

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 03/03/2024.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Camyla Rodrigues Nascimento

**Comparação das linhagens monocíticas U937 e THP-1 como modelos de
macrófago para estudos in vitro**

Araraquara

2022



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Camyla Rodrigues Nascimento

Comparação das linhagens monocíticas U937 e THP-1 como modelos de macrófago para estudos in vitro

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior

Araraquara

2022

N244c Nascimento, Camyla Rodrigues
Comparação das linhagens monocíticas U937 e THP-1 como modelos de macrófago para estudos in vitro / Camyla Rodrigues Nascimento. -- Araraquara, 2022
43 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientador: Carlos Rossa Júnior

1. Ativação de macrófagos. 2. Células THP-1. 3. Células U937. 4. Fenótipo. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara.
Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Camyla Rodrigues Nascimento

Comparação das linhagens monocíticas U937 e THP-1 como modelos de macrófago para estudos in vitro

Comissão julgadora

Defesa para obtenção do grau de Mestrado em Odontologia

Presidente e orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior

2º examinador: Profa. Dra. Morgana Rodrigues Guimarães Stalibi

3º examinador: Dr. Diego Luís Costa

Araraquara, 03 de março de 2022.

DADOS CURRICULARES

Camyla Rodrigues Nascimento

NASCIMENTO: 15/09/1995 – Tupaciguara – Minas Gerais

FILIAÇÃO: Simone Raquel Rodrigues Nascimento
Marcos Araujo do Nascimento

2013 - 2017: Graduação em Odontologia – Universidade de Uberaba (UNIUBE)

2018 - 2020: Curso de Especialização em Periodontia pelo Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC) - USP

2020 - 2022: Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração em Periodontia – Nível de Mestrado - Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) – UNESP

AGRADECIMENTOS

À CAPES:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Nascimento CR. Comparação das linhagens monocíticas U937 e THP-1 como modelos de macrófago para estudos in vitro [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

Macrófagos são células mielóides do sistema imune, caracterizados pela atividade fagocítica e capacidade de apresentar antígenos via MHC-II. Em sua maior parte, podem ter monócitos como precursores. São células altamente responsivas a sinais do microambiente, podendo assumir diferentes fenótipos em um espectro que varia de um perfil pró-inflamatório (ou 'clássico') denominado M1, até um perfil anti-inflamatório (ou 'alternativo'), denominado M2. Macrófagos M1 podem ser polarizados por estímulos inflamatórios e microbianos como LPS e IFN-gama, resultando no aumento da produção de citocinas inflamatórias, maior atividade microbicida e produção de ROS. Macrófagos M2 também conhecidos como pró-reparo, apresentam maior atividade fagocítica e propriedades angiogênicas podendo ser diferenciados por IL-4, IL-10 e IL-13. Macrófagos tem um papel central na homeostase, patogênese e reparo, assim há grande interesse nestas células para o entendimento de processos biológicos relacionados à diversas doenças e processos de reparo, além de serem um importante alvo terapêutico potencial. THP-1 e U937 são as linhagens monocíticas humanas mais comumente utilizadas como precursores de macrófagos, porém podem apresentar diferenças importantes na resposta biológica, influenciando as informações obtidas. Este trabalho tem o objetivo de caracterizar a resposta biológica de macrófagos derivados das linhagens monocíticas THP-1 e U937, contribuindo para a seleção da melhor linhagem celular segundo a área de interesse em pesquisa. Diferentemente de monócitos primários, M-CSF não induziu a diferenciação em macrófagos, indicada pela adesão ao substrato de cultura in vitro e por alterações morfológicas, tanto da linhagem de THP-1 quanto U937, sendo necessário o estímulo com forbol-miristil-acetato (PMA). A partir dos resultados observou-se que a condição M1 leva ao aumento da expressão de TNF e IL-6 e redução da expressão de Arg1 e IL-10 determinados por RT-qPCR assim como maior produção de ROS avaliada por citometria de fluxo e aumento da secreção de IL-6 e IL-1 β determinada por ELISA. Condições M2 induziram maior atividade fagocítica apenas para macrófagos derivados da linhagem THP-1. Os resultados indicam que há diferenças entre as linhagens THP-1 e U937 na resposta a estímulos externos, mas existem similaridades com a resposta biológica de macrófagos primários. Por fim, macrófagos derivados da linhagem THP-1 tendem a ter maior responsividade à estímulos M1 e a assumirem um fenótipo relacionado ao perfil pró-inflamatório/clássico, enquanto macrófagos derivados da linhagem U937 apresentam maior responsividade à estímulos M2 e desvio fenotípico para o perfil alternativo/de reparo.

Palavras-chave: Ativação de macrófagos. Células THP-1. Células U937. Fenótipo.

Nascimento CR. Comparison of monocytic cell lines U937 and THP-1 as macrophage models for in vitro studies [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

Macrophages are immune cells of myeloid origin, characterized by phagocytic activity and by capability of antigen presentation via MHC-II. Peripheral blood monocytes can differentiate into macrophages in the tissues. In response to multiple signals in microenvironment, macrophages can transiently and reversibly assume different phenotypes, ranging in a spectrum from varying from pro-inflammatory (or “classically activated”) also known as M1, to an anti-inflammatory (or “alternatively activated”) also known as M2. M1 macrophages can be induced by microbial (e.g., LPS) or endogenous (e.g., IFN-gamma) inflammatory stimuli and produce higher levels of inflammatory cytokines, have higher microbicidal activity and greater production of ROS. M2 macrophages are also known as pro-repair macrophages, have increased phagocytic activity and angiogenic properties. This phenotype can be induced by anti-inflammatory cytokines such as IL-4, IL-10 and IL-13. Macrophages play a central role in homeostasis, pathogenesis, and repair, justifying the interest in these cells for the comprehension of biological mechanisms associated with disease and repair processes, as well as an important potential therapeutic target. THP-1 and U937 are the two most used human monocytic cell lines. Albeit rarely the experimental choice for one cell line or another is rarely justified, these two monocytic cell lines have important differences in their biological response, which influences the information derived from these studies. The goal of the present study is to characterize the biological response of macrophages derived from THP-1 and U937 monocytic cell lines, contributing to an informed selection of the best cell line according to specific research goals. Unlike primary monocytes, M-CSF did not induce macrophage differentiation of neither THP-1 nor U937 cells, as observed by substrate adhesion and morphological changes, which required stimulation with phorbol-myristyl-acetate (PMA). Based on the results it was observed that the M1 condition leads to increased expression of TNF and IL-6 and reduced expression of Arg1, and IL-10 determined by RT-qPCR; as well as increased production of ROS detected by flow cytometry and higher secretion of IL-6 and IL-1 β by ELISA. Under M2 conditions, only THP-1-derived macrophages had increased phagocytic activity. The results indicate that THP-1 and U937 cell lines do respond differently to the same external stimuli, but both mimic the response of primary macrophages. Finally, macrophages derived from THP-1 cells tend to have greater responsiveness to M1 stimuli and skew their phenotype to the pro-inflammatory/classical profile, whereas macrophages derived from U937 cells exhibit greater responsiveness to M2 stimuli and a phenotypic shift towards the alternative/repair profile.

Keywords: Macrophage activation. THP-1 Cells. U937 Cells. Phenotype.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 PROPOSIÇÃO	14
3 PUBLICAÇÃO	15
4 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35
APÊNDICE A	38

1 INTRODUÇÃO

Monócitos são células mielóides do sistema imune inato encontradas na circulação sanguínea, medula óssea e baço. No sangue possuem meia-vida curta (~71 h em humanos) e podem representar uma população de até 10% das células nucleadas em um humano saudável. Tem grande importância para o sistema imune inato devido à expressão de receptores de padrão moleculares (PRRs), elevada responsividade à sinais no microambiente, e atividade fagocítica^{1,2}. No processo inflamatório, monócitos migram para o tecido afetado em resposta à um gradiente de quimiocinas produzidas localmente e, dependendo dos sinais no microambiente tecidual, podem se diferenciar em células dendríticas ou macrófagos³.

Macrófagos, comumente originários da diferenciação de monócitos em condições inflamatórias e câncer⁴ são células de vida mais longa e tamanho maior, quando comparadas com seu precursor. De fato, a distinção entre monócitos e macrófagos está relacionada primariamente à diferenças na expressão de algumas proteínas e marcadores, mas principalmente à alterações funcionais e morfológicas, bem como à sua localização intra- ou extra-vascular. Algumas características diferenciais de macrófagos são: maior atividade fagocítica e antimicrobiana, possibilitadas por um aumento no número de lisossomas e um característico pH ácido, além da maior produção de ROS⁵.

Além da habilidade de internalização ativa de partículas que lhe dá nome (denominado por Elie Metchnikoff, o termo macrófago significa “macro”: grande e “fago”: comedor⁶), essas células são conhecidas como apresentadores de antígeno prototípicos. Moléculas internalizadas por fagocitose são processadas e externalizadas em associação ao complexo de histocompatibilidade (MHC) II, possibilitando a ativação de linfócitos T. Além disso, macrófagos produzem múltiplos mediadores inflamatórios que influenciam a quimiotaxia e atividade de outras células da resposta imune inata e adaptativa, evidenciando seu papel central na resposta imune^{1,7}.

A responsividade dos macrófagos aos sinais presentes no microambiente (padrões moleculares associados a micróbios ou ao dano – MAMPs e DAMPs, respectivamente) modula o estado de ativação dessas células. Os mediadores biológicos (quimiocinas, citocinas, metaloproteinases, produtos de reações

enzimáticas como prostaglandinas, leucotrienos, ROS e outros) influenciam o aporte e ativação de outros tipos celulares no microambiente, contribuindo para determinar o tipo de resposta que deverá ser gerada⁸ para o restabelecimento da homeostase.

Uma característica fundamental dos macrófagos é precisamente esta alta responsividade/versatilidade em relação à múltiplos estímulos, a qual está diretamente relacionada à sua plasticidade fenotípica que possibilita aos macrófagos assumirem (de forma transitória e reversível) diferentes fenótipos variando em um espectro com um extremo pró-inflamatório e outro extremo anti-inflamatório, configurando os macrófagos como um “camaleão imunológico”. Em um extremo do espectro, macrófagos classicamente ativados, ou M1, tem fenótipo primariamente pró-inflamatório, caracterizado por elevada produção relativa de citocinas como interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α , além de alta expressão do complexo MHC-II e maior atividade microbicida, relacionada ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). O perfil M1 pode ser induzido por sinais microbianos (como LPS) ou inflamatórios (como IFN- γ), e se caracteriza pelo aumento da expressão relativa de marcadores como CD80, CD86, MHC II entre outros^{9,10}.

O processo de resolução da resposta inflamatória subsequentemente à correção da injúria (por ex., infecção ou trauma) também conta com importante participação de macrófagos, os quais sofrem alteração fenotípica em resposta aos novos sinais no microambiente, associados ao reparo e/ou resolução da inflamação. Macrófagos de ativação alternativa, ou M2, também conhecidos como macrófagos anti-inflamatórios ou pró-reparo, apresentam elevada expressão relativa de mediadores como IL-10, TGF- β e VEGF, além de aumento da atividade de fagocitose. O perfil M2 pode ser induzido por sinais associados ao padrão de resposta de células T helper Th2, como IL-4, IL-10 e IL-13, e se caracteriza pelo aumento da expressão relativa de marcadores como CD206 e CD163^{9,11}.

É importante considerar que a resposta e transição fenotípica dos macrófagos não é absoluta, a expressão de marcadores e funções biológicas associadas aos perfis M1 e M2 não são mutuamente exclusivas, e o fenótipo dos macrófagos transita no espectro entre estes extremos M1-M2, com expressão simultânea de marcadores característicos dos dois fenótipos pela mesma célula. A predominância da expressão/funções biológicas associadas ao perfil M1 ou M2 é o que caracteriza um macrófago como “pró-” ou “anti-inflamatório”. Em algumas situações há

persistência do processo inflamatório devido à distúrbios no controle inibitório (por ex., doenças autoimunes) ou devido à ineficácia na remoção do estímulo inflamatório (por ex., doenças periodontais ou doenças vasculares crônicas). Nestas condições, podem ser encontrados no microambiente macrófagos de perfil predominante M1 e M2^{12,13}.

Macrófagos são um dos tipos celulares imunes mais prevalentes em diversos tumores sólidos, sendo denominados macrófagos associados ao tumor (TAM, *tumor-associated macrophages*). O início de diversos tipos de tumores (por ex., tumores gástricos, de pulmão e de cabeça e pescoço) está relacionado à inflamação crônica de baixa intensidade, assim macrófagos de perfil 'clássico' ou M1 podem contribuir para a tumorigênese por meio de dano ao DNA celular resultante da produção sustentada de ROS. Múltiplos sinais presentes no microambiente de tumores sólidos estabelecidos, como reduzida tensão de oxigênio e outros produzidos por células neoplásicas, fibroblastos e outras células imunes influenciam os macrófagos que assumem um perfil fenotípico característico, frequentemente associado ao perfil alternativo ou M2 (denominado 'M2-like') devido à atividade supressora da resposta imune (por ex., maior expressão de IL-10, menor expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e TNF, menor atividade de apresentação de antígeno). Esta característica fenotípica supressora possibilita a evasão da imunovigilância pelas células neoplásicas, além da produção de mediadores angiogênicos que favorecem a vascularização e nutrição no microambiente, bem como a possibilidade de disseminação hematogênica e geração de metástases. Importante destacar que elevada infiltração de tumores sólidos por TAMs está associada a pior prognóstico^{14,15}, demonstrando a relevância deste tipo celular na progressão e resposta ao tratamento de tumores sólidos, o que os torna um possível alvo terapêutico.

Desta forma, a relevância dos macrófagos em diversas doenças, condições e processos de reparo torna estas células objeto de interesse, uma vez que a compreensão da biologia dos macrófagos e os possíveis mecanismos pelo qual eles podem modular processos de patogênese e reparo pode ser explorada para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas^{16,17}.

Estudos *in vitro* são fundamentais na investigação da biologia de macrófagos. Estes trabalhos utilizam células monocíticas primárias obtidas do sangue periférico

ou da medula de voluntários humanos posteriormente diferenciadas *in vitro*. Alternativamente, são empregadas linhagens monocíticas humanas estabelecidas como modelo experimental de macrófagos¹⁸.

Constituídas por monócitos circulantes, linfócitos T, B e NK, células dendríticas, as células mononucleares de sangue periférico (*PBMC*, *peripheral blood mononuclear cells*) são isoladas do sangue total por diferentes métodos, sendo o mais comum a associação de uma etapa de centrifugação em gradiente de densidade (utilizando um polímero de sacarose de alta densidade), seguida da separação (*sorting*) magnética ou por meio de citometria de fluxo. A manutenção de células primárias usualmente requer mais atenção e cuidados em comparação às linhagens celulares estabelecidas, além da reduzida longevidade das células primárias em cultura. O rendimento do processo de isolamento de monócitos primários é variável, uma vez que a proporção deste tipo celular em PBMC pode variar entre 2 a 10%, assim a disponibilidade é mais limitada em comparação às linhagens monocíticas estabelecidas^{19,20}.

A manutenção de monócitos primários *in vitro* é dificultada pela limitada proliferação destas células, e para retardar/inibir a senescência e apoptose, alguns estudos indicam o estímulo com mediadores inflamatórios (por ex., IL-1 β ou LPS) que funcionariam como fatores de sobrevivência, porém já influenciam no fenótipo destas células. Outra dificuldade no uso de monócitos primários é a variação do fenótipo e responsividade celular associada à características individuais dos doadores (incluindo sexo, idade, condições e estado geral de saúde), a qual pode introduzir importante heterogeneidade na resposta celular, bem como as implicações éticas e de custo relacionadas ao recrutamento de múltiplos doadores para identificação de um padrão de resposta consistente^{21,22}.

A utilização de linhagens celulares monocíticas pré-estabelecidas proporciona disponibilidade virtualmente ilimitada, menor custo e maior consistência de resposta biológica. THP-1, U937, MonoMac 6, ML-2 e HL-60 são linhagens monocíticas humanas frequentemente utilizadas, as quais tem em comum a proliferação ilimitada e resistência à apoptose por serem células neoplásicas (leucemia). Desta forma, as características convenientes destas linhagens representam também sua principal limitação, uma vez que a resposta biológica de células neoplásicas pode ser substancialmente diferente da resposta de células primárias não neoplásicas²³.

Apesar desta limitação, linhagens monocíticas foram e ainda são intensamente utilizadas por permitirem a investigação de mecanismos biológicos relevantes, os quais são verificados posteriormente em modelos in vivo.

Quando as células de interesse são os macrófagos, a dificuldade e baixo rendimento do isolamento de células primárias a partir de tecidos e a impossibilidade de expandir e manter estes macrófagos primários em cultura por período considerável faz com que sejam utilizados monócitos como células precursoras, as quais são estimuladas de forma a induzir sua diferenciação em macrófagos. As linhagens THP-1 e U937 são as mais comumente utilizadas como precursoras de macrófagos e destacam-se entre as linhagens monocíticas por serem capazes de mimetizar o processo de diferenciação de monócitos primários em macrófagos e por apresentarem semelhanças morfológicas e na resposta biológica em comparação à monócitos e macrófagos primários²⁴.

A linhagem THP-1 foi estabelecida em 1980, a partir de criança do sexo masculino com 1 ano de idade portadora de leucemia monocítica aguda. Estas células podem ser transfectadas, expressam receptor do complemento C3, receptores Fc, tem atividade fagocítica e podem ser diferenciadas em macrófagos por ésteres de forbol (TPA ou PMA). Tem proliferação ilimitada em meio de cultura com mínimos requisitos de suplementação, e podem ser polarizadas nos diferentes fenótipos de macrófagos²².

A linhagem U937 foi estabelecida em 1974 a partir da efusão pleural de um paciente do sexo masculino de 37 anos de idade apresentando linfoma histiocítico. Esta linhagem também pode ser transfectada e expressa complemento C3, além de TNF-alfa e pode ser diferenciada em macrófagos por ésteres de forbol (PMA). As principais diferenças com a linhagem THP-1 são a origem (por serem derivadas de linfoma histiocítico apresentam maior maturação) e a forma de imortalização (transformação por vírus Epstein-Barr). A facilidade de cultura em condições pouco exigentes em termos de suplementação também é uma característica desta linhagem, que é frequentemente utilizada para investigar os mecanismos de diferenciação de monócitos em macrófagos^{25,26}.

Ambas as linhagens são frequentemente utilizadas em sistemas de co-cultura com outros tipos celulares para investigar mecanismos biológicos de influência de

monócitos e macrófagos em diversas doenças e processos. Apesar das limitações do sistema *in vitro*, resultados satisfatórios e replicáveis derivados de estudos com estas linhagens são relatados e têm contribuído para o avanço do conhecimento^{27,28}.

No entanto, existem indicações de diferenças importantes no comportamento e resposta celular das linhagens THP-1 e U937, e a escolha por uma ou outra linhagem frequentemente não é justificada biologicamente nos estudos, supondo-se estar primariamente relacionada à disponibilidade e/ou experiência dos investigadores com uma das linhagens. Assim, a identificação de possíveis diferenças na resposta celular destas linhagens e a caracterização de aspectos biológicos como a diferenciação, fenótipo e responsividade de macrófagos derivados de cada uma destas linhagens monocíticas é de grande importância para que pesquisadores façam uma seleção informada da linhagem mais adequada para a finalidade específica do estudo e modelo experimental. Embora estas linhagens sejam intensamente utilizadas como modelos experimentais confiáveis de monócitos e macrófagos, não há um consenso quanto aos protocolos utilizados para sua diferenciação e polarização fenotípica, o que dificulta a interpretação de resultados conflitantes reportados na literatura. Este trabalho irá explorar o comportamento biológico dessas linhagens frente a diferentes estímulos de diferenciação e polarização fenotípica, gerando informações úteis à diversas áreas de estudo envolvendo a biologia de macrófagos.

4 CONCLUSÃO

M-CSF não foi capaz de induzir aumento de tamanho celular e adesão ao substrato de cultura nas linhagens monocíticas THP-1 e U937.

Estímulo com PMA (10 ng/mL) por 24 h, seguido de 48 h de 'recuperação' em meio de cultura suplementado sem PMA induziu de forma efetiva a adesão celular ao substrato e aumento do tamanho celular em ambas as linhagens, THP-1 e U937.

Há semelhanças e diferenças importantes nas respostas às mesmas condições por macrófagos derivados das linhagens monocíticas THP-1 e U937 que devem ser consideradas na seleção como modelo de macrófagos in vitro, dependendo dos objetivos do estudo e do contexto biológico:

- macrófagos derivados da linhagem THP-1 tendem a ter maior responsividade à estímulos M1 e a assumirem um fenótipo relacionado ao perfil pró-inflamatório/clássico, enquanto macrófagos derivados da linhagem U937 apresentam maior responsividade à estímulos M2 e desvio fenotípico para o perfil alternativo/de reparo;

- macrófagos derivados da linhagem monocítica THP-1 apresentam maior atividade fagocitária e maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) do que macrófagos derivados da linhagem U937;

- condições M1 reduzem a atividade de fagocitose e aumentam a produção de ROS em macrófagos derivados de células THP-1 e U937.

REFERÊNCIAS*

1. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* 2018; 233(9): 6425-40. Vol. 233, *J Cell Physiol.* 2018. 6425–6440 p.
2. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(6):392–404.
3. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science.* 2010;327(5966):656–61.
4. Kwak T, Wang F, Deng H, Condamine T, Kumar V, Perego M, et al. Distinct Populations of immune-suppressive macrophages differentiate from monocytic myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cell Rep.* 2020;33(13): 108571 .
5. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res.* 2014;2(1):1–9.
6. Divangahi M, King IL, Pernet E. Alveolar macrophages and type I IFN in airway homeostasis and immunity. *Trends Immunol.* 2015;36(5):307–14.
7. Neves EMSFT. Macrófago : Biologia , Diversidade e Função. [dissertação de mestrado]. Porto: Universidade Fernando Pessoa; 2015.
8. Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and functional heterogeneity of monocytes. *Immunity .* 2018;49(4):595–613.
9. Poupot R, Goursat C, Fruchon S. Multivalent nanosystems: targeting monocytes/ macrophages. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:5511–21.
10. Nikitina E, Larionova I, Choinzonov E, Kzhyshkowska J. Monocytes and macrophages as viral targets and reservoirs. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9):2821.
11. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1 / M2 polarization. *Eur J Pharmacol .* 2020;877:173090.
12. Ma WT, Gao F, Gu K, Chen DK. The role of monocytes and macrophages in autoimmune diseases: a comprehensive review. *Front Immunol.* 2019;10:1–24.
13. Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Front Immunol.* 2014;5:1–22.
14. Pan Y, Yu Y, Wang X, Zhang T. Tumor-associated macrophages in tumor immunity. *Front Immunol.* 2020;11: 583084.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

15. Komohara Y, Fujiwara Y, Ohnishi K, Takeya M. Tumor-associated macrophages: Potential therapeutic targets for anti-cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* . 2016;99:180–5.
16. Funes SC, Rios M, Escobar-vera J. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology*. 2018; 154(2): 186–95.
17. Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2020;15:123–47.
18. Baine M J, Mallya K, Batra SK. Quantitative real-time PCR expression analysis of peripheral blood mononuclear cells in pancreatic cancer patients. *Methods Mol Biol*. 2013;(1):1–16.
19. Grievink HW, Luisman T, Kluft C, Moerland M MK. Comparison of three isolation techniques for human. *Biopreserv Biobank*. 2016;14(5):410–5.
20. Posch W, Lass-Flörl C, Wilflingseder D. Generation of human monocyte-derived dendritic cells from whole blood. *J Vis Exp*. 2016;(118):2–7.
21. Rios FJ, Touyz RM, Montezano AC. Isolation and differentiation of human macrophages. 2017;1527:311–20.
22. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol*. 2014;23(1):37–45.
23. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MKB, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*. 2010;5(1): e8668.
24. Aldo PB, Craveiro V, Guller S, Mor G. Effect of culture conditions on the phenotype of THP-1 monocyte cell line. *Am J Reprod Immunol*. 2013;70(1):80–6.
25. Minafra L, Di G, Ninfa N, Cancemi P, Sperimentale O, Palermo U. Proteomic differentiation pattern in the U937 cell line. *Leuk Res*. 2011;35(2):226–36.
26. Valdés López JF U-IS. Synergism between phorbol-12-myristate-13-acetate and vitamin D3 in the differentiation of U937 cells to monocytes and macrophages Synergie entre le phorbol-12-myristate-13-acétate et la Morphologie. 2018;102(338):205–18.
27. Spalinger MR, Sayoc-Becerra A, Santos AN, Shawki A, Canale V, Krishnan M, et al. PTPN2 regulates interactions between macrophages and intestinal epithelial cells to promote intestinal barrier function. *Gastroenterology* . 2020;159(5):1763-77.
28. Benaiges E, Ceperuelo-Mallafre V, Madeira A, Bosch R, Núñez-Roa C, Ejarque M, et al. Survivin drives tumor-associated macrophage reprogramming: a novel mechanism with potential impact for obesity. *Cell Oncol*. 2021;44(4):777–92.

29. Baxter EW, Graham AE, Re NA, Carr IM, Robinson JI, Mackie SL, et al. Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFN γ +LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. *J Immunol Methods*. 2020;478:1–11.