



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 lisossomos 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.

2 PROPOSIÇÃO

Este estudo tem o objetivo de caracterizar e comparar as linhagens monocíticas THP-1 e U937 em relação à diferenciação em macrófagos e algumas características biológicas, incluindo produção de ROS, atividade fagocítica e resposta a estímulos externos.

3 PUBLICAÇÃO

Comparison of monocytic cell lines U937 and THP-1 as macrophage models for in vitro studies*

Camyla Rodrigues Nascimento^a, Natalie Ap. Rodrigues Fernandes^a, Laura Andrea Gonzalez Maldonado^a, Carlos Rossa Junior^a

^a- Department of Diagnosis and Surgery, School of Dentistry at Araraquara, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP, Brazil.

Abstract

Macrophages are innate immune cells that constitute an important bridge with adaptive immunity and have an important role in homeostasis and in various conditions and pathologies. Thus, understanding macrophage biology can improve comprehension of diverse biological processes and provide insights into novel therapeutic immunomodulatory strategies. Due to limited yield and technical difficulty in isolating primary macrophages, in vitro studies commonly use monocytes as precursor cells. Monocytic cell lines are a virtually unlimited source of macrophage precursors and two of the most frequently used cell lines are THP-1 and U937. However, there is great variability in macrophage differentiation protocols and scarce information on possible differences in the responses of these cell lines. In this study, we used a standardized differentiation protocol using PMA and compare the response of the macrophages derived from THP-1 and U937 cells to M1- and M2-polarizing conditions. THP-1-derived macrophages are more responsive and skewed to M1 conditions/phenotype, whereas U937-derived macrophages were more responsive and skewed to M2 conditions/phenotype. THP-1-derived macrophages also had greater production of ROS and phagocytic activity. The similarities in the responses of macrophages derived from these two monocytic cell lines to M1 conditions were the inhibition of phagocytosis and the increase in ROS production. This information should be considered to make an informed choice on the cell line used as in vitro macrophage model, according to the experimental goals and biological context.

*O artigo segue as normas do periódico Molecular Immunology.

1. Introduction*

Macrophages in inflammatory conditions and cancer frequently originate from circulating monocytes (Kwak et al., 2021). Microenvironmental signals (Microbe or Damage Associated Molecular Patterns- DAMPs and MAMPs, respectively) modulate their activation status and phenotype. Diverse biological mediators (chemokines, cytokines, metalloproteinase, products of enzymatic reactions such as prostaglandins, leukotrienes, reactive oxygen species- ROS, and others) produced by macrophages can influence the afflux and activation of other cell types in the microenvironment, further shaping the host response and ultimately reestablishing homeostasis (Guilliams et al., 2018).

The relevance of macrophages in various diseases, conditions and repair processes justifies the great interest in these cells, since understanding the biology of macrophages and the possible mechanisms by which they can modulate pathogenesis and repair processes can be explored for the development of new therapeutic approaches (Funes et al., 2018; Locati et al., 2020). In vitro studies using human cells are critical in investigating macrophage biology and rely either on primary cells obtained from donors or on established monocytic cell lines (Baine, M. J., Mallya, K., & Batra, 2013).

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are isolated from whole blood and include T and B lymphocytes, monocytes, and dendritic cells. The maintenance of primary cells in culture is usually more demanding compared to established cell lines. The yield of the primary monocyte isolation process is variable, since the proportion of this cell type in PBMC range from 2 to 10%, thus availability is limited compared to established monocytic cell lines. Moreover, there may be important variability in phenotype and cellular response both inter- and intra-individual donors (Grievink HW, Luisman T, Kluft C, Moerland M, 2016; Posch et al., 2016).

The use of pre-established monocytic cell lines provides virtually unlimited availability, reduced cost, and greater consistency of biological response. THP-1, U937, MonoMac 6, ML-2 and HL-60 are frequently used human monocytic cell lines, which have in common unlimited proliferation and resistance to apoptosis because of their neoplastic (leukemia) nature. Thus, the convenient characteristics of these cell lines also represent their main limitation, since the biological response of neoplastic

* APÊNDICE A

cells can be substantially different from that of primary non-neoplastic cells (Daigneault et al., 2010). Despite this limitation, monocytic cell lines are intensely used because they allow the investigation of relevant biological mechanisms, which are subsequently verified in *in vivo* models.

THP-1 and U937 are the most commonly used monocytic cell lines used as macrophage precursors because of their ability to mimic the macrophage differentiation process and for the similarities to primary monocytes and macrophages in morphology and biological responses (Aldo et al., 2013). The THP-1 cell line can be transfected, expresses C3 receptors and Fc receptors, have phagocytic activity and can be differentiated into macrophages by phorbol esters (TPA or PMA) (Chanput et al., 2014). The U937 cell line can also be transfected and expresses C3 complement in addition to TNF-alpha and can be differentiated into macrophages by phorbol esters (PMA). Distinctive characteristics of U937 cells in comparison to THP-1 cells are their origin (since these cells derive from histiocytic lymphoma, they are more mature) and the form of immortalization (transformation by Epstein-Barr virus). Both THP-1 and U937 are not demanding in their culture conditions (Minafra et al., 2011; Valdés López JF, 2018).

Despite the limitations inherent to *in vitro* studies, the use of these cell lines has yielded important and replicable information that contributed to the advancement of knowledge on macrophage biology and their relevance in diverse contexts (Benaiges et al., 2021; Spalinger et al., 2020). Nevertheless, there are indications of important differences in the biological response of THP-1 and U937 cells, and the choice of one or the other lineage is often not justified biologically in the published studies. Speculatively, the use of U937 or THP-1 cells may be primarily related to the availability and/or personal experience of the investigators. Thus, identifying possible differences in cellular response of these cell lines and characterizing biological aspects involved in macrophage differentiation and polarization *in vitro* can aid researchers to select the most appropriate cell line for the specific purpose of the study and experimental model.

There is no consensus on the protocols used for their differentiation and polarization, making it difficult to interpret conflicting results reported in the literature. This study will explore the biological behavior of these cell lines in response to pre-defined differentiation and polarization stimuli, generating information that is useful to several areas of study using these cell lines as *in vitro* models of macrophages.

2. Material and Methods

2.1 Cell lines

The human monocyte cell line THP-1 was obtained from ECACC and U937 cells acquired from ATCC. The both cell lines were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% antibiotics (P/S-penicillin and streptomycin). Cells were cultured in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO₂. Both monocytic cell lines were differentiated into macrophages by treatment with PMA at 10ng/mL for 24h. The medium containing PMA was then removed, and cells washed gently with PBS to remove residual PMA and non-adhered / dead cells. Complete RPMI medium (10% FBS, 1% P/S) was added, and cells were maintained in culture for an additional 48h (Baxter et al., 2020). At the end of this period, adhered cells were used for experiments as 'M0' macrophages.

2.2 Differentiation of THP-1 and U937 cells in macrophages with PMA and M-CSF – morphological and cytoskeletal changes

2.2.1 Morphology

Monocytic cells were cultured in 4-well chamber slides at a density of 70,000 cells/mL (500 µL/well). After 24 hours, cells were treated with 10 ng/mL of phorbol-myristate- acetate (PMA; Sigma-Aldrich, St Louis,MO, USA) or rhM-CSF (Peprotech Inc) at 50 and 100ng/mL concentrations. After 24 h, medium containing PMA was removed, the attached cells gently washed with Ca/EDTA-free PBS, fresh RPMI medium (10% FBS, 1% P/S) was added and the morphology of cells was registered on a digital inverted microscope (brightfield). After an additional 48h in culture (72h after treatment with PMA) cell morphology was registered again. For cells treated with rhM-CSF, half of the volume was changed after 3 days including fresh rhM-CSF and morphology was recorded in the same digital inverted microscope at the same magnification on the 6th day of culture.

2.2.2 Cytoskeleton

Immediately after imaging cells in brightfield in each period (24 and 72 h for PMA, 6 days for M-CSF), cells were fixed with paraformaldehyde, permeabilized in saponin-containing buffer and stained with AlexaFluor488-conjugated phalloidin

(Thermo Fisher Scientific) (40 nM) for 40 min, followed by DNA staining with DAPI (Thermo Fisher Scientific) (2 ug/mL) for 5 min. After extensive wash with PBS, the images were obtained at 100 and 400x magnification on an inverted digital fluorescence microscope (Evos fl, AMG Micro) in three random fields.

2.3 Phenotypical polarization

PMA-differentiated macrophages were de-induced in low FBS culture medium (RPMI, 1% FBS, 1% P/S) for 16-18 h. M1 polarization was induced by stimulation with LPS (Sigma-Aldrich, Merck) (100 ng/mL) and IFN- γ (Peprotech Inc) (20 ng/mL), and M2 was induced by used IL-4 (Peprotech Inc) (20 ng/mL) and IL-13 (Peprotech Inc) (20 ng/mL). The stimuli were maintained for 48h. The cells were collected to assess phenotype, production of ROS, phagocytic activity and gene expression, and culture supernatants was collected for ELISA.

2.4 Gene expression

Total RNA was extracted from lysed cells using affinity columns according to the manufacturer's protocol (Cellco, BR). The quantity and purity of total RNA were determined by UV spectrophotometry and by the absorbance at 260 nm and the ratio 260/280 nm, respectively. 200 ng of total RNA were converted into cDNA using random hexamer primers and synthetic reverse transcriptase in a reaction volume of 20 uL, following the instructions of the supplier (High Capacity cDNA Synthesis kit, Applied Biosystems, Invitrogen Corp., Foster City, CA, USA). qPCR reactions were performed in a 10 μ L total volume reaction, including SYBR Green mastermix (PowerUp SYBR Green, ThermoFisher Scientific), cDNA template, deionized water, and human-specific pre-designed and optimized sets of primers (Table 1). Cycling conditions were empirically optimized in control samples by assessing the melting curve after 45 amplification cycles. Reactions were run on a StepOne Plus qPCR thermocycler (Applied Biosystems, Invitrogen Corp., Foster City, CA, USA). Relative levels of gene expression were determined by the Δ Ct method using the thermocycler's software and automated detection of the Ct. Expression of GAPDH (no significant change in Ct in the different experimental conditions for both cell lines) was used in the calculations as the normalizing gene.

Table 1 – Primer sequences used in the assessment of gene expression by RT-qPCR

Gene	Transcript	Sequence (5'-3')
<i>GAPDH</i>	NM_002046.7	S- ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG AS-GCCATCACGCCACAGTTT C
<i>IL10</i>	NM_000572.3	S - GGCACCCAGTCTGAGAACAG AS - ACTCTGCTGAAGGCATCTCG
<i>TNF</i>	NM_000594.4	S - GCTGCACTTTGGAGTGATCG AS - TCACTCGGGGTTTCGAGAAGA
<i>IL6</i>	NM_000600.5	S- CCTGAACCTTCCAAAGATGGC AS- TTCACCAGGCAAGTCTCCTCA
<i>Arg1</i>	NM_000045.4	S- GTGGAACTTGCATGGACAAC AS- AATCCTGGCACATCGGGAATC

2.5 Phagocytosis activity

PMA-differentiated macrophages from THP-1 and U937 cells were polarized to M1 or M2 phenotype. Control 'M0' macrophages were treated with the same volume of PBS in lieu of M1/M2 stimuli. 8 uL of 2.0 µm FITC-latex beads (L4530; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) were added in 500 uL of complete culture medium. After 30 min at 37C/5% CO₂, cells were thoroughly washed with PBS, enzymatically dissociated from the culture substrate (Accutase, BD Biosciences), resuspended in PBS + 2% FBS and analyzed by flow cytometry (BD FACS Verse, BD Biosciences). The experiment was realized in triplicate with acquisition of 10,000 events in each sample.

2.6 Production of ROS

CM-H2DCFDA substrate (Thermo Fisher Scientific) (50ng) was added to cultures of PMA-differentiated macrophages of polarized to M0, M1, and M2 phenotypes. Following a 30min incubation at 37°C in the dark, cells collected by gentle enzymatic dissociation (Accutase, BD Biosciences), washed in PBS and resuspended in PBS + 2% FBS. Emission of fluorescence by ROS-converted substrate was detected using flow cytometry (BD FACS Verse, BD Biosciences). The experiment was realized in triplicate with the acquisition of 10,000 events/sample.

2.7 Cytokine secretion

Secretion of IL-6 (Interleukin-6), and IL-1β (Interleukin-1β) by PMA-differentiated macrophages according to the polarizing stimuli was quantified in culture supernatants sandwich ELISAs, according to the manufacturer's instructions

(Peprotech). The results were normalized to the total protein concentration in the culture supernatant samples. The experiment was performed in triplicate.

2.8 Data Analyses

Data obtained from each experiment were analyzed using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Ind., San Diego, CA, USA). The purpose of the analysis was to compare the outcomes assessed between cell lines (THP-1 vs U937) in the same experimental conditions and among the polarizing conditions (M0 vs M1 vs M2) within each cell line (THP-1 or U937). The significance level was set at 95% ($p < 0.05$) in all analyses.

3. Results

3.1 Morphology

THP-1 and U937 cells cluster together PMA-induced differentiation

Neither monocytic cell lines showed morphological changes in comparison to unstimulated controls at 24 h. There is comparatively more attached THP-1 than U937 cells at 24 h. After 72 h (24 h of PMA stimulation and 48 h of 'resting'), cells were noticeably larger and maintained their pattern of clusters in small colony-like formations, that were firmly adhered to the culture substrate (Figure 1A).

M-CSF failed to induce differentiation of U937 cells

After 6 days of stimulation with M-CSF (50 and 100 ng/mL), U937 cells failed to adhere to the culture substrate, as nearly all cells were removed by gentle washing. This indicates that M-CSF was not effective in differentiating this cell line into macrophages. Similarly to the observation with the PMA stimulation, there were more THP-1 cells attached at the end of stimulation, but cell size did not change in comparison to unstimulated controls (Figure 1B).

3.2 Gene expression

Expression of TNF, IL-6, IL-10, and Arg-1 was differentially regulated by M1 and M2 stimuli in THP-1 and U937-derived PMA-differentiated macrophages

In general, THP-1-derived macrophages were more responsive to M1 stimulation and U937-derived macrophages were more responsive to M2 stimulation. TNF was

induced in M1 conditions only in THP-1-derived macrophages. Moreover, fold change in IL-6 expression induced by M1 conditions was also greater in THP-1-derived macrophages. On the other hand, IL-10 expression was induced by M2 stimuli only U937-derived macrophages, which also had increased regulation of Arg-1 expression in both M1 and M2 conditions. (Figure 2 A).

3.3 Cytokine secretion

Regulation of IL-1 β and IL-6 in M1 and M2 conditions is similar in macrophages from both THP-1- and U937-derived macrophages

Regulation of IL-6 production was similar in macrophages derived from both cell lines: M1 conditions greatly increase IL-6 secretion, whereas M2 stimuli decreased IL-6 production below levels in M0 macrophages. Regulation of IL-1 β production was similar (increased in M1, reduced in M2 conditions) for U937-derived macrophages, whereas in THP-1-derived macrophages secretion of IL-1 β in M2 conditions was much lower than under M1 stimuli, but still greater than in M0 conditions, which had no detectable production of this cytokine. Overall, production of these candidate pro-inflammatory cytokines was more pronounced in THP-1-derived macrophages. (Figure 2 B).

3.4 Phagocytosis

THP-1-derived macrophages have greater phagocytic activity

Phagocytosis by THP-1-derived macrophages cells was markedly greater than that of U937-derived macrophages in all phenotypical conditions. M1 stimuli significantly reduced phagocytic activity of THP-1-derived macrophages, whereas M2 conditions had no effect. U937-derived macrophages had the greatest phagocytic activity in M0 conditions, whereas phagocytosis was nearly abrogated in M1 conditions and significantly decrease by M2 stimuli. (Figure 3 A).

3.5 Production of ROS

THP-1-derived macrophages produce more ROS

The percentage of ROS-producing cells was greater in THP-1-derived macrophages than in U937-derived macrophages across all phenotypical conditions. In macrophages derived from both cell lines M1 conditions increased and M2 stimuli reduced the percentage of ROS-producing cells. (Figure 3 B).

4. Discussion

Macrophages are terminally differentiated cells and their precise origin is currently under debate, as they may have an embryonic precursor generating a population of resident macrophages and differentiate from circulating monocytes of myeloid origin (Nobs and Kopf, 2021; Sreejit et al., 2020). Established immortalized monocytic cell lines are frequently used as a source of macrophages, which could facilitate comparisons among studies using standardized methods because of the greater homogeneity in cell response.

THP-1 and U937 are two widely used established human monocytic cell lines considered to be capable of mimicking some responses of primary monocytes and macrophages (Aldo et al., 2013; Spalinger et al., 2020). This study compares the responses of THP-1 and U937 cell lines in their ability to differentiate into macrophages and on common cellular responses of macrophages, including gene expression, phenotypical polarization, production of ROS and phagocytosis. Overall, both cell lines can differentiate into macrophages (based on changes in cell size and attachment to culture substrate) but their responses to M1 and M2 polarizing stimuli are distinct: THP-1 cells are more responsive to M1 conditions and U937 cells are shifted towards the M2 phenotype.

Granulocyte–macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony stimulating factor (M-CSF) are major endogenous growth factors implicated in macrophage differentiation from monocytes (Jaguin et al., 2013). Notably, stimulation with M-CSF in concentrations and periods sufficient to induce differentiation of primary monocytes did not induce macrophage differentiation of either THP-1 and U937 cells. Aldo et al., also reported on the lack of responsiveness to M-CSF by THP-1 cells, as it did not increase expression of CD14 (Aldo et al. 2013). This may be associated with expression/functionality of M-CSF receptor by these cell lines, although there is a report indicating c-fms gene and M-CSFR protein expression and activation (Tyrosine phosphorylation) in IL-12-stimulated THP-1 and U937 cells (Ma et al., 2015). Other possibilities include genetic drifting with changes in phenotype which occurs with widely-distributed cell lines, differences in culture conditions such as cell density that can affect responsiveness to external stimuli (Aldo et al., 2013), and accidental contamination with other cell lines. According to information on American Type Culture Collection's (ATCC) website

(<https://www.atcc.org/products/crl-1593.2>), in 1994 PCR and cytogenetic analyses showed that a number of stocks of U937 were contaminated with the human myeloid leukemia cell line K-562, which prompted the temporary discontinuation of its distribution. In this study, we used recently-acquired stocks of both THP-1 and U937 cells, the latter from a new stock (ATCC CRL-1593.2) that was tested and verified to be free of second contaminant subpopulations.

Differentiation protocol with PMA was used as recently described (Baxter et al., 2020) to obtain macrophages in a less-activated state, consistent with an M0 phenotype. Using this protocol, both THP-1 and U937 cells adhered to the culture substrate after the initial 24 h, but there was no marked difference in cell morphology, which was clearly noticeable as increased size for both cell lines after 72 h, which is also reported by Aldo et al. (2013). Importantly, expression of candidate pro-inflammatory genes in the absence of stimulation was lower than that after M1 polarization, but higher than that observed after M2 stimulation, suggesting that this differentiation protocol yielded cells that were highly responsive to stimulation in either direction of the macrophage phenotype spectrum. At the end of the differentiation protocol, THP-1 cells had a more irregular morphology, which is associated with pro-inflammatory/M1 macrophages; whereas U937 cells were more uniformly round, a morphology associated with an M2 phenotypical profile (Tedesco et al., 2015; Vogel et al., 2014). As M1 and M2 stimuli, we used 100 ng/mL LPS (100 ng/mL) + IFN- γ (20 ng/mL) and IL-4 (20 ng/mL) + IL-13 (20 ng/mL), respectively, which are commonly reported in the literature (Baxter et al., 2020; Rios et al., 2017; Zhang et al., 2019).

Interestingly, subsequent experiments supported this morphological association with macrophage phenotype, as THP-1 cells skewed more to an M1 phenotype (increased production of ROS and expression of pro-inflammatory cytokines), whereas U937 cells were shifted towards the M2 phenotype, with reduced expression and secretion of pro-inflammatory cytokines, increased expression of IL-10 and lower production of ROS, which is associated with microbicidal activity, reported as more pronounced in M1 macrophages (Zhao et al., 2019).

Phagocytic activity *in vivo* is reported to be more pronounced in M2 macrophages, (Jaggi et al., 2020; Denney et al., 2012; Tierney et al., 2009); and indeed, under M1 conditions, both THP1- and U937-derived macrophages had a significant decrease in phagocytosis. However, phagocytosis may be mediated by

distinct receptors in M1 (FcR, Complement receptors) or M2 (non-opsonin receptors: mannose receptor, DC-SIGN, integrins) conditions (Kurynina et al., 2018). Nevertheless, M2 condition did not enhance phagocytosis by macrophages derived from either monocytic cell line; which is contrary to the findings of Tedesco et al. (2018), who reported a reduction in phagocytosis by THP-1-derived macrophages under the same M2 conditions and an increase in phagocytosis associated with the same M1 conditions. In fact, for U937-derived macrophages M2 stimuli reduced phagocytosis in comparison to unstimulated (M0) conditions. Notably, the M1-skewed THP-1-derived macrophages had significantly greater phagocytic activity than U937-derived macrophages.

Interestingly, Kurynina et al. (2018) reported differences in phagocytotic activity of THP-1-derived macrophages according to the differentiation stage and influenced by the phenotype. Contrasts between our results and previous studies using the same monocytic cell lines are likely to be associated with the differentiation protocol, including concentrations of PMA, period of treatment and the inclusion of a 'resting' period after differentiation. Prasad et al., showed that differentiation of U937 monocytes with 100 ng/mL of PMA induced increased ROS production (Prasad et al., 2020). Kuno et al., showed that phagocytosis by the U937-derived macrophages was inversely related with the concentration of PMA used in their differentiation, with lower phagocytic activity associated with higher concentrations of PMA (Kuno et al., 2020). Other important details of the protocols, such as time of incubation with latex beads in phagocytosis assays may account for some contrasting findings. Collectively, this information highlights the importance of considering the differentiation and other experimental protocols as important variables that may significantly affect the functional outcome of the differentiated macrophages.

It is important to acknowledge that M1 pro-inflammatory and M2 anti-inflammatory M2 phenotypes are extremes in a spectrum that are not absolute or mutually exclusive, and macrophages assume a phenotype in this spectrum that usually skews toward either extreme, meaning that the predominant genes expressed and activity of biological functions conform to the phenotype in one end of the spectrum, but some characteristics of the opposite end of the phenotype spectrum may remain (Italiani and Boraschi, 2014). Similarly, the cytokines expressed are not unique to each profile and can lead to different responses depending on concentration, timing of exposure and context (other cues in the

microenvironment). It has been observed that exposure of M2 macrophages to the cytokine IL-6, usually considered as pro-inflammatory, may further support this phenotype instead of skewing macrophages to the M1 phenotype (Ayaub et al., 2019).

Overall, these of this study indicate that, under the standardized PMA-induced differentiation conditions, THP-1-derived macrophages are more responsive to pro-inflammatory (M1) stimuli, whereas U937-derived macrophages are skewed towards the M2/alternative phenotype. This information is useful in planning studies using these monocytic cell lines that emphasize a specific pro- or anti-inflammatory phenotype or a specific biological function of macrophages.

5. Conclusion

Our results show that the both THP-1 and U937 human monocytic cell lines can differentiate into macrophages and mimic the responses of primary macrophages. Also under the same standardized PMA differentiation conditions, macrophages derived from each cell line have distinct biological responses to the same stimuli, which makes them not 'interchangeable' as in vitro model of macrophage precursor cells. Thus, even under the same differentiation conditions, the choice of monocytic precursor cell should be based on the biological responses, goals and biological context of interest.

References

- Aldo, P.B., Craveiro, V., Guller, S., Mor, G., 2013. Effect of culture conditions on the phenotype of THP-1 monocyte cell line. *Am. J. Reprod. Immunol.* 70, 80–86. <https://doi.org/10.1111/aji.12129>
- Ayaub, E.A., Tandon, K., Padwal, M., Imani, J., Patel, H., Dubey, A., Mekhael, O., Upagupta, C., Ayoub, A., Dvorkin-Gheva, A., Murphy, J., Kolb, P.S., Lhotak, S., Dickhout, J.G., Austin, R.C., Kolb, M.R.J., Richards, C.D., Ask, K., 2019. IL-6 mediates ER expansion during hyperpolarization of alternatively activated macrophages. *Immunol. Cell Biol.* 97, 203–217. <https://doi.org/10.1111/imcb.12212>
- Baine, M. J., Mallya, K., & Batra, S.K., 2013. Quantitative Real-Time PCR Expression Analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Pancreatic Cancer Patients. *Methods Mol Biol.* 1–16. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-287-2>
- Baxter, E.W., Graham, A.E., Re, N.A., Carr, I.M., Robinson, J.I., Mackie, S.L.,

- Morgan, A.W., 2020. 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* 478, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.112721>
- Benaiges, E., Ceperuelo-Mallafre, V., Madeira, A., Bosch, R., Núñez-Roa, C., Ejarque, M., Maymó-Masip, E., Huber-Ruano, I., Lejeune, M., Vendrell, J., Fernández-Veledo, S., 2021. Survivin drives tumor-associated macrophage reprogramming: a novel mechanism with potential impact for obesity. *Cell. Oncol.* 44, 777–792. <https://doi.org/10.1007/s13402-021-00597-x>
- Chanput, W., Mes, J.J., Wichers, H.J., 2014. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int. Immunopharmacol.* 23, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>
- Daigneault, M., Preston, J.A., Marriott, H.M., Whyte, M.K.B., Dockrell, D.H., 2010. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008668>
- Denney, L., Kok, W.L., Cole, S.L., Sanderson, S., McMichael, A.J., Ho, L.-P., 2012. Activation of Invariant NKT Cells in Early Phase of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Results in Differentiation of Ly6C hi Inflammatory Monocyte to M2 Macrophages and Improved Outcome . *J. Immunol.* 189, 551–557. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103608>
- Funes, S.C., Rios, M., Escobar-vera, J., 2018. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology* 186–195. <https://doi.org/10.1111/imm.12910>
- Grievink HW, Luisman T, Kluft C, Moerland M, M.K., 2016. Comparison of Three Isolation Techniques for Human. *Biopreserv. Biobank.* 14, 410–415. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0104>
- Guilliams, M., Mildner, A., Yona, S., 2018. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* 49, 595–613. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.005>
- Italiani, P., Boraschi, D., 2014. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Front. Immunol.* 5, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00514>
- Jaggi, U., Yang, M., Matundan, H.H., Hirose, S., Shah, P.K., Sharifi, B.G., Ghiasi, H., 2020. Increased phagocytosis in the presence of enhanced M2-like macrophage responses correlates with increased primary and latent HSV-1 infection. *PLoS Pathog.* 16, 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008971>
- Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O., Lecureur, V., 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, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.01.010>
- Kuno, S., Srinoun, K., Penglong, T., 2020. The effects of phorbol 12-myristate 13-acetate concentration the expression of miR-155 and miR-125b and their macrophage function-related genes in the U937 cell line. *J. Toxicol. Sci.* 45, 751–761. <https://doi.org/10.2131/jts.45.751>

- Kurynina, A. V., Erokhina, M. V., Makarevich, O.A., Sysoeva, V.Y., Lepekha, L.N., Kuznetsov, S.A., Onishchenko, G.E., 2018. Plasticity of Human THP–1 Cell Phagocytic Activity during Macrophagic Differentiation. *Biochem.* 83, 200–214. <https://doi.org/10.1134/S0006297918030021>
- Kwak, T., Wang, F., Deng, H., Condamine, T., Kumar, V., Perego, M., Kossenkova, A., Montaner, L.J., Xu, X., Xu, W., Schuchter, L.M., Amaravadi, R.K., Mitchell, T.C., Giorgos, C., Mulligan, C., Nam, B., Masters, G., Hockstein, N., 2021. Distinct Populations of Immune-Suppressive Macrophages Differentiate from Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer. *Cell Rep* 33. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108571>. Distinct
- Locati, M., Curtale, G., Mantovani, A., 2020. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 15, 123–147. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718>
- Ma, T. ting, Wu, B.T., Lin, Y., Xiong, H.Y., Wang, Q., Li, Z.W., Cheng, F., Tu, Z.G., 2015. IL-12 could induce monocytic tumor cells directional differentiation. *Mol. Cell. Biochem.* 402, 157–169. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2323-9>
- Minafra, L., Di, G., Ninfa, N., Cancemi, P., Spermentale, O., Palermo, U., 2011. Proteomic differentiation pattern in the U937 cell line. *Leuk. Res.* 35, 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.07.040>
- Nobs, S.P., Kopf, M., 2021. Tissue-resident macrophages: guardians of organ homeostasis. *Trends Immunol.* 42, 495–507. <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.04.007>
- Posch, W., Lass-Flörl, C., Wilflingseder, D., 2016. Generation of human monocyte-derived dendritic cells from whole blood. *J. Vis. Exp.* 2016, 2–7. <https://doi.org/10.3791/54968>
- Prasad, A., Sedlářová, M., Balukova, A., Ovsii, A., Rác, M., Křupka, M., Kasai, S., Pospíšil, P., 2020. Reactive Oxygen Species Imaging in U937 Cells. *Front. Physiol.* 11, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.552569>
- Rios, F.J., Touyz, R.M., Montezano, A.C., 2017. Isolation and Differentiation of Human Macrophages 1527, 311–320. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6625-7>
- Spalinger, M.R., Sayoc-Becerra, A., Santos, A.N., Shawki, A., Canale, V., Krishnan, M., Niechcial, A., Obialo, N., Scharl, M., Li, J., Nair, M.G., McCole, D.F., 2020. PTPN2 Regulates Interactions Between Macrophages and Intestinal Epithelial Cells to Promote Intestinal Barrier Function. *Gastroenterology* 159, 1763–1777.e14. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.07.004>
- Sreejit, G., Fleetwood, A.J., Murphy, A.J., Nagareddy, P.R., 2020. Origins and diversity of macrophages in health and disease. *Clin. Transl. Immunol.* 9, 1–19. <https://doi.org/10.1002/cti2.1222>
- Tedesco, S., Bolego, C., Toniolo, A., Nassi, A., Fadini, G.P., Locati, M., Cignarella, A., 2015. Phenotypic activation and pharmacological outcomes of spontaneously differentiated human monocyte-derived macrophages. *Immunobiology* 220, 545–554. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.12.008>

- Tedesco, S., De Majo, F., Kim, J., Trenti, A., Trevisi, L., Fadini, G.P., Bolego, C., Zandstra, P.W., Cignarella, A., Vitiello, L., 2018. Convenience versus biological significance: Are PMA-differentiated THP-1 cells a reliable substitute for blood-derived macrophages when studying in vitro polarization? *Front. Pharmacol.* 9, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00071>
- Tierney, J.B., Kharkrang, M., La Flamme, A.C., 2009. Type II-activated macrophages suppress the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol. Cell Biol.* 87, 235–240. <https://doi.org/10.1038/icb.2008.99>
- Valdés López JF, U.-I.S., 2018. 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* 102, 205–218. <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2018.06.001>
- Vogel, D.Y.S., Glim, J.E., Stavenhagen, A.W.D., Breur, M., Heijnen, P., Amor, S., Dijkstra, C.D., Beelen, R.H.J., 2014. Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. *Immunobiology* 219, 695–703. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.05.002>
- Zhang, B., Du, Y., He, Y., Liu, Y., Zhang, G., Yang, C., Gao, F., 2019. INT-HA induces M2-like macrophage differentiation of human monocytes via TLR4-miR-935 pathway. *Cancer Immunol. Immunother.* 68, 189–200. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2261-6>
- Zhao, Y.L., Zhang, X., Liu, W.W., Yang, Y.T., Gao, Z.K., Liu, X.L., Liu, W., Hayashi, T., Yamato, M., Fujisaki, H., Hattori, S., Mizuno, K., Atsuzawa, Y., Tashiro, S. ichi, Onodera, S., Ikejima, T., 2019. Reactive oxygen species are responsible for the cell aggregation and production of pro-inflammatory mediators in phorbol ester (PMA)-treated U937 cells on gelatin-coated dishes through upregulation of autophagy. *Connect. Tissue Res.* 60, 323–334. <https://doi.org/10.1080/03008207.2018.1530770>

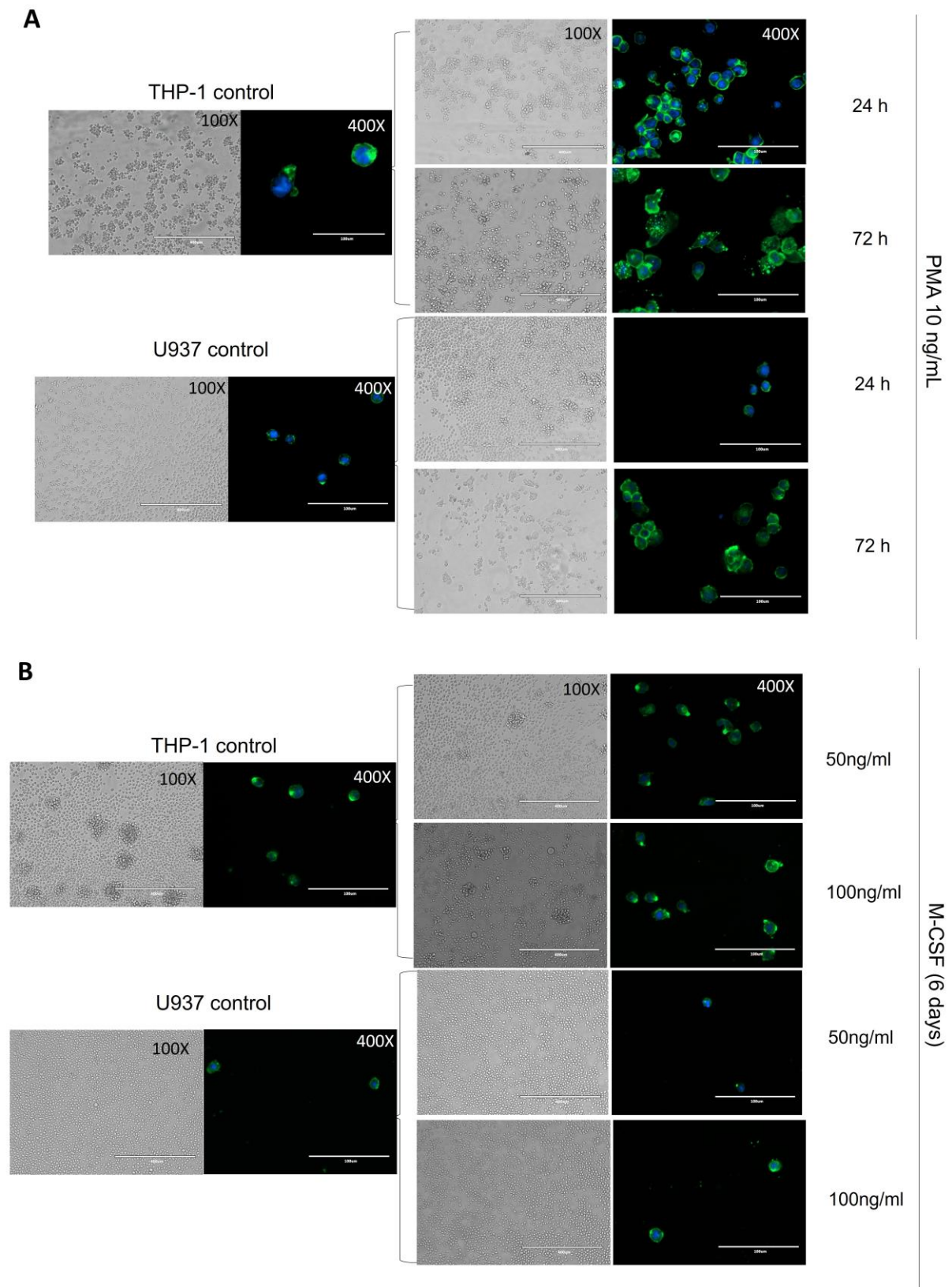


Figure 1- Morphology and substrate adhesion of THP-1 and U937 cells in different differentiation conditions: representative brightfield and fluorescence images of THP-1 and U937 cells according to the indicated differentiation conditions: **(A)** PMA stimulation; **(B)** M-CSF stimulation. Images shown were obtained from the central portion of the culture well.

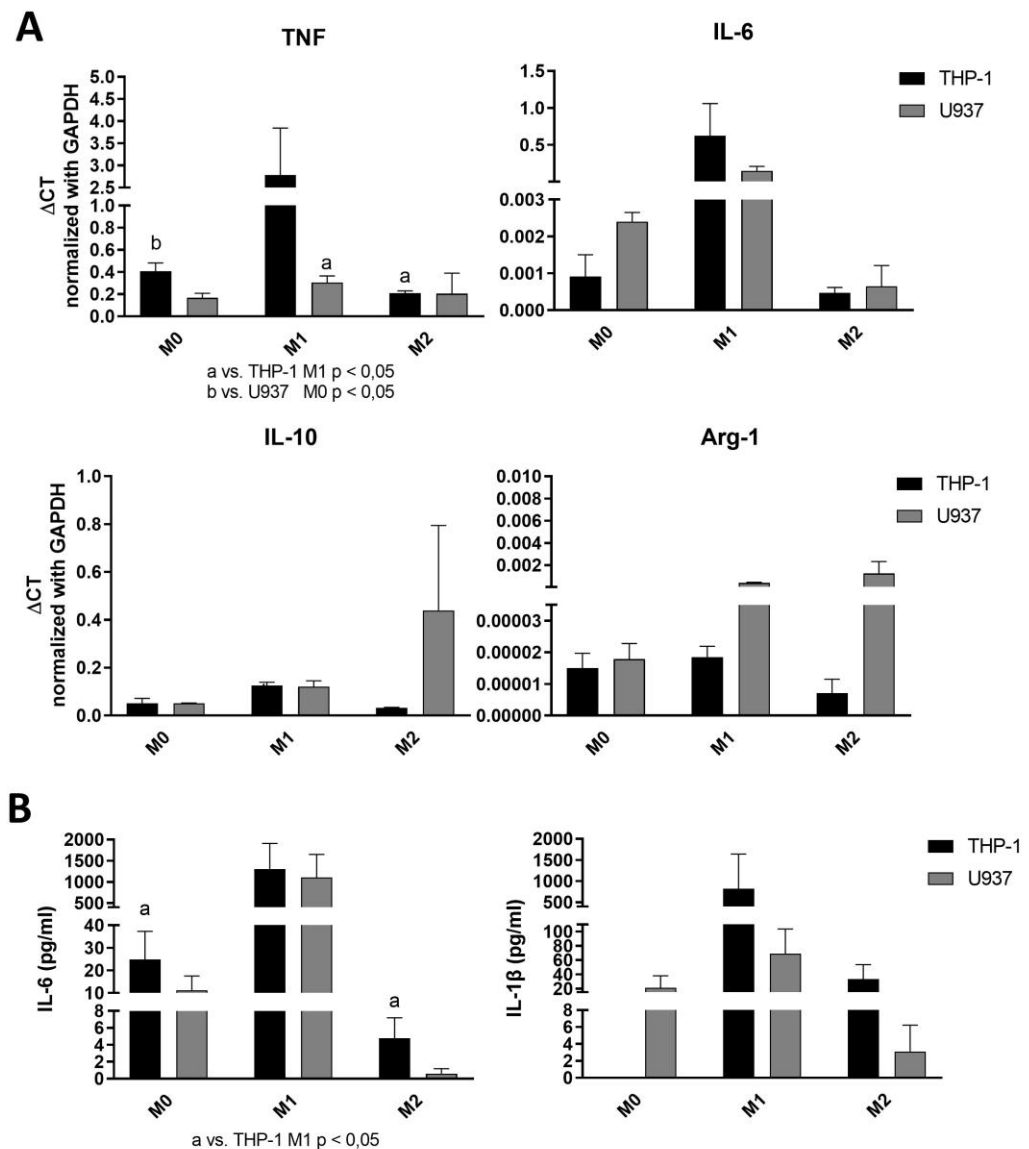


Figure 2- Distinct responsiveness of THP-1- and U937-derived macrophages to M1 and M2-polarizing conditions: **(A)** Normalized candidate gene expression determined by RT-qPCR in resting, M1 and M2 conditions. (a) $p < 0.05$ compared with the THP-1 M1 group. (d) $p < 0.05$ compared with the U937 M0 group **(B)** Secretion of IL-1 β and IL-6 by THP-1 and U937-derived macrophages in resting, M1 and M2 conditions quantified by ELISA. Cytokine concentrations were normalized to the concentration of total protein in the culture supernatants. (a) $p < 0.05$ compared with the THP1 M1 group. In **(A)** and **(B)** bars represent average and vertical lines the standard deviation of three independent experiments assessed in duplicate.

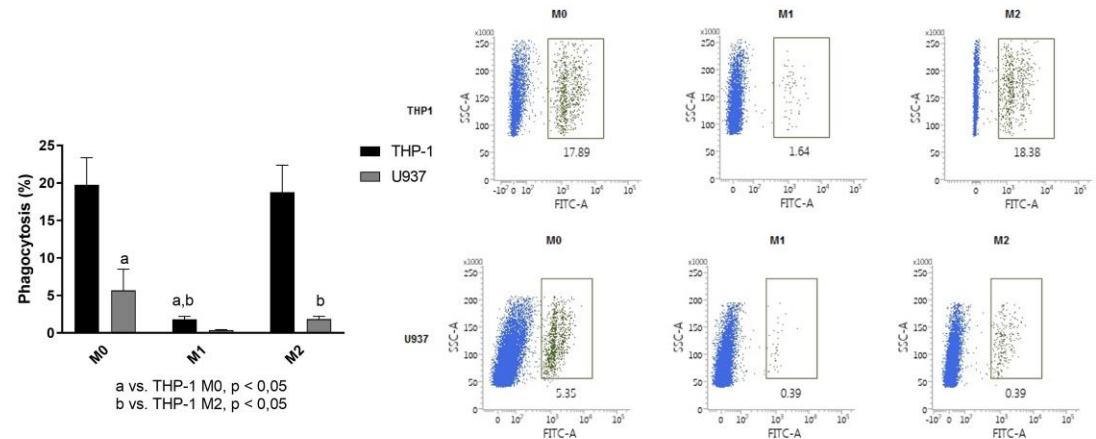
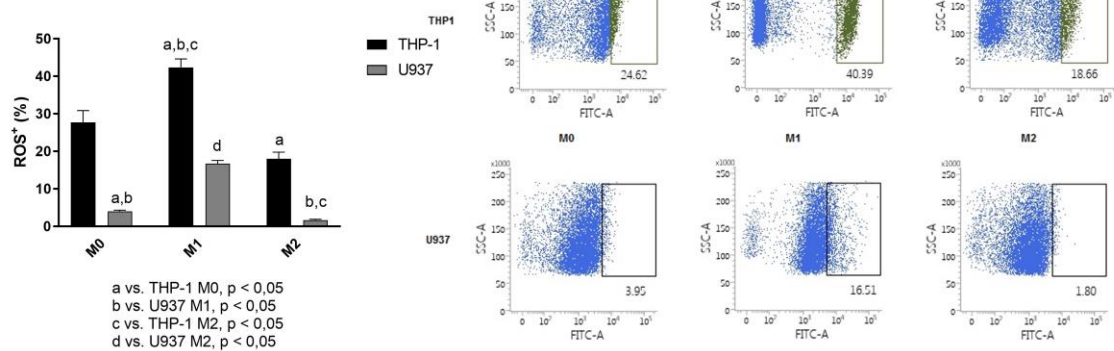
A**B**

Figure 3 – Functional differences of THP-1- and U937-derived macrophages: **(A)** Phagocytic activity of THP-1-derived macrophages is greater than that of U937-derived macrophages. In M1 conditions, phagocytosis is markedly reduced in macrophages derived from both cell lines, and M2 conditions only reduced phagocytosis in U937-derived macrophages. (a) $p < 0.05$ compared with the THP-1 M0 group. (b) $p < 0.05$ compared with the THP-1 M2 group. The dot-plots show the percentage cells realize phagocytosis. The right gate on y-axis corresponds to initial phagocytosis and the left gate represents phagocytosis in final stage. The Dot-plots represented the M0, M1 and M2 phenotype corresponded to THP-1 and U937 line, respectively **(B)** Production of ROS is also higher in THP-1-derived macrophages and in macrophages derived from both THP-1 and U937, M1 conditions increase and M2 conditions decrease the percentage of ROS-producing cells. (a) $p < 0.05$ compared with the THP-1 M0 group. (b) $p < 0.05$ compared with the U937 M1 group. (c) $p < 0.05$ compared with the THP-1 M2 group. (d) $p < 0.05$ compared with the U937 M2 group. The Dot-plots represented the M0, M1 and M2 phenotype corresponded to THP-1 and U937 line, respectively. In both **(A)** and **(B)**, bars represent average and vertical lines the standard deviation of three independent experiments, each acquiring 10,000 events. Representative

dot-plots with gates indicating the percentage of phagocytosing **(A)** or ROS-producing **(B)** cells, according to the monocytic precursor cell line and conditions.

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. Williams 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, Spermentale 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-Mallafré 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.

APÊNDICE A – Material e Método

1 MATERIAL E MÉTODO

1.1 Linhagens Celulares

Foram usadas linhagens celulares monocíticas humanas THP-1 obtida da ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures, cat# TIB-202) e U937, adquirida da American Type Culture Collection (ATCC cat# 1593.2) como precursoras de macrófagos. Ambas linhagens foram mantidas em meio de cultura RPMI1640 (cat# 11875119, Gibco, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) suplementado com 10% (v:v) de Soro Fetal Bovino (FBS) inativado por calor (cat# 12657029, Gibco, ThermoFisher Scientific) e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina- P/S 100 U/mL e 100 µg/mL, respectivamente, cat# 15070063, Gibco, ThermoFisher Scientific). As culturas foram realizadas em incubadora com atmosfera de ar suplementado com 5% de CO₂, à 98% de umidade e temperatura de 37°C.

1.2 Diferenciação das linhagens monocíticas THP-1 e U937 em macrófagos com PMA e M-CSF – Avaliação morfológica e adesão ao substrato de cultura

1.2.1 Morfologia

As linhagens monocíticas U937 e THP-1 foram plaqueadas em câmaras de cultura de 4 poços (4-well culture chamber slides, cat# 354104, Corning), na concentração de 7×10^4 /mL (500 µL/poço). Após 24 horas, 2 poços de cada linhagem foram tratados com forbol-miristil-acetato (10 ng/mL) (PMA, cat# P1585, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) ou com M-CSF (cat# 300-25, Peprotech) nas concentrações de 50 e 100 ng/mL. Nos poços tratados com PMA, a morfologia celular foi avaliada em microscópio invertido (campo claro) após 24 h, momento em que estas células foram lavadas com PBS e foi acrescentado RPMI1640 suplementado com 10% de FBS inativado por calor e 1% de P/S. Após mais 48 h em cultura (72 horas do tratamento com PMA), a morfologia celular foi novamente avaliada em microscópio invertido. Nas células tratadas com M-CSF, a avaliação da morfologia foi feita apenas após 6 dias em cultura, com substituição de 50% do volume original de meio de cultura e do M-CSF aos 3 dias.

1.2.2 Citoesqueleto

Após a obtenção das imagens em campo claro em cada período (24 e 72 h para estímulo com PMA, 6 dias para estímulo com M-CSF), as células foram fixadas por 10 min em formaldeído 4% e permeabilizadas por 15 min em tampão contendo saponina (BD Cytofix/Cytoperm, BD Biosciences). Para visualização do citoesqueleto, as células foram incubadas em solução de 40 nM de faloidina conjugada à fluoróforo (Alexa Fluor™ 488 Phalloidin - A12379 – Thermofisher) por 40 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. O DNA genômico foi marcado por incubação das células com DAPI (2 µg/mL) por 5 minutos à temperatura ambiente. Após extensa lavagem em PBS, foram obtidas imagens em microscópio invertido com fluorescência (Evos fl, AMG Micro) nas magnificações de 100 e 400X em três campos aleatórios

1.3 Diferenciação de Monócitos em Macrófagos

As linhagens monocíticas U937 e THP-1 foram diferenciadas em macrófagos por meio de tratamento com forbol-miristil-acetato (PMA, cat# P1585, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA). Os monócitos foram tratados com PMA na concentração de 10 ng/mL por 24 horas, seguido de remoção do meio, lavagem das células com tampão fosfato (PBS, pH 7.2, cat# 20012-027, Gibco, ThermoFisher Scientific) para remoção de células mortas e não aderidas. Em seguida foi acrescentado RPMI1640 suplementado com 10% de FBS inativado por calor e 1% de antibióticos. Após 48h, as células aderidas foram utilizadas para os experimentos como macrófagos “M0”²⁹. A diferenciação celular foi confirmada pelas alterações nas características fenotípicas de aderência ao substrato de cultura e morfologia celular.

1.4 Estímulos polarizantes M1/M2

Macrófagos foram estimulados ao final do período total de 72 h de diferenciação. O meio de cultura RPMI1640 suplementado foi removido, as células lavadas gentilmente com PBS (pH 7.2) e meio RPMI1640 suplementando com 1% de FBS inativado por calor e 1% de antibióticos foi adicionado às culturas de

macrófagos. A estimulação dos macrófagos foi feita com 100 ng/mL de LPS (lipopolissacarídeos) de *E. coli* (cat# L6529, Sigma-Aldrich, Merck) e 20 ng/mL IFN- γ (Interferon gama, cat# 300-02, Peprotech) para um perfil M1. Para o perfil M2 foram utilizados 20 ng/mL de IL-4 (Interleucina-4, cat# 200-04, Peprotech) e 20 ng/mL de IL-13 (interleucina-13, cat# 200-13, Peprotech,). Os estímulos foram mantidos por 48h. As células foram coletadas para avaliar o perfil fenotípico e expressão gênica e o meio de cultura com as citocinas foi coletado para análise por ELISA. As células coletadas neste período também foram utilizadas nos experimentos funcionais de produção de ROS e fagocitose.

1.5 Expressão gênica

O RNA total foi purificado de lisados celulares preparados ao final do período de 48h de estímulo polarizante utilizando sistema colunas de afinidade (cat# DPK-108LCellco) de acordo com o protocolo do fabricante. A quantificação do RNA total isolado de cada amostra foi realizada em espectrofotômetro de microvolumes (NanoVue Plus, GE Healthcare), por meio da avaliação da absorbância em 260 nm. A pureza da suspensão de RNA foi avaliada pela relação entre as absorbâncias obtidas em 260 e 280 nm, a qual deveria estar entre 1,8 a 2,0. A síntese do DNA complementar (cDNA) foi feita utilizando 500 ng de RNA total, utilizando random hexamers como primers e a enzima sintética transcriptase reversa segundo as instruções do fornecedor dos reagentes (High capacity cDNA reverse transcription kit, cat# 4368814, Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific).

A detecção dos genes-alvo de interesse por PCR em tempo real (qPCR) foi feita utilizando o sistema SYBR Green e as sequências de oligonucleotídeos apresentados na Tabela 1, obtidas do banco de primers online da Universidade de Harvard (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>). Após otimização, os primers foram utilizados na concentração final de 600 nM, e as reações de amplificação realizadas em volume final de 10 μ L (1 μ L de cDNA) utilizando master mix do sistema SYBR Green (PowerUp SYBR Green, cat# A25779, Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific), segundo as orientações do fornecedor do reagente. As reações foram realizadas em termocicladora de qPCR (StepOne Plus, Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) nas seguintes condições: 2 minutos a 50 °C, 2 minutos a 95 °C, 45 ciclos com 2 estágios de 3 segundos a 95 °C e 30 segundos a

60 °C por ciclo. A expressão dos genes-alvo de interesse foi normalizada usando o gene constitutivo (não alterado pelas condições experimentais) GAPDH, e os dados apresentados como quantificação relativa, ΔCT , calculados utilizando o software da termocicladora.

Tabela A1- Sequência (‘‘S’’-sense; ‘‘AS’’-anti-sense) dos *primers* utilizados para avaliação da expressão gênica por RT-qPCR.

Gene	Transcript	Sequence (5'-3')
GAPDH	NM_002046.7	S- ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG AS-GCCATCACGCCACAGTTT C
IL10	NM_000572.3	S – GGCACCCAGTCTGAGAACAG AS – ACTCTGCTGAAGGCATCTCG
TNF	NM_000594.4	S – GCTGCACTTTGGAGTGATCG AS – TCACTCGGGGTTTCGAGAAGA
IL6	NM_000600.5	S- CCTGAACCTTCCAAAGATGGC AS- TTCACCAGGCAAGTCTCCTCA
Arg1	NM_000045.4	S- GTGGAAACTTGCATGGACAAC AS- AATCCTGGCACATCGGGAATC

Fonte: Autoria própria

1.6 Atividade fagocítica

As linhagens celulares U937 e THP-1 foram plaqueadas na concentração 1×10^6 /mL em placa de 48 poços e diferenciadas com PMA como descrito anteriormente. Após 72 h, as células receberam o mesmo volume de veículo PBS (MO), ou foram estimuladas com LPS + IFN (M1) ou IL-4 + IL-13 (M2). Ao final das 48 horas de estímulo, foram adicionados 8 uL de partículas de látex fluorescentes de 2 μ m de diâmetro (Latex beads, cat# L4530, Sigma-Aldrich, Merck) em cada poço, seguido de incubação a 37 C por 30 minutos ao abrigo da luz (condições baseadas em otimização experimental - dados não apresentados). Após a incubação, as células foram dissociadas com solução enzimática (Accutase, cat# A1110501, Gibco, ThermoFisher Scientific), lavadas com PBS e ressuspensas em tampão de marcação de citometria (tampão fosfato – PBS pH 7.2 – suplementado com 2% vol:vol de FBS inativado por calor). Um poço de cada linhagem celular não tratado com partículas de látex foi usado como controle negativo e de auto-fluorescência, e a atividade fagocítica foi avaliada por citometria de fluxo (BD FACS Verse, BD

Biosciences), avaliando o percentual de eventos (células viáveis) apresentando fluorescência no canal FL1 (FITC). O experimento foi realizado em triplicata.

1.7 Produção de ROS

Células THP-1 e U937 foram semeadas em placas de 12 poços na concentração de 5×10^5 /mL e foram diferenciadas com PMA, seguindo-se o estímulo para polarização “M0” (controle veículo), “M1” e “M2” como descrito anteriormente. Após as 48 horas do estímulo, o meio de cultura foi removido e foi adicionado o substrato CM-H2DCFDA (cat# C6827, Invitrogen, ThermoFisher Scientific) diluído em PBS, seguindo-se um período de incubação de 30 minutos a 37°C ao abrigo da luz para internalização do substrato. Este composto é oxidado por ROS presente no meio intracelular e o resultado da reação emite fluorescência no canal FL1 (FITC) quando excitado por laser de 488 nm. Após esta incubação, as células foram dissociadas enzimaticamente, lavadas com PBS e ressuspensas em tampão de marcação de citometria. A presença de espécies reativa de oxigênio no citoplasma celular foi avaliada por citometria de fluxo, sendo a intensidade de fluorescência proporcional à extensão da oxidação do substrato, a qual é relacionada à quantidade de ROS produzida pelas células. Controles negativos de auto-fluorescência foram feitos com células diferenciadas e estimuladas em paralelo, porém incubadas em PBS sem o substrato CM-H2DCFDA. O experimento foi feito em triplicata.

1.8 Secreção de citocinas

A produção de IL-1 β (Interleucina-1 β) e IL-6 (Interleucina-6) pelos macrófagos derivados das linhagens THP-1 e U937 segundo as condições de estímulo experimental foi avaliada no meio de cultura utilizando ensaios ELISA sanduíche e os dados obtidos em leitora de microplacas UV/Vis com monocromador (Spectramax L, Molecular Devices), segundo o protocolo do fornecedor dos reagentes (Peprotech Inc.). Os resultados dos ensaios foram normalizados pela quantidade de proteína total presente (determinada por ensaio de fluorescência) e apresentados em pg/mL da citocina-alvo por μ g de proteína total da amostra.

1.9 Análise estatística

Os dados obtidos de cada experimento foram analisados utilizando o GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Ind., San Diego, CA, EUA). O objetivo da análise foi comparar os resultados entre macrófagos derivados das duas diferentes linhagens precursoras (THP-1 e U937), considerando as mesmas condições experimentais (M0, M1 e M2); e também comparar os resultados entre cada condição experimental (M0, M1 e M2) em macrófagos derivados de uma mesma linhagem precursora (THP-1 e U937). O nível de significância foi fixado em 95% ($p < 0,05$) em todas as análises.

**Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data de
defesa**

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 03 de março de 2022.

Camyla Rodrigues Nascimento