias de sinalização específicas ou, ainda, favorecer uma diminuição ou inibição das funções celulares através do bloqueio dos receptores (Beliakova-Bethell et al. 2013).

Por outro lado, técnicas de isolamento como SN e AP, as quais não são baseadas na ligação direta de anticorpos aos receptores de membrana das células de interesse, parecem não induzir vias de sinalização específicas. No entanto, estas

técnicas também apresentam limitações, visto que seus isolados apresentam índices consideráveis de contaminação por outras células (Beliakova-Bethell et al. 2013).

Neste sentido, um trabalho prévio procurou analisar o impacto de duas técnicas diferentes de isolamento de populações leucocitárias (SP e SN) sobre a expressão gênica de células como monócitos e linfócitos T auxiliares (TCD4) e T citotóxicos (TCD8). Neste estudo, foi observado uma expressão gênica diferencial entre as mesmas populações celulares isoladas por métodos diferentes. Contudo, os autores sugerem que essa expressão gênica diferencial não é resultado da técnica de isolamento *per se* e sim, resultante da presença de outros tipos celulares presentes na amostra, denominadas células contaminantes (Lyons et al. 2007). No entanto, os experimentos foram conduzidos com as células imediatamente após a purificação, sem avaliar o impacto dessas contaminações em cultivos celulares.

No presente trabalho, as duas técnicas de purificação abordadas, tanto a SP quanto a de AP, exploram características celulares distintas dos monócitos para poder purificá-los. A diferença entre a abordagem metodológica das duas técnicas resultou, como esperado, em purezas finais significativamente distintas. Nossos resultados, que estão de acordo com a literatura (Zhou et al. 2012), revelaram que o método de SP apresenta uma população de monócitos com pureza superior a 98%, enquanto que o método de AP possui pureza em torno de 70% com alta percentagem de linfócitos contaminantes.

Nesta visão, a contaminação de linfócitos na primeira hora após a aderência pode ser alta, chegando a 50% da população celular total após 2 lavagens e a 30% após 5 lavagens. Ainda, em 24 horas e após 4 lavagens vigorosas, 25% das células remanescentes podem ser linfócitos (Bennett et al. 1992). No entanto, os linfócitos T precisam para sobreviver em cultura, do estímulo induzido pela interação entre a IL-2



e seu receptor, o IL-2R (CD25). Assim, culturas de monócitos vão naturalmente aumentando sua pureza já que, na ausência de IL-2, os linfócitos contaminantes não conseguem sobreviver por longos períodos, como em uma cultura de macrófagos. (Zhou et al. 2012).

A heterogeneidade fenotípica dos macrófagos depende do microambiente de citocinas e fatores de crescimento nos quais a célula está inserida. Entre estes fatores, os principais indutores fenotípicos são os fatores de crescimento GM-CSF e M-CSF liberados tanto por eles mesmos, assim como por outras células do sistema imune como linfócitos T, células *Natural Killer*, mastócitos e também por células endoteliais (Akagawa 2002; Akagawa et al. 2006). Esses fatores sinalizam para a diferenciação a macrófagos. Porém, embora ambos sejam comumente utilizados nos diversos protocolos, os macrófagos induzidos por eles não compartilham a expressão de todos marcadores celulares (Lovren et al. 2010; Solinas et al. 2010; Ambarus et al. 2012; Jaguin et al. 2013).

No nosso protocolo, e com o intuito de adaptarmos um protocolo de diferenciação que contemplasse os dois principais fenótipos de macrófagos descritos na literatura, M1 e M2, escolhemos a adição de M-CSF para diferenciação de monócitos a macrófagos. Posteriormente, e com o objetivo de mimetizar o curso natural de uma infecção bacteriana associada a um perfil de ativação clássico M1, o meio de cultura foi suplementado com IFN- $\gamma$  e LPS, fatores presentes naturalmente no curso da infecção. Para a polarização no perfil M2, imunorregulador ou supressor, os macrófagos foram posteriormente suplementados com IL-4, uma citocina clássica TH2 (Solinas et al. 2010; Ambarus et al. 2012).

A diferenciação de macrófagos a partir dos monócitos isolados pelas duas técnicas de separação, AP ou SP, nos mostrou uma modulação de marcadores de

superfície. Observamos uma regulação positiva da molécula coestimulatória CD80 (também denominada B7.1) em macrófagos M1 em relação aos monócitos e essa regulação foi independente do método de isolamento. Este aumento na expressão do CD80 já está bem estabelecido e descrito em outros trabalhos, que confirmaram o CD80 como um marcador clássico de polarização M1. Entretanto, a expressão do CD80 pode ser induzida ainda por outras vias, como pela ação de outras citocinas inflamatórias como o TNF- $\alpha$  (Ambarus et al. 2012; Jaguin et al. 2013). Em contrapartida, vimos que os monócitos apresentam uma maior expressão de CD86 (também denominada B7.2) em relação aos macrófagos M1. No entanto, embora a expressão do CD86 tenha sido modulada negativamente, ele continuou positivo nos macrófagos M1, podendo ser considerado um marcador destes macrófagos, como já descrito na literatura (Mantovani et al. 2002; Benoit et al. 2008; Kigerl et al. 2009),

Outra característica observada a partir do tratamento com IFN- $\gamma$  foi o aumento da expressão de MHC-II. Nesse sentido, as células da linhagem monocítica-macrofágica, como em linfócitos B e DC, aumentam a expressão de moléculas MHC-II ante um estímulo pró-inflamatório, ativando a célula e estimulando a amplificação da resposta imune (Schroder et al. 2004). *In vivo*, essas modificações a favor de um perfil pró-inflamatório (CD80<sup>++</sup>CD86<sup>+</sup>HLA-DR<sup>++</sup>) tornam a célula mais eficiente como célula apresentadora de antígeno frente a linfócitos T.

Em relação a diferenciação dos monócitos a macrófagos M2, foi observado uma regulação positiva do MRC1 (CD206). Embora esta modulação seja evidente, alguns estudos demonstraram que a expressão de CD206 não é capaz de diferenciar macrófagos M2 de macrófagos M1 em culturas primárias humanas, ao contrário do que acontece em camundongo. Estes trabalhos igualmente sugerem o marcador CD200R, o qual não foi utilizado no nosso trabalho, para diferenciar com precisão

macrófagos M2 de macrófagos M1 (Ambarus et al. 2012; Jaguin et al. 2013). Concomitante a isto, também foi observado que a IL-4 é um modulador negativo de CD163, um clássico marcador de macrófagos anti-inflamatórios. Entretanto e de acordo com a literatura, CD163 é um marcador clássico de macrófagos M2 induzidos por IL-10 e não por IL-4 (Ambarus et al. 2012).

Nesta abordagem, vimos que a modulação de marcadores de superfície na diferenciação de monócitos a macrófagos foi similar em ambas as estratégias de separação e parece não ser influenciada pelo método de isolamento de monócitos utilizado. Nesta visão, outros trabalhos obtiveram resultados semelhantes. Macrófagos diferenciados a partir de monócitos obtidos por SN e SP pelo estímulo de M-CSF apresentaram expressão similar dos marcadores de superfície CD14, CD163 e CD206 (Neu et al. 2013). Outro estudo, onde foi avaliada a influência dos métodos de isolamento por SP e AP na diferenciação de monócitos a DC, mostrou que os diferentes tipos de isolamento não interferem na expressão dos marcadores de superfície CD80, CD83 e CD86 nas DC diferenciadas (Elkord et al. 2005).

Em relação à expressão gênica de citocinas consideradas pró-inflamatórias e reguladoras, observamos que, como esperado, os macrófagos M1 apresentaram um aumento significativo da expressão do mRNA de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em relação aos macrófagos M2. Esse resultado difere de um estudo publicado recentemente, onde não foi encontrada diferença significativa na expressão de mRNA destas citocinas entre macrófagos M1 e M2. No entanto, este mesmo trabalho encontrou aumento significativo das proteínas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no sobrenadante da cultura dos macrófagos M1 quando comparados com os macrófagos M2. Os autores justificaram a diferença encontrada pelo fato de que a proteína no sobrenadante da cultura reflete 24 horas de secreção de citocinas pelas células, e a expressão relativa do mRNA reflete somente

o estado transcricional das células no momento da coleta, realizada no tempo de 24 horas (Jaguin et al. 2013). Em nosso trabalho, o mRNA das células foi coletado no tempo de 18 horas, o que possivelmente prediz uma síntese ativa dessas citocinas neste momento.

Um fato interessante que encontramos em relação a expressão da IL-1 $\beta$  em nível de mRNA é que sua expressão foi mais acentuada em macrófagos M1 obtidos de monócitos isolados por AP, que nos macrófagos M1 obtidos de monócitos isolados pela SP. Sabendo que o LPS parece ser o principal modulador positivo de IL-1 $\beta$  (Eggesbo et al. 1994) e que o protocolo de purificação utilizando o anticorpo anti-CD14 liga-se ao receptor de LPS, sugerimos que a interação anti-CD14/CD14 pode interferir, ao menos parcialmente, no estímulo de LPS. Assim inferimos que a técnica de seleção positiva poderia inibir parcialmente a expressão desta citocina nos macrófagos diferenciados *in vitro* com LPS. De acordo com nossa hipótese, DC estimuladas *in vitro* com LPS secretam concentrações maiores de citocinas inflamatórias como IL-12 e TNF- $\alpha$  em culturas obtidas por AP do que em culturas obtidas por SP (Elkord et al. 2005). Por outro lado, como a cultura purificada por AP apresenta altas quantidades de células contaminantes (em torno de 30% de contaminação por linfócitos), fica difícil estimar a real contribuição dos contaminantes na expressão final da IL-1 $\beta$ , mesmo sabendo que há uma diminuição na viabilidade dos linfócitos, possivelmente causada pela ausência de suplementação com IL-2, ou ainda, pela remoção dos mesmos decorrente das lavagens do cultivo celular a cada troca de meio de cultura.

Sabe-se que a expressão de CCL18 é induzida por IL-4 e inibida por IFN- $\gamma$ . *In vivo* esta quimiocina também pode ser secretada por macrófagos associados a tumores (Mantovani, 2004). Assim, em relação a CCL18, encontramos uma regulação

positiva de mRNA em macrófagos M2 obtidos por ambas culturas. Já foi demonstrado que macrófagos M2 induzidos na presença de linfócitos T regulatórios possuem aumento de secreção de CCL18 (Tiemessen et al. 2007). A CCL18 secretada pode exercer efeito sobre os próprios macrófagos, contribuindo com o aumento de expressão de marcadores como CD206 e IL-10. (Schraufstatter et al. 2012). Por outro lado, situações que favorecem um ambiente pró-inflamatório, como fumo, contribuem para uma diminuição da produção de CCL18 nos macrófagos alveolares (Kollert et al. 2009).

A IL-10 é uma potente citocina antiinflamatória que exerce papel fundamental no controle da inflamação (Iyer e Cheng 2012). Ao contrário do esperado, não encontramos diferença significativa entre a expressão de mRNA de IL-10 entre macrófagos M1 e M2. No entanto, esse resultado também foi encontrado em outro trabalho, que não observou diferenças na expressão gênica de IL-10 entre macrófagos M1 e M2, mas curiosamente detectou uma quantidade maior de IL-10 no sobrenadante da cultura de macrófagos M1 em relação ao sobrenadante da cultura de macrófagos M2 (Jaguin et al. 2013). No nosso estudo utilizamos a IL-4 como única citocina para a diferenciação de macrófagos no perfil alternativo M2. Contudo, é provável que outros estímulos como a IL-13 (Gordon e Martinez 2010), TGF- $\beta$  (Gong et al. 2012) e a própria IL-10 (Biswas et al. 2012) também sejam necessários para a indução total de macrófagos como células especializadas com profundo mecanismo efetor supressor de ação.

Outra citocina com potente ação imunossupressora e imunorreguladora é o TGF- $\beta$ . Ele exerce função central no desenvolvimento, cicatrização e nas respostas imunes através de seus efeitos regulatórios sobre células epiteliais e hematopoiéticas (Blobe et al. 2000). Em nossos experimentos, o tratamento de macrófagos com IL-4

foi capaz de direcionar as culturas para uma população com perfil imunorregulador. Observamos um aumento da expressão de mRNA de TGF- $\beta$  em macrófagos M2 em relação a macrófagos M1. Entretanto, não foi detectada uma diferença significativa na expressão diferencial da proteína entre macrófagos M1 e M2 no sobrenadante da cultura, tanto no protocolo de purificação por AP como por SP. Nossa plausível explicação é que no protocolo por AP temos uma quantidade de células contaminantes que diluem os resultados observados. No caso do protocolo por coluna, observamos uma tendência de aumento nos macrófagos com o perfil regulador M2, porém não significativa e com grande variabilidade entre os diferentes valores observados.

Diferentes repertórios de quimiocinas estão associados aos perfis M1 e M2 de macrófagos. As quimiocinas produzidas por macrófagos durante a ativação clássica potencializam sua ação na resistência à tumores e no combate a infecções. O perfil de secreção de quimiocinas detectado foi preponderantemente marcador de macrófagos M1, sendo que este tipo de macrófagos apresentou aumento da secreção de CXCL9, CXCL10 e CCL5. De acordo com este resultado, alguns autores já descreveram o aumento da expressão gênica destas quimiocinas em macrófagos M1 (Martinez et al. 2006; Biswas e Mantovani 2010; Jaguin et al. 2013). Sabe-se que o LPS e o IFN- $\gamma$  induzem a expressão dessas quimiocinas através da ativação do fator de transcrição regulador do interferon 3 (IRF-3) (Ohmori e Hamilton 2001), e que a sinalização de IL-4 inibe a expressão das quimiocinas características de macrófagos M1 pela regulação negativa dos fatores NF $\kappa$ B e STAT1 (Mantovani et al. 2004).

Estes dados sugerem que macrófagos diferenciados *in vitro* com a fator de crescimento M-CSF são capazes de responder ao estímulo de IFN- $\gamma$  e LPS, expressando marcadores classificados como inflamatórios. Embora no nosso modelo

experimental não tenhamos testado, é provável que a modulação ao perfil inflamatório seja consequência da ação cooperativa de fatores de transcrição como NFκB e membros da família IRF, através da ativação de TLR, que induzem a expressão de vários genes pró-inflamatórios, permitindo uma polarização M1 (Lawrence e Natoli 2011).

Em relação a quimiocina CXCL-8, vimos que não houve diferença significativa na sua secreção por macrófagos obtidos por AP, mas que na técnica de SP, sua secreção foi maior por macrófagos M2. Embora não tenhamos encontrado descrição na literatura de CXCL8 secretada por macrófagos M2 diferenciados *in vitro*, sabe-se que quando os macrófagos são expostos a IL-4 ou IL-13, há um aumento na expressão dos receptores para CXCL8, bem como aumento da sensibilidade dessas células a sinalização desta quimiocina (Bonecchi et al. 2004). Assim, os sinais do microambiente induzem a ação das quimiocinas pela regulação da sua secreção e pela indução da expressão de seus receptores na membrana plasmática (Mantovani et al. 2004).

Finalmente, além da atividade anti-inflamatória, uma das principais características de macrófagos M2 é sua alta capacidade fagocítica, a qual é independente da produção de oxidantes (Gordon 2003). Deste modo, com o intuito de demonstrar que os macrófagos purificados e diferenciados conservavam sua característica diferencial de fagocitose não específica, utilizamos micropartículas fluorescentes. Mostramos que os macrófagos obtidos em nossos cultivos são células ativas e funcionais, capazes de realizar fagocitose. Nossos resultados demonstram que, como esperado, os macrófagos M2 apresentaram uma atividade fagocítica maior em relação aos macrófagos M1. Em um estudo recente, macrófagos considerados anti-inflamatórios também demonstraram uma atividade fagocítica não específica de

partículas de látex maior do que macrófagos inflamatórios e, além disso, esta fagocitose não foi influenciada pelo tipo de isolamento de monócitos utilizado (Neu et al. 2013).

Nossos dados apoiam a hipótese proposta por diversos autores (Martinez, 2006; Ambarus, 2012, Jaguina, 2013, Gordon. 1992) de que monócitos humanos podem ser diferenciados a macrófagos pelo estímulo de M-CSF, e posteriormente polarizados a macrófagos pró-inflamatórios pelo estímulo de LPS e/ou IFN- $\gamma$ , e anti-inflamatórios pelo estímulo de IL-4. Além disso, mostramos que independente do método de isolamento utilizado, os monócitos são diferenciados e adquirem características clássicas de macrófagos M1 e M2, com perfil de expressão de marcadores de superfície e de citocinas e quimiocinas (Tabela 2). Contudo, é muito importante salientar que tanto o isolamento dos monócitos como a diferenciação a macrófagos são experimentos marcadamente influenciados pela manipulação do experimentador, pela variabilidade da rotina de laboratório e ainda, pelas características de cada indivíduo, o que aumenta o grau de dificuldade e a comparação das duas técnicas.

Tabela 2. Marcadores de diferenciação de macrófagos M1 e M2 obtidas neste trabalho

	<b>Macrófagos M1</b>	<b>Macrófagos M2</b>
<b>Marcadores de Superfície</b>	CD80 <sup>++</sup> CD86 <sup>+</sup>	CD206 <sup>++</sup>
<b>Citocinas (mRNA)</b>	TNF- $\alpha$ IL-1 $\beta$	TGF- $\beta$
<b>Quimiocinas</b>	CCL5 CXCL9 CXCL10	CCL18 (mRNA)
<b>Fagocitose</b>	++	+++



Nesta visão, a escolha do método de isolamento de monócitos depende do objetivo do pesquisador. A técnica de AP é amplamente utilizada, pois é de simples execução, apresenta um custo menor em relação a outras técnicas e pode ser facilmente aplicada a um grande número de amostras. Assim, quando a pureza celular não é estritamente necessária, e não chega a influenciar o contexto dos resultados obtidos, a tradicional técnica de AP permanece como uma ótima opção. No entanto, se uma alta pureza é requerida, e os resultados dos experimentos são independentes da ligação do CD14 ao seu receptor na membrana plasmática, a técnica de SP é a técnica padrão-ouro. No entanto, os reagentes necessários representam um alto custo, principalmente se há um grande número de amostras a ser processado.

Por fim, salientamos que estudos da biologia de macrófagos devem ser preferencialmente conduzidos em culturas primárias de macrófagos humanos. Isso se deve ao fato de que culturas primárias de modelos murinos possuem expressão gênica diferencial em relação a humanos e de que linhagens de macrófagos humanos rotineiramente utilizadas na pesquisa não conseguem representar e traduzir com precisão a heterogeneidade dos macrófagos em resposta a diferentes estímulos, nem as diferenças genéticas interindividuais do sistema imune. Por outro lado, este modelo também apresenta algumas limitações a falta de renovação celular, a ausência da matriz extracelular específica de cada tecido que lhes proporcionaria fatores e estímulos tróficos específicos e o tempo de sobrevivência celular adaptado, que não reproduz exatamente o que ocorre nos tecidos (Eligini et al. 2013).

Apesar das limitações, a diferenciação *ex vivo* de macrófagos derivados de monócitos humanos representa um bom modelo de macrófagos teciduais humanos

(Eligini, 2012). Assim, estes macrófagos representam ferramentas consistentes para estudar as interações de macrófagos humanos com patógenos (Verreck et al. 2004; Bayer et al. 2013; Neu et al. 2013), o papel dos macrófagos no câncer (Wu et al. 2012; Becker et al. 2014), em doenças autoimunes (Smith et al. 2009), em transplante (Tse e Hughes 2013), na obesidade (Weisberg et al. 2003) entre outros. Ainda, acredita-se que a manipulação ex vivo de monócitos e sua polarização a macrófagos é uma ótima perspectiva de terapia celular (Broichhausen et al. 2012).

## 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

1. Foi possível isolar monócitos humanos do sangue periférico através de dois métodos diferentes, AP e SP.
2. A partir de ambas as técnicas, foi possível diferenciar monócitos humanos (CD14<sup>++</sup>CD80<sup>-</sup>CD86<sup>++</sup>CD163<sup>low</sup>CD206<sup>-</sup>) a macrófagos nos perfis desejados, M1 (CD14<sup>+</sup>CD80<sup>++</sup>CD86<sup>+</sup>) e M2 (CD14<sup>+</sup>CD206<sup>++</sup>CD163<sup>-</sup>).
3. Consideramos a técnica de SP como padrão-ouro de isolamento.
4. Os macrófagos diferenciados *in vitro* apresentaram suas principais características clássicas como: morfologia com redução da razão núcleo/citoplasma, modulação de marcadores de superfície, expressão gênica de citocinas clássicas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e TGF- $\beta$ , secreção de quimiocinas inflamatórias em macrófagos M1 e, ainda, fagocitose inespecífica de partículas de látex.
5. Com esses procedimentos padronizados, poderemos identificar e validar mecanismos fisiopatológicos subjacentes a biologia de macrófagos em várias doenças humanas, bem como identificar possíveis alvos terapêuticos relacionados a doenças associadas ao sistema imune.

## REFERÊNCIAS

- Akagawa, K. S. (2002). "Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages." Int J Hematol **76**(1): 27-34.
- Akagawa, K. S., I. Komuro, H. Kanazawa, T. Yamazaki, K. Mochida e F. Kishi (2006). "Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages." Respirology **11 Suppl**: S32-36.
- Almeida, J., C. Bueno, M. C. Alguero, M. L. Sanchez, M. de Santiago, L. Escribano, B. Diaz-Agustin, J. M. Vaquero, F. J. Laso, J. F. San Miguel e A. Orfao (2001). "Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical, and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage(-)/CD16(+)/HLA-DR(+)/CD14(-/lo) cells, CD14(+) monocytes, and CD16(-) dendritic cells." Clin Immunol **100**(3): 325-338.
- Ambarus, C. A., S. Krausz, M. van Eijk, J. Hamann, T. R. Radstake, K. A. Reedquist, P. P. Tak e D. L. Baeten (2012). "Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages." J Immunol Methods **375**(1-2): 196-206.
- Auffray, C., M. H. Sieweke e F. Geissmann (2009). "Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells." Annu Rev Immunol **27**: 669-692.
- Bayer, C., S. Varani, L. Wang, P. Walther, S. Zhou, S. Straschewski, M. Bachem, C. Soderberg-Naucler, T. Mertens e G. Frascaroli (2013). "Human cytomegalovirus infection of M1 and M2 macrophages triggers inflammation and autologous T-cell proliferation." J Virol **87**(1): 67-79.
- Becker, M., C. B. Muller, M. A. De Bastiani e F. Klamt (2014). "The prognostic impact of tumor-associated macrophages and intra-tumoral apoptosis in non-small cell lung cancer." Histol Histopathol **29**(1): 21-31.
- Beliakova-Bethell, N., M. Massanella, C. White, S. M. Lada, P. Du, F. Vaida, J. Blanco, C. A. Spina e C. H. Woelk (2013). "The effect of cell subset isolation method on gene expression in leukocytes." Cytometry A.
- Bennett, S., S. B. Por, E. R. Stanley e S. N. Breit (1992). "Monocyte proliferation in a cytokine-free, serum-free system." J Immunol Methods **153**(1-2): 201-212.
- Benoit, M., B. Desnues e J. L. Mege (2008). "Macrophage polarization in bacterial infections." J Immunol **181**(6): 3733-3739.
- Berenson, C. S., R. L. Kruzel, E. Eberhardt e S. Sethi (2013). "Phagocytic dysfunction of human alveolar macrophages and severity of chronic obstructive pulmonary disease." J Infect Dis **208**(12): 2036-2045.
- Bhattacharjee, A., M. Shukla, V. P. Yakubenko, A. Mulya, S. Kundu e M. K. Cathcart (2013). "IL-4 and IL-13 employ discrete signaling pathways for target gene expression in alternatively activated monocytes/macrophages." Free Radic Biol Med **54**: 1-16.
- Biswas, S. K., M. Chittechath, I. N. Shalova e J. Y. Lim (2012). "Macrophage polarization and plasticity in health and disease." Immunol Res **53**(1-3): 11-24.
- Biswas, S. K. e A. Mantovani (2010). "Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm." Nat Immunol **11**(10): 889-896.
- Blobe, G. C., W. P. Schiemann e H. F. Lodish (2000). "Role of transforming growth factor beta in human disease." N Engl J Med **342**(18): 1350-1358.

- Bonecchi, R., M. Locati, E. Galliera, M. Vulcano, M. Sironi, A. M. Fra, M. Gobbi, A. Vecchi, S. Sozzani, B. Haribabu, J. Van Damme e A. Mantovani (2004). "Differential recognition and scavenging of native and truncated macrophage-derived chemokine (macrophage-derived chemokine/CC chemokine ligand 22) by the D6 decoy receptor." J Immunol **172**(8): 4972-4976.
- Broichhausen, C., P. Riquelme, E. K. Geissler e J. A. Hutchinson (2012). "Regulatory macrophages as therapeutic targets and therapeutic agents in solid organ transplantation." Curr Opin Organ Transplant **17**(4): 332-342.
- Brys, L., A. Beschin, G. Raes, G. H. Ghassabeh, W. Noel, J. Brandt, F. Brombacher e P. De Baetselier (2005). "Reactive oxygen species and 12/15-lipoxygenase contribute to the antiproliferative capacity of alternatively activated myeloid cells elicited during helminth infection." J Immunol **174**(10): 6095-6104.
- Buechler, C., M. Ritter, E. Orso, T. Langmann, J. Klucken e G. Schmitz (2000). "Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli." J Leukoc Biol **67**(1): 97-103.
- Buttari, B., L. Segoni, E. Profumo, D. D'Arcangelo, S. Rossi, F. Facchiano, R. Businaro, L. Iuliano e R. Rigano (2013). "7-Oxo-cholesterol potentiates pro-inflammatory signaling in human M1 and M2 macrophages." Biochem Pharmacol **86**(1): 130-137.
- Cassetta, L., E. Cassol e G. Poli (2011). "Macrophage polarization in health and disease." ScientificWorldJournal **11**: 2391-2402.
- Dai, X. M., G. R. Ryan, A. J. Hapel, M. G. Dominguez, R. G. Russell, S. Kapp, V. Sylvestre e E. R. Stanley (2002). "Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects." Blood **99**(1): 111-120.
- Daigneault, M., J. A. Preston, H. M. Marriott, M. K. Whyte e D. H. Dockrell (2010). "The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages." PLoS One **5**(1): e8668.
- Dale, D. C., L. Boxer e W. C. Liles (2008). "The phagocytes: neutrophils and monocytes." Blood **112**(4): 935-945.
- Eggesbo, J. B., I. Hjermann, P. K. Lund, G. B. Joo, R. Ovstebo e P. Kierulf (1994). "LPS-induced release of IL-1 beta, IL-6, IL-8, TNF-alpha and sCD14 in whole blood and PBMC from persons with high or low levels of HDL-lipoprotein." Cytokine **6**(5): 521-529.
- Eligini, S., M. Crisci, E. Bono, P. Songia, E. Tremoli, G. I. Colombo e S. Colli (2013). "Human monocyte-derived macrophages spontaneously differentiated in vitro show distinct phenotypes." J Cell Physiol **228**(7): 1464-1472.
- Elkord, E., P. E. Williams, H. Kynaston e A. W. Rowbottom (2005). "Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells." Immunology **114**(2): 204-212.
- Erbel, C., G. Rupp, C. M. Helmes, M. Tyka, F. Linden, A. O. Doesch, H. A. Katus e C. A. Gleissner (2013). "An in vitro model to study heterogeneity of human macrophage differentiation and polarization." J Vis Exp(76): e50332.
- Fan, Q., M. Lu, Z. Y. Xia e L. Bao (2013). "Mycobacterium tuberculosis MPT64 stimulates the activation of murine macrophage modulated by IFN-gamma." Eur Rev Med Pharmacol Sci **17**(24): 3296-3305.
- Fleming, B. D. e D. M. Mosser (2011). "Regulatory macrophages: setting the threshold for therapy." Eur J Immunol **41**(9): 2498-2502.

- Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad e K. Ley (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." Science **327**(5966): 656-661.
- Gong, D., W. Shi, S. J. Yi, H. Chen, J. Groffen e N. Heisterkamp (2012). "TGFbeta signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage activation." BMC Immunol **13**: 31.
- Gordon, S. (2003). "Alternative activation of macrophages." Nat Rev Immunol **3**(1): 23-35.
- Gordon, S. e F. O. Martinez (2010). "Alternative activation of macrophages: mechanism and functions." Immunity **32**(5): 593-604.
- Gordon, S. e P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." Nat Rev Immunol **5**(12): 953-964.
- Heidenreich, S. (1999). "Monocyte CD14: a multifunctional receptor engaged in apoptosis from both sides." J Leukoc Biol **65**(6): 737-743.
- Hume, D. A. (2006). "The mononuclear phagocyte system." Curr Opin Immunol **18**(1): 49-53.
- Hunter, M., Y. Wang, T. Eubank, C. Baran, P. Nana-Sinkam e C. Marsh (2009). "Survival of monocytes and macrophages and their role in health and disease." Front Biosci (Landmark Ed) **14**: 4079-4102.
- Iyer, S. S. e G. Cheng (2012). "Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease." Crit Rev Immunol **32**(1): 23-63.
- Jaguin, M., N. Houlbert, O. Fardel e V. Lecreur (2013). "Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin." Cell Immunol **281**(1): 51-61.
- Jambo, K. C., D. H. Banda, A. M. Kankwatira, N. Sukumar, T. J. Allain, R. S. Heyderman, D. G. Russell e H. C. Mwandumba (2014). "Small alveolar macrophages are infected preferentially by HIV and exhibit impaired phagocytic function." Mucosal Immunol.
- Kaszuba-Zwoinska, J., P. Chorobik, K. Juszczak, W. Zaraska e P. J. Thor (2012). "Pulsed electromagnetic field affects intrinsic and endoplasmic reticulum apoptosis induction pathways in MonoMac6 cell line culture." J Physiol Pharmacol **63**(5): 537-545.
- Kigerl, K. A., J. C. Gensel, D. P. Ankeny, J. K. Alexander, D. J. Donnelly e P. G. Popovich (2009). "Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord." J Neurosci **29**(43): 13435-13444.
- Kollert, F., C. Probst, J. Muller-Quernheim, G. Zissel e A. Prasse (2009). "CCL18 production is decreased in alveolar macrophages from cigarette smokers." Inflammation **32**(3): 163-168.
- Krausgruber, T., K. Blazek, T. Smallie, S. Alzabin, H. Lockstone, N. Sahgal, T. Hussell, M. Feldmann e I. A. Udalova (2011). "IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses." Nat Immunol **12**(3): 231-238.
- Lawrence, T. e G. Natoli (2011). "Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity." Nat Rev Immunol **11**(11): 750-761.
- Levine, J. A., M. D. Jensen, N. L. Eberhardt e T. O'Brien (1998). "Adipocyte macrophage colony-stimulating factor is a mediator of adipose tissue growth." J Clin Invest **101**(8): 1557-1564.

- Lovren, F., Y. Pan, A. Quan, P. E. Szmitko, K. K. Singh, P. C. Shukla, M. Gupta, L. Chan, M. Al-Omran, H. Teoh e S. Verma (2010). "Adiponectin primes human monocytes into alternative anti-inflammatory M2 macrophages." Am J Physiol Heart Circ Physiol **299**(3): H656-663.
- Lyons, P. A., M. Koukoulaki, A. Hatton, K. Doggett, H. B. Woffendin, A. N. Chaudhry e K. G. Smith (2007). "Microarray analysis of human leucocyte subsets: the advantages of positive selection and rapid purification." BMC Genomics **8**: 64.
- Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi e M. Locati (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." Trends Immunol **25**(12): 677-686.
- Mantovani, A., S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena e A. Sica (2002). "Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes." Trends Immunol **23**(11): 549-555.
- Marks, S. C., Jr., A. Wojtowicz, M. Szperl, E. Urbanowska, C. A. MacKay, W. Wiktor-Jedrzejczak, E. R. Stanley e S. L. Aukerman (1992). "Administration of colony stimulating factor-1 corrects some macrophage, dental, and skeletal defects in an osteopetrotic mutation (toothless, tl) in the rat." Bone **13**(1): 89-93.
- Martinez, F. O., S. Gordon, M. Locati e A. Mantovani (2006). "Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression." J Immunol **177**(10): 7303-7311.
- Martinez, F. O., A. Sica, A. Mantovani e M. Locati (2008). "Macrophage activation and polarization." Front Biosci **13**: 453-461.
- Mestas, J. e K. Ley (2008). "Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis." Trends Cardiovasc Med **18**(6): 228-232.
- Montoya-Rodriguez, A., E. G. de Mejia, V. P. Dia, C. Reyes-Moreno e J. Milan-Carrillo (2014). "Extrusion improved the anti-inflammatory effect of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) hydrolysates in LPS-induced human THP-1 macrophage-like and mouse RAW 264.7 macrophages by preventing activation of NF-kappaB signaling." Mol Nutr Food Res.
- Murray, P. J. e T. A. Wynn (2011). "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets." Nat Rev Immunol **11**(11): 723-737.
- Nathan, C. F., T. J. Prendergast, M. E. Wiebe, E. R. Stanley, E. Platzer, H. G. Remold, K. Welte, B. Y. Rubin e H. W. Murray (1984). "Activation of human macrophages. Comparison of other cytokines with interferon-gamma." J Exp Med **160**(2): 600-605.
- Neu, C., A. Sedlag, C. Bayer, S. Forster, P. Crauwels, J. H. Niess, G. van Zandbergen, G. Frascaroli e C. U. Riedel (2013). "CD14-dependent monocyte isolation enhances phagocytosis of listeria monocytogenes by proinflammatory, GM-CSF-derived macrophages." PLoS One **8**(6): e66898.
- Newman, A. C. e C. C. Hughes (2012). "Macrophages and angiogenesis: a role for Wnt signaling." Vasc Cell **4**(1): 13.
- Ohmori, Y. e T. A. Hamilton (2001). "Requirement for STAT1 in LPS-induced gene expression in macrophages." J Leukoc Biol **69**(4): 598-604.
- Pantic, J. M., M. Mechkarska, M. L. Lukic e J. M. Conlon (2014). "Effects of tigerinin peptides on cytokine production by mouse peritoneal macrophages and spleen cells and by human peripheral blood mononuclear cells." Biochimie.
- Pollard, J. W. (2009). "Trophic macrophages in development and disease." Nat Rev Immunol **9**(4): 259-270.
- Preuss, I., M. G. Ludwig, B. Baumgarten, F. Bassilana, F. Gessier, K. Seuwen e A. W. Sailer (2014). "Transcriptional regulation and functional characterization of

- the oxysterol / EBI2 system in primary human macrophages." Biochem Biophys Res Commun.
- Puerta-Guardo, H., A. Raya-Sandino, L. Gonzalez-Mariscal, V. H. Rosales, J. Ayala-Davila, B. Chavez-Mungia, D. Martinez-Fong, F. Medina, J. E. Ludert e R. M. del Angel (2013). "The cytokine response of U937-derived macrophages infected through antibody-dependent enhancement of dengue virus disrupts cell apical-junction complexes and increases vascular permeability." J Virol **87**(13): 7486-7501.
- Randolph, G. J., C. Jakubzick e C. Qu (2008). "Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells." Curr Opin Immunol **20**(1): 52-60.
- Ritter, M., C. Buechler, T. Langmann, E. Orso, J. Klucken e G. Schmitz (1999). "The scavenger receptor CD163: regulation, promoter structure and genomic organization." Pathobiology **67**(5-6): 257-261.
- Schmittgen, T. D. e K. J. Livak (2008). "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method." Nat Protoc **3**(6): 1101-1108.
- Schraufstatter, I. U., M. Zhao, S. K. Khaldoyanidi e R. G. Discipio (2012). "The chemokine CCL18 causes maturation of cultured monocytes to macrophages in the M2 spectrum." Immunology **135**(4): 287-298.
- Schroder, K., P. J. Hertzog, T. Ravasi e D. A. Hume (2004). "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions." J Leukoc Biol **75**(2): 163-189.
- Smith, A. M., F. Z. Rahman, B. Hayee, S. J. Graham, D. J. Marks, G. W. Sewell, C. D. Palmer, J. Wilde, B. M. Foxwell, I. S. Gloger, T. Sweeting, M. Marsh, A. P. Walker, S. L. Bloom e A. W. Segal (2009). "Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease." J Exp Med **206**(9): 1883-1897.
- Solinas, G., S. Schiarea, M. Liguori, M. Fabbri, S. Pesce, L. Zammataro, F. Pasqualini, M. Nebuloni, C. Chiabrando, A. Mantovani e P. Allavena (2010). "Tumor-conditioned macrophages secrete migration-stimulating factor: a new marker for M2-polarization, influencing tumor cell motility." J Immunol **185**(1): 642-652.
- Stein, M., S. Keshav, N. Harris e S. Gordon (1992). "Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation." J Exp Med **176**(1): 287-292.
- Tauber, A. I. (2003). "Metchnikoff and the phagocytosis theory." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(11): 897-901.
- Tiemessen, M. M., A. L. Jagger, H. G. Evans, M. J. van Herwijnen, S. John e L. S. Taams (2007). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(49): 19446-19451.
- Tse, G. H. e J. Hughes (2013). "Macrophages and transplant rejection: a novel future target?" Transplantation **96**(11): 946-948.
- Van Dyken, S. J. e R. M. Locksley (2013). "Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease." Annu Rev Immunol **31**: 317-343.
- Verreck, F. A., T. de Boer, D. M. Langenberg, M. A. Hoeve, M. Kramer, E. Vaisberg, R. Kastelein, A. Kolk, R. de Waal-Malefyt e T. H. Ottenhoff (2004). "Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(13): 4560-4565.



- Weisberg, S. P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel e A. W. Ferrante, Jr. (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." J Clin Invest **112**(12): 1796-1808.
- Weiss, M., K. Blazek, A. J. Byrne, D. P. Perocheau e I. A. Udalova (2013). "IRF5 Is a Specific Marker of Inflammatory Macrophages In Vivo." Mediators Inflamm **2013**: 245804.
- Wiktor-Jedrzejczak, W. e S. Gordon (1996). "Cytokine regulation of the macrophage (M phi) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse." Physiol Rev **76**(4): 927-947.
- Wu, H., J. B. Xu, Y. L. He, J. J. Peng, X. H. Zhang, C. Q. Chen, W. Li e S. R. Cai (2012). "Tumor-associated macrophages promote angiogenesis and lymphangiogenesis of gastric cancer." J Surg Oncol **106**(4): 462-468.
- Zamani, F., F. Zare Shahneh, L. Aghebati-Maleki e B. Baradaran (2013). "Induction of CD14 Expression and Differentiation to Monocytes or Mature Macrophages in Promyelocytic Cell Lines: New Approach." Adv Pharm Bull **3**(2): 329-332.
- Zhou, L., R. Somasundaram, R. F. Nederhof, G. Dijkstra, K. N. Faber, M. P. Peppelenbosch e G. M. Fuhler (2012). "Impact of human granulocyte and monocyte isolation procedures on functional studies." Clin Vaccine Immunol **19**(7): 1065-1074.
- Ziegler-Heitbrock, H. W. (2000). "Definition of human blood monocytes." J Leukoc Biol **67**(5): 603-606.
- Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. Leenen, Y. J. Liu, G. MacPherson, G. J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J. M. Austyn e M. B. Lutz (2010). "Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood." Blood **116**(16): e74-80.

## ANEXO A: TCLE

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA- RS (PUCRS)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS)

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DOPACIENTE:.....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO: M  F   
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO ..... Nº.....  
APTO: .....BAIRRO: .....  
CIDADE ..... CEP:.....  
TELEFONE: DDD (.....).....  
2.RESPONSÁVEL LEGAL

.....  
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

.....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M  F   
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....  
BAIRRO: ..... CIDADE: .....  
CEP: ..... TELEFONE: DDD  
(.....).....

#### II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: *Papel dos monócitos na tolerância operacional no transplante renal humano dependente de TGF- $\beta$*

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: **Dra. Florencia Maria Barbé-Tuana**

CARGO: Pesquisadora do Departamento de Bioquímica da UFRGS

#### 3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO                      **RISCO MÍNIMO**      **X**                      RISCO      MÉDIO  
RISCO BAIXO                      RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: Dois (2) anos

### **III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:**

#### **1. Justificativa e os objetivos da pesquisa;**

Neste projeto de pesquisa, estudaremos algumas diferenças no comportamento imunológico entre as pessoas que foram transplantadas e que, com o tempo, ficaram muito bem (com seu órgão transplantado funcionando bem), e aquelas que não evoluíram tão bem e rejeitaram o enxerto, desenvolvendo rejeição crônica.

Em todo mundo, médicos e pesquisadores que trabalham com transplante estão estudando para tentar compreender as diferenças nesses dois tipos de situação. Algumas pessoas que foram transplantadas conseguem chegar a um melhor equilíbrio, precisando de apenas pequenas doses de drogas imunossupressoras, que são os remédios que previnem a rejeição. Quase todos os pacientes que param de tomar os remédios imunossupressores perdem o órgão transplantado rapidamente, porém, existem alguns casos raros de pessoas que precisaram suspender todos os remédios imunossupressores e que não perderam o enxerto. Nós acreditamos que se conseguirmos compreender melhor essas diferenças, e saber como as pessoas transplantadas que estão bem chegaram a este estado de equilíbrio, nós possamos usar este conhecimento em benefício de novos pacientes. Poderemos usar os novos conhecimentos para identificar melhor (diagnosticar) o estado de equilíbrio no transplante e, desta forma, oferecer outras opções para diminuir os remédios para rejeição de quem não precisa de tanto, e também para criar novos tratamentos para a rejeição no futuro, que possam ajudar ao organismo da pessoa transplantada a desenvolver o estado de melhor equilíbrio. Desta forma, esperamos que os conhecimentos conseguidos nessa pesquisa possam ajudar pacientes no futuro. Este projeto de pesquisa conta com a participação de vários centros de transplante no Brasil (estudo multicêntrico). Também teremos um grupo de indivíduos sadios, não transplantados, como um grupo comparativo dos padrões imunológicos.

#### **2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais;**

Os nossos estudos serão feitos utilizando um pouco de seu sangue que será colhido de uma veia do seu braço. Usaremos o seu sangue para obter umas células chamadas monócitos, e com esse material faremos nossos estudos, analisando substâncias produzidas por essas células.

Caso aceite participar deste estudo, você deverá assinar este documento concordando que seja colhido o seu sangue para este propósito, de acordo com o seguinte roteiro:

- Coleta de 100 ml de sangue a ser feita de uma veia do seu braço. A coleta será previamente agendada no momento do seu ingresso na pesquisa.

#### **3. Desconfortos e riscos esperados;**

O desconforto será de uma picada da agulha para a retirada do sangue.

É importante ressaltar que você não é obrigado a participar desta pesquisa e que, se não quiser participar, nada afetará o seu tratamento e acompanhamento neste hospital.

#### **4. Benefícios que poderão ser obtidos;**

É importante dizer que esta pesquisa não prevê qualquer benefício direto para o seu tratamento, mas, poderá ajudar outros pacientes no futuro.

## **5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo**

Não se aplica.

---

## **IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:**

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas. Os riscos desta pesquisa para o Sr ou Sra são mínimos, e estão relacionados à coleta de sangue. A coleta de sangue será semelhante à coleta de exames, feita habitualmente pelo paciente no laboratório, para os exames de rotina. O local da picada no seu braço pode ficar roxo no após a punção, chamado hematoma, que desaparece com o passar dos dias. A coleta do sangue necessária para a pesquisa vai sempre ser acompanhada pelo exame de hemograma e não será colhido sangue do paciente que estiver com anemia que contra indique a retirada de sangue. O pesquisador se responsabiliza por esclarecer os riscos e benefícios relacionados a esta pesquisa e quaisquer outras dúvidas que o paciente tenha sobre a pesquisa.
  2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. O sujeito de pesquisa está livre para retirar o seu consentimento a qualquer momento e desistir de participar desta pesquisa. O fato de não querer participar desta pesquisa não vai trazer nenhum prejuízo para o seu tratamento. O paciente vai receber todos os tratamentos disponíveis e necessários para o seu caso.
  3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade. Todas as informações obtidas dos pacientes serão confidenciais e sigilosas durante toda a pesquisa e no momento em que esta pesquisa for publicada nas revistas da área de saúde.
  4. Disponibilidade de assistência no HSL da PUCRS, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa. Se ocorrer algum dano causado por esta pesquisa o paciente terá toda assistência a sua saúde no hospital onde é acompanhado (Hospital São Lucas da PUCRS).
  5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa. Este estudo prevê apenas riscos mínimos para o paciente, sem risco de dano à saúde do paciente. Não existe remuneração ou indenização ao paciente que aceitar participar deste estudo.
- 

## **V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.**

### **1. Coordenação do projeto**

Florencia M. Barbé-Tuana – Departamento de Bioquímica- Rua Ramiro Barcelos, 2600, Porto Alegre. CEP: 90035-000. Fones: Laboratório (051) 3308-5763 ou Celular (051) 9959-8525

### **2. Pesquisador USP**

- Verônica Coelho - Laboratório de Imunologia – Instituto do Coração – Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 – 9º andar – bloco 2 – CEP: 05403-010 - fones: (011) 3069-905 ou (011) 3069 5180

### **3. Pesquisador PUCRS**

- David Saitovitch – Serviço de Nefrologia – Hospital São Lucas da PUCRS - Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar, hemodiálise - CEP: 90610-000 – fone: (51) 3336 7700 ou celular (051) 99590864.

- Mariana Migliorini Parisi: (051) 9558-5407.

- Comitê de ética da UFRGS: (051) 3308-4085.

### **VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:**

### **VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

(carimbo ou nome Legível)

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

## ANEXO B: Aprovação do Comitê de Ética



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF.CEP-1124/10

Porto Alegre, 13 de outubro de 2010.

Senhor Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 10/04995 intitulado **"Papel do monócito na manutenção da tolerância operacional em transplante renal humano dependente de TGF-beta"**.

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Virginia Minghelli Schmitt,  
Coordenadora Substituta do CEP-PUCRS

Ilmo. Sr.  
Prof. Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo  
IPB  
Nesta Universidade

**PUCRS**

**Campus Central**  
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000  
Sala 314 - Fone Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [cep@pucrs.br](mailto:cep@pucrs.br)  
[www.pucrs.br/prppg/cep](http://www.pucrs.br/prppg/cep)

## ANEXO C: Resumos em congressos

1 PARISI, Mariana Migliorini; SAITOVICH, David; GUMA, Fátima Costa Rodrigues, BARBÉ-TUANA, Florencia Maria. Padronização da diferenciação de monócitos isolados do sangue periférico de indivíduos sadios em macrófagos nos seus perfis clássico (M1) e alternativo (M2). IN: VIII Semana Científica do Unilassale, 2012, Canoas, Brasil.

2 PARISI, Mariana Migliorini; HIRSCH, Gabriela; SAITOVICH, David; GUMA, Fátima Costa Rodrigues, BARBÉ-TUANA, Florencia Maria. Impact of Human. Monocytes Isolation Procedures on culture phenotype. In: XLII Reunião Anual da SBBq, 2013, Foz do Iguaçu, Brasil.

3 PARISI, Mariana Migliorini; HIRSCH, Gabriela; SAITOVICH, David; GUMA, Fátima Costa Rodrigues, BARBÉ-TUANA, Florencia Maria. Impacto de dois diferentes protocolos de isolamento de monócitos humanos no fenótipo e na expressão de citocinas inflamatórias ou reguladoras em macrófagos diferenciados *in vitro*. In: 33ª Semana Científica do HCPA, 2013, Porto Alegre, Brasil.

## **ANEXO D: Apresentação oral em Congresso**

1 PARISI, Mariana Migliorini; KALIL, Jorge; COELHO, Verônica Porto; SAITOVICH, David; GUMA, Fátima Costa Rodrigues, BARBÉ-TUANA, Florencia Maria. Pesquisa translacional: padronização de técnica de purificação de monócitos como modelo de cultura celular para estudo de doenças de origem imunológica. IN: IX Semana Científica do Unilassale, 2013, Canoas, Brasil.