

Diferenciação macrofágica induzida por soro hiperimune COVID-19

Macrophage differentiation induced by COVID-19 hyperimmune serum

Gabriela Ruva Fagundes

Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG – Ponta Grossa – Brasil
gabi.fr2609@gmail.com

Larissa Glugoski

Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG – Ponta Grossa – Brasil
larissaglugoski23@gmail.com

Marcelo Ricardo Vicari

Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG – Ponta Grossa – Brasil
vicarimr@uepg.br

Raylan Golinski Costa

Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná – HEMEPAR – Ponta Grossa – Brasil
raylan-costa@hotmail.com

Angelo César D'Urso Panerari

Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG – Ponta Grossa – Brasil
panerariangelo@hotmail.com

Orlei José Domingues Soares

Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG – Ponta Grossa – Brasil
oidsoares@uepg.br

Bruno Ribeiro Cruz

Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG – Ponta Grossa – Brasil
bracruz@uepg.br

Giovani Marino Favero

Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG – Ponta Grossa – Brasil
gmfavero@uepg.br

Resumo

Os monócitos no sangue periférico exibem heterogeneidade morfológica, antigênica e funcional. Existem diferentes subpopulações de monócitos com base em suas características. Os monócitos podem se diferenciar em macrófagos, que são células mieloides altamente heterogêneas com papéis específicos na resposta imune e na proteção dos tecidos. Os macrófagos desempenham funções como fagocitose, apresentação de antígenos e ativação das células T. Eles têm receptores de superfície celular que interagem com uma ampla gama de moléculas e desempenham diferentes funções, como diferenciação, migração e ativação. Dependendo dos estímulos ambientais, os macrófagos podem ser polarizados para diferentes subtipos: M1 e M2. A cultura celular de linhagens macrofágicas foi realizada em meio de cultura específico, e o teste de citotoxicidade foi feito para avaliar os efeitos de diferentes substâncias nos

macrófagos juntamente com técnicas de biologia molecular avaliando o perfil fenotípico. Em resumo, o estudo demonstrou que os tratamentos com Plasma Hiperimune têm um impacto favorável na expressão gênica de macrófagos, favorecendo um perfil M2 anti-inflamatório. Isso é caracterizado pela regulação positiva dos genes IL-10 e Mcr1, conhecidos por suas propriedades anti-inflamatórias e reparadoras de tecidos, enquanto os genes pró-inflamatórios associados a M1, INos e Arg, são regulados negativamente. Esses achados destacam o potencial valor terapêutico do Plasma Hiperimune na modulação da resposta imune e na promoção de um ambiente antiinflamatório em condições patológicas.

Palavras-chave: macrófagos, plasma hiperimune, biologia molecular, SARS-CoV-2.

Abstract

Monocytes in peripheral blood exhibit morphological, antigenic, and functional heterogeneity. There are different subpopulations of monocytes based on their characteristics. Monocytes can differentiate into macrophages, which are highly heterogeneous myeloid cells with specific roles in the immune response and tissue protection. Macrophages perform functions such as phagocytosis, antigen presentation and T cell activation. They have cell surface receptors that interact with a wide range of molecules and perform different functions such as differentiation, migration and activation. Depending on the environmental stimuli, macrophages can be polarized to different subtypes: M1 and M2. Cell culture of macrophage strains was performed in a specific culture medium, and the cytotoxicity test was performed to evaluate the effects of different substances on macrophages, together with molecular biology techniques, evaluating the phenotypic profile. In summary, the study demonstrated that Hyperimmune Plasma treatments have a favorable impact on macrophage gene expression, favoring an anti-inflammatory M2 profile. This is characterized by the upregulation of the IL-10 and Mcr1 genes, known for their anti-inflammatory and tissue repairing properties, while the M1-associated pro-inflammatory genes, INos and Arg, are downregulated. These findings highlight the potential therapeutic value of Hyperimmune Plasma in modulating the immune response and promoting an anti-inflammatory environment in pathological conditions.

Keywords: macrophages, hyperimmune plasma, molecular biology, SARS-CoV-2.

1. Introdução

Os monócitos no sangue periférico exibem heterogeneidade morfológica, antigênica e funcional. Existem diferentes subpopulações de monócitos que podem ser distinguidas com base em suas características. Em relação à heterogeneidade antigênica, os monócitos podem ser classificados em diferentes subpopulações com base na expressão de moléculas de superfície celular. Os monócitos liberados na corrente sanguínea podem se diferenciar em macrófagos (GORDON; TAYLOR, 2005).

Os macrófagos são células mieloide altamente heterogêneas que desempenham um papel específico e importante em diversos ambientes infecciosos. São essenciais para manter a homeostase fisiológica dos tecidos e proteger o organismo (ORECCHIONI et al., 2019). Canonicamente, sua função primária é ingerir e destruir microrganismos, além de remover tecidos danificados, ação na qual é facilitada devido sua ampla distribuição nos tecidos e órgãos do organismo (CRUVINEL et al., 2010, HERRE et al., 2004). Além disso, os macrófagos desempenham funções essenciais, como a apresentação de antígenos (células APCs, antigen-presenting cells), ativando as células T. Isso é importante para a ativação da fase efetora das respostas imunes mediadas por células T (CRUVINEL et al., 2010).Essas células têm um impacto significativo no

desenvolvimento de doenças infecciosas, câncer e doenças inflamatórias crônicas, sendo amplamente reconhecidas como componentes essenciais da imunidade inata (ALLAVENA et al., 2005, ANAYA et al., 2012)

Conforme mencionado previamente, os receptores macrófagos presentes na superfície celular apresentam uma notável diversidade funcional. Esses receptores desempenham diversas funções, como diferenciação fenotípica, fagocitose, migração, adesão, ativação e desenvolvimento da toxicidade. (TAKESUE et al., 2023, TAYLOR et al., 2005). Além disso, eles têm a capacidade de interagir com uma ampla gama de moléculas, exibindo diferentes níveis de afinidade. Essa característica permite que os receptores atuem em ambientes complexos e específicos. Consequentemente, as células mieloides têm a capacidade de reconhecer microrganismos, fatores de coagulação, proteínas, hormônios, citocinas e células cancerígenas. A presença diversificada de diferentes famílias de receptores têm um impacto direto na resposta macrofágica (WOODS; LU; LOWDER, 2000, MACHADO et al., 2004).

Os macrófagos possuem receptores pertencentes à família Toll-Like (TLR), os quais estão amplamente distribuídos na membrana celular. Os diferentes tipos de receptores TLR desempenham um papel crucial na ativação de vias de sinalização e no reconhecimento de microrganismos, como bactérias, fungos, protozoários e vírus (HIRSCHFELD et al., 2001, PETERS et al., 1995, GOLDMAN, 2007). O receptor TLR2 exibe a capacidade de detectar estímulos derivados de componentes microbianos, incluindo o peptidoglicano e o ácido lipoteicoico presentes em bactérias gram-positivas. Por sua vez, o TLR3 possui a capacidade de reconhecer o RNA dupla fita (dsRNA) viral, enquanto o TLR4 é capaz de reconhecer o lipopolissacarídeo (LPS), um componente essencial da parede celular bacteriana. Além disso, o receptor TLR5 reconhece a flagelina, uma proteína que constitui o principal componente dos flagelos bacterianos. Já a interação entre o TLR6 e o receptor TLR2 permite o reconhecimento de lipoproteínas. Por sua vez, os receptores TLR7 e TLR8 atuam em conjunto para reconhecer o RNA de fita simples (ssRNA) viral. Por fim, o TLR9 é responsável pelo reconhecimento do DNA (TAKEDA; AKIRA, 2005, HIRSCHFELD et al., 2001, SUGANAMI et al., 2007, FERRAZ et al., 2023).

Através dos receptores pré-citados, os macrófagos podem ser ativados para desempenhar diversas funções em resposta a diferentes estímulos no ambiente extracelular. Esses estímulos são desempenhados pelas moléculas ativadoras que se ligam a receptores específicos expressos na superfície dos macrófagos. (MILLS et al., 2000). Dependendo dos estímulos ambientais aos quais são expostos, os macrófagos adquirem capacidades funcionais distintas. Por expressarem tal repertório múltiplo de receptores, a sua atividade de polarização pode ser potencializada por meio da alteração dos marcadores de superfície celular (MOSSER et al., 2008).

Os macrófagos possuem a capacidade de serem ativados por duas vias distintas: a via clássica e a via alternativa, resultando na geração de macrófagos com diferentes fenótipos e funcionalidades. A ativação dessas vias é crucial para o funcionamento eficiente do sistema imunológico, exigindo a manutenção de um equilíbrio constante entre elas (THEERAWUT et al., 2014).

Existem dois subtipos principais de macrófagos ativados: os M1 e os M2. Os macrófagos M1, classificados como ativados, desempenham papel na proteção contra agentes patogênicos e células cancerígenas. São polarizados pela ação de lipopolissacarídeos (LPS) e citocinas Th1, como o interferon-gama (IFN- γ) e TNF- α (HIRAYAMA; IIDA; NAKASE, 2017). Esses estímulos ativam vias de sinalização que levam à polarização dos macrófagos para o estado M1.. Essa via clássica promove a ativação da transcrição de fator nuclear kB e proteína de ativação 1 (AP-1), juntamente com o fator de transcrição STAT1. Esses fatores estimulam várias enzimas, incluindo a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (O'NEILL; PEARCE, 2016). A óxido nítrico sintase

induzível (iNOS) é uma enzima produzida pelos macrófagos M1 em resposta à ativação. A iNOS catalisa a produção de óxido nítrico (NO), que tem propriedades microbicidas e pró-inflamatórias, resultando na produção de enzimas lisossômicas e pró-citocinas inflamatórias, como IL-6, IL-2, IL-23, α -TNF, IL-1 β e CXCL10 (JHA et al., 2015, CERQUEIRA et al., 2010). Essas citocinas desempenham um papel importante na amplificação da resposta imune, na inflamação e na ativação de outras células do sistema imunológico, caracterizando sua resposta pró-inflamatória (SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018).

O outro subtipo são os macrófagos ativados alternativamente, também conhecidos como M2, são importantes para resolução da inflamação. Esses macrófagos são polarizados por estímulos das citocinas IL-4, IL-13, IL-10 ou corticosteroides, podendo ter influência de TGF- β ("transforming growth factor-beta") e de PGE2 (prostaglandina E2). Essas citocinas desencadeiam uma via de sinalização intracelular que leva à polarização dos macrófagos para o estado M2. São classificados como anti-inflamatórios e imunorreguladores, devido à produção de interleucinas IL-10, IL-1ra, IL4 e IL13 quimiocinas CCL17 e CCL22 e TGF- β (BENTO, 2020). Essas citocinas são conhecidas por sua capacidade de suprimir a resposta inflamatória e modular a atividade do sistema imunológico. A IL-10, por exemplo, inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias e diminui a ativação de células imunes, enquanto o TGF- β é importante na regulação da resposta imune e na modulação da cicatrização de tecidos (ZHANG et al., 2019, ORECCHIONI et al., 2019, LOCATI; CURTALE; MANTOVANI, 2020).

As células ativadas por via alternativa podem se diferenciar em três subtipos distintos quando estimulados por diferentes fatores. Os macrófagos M2a são ativados pelas citocinas IL-4 e IL-13, desempenhando funções na resposta imunológica adaptativa, cicatrização de feridas e resolução da inflamação. Os macrófagos M2b são ativados por complexos imunes e ligantes TLR, estando envolvidos na regulação da resposta imune e modulação da resposta inflamatória. Já os macrófagos M2c são ativados pelas citocinas IL-10 e glucocorticoides, relacionando-se com a supressão da inflamação e resolução dos processos inflamatórios. Esses subtipos desempenham papéis específicos na regulação do sistema imunológico e na manutenção da homeostase do organismo (OBEID et al., 2013, GORDON; TAYLOR, 2005, MIRON et al., 2013).

O Sars-CoV-2 é um vírus altamente contagioso e patogênico, que desencadeia uma resposta inflamatória no organismo. Essa doença respiratória é caracterizada pela liberação exponencial de interleucinas (IL-6, IL-2, IL-7, IL-10) e por processos inflamatórios envolvendo a produção de MCP-1 e MIP-1 α , substâncias relacionadas aos macrófagos. Essa tempestade de citocinas contribui para a gravidade da doença (XAVIER et al., 2020, TONG et al., 2020).

Durante a pandemia, o plasma hiperimune de pacientes recuperados da COVID-19 tem sido estudado como uma opção terapêutica. Esse plasma contém níveis elevados de anticorpos específicos para o Sars-CoV-2, capazes de neutralizar o vírus e auxiliar na eliminação da infecção. Além disso, o plasma hiperimune pode modular a resposta imunológica, atuando sobre antígenos e reduzindo a produção exagerada de proteínas inflamatórias, como a C-reativa, uma proteína de fase aguda (HU et al., 2020, HIRAYAMA; IIDA; NAKASE, 2017, JHA et al., 2015).

Os macrófagos desempenham um papel fundamental na resposta imunológica contra o Sars-CoV-2. Eles reconhecem o vírus por meio de receptores como os TLRs (receptores tipo Toll) e iniciam uma resposta inflamatória para combater a infecção. Essa resposta inclui a produção das citocinas pró-inflamatórias mencionadas anteriormente, que recrutam e ativam outras células do sistema imunológico para combater o vírus. HIRSCHFELD et al., 2001, FERRAZ et al., 2023).

No entanto, em casos graves de COVID-19, ocorre uma resposta imunológica desregulada, conhecida como tempestade de citocinas, na qual há uma liberação

excessiva e descontrolada de citocinas pró-inflamatórias. Isso pode levar a danos generalizados nos tecidos, inflamação exacerbada e agravamento dos sintomas

Portanto, o uso do plasma hiperimune de pacientes convalescentes tem sido investigado como uma possível terapia, pois ele contém anticorpos neutralizantes específicos para o Sars-CoV-2, que podem ajudar a neutralizar o vírus e limitar a propagação da infecção. Além disso, o plasma hiperimune pode modular a resposta inflamatória desregulada, incluindo a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos e outras células do sistema imunológico

2. Metodologia

2.1. Cultura Celular

As linhagens macrofágicas serão cultivadas em meio de cultura RPMI 1640; suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e complementados com uma mistura de antibióticos a 1% (v/v) de penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 ug/mL. Após serão acondicionadas em garrafas estéreis de cultivo celular de 125 cm e serão mantidas em estufa a 37°C com uma atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂). A linhagem de células macrofágicas serão plaqueadas em poços em quantidade 4x10⁴ totalizando 2mL por unidade. Aos poços será adicionado concentrações distintas de plasma rico em plaquetas e hiperimune pós infecção pelo Sars-CoV-2.

2.2. Teste de citotoxicidade pelo método MTT

O teste de citotoxicidade pelo método MTT será realizado com o soro fetal bovino, plasma hiperimune e plasma rico em plaquetas. Para cada um dos substratos, as células J774 serão plaqueadas em quantidade 4x10⁴ em placas de 96 poços, sendo estas mantidas em condição de cultura, com meio de cultura RPMI, suplementados com 10% de substrato, e antibiótico, em triplicatas.

2.3. Síntese cDNA

A síntese do cDNA da linhagem celular macrofágica J774 será realizada a partir da conversão enzimática de mRNA, originada da uma transcriptase reversa dependente do RNA extraído da célula. A síntese será feita de acordo com as instruções do fabricante (kit GoTaq® Probe 2-Step RT-qPCR System).

2.4. RT-PCR:

A reação de PCR será realizada em volume correspondente ao da amostra contendo o cDNA, tampão de PCR (10x), MgCl₂, dNTPs, primers ISSR, enzima taq polimerase e água ultrapura em concentrações conforme a necessidade sequencia de primers ISSR.

Tabela 1: Sequências de primers ISSR

Nome	Sequência (5'-3')
Act_b_rat_fw	GGCTGTATTCCCCTCCATCG
Act_b_rv	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
Arg1_rat_fw	CATTGGCTTGCGAGACGTAGAC

Arg1_rat_rv	GCTGAAGGTCTCTCCATCACC
IL10_rat_fw	CGGGAAGAACAATAACTGCACCC
IL10_rat_rv	CGGTTAGCAGTATGTTGTCCAGC
iNOS_rat_fw	GAGACAGGGAAGTCTGAAGCAC
iNOS_rat_rv	CCAGCAGTAGTTGCTCCTCTTC
Mrc1_rat_fw	GTTACCTGGAGTGATGGTTCTC
Mrc1_rat_rv	AGGACATGCCAGGGTCACCTTT
Rpl32_rat_fw	GCCTCTGGTGAACCCAAG
Rpl32_rat_rv	TTGTTGCTCCCATAACCGATGT

Fonte: Autores

3. Resultados

Nota-se que a quantidade de RNA corrigido por meio dos controles internos ACTb e RP132 indicou que os tratamentos com Plasma Hiperimune estimulam a expressão dos genes IL-10 e Mrc1 de maneira superior aos genes INos e Arg. Isso é consistente com um perfil anti-inflamatório M2 macrófago

O gene IL-10 é usualmente conhecido por sua função na reguladora da resposta imune e tem propriedades anti-inflamatórias. Sua expressão aumentada sugere um efeito supressor da inflamação. O gene Mrc1 está associado à ativação de macrófagos M2, que também têm uma função anti-inflamatória e são responsáveis por promover a reparação dos tecidos. Por outro lado, a expressão reduzida dos genes INos e Arg é interessante, pois ambos estão associados ao perfil inflamatório M1 macrófago.

Portanto, os resultados sugerem que os tratamentos com Plasma Hiperimune, de pacientes pós-covid, têm a capacidade de promover um perfil anti-inflamatório M2 macrófago, caracterizado pelo aumento da expressão dos genes IL-10 e Mrc1 e a redução dos genes INos e Arg. Isso pode ser relevante para a modulação da resposta inflamatória e abranger potencialmente um benefício em condições patológicas.

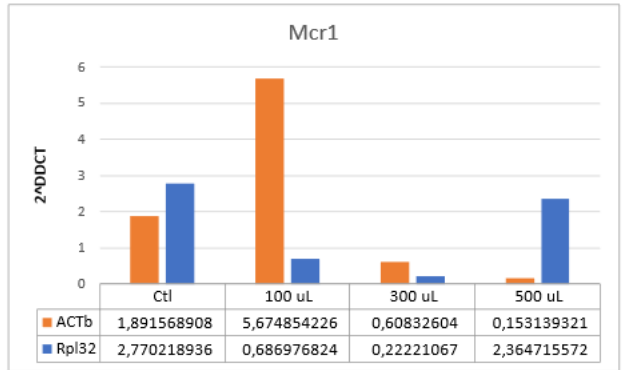
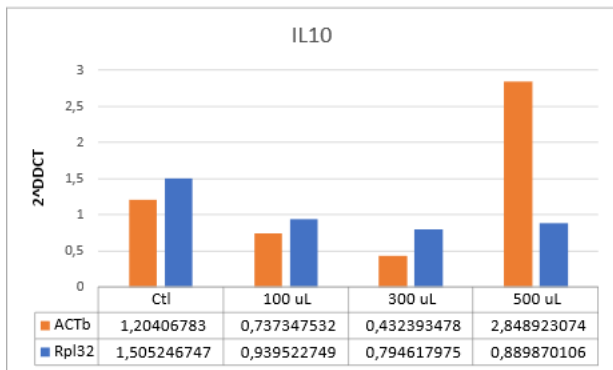
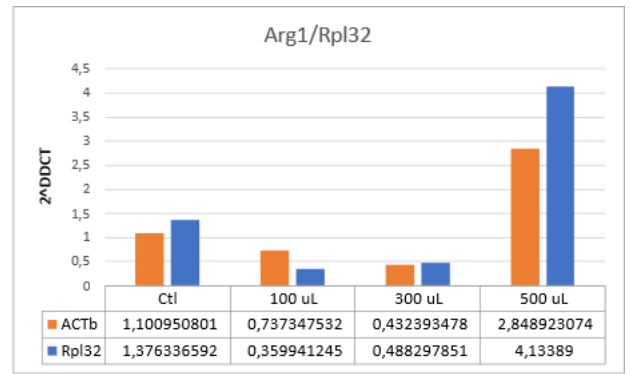
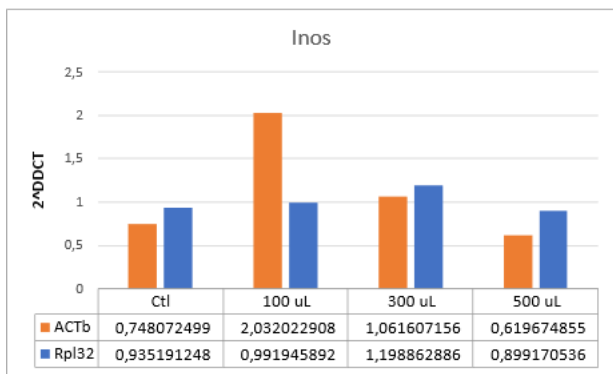


Figura 1: Análise da expressão gênica em macrófagos J774 após estímulo com soro hiperimune de pacientes pós covid-19.

4. Discussão

O soro hiperimune é um produto derivado do sangue de pessoas que se recuperaram de uma determinada doença infecciosa, nesse caso a COVID-19, contendo anticorpos específicos contra o vírus. Os anticorpos presentes no soro têm a capacidade de se ligar ao vírus e neutralizá-lo, ajudando a reduzir a replicação viral e a gravidade da infecção. No entanto, é importante destacar que a eficácia do soro hiperimune pode variar dependendo de fatores como o estágio da doença e a presença de variantes do vírus.

A diferenciação de macrófagos pode ser influenciada por vários estímulos, incluindo a presença de agentes infecciosos. Durante a infecção por SARS-CoV-2, os macrófagos são ativados e recrutados para os locais de infecção, onde desempenham um papel na eliminação do vírus e na resolução da inflamação.

No entanto, estudos recentes também mostraram que o SARS-CoV-2 pode manipular a resposta dos macrófagos para promover a replicação viral e uma resposta inflamatória desregulada. A plasticidade dos macrófagos permite que eles apresentem diferentes fenótipos funcionais, podendo ser pró-inflamatórios (M1) ou anti-inflamatórios/regenerativos (M2). A desregulação dessa diferenciação pode contribuir para a gravidade da doença em alguns pacientes.

Compreender e modular a diferenciação de macrófagos pode ser importante para o desenvolvimento de terapias mais eficazes para a COVID-19. Estratégias que promovam a diferenciação de macrófagos em um fenótipo anti-inflamatório/regenerativo podem ajudar a reduzir a resposta inflamatória exacerbada observada em casos graves da doença.

Nesse estudo inicial observamos uma predominância em diferenciação para a forma antiinflamatória dos macrófagos.

Referências

ALLAVENA, P. et al. Anti-inflammatory Properties of the Novel Antitumor Agent Yondelis (Trabectedin): Inhibition of Macrophage Differentiation and Cytokine Production. **Cancer Research**, v. 65, n. 7, p. 2964–2971, apr. 2005.

ANAYA, J. et al. Common mechanisms of autoimmune diseases (the autoimmune tautology). **Autoimmunity Reviews**, v. 11, n. 11, p. 781–784, sep. 2012.

ANDERSON, A. et al. 7-Ketocholesterol in disease and aging. **Redox Biology**, v. 29, p. 101380, jan. 2020.

ARTYOMOV, et al. Integrating immunometabolism and macrophage diversity. **Seminars in Immunology**, v. 28, n. 5, p. 417–424, oct. 2016.

BENTO, C. A. A influência de diferentes polarizações de macrófagos e do receptor P2X7 na invasividade e resistência de neuroblastoma. 2020. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

BROWN, A. J.; DEAN, R. T.; JESSUP, W. Free and esterified oxysterol: formation during copper-oxidation of low density lipoprotein and uptake by macrophages. **Journal of Lipid Research**, v. 37, n. 2, p. 320–335, feb. 1996.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2010.

CRUVINEL, W. M. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434–447, ago. 2010.

FERRAZ, Eduardo Gomes. et al. Receptores Toll-Like: ativação e regulação da resposta imune. **RGO.Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 59, n. 3, p. 483–490, 2023.

GOLDMAN, Michel. Translational Mini-Review Series on Toll-like Receptors: Toll-like receptor ligands as novel pharmaceuticals for allergic disorders. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 147, n. 2, p. 208–216, 2007.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 12, p. 953–964, dec. 2005.

HERRE, J. et al. Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. **Blood**, v. 104, n. 13, p. 4038–4045, dec. 2004.

HIRAYAMA, D.; IIDA, T.; NAKASE, H. The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 92, dec. 2017.

HIRSCHFELD, M. et al. Signaling by Toll-Like Receptor 2 and 4 Agonists Results in Differential Gene Expression in Murine Macrophages. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1477–1482, mar. 2001.

- HU, B. et al. Characteristics of SARS-COV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, p. 1–14, oct. 2020.
- JHA, A. K. et al. Network Integration of Parallel Metabolic and Transcriptional Data Reveals Metabolic Modules that Regulate Macrophage Polarization. **Immunity**, v. 42, n. 3, p. 419–430, mar. 2015.
- LOCATI, M.; CURTALE, G.; MANTOVANI, A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 15, p. 123-147, 2020.
- O'NEILL L. A. J.; PEARCE, E. J. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. **Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 1, p. 15–23, jan. 2016.
- MACHADO, P. L. R. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647–662, 2004.
- MILLS, C. D. et. al. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6166–6173, jun. 2000.
- MIRON, V. E. et al. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. **Nature Neuroscience**, v. 16, n. 9, p. 1211–1218, sep. 2013.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–969, dec. 2008.
- OBEID, E. et al. The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression. **Histology and Histopathology**, v. 43, n. 1, p. 5–12, july 2013.
- ORECCHIONI, M. et al. Macrophage polarization: different gene signatures in M1 (LPS+) vs. classically and M2 (LPS-) vs. alternatively activated macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1084, 2019.
- PETERS, Christopher L. et al. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. 12, p. 3715–3724, 1995.
- SHAPOURI-MOGHADDAM, A. et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 9, p. 6425-6440, 2018.
- SUGANAMI, T. et al. Role of the Toll-like Receptor 4/NF-κB Pathway in Saturated Fatty Acid-Induced Inflammatory Changes in the Interaction Between Adipocytes and Macrophages. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, n. 1, p. 84–91, 2007.
- TAKEDA, Kiyoshi; SHIZUO, Akira. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2005.
- TAKESUE Y et al. [Antiinfective host defense mechanism: toll-like receptors and innate immunity]. **Nihon Geka Gakkai Zasshi**, v. 104, n. 7, jul. 2023.

TAYLOR, P. R. et al. Macrophage receptors and immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 901–944, 2005.

THEERAWUT, C. et al. Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. **Cancers (Basel)**, v. 6, n. 3, p. 1670–1690, aug. 2014.

TONG, M et al. Elevated Expression of Serum Endothelial Cell Adhesion Molecules in COVID-19 Patients. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 222, n. 6, p. 894–898, aug. 2020.

WOODS, J. A.; LU, Q; LOWDER, T. Exercise-induced modulation of macrophage function. **Immunology & Cell Biology**, v. 78, n. 5, p. 545–553, oct. 2000.

XAVIER, A. R. et al. COVID-19: manifestações clínicas e laboratoriais na infecção pelo novo coronavírus. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 56, 2020.

ZHANG, W. et al. Lipopolysaccharide mediates time-dependent macrophage M1/M2 polarization through the Tim-3/Galectin-9 signaling pathway. **Experimental Cell Research**, v. 376, n. 2, p. 124-132, 2019.