



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA**  
**CELULAR**

**AÇÃO DO METABÓLITO SECUNDÁRIO 5-HIDROXI-2-HIDROXIMETIL GAMAPIRONA ISOLADO DE FUNGOS DO GÊNERO *ASPERGILLUS* SOBRE MONÓCITOS HUMANOS *IN VITRO*.**

**JOSINEIDE PANTOJA DA COSTA**

**Bióloga**

**BELÉM-PARÁ-BRASIL**  
**2012**

**AÇÃO DO METABÓLITO SECUNDÁRIO 5-HIDROXI-2-HIDROXIMETIL GAMAPIRONA ISOLADO DE FUNGOS DO GÊNERO *ASPERGILLUS* SOBRE MONÓCITOS HUMANOS *IN VITRO*.**

**JOSINEIDE PANTOJA DA COSTA**

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Curso de Mestrado, no Instituto de Ciências Biológicas.

Prof<sup>a</sup>. Dr. Edilene Oliveira da Silva- Orientadora

**BELÉM-PARÁ-BRASIL  
2012**

**AÇÃO DO METABÓLITO SECUNDÁRIO 5-HIDROXI-2-HIDROXIMETIL GAMAPIRONA ISOLADO DE FUNGOS DO GÊNERO *ASPERGILLUS* SOBRE MONÓCITOS HUMANOS *IN VITRO*.**

**Por**

**JOSINEIDE PANTOJA DA COSTA**

Orientadora: **Prof<sup>a</sup>. Dr. Edilene Oliveira da Silva**

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Curso de Mestrado, no Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, sob avaliação da seguinte banca:

Membro: **Prof. Dr. José Antônio Picanço Diniz.**

Instituto Evandro Chagas-IEC

Membro: **Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta.**

Universidade Estadual do Norte Fluminense-UENF

Suplente: **Prof. Dr. José Luis Martins do Nascimento.**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFPA

**Belém- PARÁ 15 de junho de 2012.**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia e de Biologia Estrutural (LBE) do Instituto de Ciências Biológicas, em colaboração com o Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos do Instituto de Ciências Exatas e Naturais, ambos na Universidade Federal do Pará, com suporte financeiro das seguintes agências: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e do Projeto de Cooperação Interinstitucional em Neurociências e Biologia Celular em Modelos Experimentais de Interesse na Região Amazônica e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem – Instituto do Milênio (INCTBEB de Biologia).

*“A coisa mais perfeita que podemos experimentar é o misterioso. É a fonte de toda arte e de toda ciência verdadeira”.*

*(Albert Einstein)*

Ao maravilhoso e glorioso DEUS, que foi minha grande fortaleza  
nessa grande jornada.

Ao meu esposo Hélio Jr, por todo amor e compreensão durante os  
anos em que me ausentei.

À minha mãe por todo apoio e carinho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu maravilhoso e misericordioso Deus, que me ensinou durante toda minha jornada de mestranda que os percalços e obstáculos que a vida nos impõe, nos mostram o quanto somos fortes e capazes de chegar onde queremos, quando acreditamos que PODEMOS! Amo-te meu Senhor, tu és minha fortaleza!

Ao meu esposo Hélio Jr, meu grande amor, pelo carinho, dedicação, e pela imensurável compreensão que você teve comigo durante esses dois anos de grande ausência. Todas as vezes que entrava no ônibus e via seu rosto entristecido por me ver partir rumo à Belém, meu coração apertava e acompanhava seu sofrimento. Muito obrigada meu amor, por ser esse homem tão maravilhoso.

Aos meus queridos pais Fátima e João, que se enchem de orgulho da filha que de origem humilde, conseguiu alcançar seus maiores sonhos e VENCER na vida!

À minha sogra e segunda mãe Irene, por todo carinho, apoio, força e pela sua grande fé de que no final como você sempre dizia “tudo daria certo”. Agradeço imensamente tudo o que você fez por mim!

Aos meus amados sobrinhos Mayra, Marcos, Emmilly, Jhon, Jully e Amanda, que sempre me trouxeram muita alegria, principalmente nos momentos mais difíceis!

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Edilene pela oportunidade que me concedeu aceitando-me como sua aluna e como integrante de seu grupo de pesquisa. Obrigada professora por ter acreditado em mim!

Ao professor José Luiz, por todo apoio que me concedeu no decorrer de minha pesquisa.

Ao HEMOPA e a todos os doadores de sangue. Vocês foram de fundamental importância para que fosse possível a realização desta pesquisa!

Ao Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos, por fornecer o metabólito utilizado neste estudo.

À Paula Frade e Bruno Martins, pelas incontáveis contribuições nos experimentos, gráficos, pranchas, enfim, por toda ajuda que me forneceram em minha pesquisa e por me confortarem em meus vários momentos de desespero! Jamais esquecerei todo tempo que vocês dedicaram a mim e ao meu trabalho!

À Raquel Raick e Amanda Hage por todos os ensinamentos nos experimentos, e principalmente pela grande amizade que construímos. Não sei se teria conseguido finalizar minha jornada sem o apoio de vocês. Vou carregar vocês sempre em meu coração!

Aos meus queridos colegas Rodrigo, Caroline, Camila, Jorge e Davi por todos os momentos de atenção e descontração ao longo dos dois anos que passei com vocês.

À Ana Paula, que por toda ajuda nos experimentos e orientação em minhas intermináveis dúvidas! Obrigada por todo tempo que você dedicou ao meu trabalho, até mesmo nos momentos mais inusitados, como quando você estava no topo do vulcão no Chile!

Ao Luís Henrique, que foi a primeira pessoa de nosso grupo que conheci. Obrigada por toda ajuda que você me forneceu até mesmo nos finais de semana.

À Fernanda do LBE por todo apoio que me forneceu ao longo deste trabalho com minhas inúmeras amostras para Microscopia Eletrônica de Transmissão!

À Neidiane do Laboratório de Neuroquímica, por todas as vezes que me ajudou com seu jeitinho brasileiro de ser!

Ao professor Chubert pela disponibilidade e auxílio em meus momentos de dúvida.

Ao Heyder por toda ajuda que me prestou na microscopia eletrônica.

A professora Suzane do Laboratório de Citogenética pela ajuda fornecida na obtenção das imagens de imunofluorescência.

Aos meus amigos do Colégio MAC, em especial ao meu grande amigo e chefe Felipe, por toda paciência ao longo do meu curso.

Aos meus queridos alunos, que sempre torceram pelo meu sucesso.

A todos que de alguma forma contribuíram com essa grande conquista!



## SUMÁRIO

### LISTA DE TABELAS E FIGURAS

### LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

### RESUMO

### ABSTRACT

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	SISTEMA FAGOCÍTICO MONONUCLEAR .....	2
1.1.1	Origem e diferenciação .....	2
1.1.2	Monócitos humanos.....	6
1.1.3	Macrófagos.....	9
1.1.4	Células dendríticas.....	11
1.2	5-HIDROXI-2-HIDROXIMETIL- $\gamma$ -PIRONA (HMP).....	12
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
3.1	Objetivo geral.....	16
3.2	Objetivos específicos.....	16
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
4.1	OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS HUMANAS MONONUCLEARES.....	17
4.2	OBTENÇÃO DO METABÓLITO HMP .....	18
4.3	DILUIÇÃO DO HMP.....	19
4.4	TRATAMENTO DOS MONÓCITOS COM HMP.....	19
4.5	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS TRATADAS COM HMP.....	19
4.5.1	Metodo do Thiazolyl Blue.....	19
4.5.2	Detecção do Potencial da Membrana Mitocondrial $\Delta\Psi$ M (JC1).....	20
4.5.3	Teste do Vermelho Neutro (VN).....	20
4.5.4	Azul de Tripan.....	21
4.6	ANÁLISE DA MORFOLOGIA DE MONÓCITOS TRATADOS COM HMP.....	22
4.6.1	Microscopia Óptica.....	22
4.6.2	Microscopia Óptica de fluorescência-avaliação da expressão de proteína de superfície específicas de macrófagos (F4/80).....	22

4.6.3	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	23
4.6.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	23
4.6.5	Morfometria.....	24
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
5.1.1	VIABILIDADE CELULAR.....	25
5.1.2	Método thiazolyl blue (MTT).....	25
5.1.3	Detecção de Potencial Da Membrana Mitocondrial- $\Delta\psi_m$ (JC1).....	26
5.1.4	Azul de Tripán.....	29
5.1.5	Teste do Vermelho Neutro.....	30
5.2	ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ÓPTICA (MO), MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	31
5.2.1	Microscopia Óptica.....	31
5.2.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	34
5.2.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	41
5.3	MICROSCOPIA ÓPTICA DE FLOURESCÊNCIA.....	48
5.4	ANÁLISE DE ÁREA CELULAR (MORFOMETRIA).....	55
5.5	QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA F4/80 POR IMUNOFLUORES- CÊNCIA.....	56
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>62</b>



## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Diferenciação das células hematopoiéticas.....	3
<b>Figura 2.</b>	Origem de macrófagos a partir de células HSC na medula óssea.....	4
<b>Figura 3.</b>	Subclasses de monócitos humanos mostrando expressão diferencial de receptores CD14 e CD16. ....	7
<b>Figura 4.</b>	Desenho esquemático da ação da enzima iNOS.....	11
<b>Figura 5.</b>	Estrutura química do HMP.....	12
<b>Figura 6.</b>	Esquema ilustrativo da separação de monócitos a partir de concentrado de leucócitos.....	17
<b>Figura 7.</b>	Análise da viabilidade celular pelo método MTT em monócitos tratados com o HMP nas concentrações de 50 a 100 µg/mL por 24, 48 e 72.....	25
<b>Figura 8.</b>	Análise da viabilidade celular pelo método JC-1 em monócitos tratados com o HMP por 24, 48 e 72h nas concentrações de 50 e 100 µg/mL.....	28
<b>Figura 9.</b>	Viabilidade celular através do teste de exclusão Azul de tripan de monócitos tratados com o HMP durante 24 , 48 e 72h.....	29
<b>Figura 10.</b>	Viabilidade celular através do método VN de monócitos tratados com o HMP durante 24, 48 e 72 horas.....	30
<b>Figura 11.</b>	Alterações morfológicas em monócitos tratados com 50 e 100µg/mL de HMP por 24, 48 e 72h.....	33
<b>Figura 12.</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura de monócitos humanos cultivados por 24h com 50µg/mL e 100µg/mL.....	36
<b>Figura 13.</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura de monócitos humanos cultivados por 48h com 50µg/mL e 100µg/mL.....	38
<b>Figura 14.</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura de monócitos humanos tratados por 72 horas com 50µg/mL e 100µg/mL de HMP.....	40
<b>Figura 15.</b>	Alterações ultraestruturais de monócitos tratados com HMP por 24h e observados através de MET .....	43
<b>Figura 16.</b>	Alterações ultraestruturais de monócitos tratados com HMP por 48 h e observados através de MET .....	45
<b>Figura 17.</b>	Alterações ultraestruturais de monócitos tratados com HMP por 72 h e observados através de MET.....	47

<b>Figura 18.</b>	Detecção da expressão da proteína F4/80 em monócitos estimulados com M-CFS e macrófagos peritoneais. ....	50
<b>Figura 19.</b>	Detecção da expressão da proteína F4/80 em monócitos tratados com 50 (b1-b3) e 100 µg/mL de HMP por 48h.....	52
<b>Figura 20.</b>	Detecção da expressão da proteína F4/80 em monócitos tratados com 50 e 100 µg/mL de HMP por 72h.....	54
<b>Figura 21.</b>	Medida da área citoplasmática de monócitos tratados com HMP por 24, 48 e 72h, nas concentrações de 50 e 100 µg/mL .....	55
<b>Figura 22.</b>	Quantificação da expressão de proteínas de superfície em monócitos tratados com HMP por 48 e 72h, 50 e 100 µg/mL.....	56

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

µg/mL – Microgramas por mililitros

µL – Microlitros

BSA – Bovina serum albumin

DAPI – Diamino fenilindole

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO – Dimetilsufóxido

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio

IL – Interleucina

INF-γ – Interferon –γ

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

mg/mL – Miligramas por mililitros

MTT – Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide

M – Molar

MHC- complexo total de histocompatibilidade

HMP-5-hidroxi-2-hidroximetil-γ-pirona

VN-Vermelho neutro

PBMC-Células mononucleares do sangue periférico

ΔΨM: Potencial de membrana mitocondrial

NO – Óxido nítrico

OH<sup>-</sup> – Radical hidroxila

TNF-α – Fator de necrose tumoral

NH<sub>4</sub>Cl – Cloreto de amônio

SBF – Soro bovino fetal

SOD – Superóxido dismutase

PBS – Sigla inglesa para tampão fosfato salino

APC-Células apresentadoras de antígenos

CTH-células tronco hematopoiéticas

ROS – Radicais de oxigênio

INF- $\gamma$  – Interferon  $\gamma$

NADPH- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase hidrogenase.

PE- Ficoeritrina

HSC-Células progenitoras hematopoéticas pluripotentes

CLP-Células progenitoras linfoides

CMP-Células progenitoras mieloides

GM-CFU- unidade formadora de colônia de granulócitos/macrófagos

M-CFU-unidade formadora de colônia de macrófagos.

## RESUMO

O 5-hidroxi-2-hidroximetil-gama-pirona (HMP) é um metabólito secundário sintetizado por algumas espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Acetobacter*. O HMP tem várias aplicações, sendo utilizado como antioxidante, inibidor da tirosinase, agente protetor contra a radiação e antitumoral. Recentemente, foi também demonstrado que esse metabólito atua como ativador de macrófagos. No entanto, o efeito do HMP em monócitos humanos é desconhecido. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de HMP sobre a viabilidade e diferenciação celular de monócitos do sangue humano *in vitro*. Leucócitos humanos do sangue periférico foram obtidos a partir de bolsas de sangue doadas pela Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (HEMOPA). O isolamento das células foi realizado por meio de gradiente de densidade com Histopaque®1077. Os monócitos foram tratados durante 24, 48 e 72 horas com 50 e 100 µg / mL de HMP. A análise ultraestrutural dos monócitos tratados revelou que essas células apresentam maior espriamento, elevado número de projeções citoplasmáticas e vacúolos, características que são frequentemente observadas em células ativadas. A análise da expressão da proteína de superfície específica para macrófago (F4/80) por imunofluorescência, demonstrou que os monócitos humanos tratados com 50 e 100 µg / mL de HMP por 48 e 72 horas, mostrou um padrão de expressão semelhante ao verificado em macrófagos humanos originados de monócitos tratados com o M-CFS. Os testes de viabilidade utilizados (Método thiazolyl blue, Potencial de membrana mitocondrial, Vermelho Neutro e Azul de Tripan) mostraram que o HMP não tem nenhum efeito citotóxico em monócitos humanos quando tratados com 50 e 100 µg/ mL do bioproduto. Estes resultados demonstram um novo papel para HMP como um agente imunomodulador, induzindo a diferenciação de monócitos em macrófagos.

**Palavras-chave:** Monócitos humanos, bioproduto, imunomodulador, diferenciação celular.

## **ABSTRACT**

The 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-gamma-pyrone (HMP) is a secondary metabolite synthesized by some species of fungi from *Aspergillus*, *Penicillium* and *Acetobacter* genera. The HMP has several applications, being used as antioxidant, tyrosinase inhibitor, protective agent against radiation and antitumor. Recently, it was also shown that this metabolite acts as a macrophage activator. However, the effect of HMP in human monocytes is unknown. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of HMP on the cell viability and differentiation of human blood monocytes *in vitro*. Human peripheral leucocytes were obtained from blood bag donated from Fundação Hemocenter of Para State. Cell isolation was performed using HISTOPAQUE® 1077-density-gradient. Monocytes were treated for 24, 48 and 72 hours with 50 and 100 µg/mL of HMP. The ultrastructural analysis of treated monocytes showed spreading ability, high number of cytoplasmatic projections and vacuoles, features that are often observed in activating cells. Immunofluorescence analysis of the expression of surface protein specific for the macrophage (F4/80), demonstrated that human monocytes treated with 50 and 100 µg/mL for 48 and 72 h showed the similar pattern of expression of proteins to that of human monocytes differentiated by macrophage colony-stimulating factor (M-CFS). The viability test used showed that HMP has no cytotoxicity effect on human monocytes when treated with 50 and 100 µg/mL of HMP. These results demonstrate a new role for HMP as an immunomodulator agent, inducing the differentiation of monocytes into macrophages.

**Keywords:** Human monocytes, bioproduct, immunomodulator, cell differentiation.

## 1- INTRODUÇÃO

Leucócitos são um conjunto de células heterogêneas do sistema circulatório, que atuam na imunidade do organismo, predominantemente nos tecidos (MOSSER & EDWARDS, 2008). Monócitos são leucócitos observados somente na circulação (PUKA *et al.*, 2005). São consideradas eficientes células efetoras da resposta inflamatória contra patógenos (SAHA & GEISSMANN, 2011). Nas respostas contra patógenos, estas células recebem sinalização por meio da ação de citocinas e quimiocinas, migram para os tecidos onde são capazes de promover a morte de microorganismos invasores através de várias funções como fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO), mieloperoxidase e citocinas inflamatórias (SERBINA *et al.*, 2008; ECKER *et al.*, 2010). Juntamente com os neutrófilos, monócitos/macrófagos são considerados células fagocíticas profissionais, capazes de destruir e fagocitar agentes infecciosos. São células essenciais para imunidade, absolutamente necessárias para construir e modular a resposta inata (KANTARI *et al.*, 2008).

Monócitos representam um grande grupo de células precursoras circulantes do sangue, que podem diferenciar-se em macrófagos ou células dendríticas, sendo portanto células fundamentais na resposta imune (CHOMARAT *et al.*, 2000). São células com considerável plasticidade, podendo assumir fenótipos variados de acordo com os estímulos gerados pelo ambiente (CHOMARAT *et al.*, 2000; STRAUSS-AYALI *et al.*, 2007; DAIGNEAULT *et al.*, 2010).

A diferenciação de monócitos em macrófagos ou células dendríticas é dependente da ação de citocinas específicas, que regulam o metabolismo da célula e definem seu fenótipo. Para que ocorra diferenciação em macrófago, monócitos sofrem ação das citocinas M-CSF (Fator estimulador de colônia de macrófago) e IL-6, enquanto que na diferenciação em células dendríticas, monócitos recebem ação das citocinas GM-CSF (Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos) e IL-4 (CHOMARAT *et al.*, 2000; CESAR *et al.*, 2008; POLAN-CEC *et al.*, 2012).

Na literatura há vários estudos demonstrando a atuação da atividade de drogas e bioprodutos sobre células do sistema fagocítico, a fim de promover ativação celular para atuação no combate a patógenos (LOPES, *et al.*, 2006). Recentemente, alguns estudos têm demonstrado que o medicamento homeopático @Canova tem ação similar às citocinas na diferenciação celular. Esses estudos mostraram que a @Canova induz a diferenciação de células mononucleares em camundongos e seres humanos, na ausência de citocinas estimulatórias (SMIT *et*

*al.*, 2008; CESAR *et al.*, 2008) além de estimular a diferenciação de células progenitoras originadas da medula óssea (ABUD *et al.*, 2006).

## 1.1- SISTEMA FAGOCÍTICO MONONUCLEAR

### 1.1.1- Origem e diferenciação

O sistema fagocítico mononuclear consiste em um grupo celular de origem medular mielóide, que circula no sangue (monócitos) ou preenchem os tecidos (macrófagos), sendo originados pelo processo de hematopoiese (PUKA *et al.*, 2005; GEISSMANN *et al.*, 2010). Na vida adulta, a medula óssea é o local de geração de todas as células sanguíneas circulantes, (CESAR *et al.*, 2008) embora o fígado e o baço possam ser recrutados como sítios de hematopoiese em situações emergenciais (PUKA *et al.*, 2005). Essas células têm origem comum, porém em função de estímulos, tornam-se morfologicamente e funcionalmente distintas (GEISSMANN *et al.*, 2010). São formadas a partir de células tronco hematopoiéticas (CTH), células indiferenciadas presentes na medula e com alta capacidade de proliferação e diferenciação (YONA & JUNG, 2010). As CTH originam células progenitoras hematopoiéticas pluri-potentes (HSC) por meio da ação de citocinas, como os fatores estimuladores de colônias (CSF- produzidas por células estromais, macrófagos da medula, macrófagos ativados e linfócitos T). Assim, as HSC são estimuladas a sofrer maturação/diferenciação, originando as linhagens celulares sanguíneas (CESAR *et al.*, 2008; MOSSER & EDWARDS, 2008). Dessa forma, sob estímulo de citocinas estimulatórias (fator estimulador de granulócitos/macrófago (GM-CSF), fator estimulador de macrófagos (M-CSF e IL-3), as células HSC sofrem maturação/diferenciação, originando as progenitoras linfóides (CLP) e mielóides (CMP). A linhagem linfóide originará linfócitos T, B, *natural killeres* e células dendríticas, enquanto que a linhagem mielóide, resultará em monócitos/macrófagos, células dendríticas, granulócitos, eritrócitos e megacariócitos (PUKA *et al.*, 2005; CESAR *et al.*, 2008; MOSSER & EDWARDS, 2008; HEINSBROEK & GORDON, 2009; NAKAJIMA, 2011) (Figura 1).

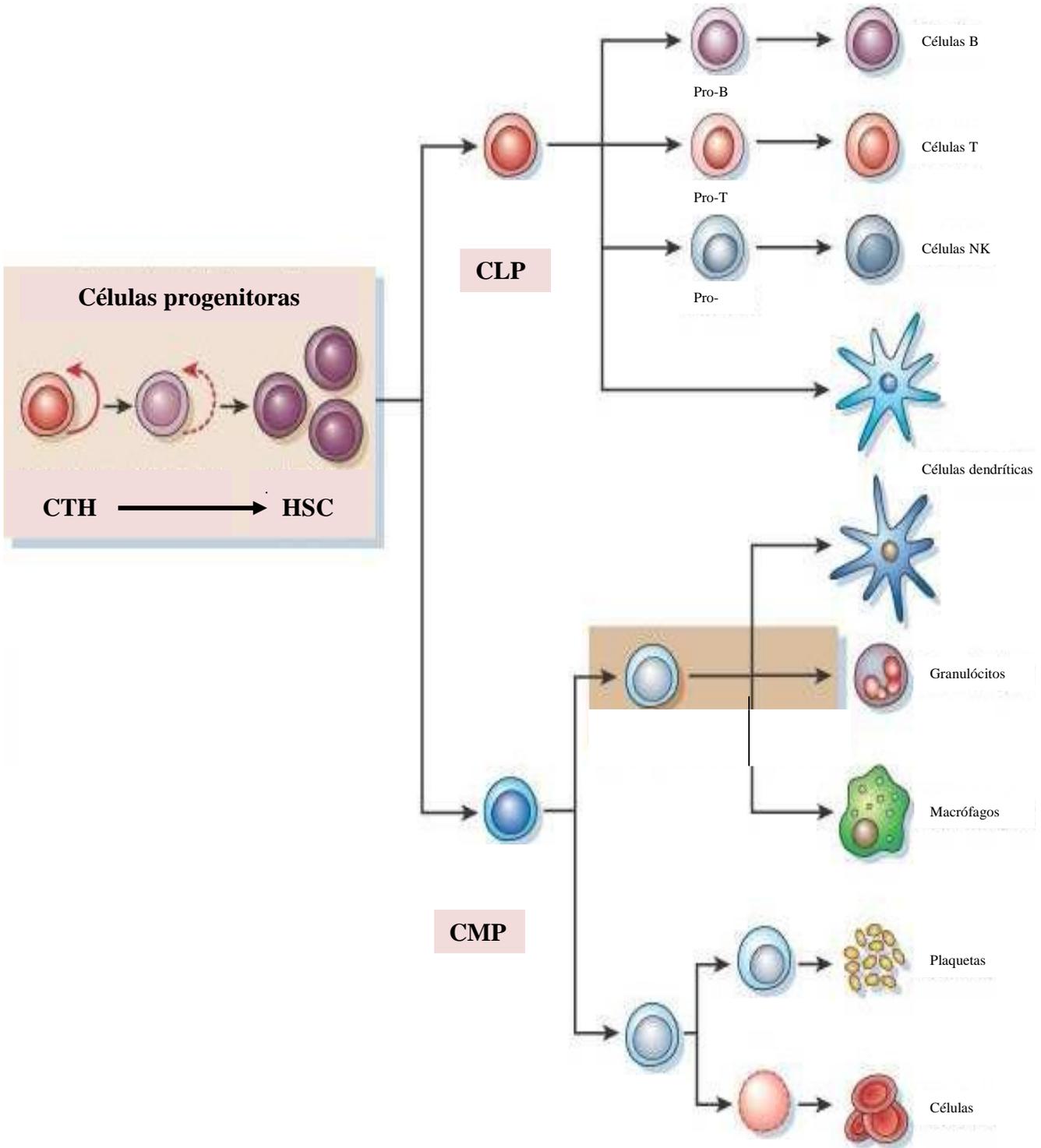


Figura 1: Diferenciação das células hematopoiéticas. CTH: Células-tronco hematopoiéticas; HSC: Células progenitoras hematopoiéticas pluripotentes. CLP: Células progenitoras linfóides; CMP: Células progenitoras mielóides.

Fonte: <http://www.nih.gov/news/stemcell/scireport.htm> (modificado).

Na maturação dos macrófagos, células HSC evoluem até o estágio de pró-monócito na medula (Figura 2A). Sob estímulo do meio migram para a corrente sanguínea, onde amadurecem formando os monócitos. Dependendo do estímulo recebido, essas células migram para tecidos diferentes, onde sofrerão diferenciação em macrófagos com morfologia e fisiologia característica de cada tecido, formando-se assim um espectro de fenótipos diferentes (MOSSER & EDWARDS, 2008) (Figura 2B). Em condições inflamatórias crônicas, incluindo a sarcoidose e a tuberculose, monócitos podem ainda se fundir para formar células gigantes (DALE *et al.*, 2008).

Além da origem, macrófagos e células dendríticas apresentam similaridades no processo de diferenciação, pois essas duas células são formadas a partir de monócitos (HUME *et al.*, 2002; PUKA *et al.*, 2005; KATOH *et al.*, 2006; CESAR *et al.*, 2008; SMIT *et al.*, 2008; GEISSMANN *et al.*, 2010; YONA & JUNG, 2010). Após sua formação na medula, os monócitos são direcionados à circulação sanguínea, onde se mantêm por cerca de um a três dias (GUIMARÃES & DA GAMA, 2009; HEINSBROEK & GORDON, 2009; SHI & PAMER, 2011). Posteriormente migram para os tecidos, onde se transformam em macrófagos ou células dendríticas (CHOMARAT *et al.*, 2000; CESAR *et al.*, 2008).

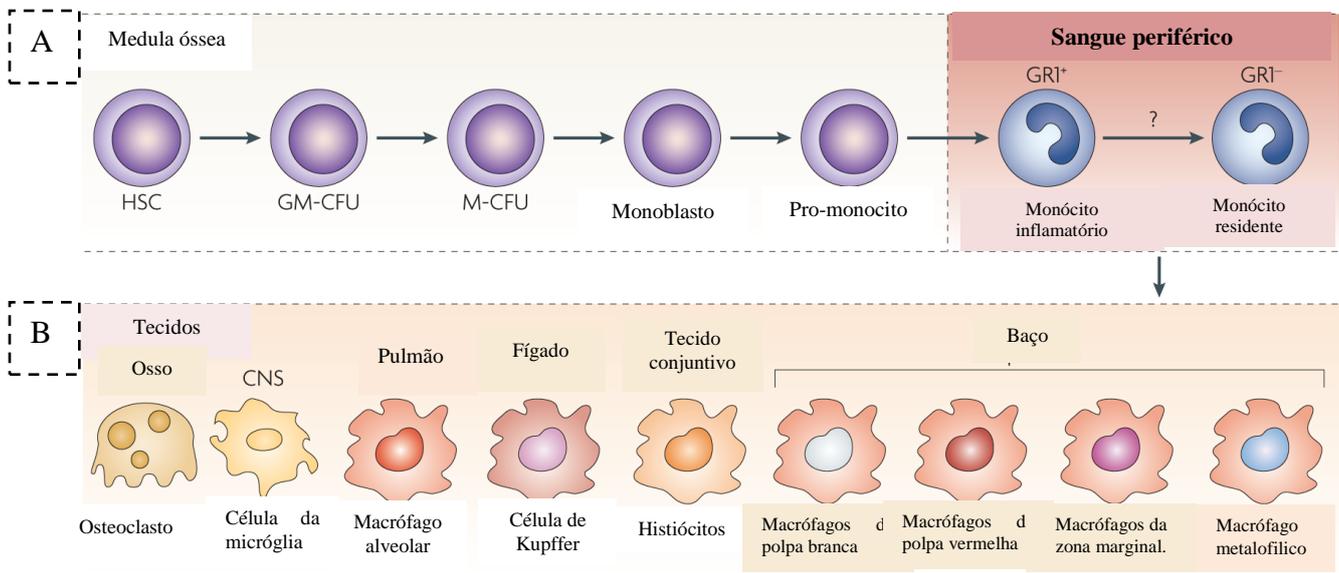


Figura 2:A- Origem de macrófagos a partir de células HSC na medula óssea. B-Distintas morfologias dos macrófagos em diversos tecidos do corpo. GM-CFU: unidade formadora de colônia de granulócitos/macrófagos; M-CFU:unidade formadora de colônia de macrófagos.

Fonte: MOSSER & EDWARDS, 2008 (Modificado).

Os monócitos possuem formato regular, com poucas ou sem projeções citoplasmáticas (filopódios), núcleo em forma de ferradura, citoplasma não volumoso contendo poucas mitocôndrias, assim como complexo de Golgi e retículos endoplasmático liso e rugoso (DICKHOUT *et al.*, 2010). Quando se diferenciam em macrófago, apresentam grande espriamento, citoplasma volumoso com expressivas projeções citoplasmáticas, além de um número maior de mitocôndrias, complexo de golgi e retículos (SMIT, *et al.*, 2008). Há presença de inúmeros vacúolos no citoplasma, com redução da cromatina condensada no núcleo (DICKHOUT *et al.*, 2010). Quando se diferenciam em células dendríticas, observa-se uma morfologia normalmente muito semelhante aquela verificada em macrófagos. Entretanto, são células maiores, irregulares com extensões citoplasmáticas partindo do corpo celular (SMIT, *et al.*, 2008).

A distinção entre células dendríticas e macrófagos, usando como parâmetros somente aspectos morfológicos, não é assegurada, devido às semelhanças existentes nessas células (SMIT *et al.*, 2008). Sendo assim, para caracterizar essas células é realizada a análise da expressão de moléculas de superfície como CD1a, CD11c, CD14, CD80, CD86, EMR1-F4/80 e HLA-DR (KÖLLER *et al.*, 2004; SMIT *et al.*, 2008; SATO, 2010). CD14, é uma molécula expressa preferencialmente em monócitos (SATO, 2010), CD11c, CD1a e HLA-DR, são moléculas de superfície características e constitutivas de células dendríticas (SATO, 2010), EMR1-F4/80 é um marcador considerado específico de macrófagos (KHAZEN, 2005) e CD80 e CD86 são moléculas co-estimulatórias presentes em ambas as células apresentadoras de antígenos (SMIT *et al.*, 2008). A diferenciação de monócitos *in vivo* ocorre por volta do quarto dia, após sua saída da medula (GUIMARÃES & DA GAMA, 2009), a diferenciação *in vitro* ocorre por volta do quinto dia de cultivo (SMIT *et al.*, 2008). Em cultura a diferenciação de monócito em macrófago/célula dendrítica ocorre apenas na presença de citocinas como GM-CSF, IL-4 e TNF- $\alpha$  durante um longo período (cerca de 5 a 8 dias) (KÖLLER *et al.*, 2004; SMIT *et al.*, 2008).

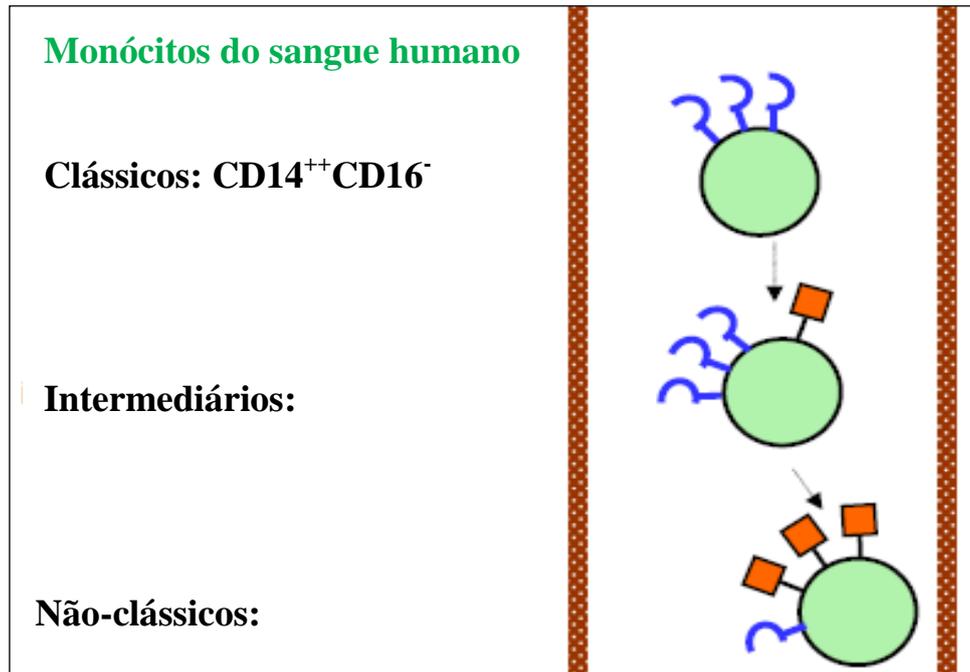
A utilização de drogas em cultura também pode promover a diferenciação de monócitos na ausência de citocinas estimulatórias. Um estudo desenvolvido com monócitos humanos tratados com o medicamento homeopático Canova®, demonstrou que essas células mantidas em cultura por 48h com 10% do medicamento, apresentaram morfologia semelhante às mantidas em cultura por longos períodos e tratadas com o fator de diferenciação. Isso mostra que esse medicamento tem efeito semelhante ao de citocinas, que induzem a diferenciação dessas células, sugerindo que essa droga tem efeito imunomodulador (SMIT *et al.*, 2008). Além disso, a adição de um outro tipo celular na cultura também pode interferir na diferencia-

ção de monócitos. Um estudo desenvolvido por Chomarar e colaboradores (2000), mostrou que a adição de fibroblastos em uma cultura de monócitos, induz essas células a diferenciarem-se em macrófagos. Isso está relacionado com a produção de IL-6 pelos fibroblastos, que regula a liberação e o consumo autócrino de M-CFS por monócitos, estimulando assim sua diferenciação em macrófagos.

### 1.1.2-Monócitos

Monócitos são fagócitos mononucleares presentes no sangue periférico com capacidade para diferenciar-se em macrófagos (RANDOLPH & JAKUBZICK, 2008). No entanto, em função de estímulos do ambiente, essas células também podem diferenciar-se em células dendríticas (CHOMARAT *et al.*, 2000; GEISSMANN *et al.*, 2010). O termo monócito sugere que esta população de células seja um grupo homogêneo. Entretanto, vários estudos indicam que os monócitos são compostos de subgrupos, que diferem no fenótipo, tamanho, morfologia nuclear, granulosidade e perfis gênicos (RANDOLPH & JAK UBZICK, 2008; SERBINA *et al.*, 2008; YONA & JUNG, 2010; HEITBROCK *et al.*, 2010). Os monócitos humanos constituem um grupo celular heterogêneo com funções distintas (SAHA & GEISSMANN, 2011). São definidos como células mononucleares da circulação, com capacidade fagocítica e potencialmente capazes de se diferenciar em macrófagos/células dendríticas. Quando ocorre a saída da circulação e passagem destas células para os tecidos, inicia-se o processo de diferenciação celular, sendo ambos os tipos celulares definidos como “células derivadas de monócitos” (RANDOLPH & JAK UBZICK, 2008).

Monócitos humanos encontram-se divididos em subgrupos (BELGE *et al.*, 2002; TACKE & FRANDOLPH, 2006; HEITBROCK, 2007; HEITBROCK *et al.*, 2010). Atualmente, os monócitos são caracterizados e classificados por meio de marcadores de superfície celular (TACKE & RANDOLPH, 2006; HEITBROCK, 2007; HEITBROCK *et al.*, 2010). Assim, essas células encontram-se subdivididas em três subgrupos ou subclasses, com base na expressão diferencial de receptores CD14 e CD16 (SZAFLARSKA *et al.*, 2004; SERBINA *et al.*, 2009; HEITBROCK *et al.*, 2010; ROGACEV *et al.*, 2011). Esses subgrupos são classificados como monócitos clássicos, monócitos intermediários e monócitos não-clássicos (HEITBROCK *et al.*, 2010) (Figura 3).



**Figura 3:** Subclasses de monócitos humanos mostrando expressão diferencial de receptores CD14 e CD16.

**Fonte:** HEITBROCK *et al.*, 2010 (modificado).

Quando não há distinção entre as subclasses de monócitos intermediários e não clássicos, estes dois grupos são referidos coletivamente como monócitos CD16<sup>+</sup> (ROGACEV *et al.*, 2011). Os principais grupos de monócito são CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (clássicos) e CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> (não clássicos) (SZAFLARSKA *et al.*, 2004; TACKE & RANDOLPH, 2006 ; HEITBROCK, 2007; HEITBROCK *et al.*, 2010; ROGACEV *et al.*, 2011). Por esse motivo, alguns autores consideram a existência de apenas duas subclasses (BELGE *et al.*, 2002). Vários estudos demonstraram que cerca de 80-90% dos monócitos expressam marcadores de monócitos clássicos, em contraste com apenas 10-20% de monócitos não clássicos (BELGE *et al.*, 2002; ; SERBINA, *et al.*, 2008; ROGACEV *et al.*, 2011).

As células da linhagem monocítica, são importantes elementos para a imunidade humoral e celular, pois são importantes fagócitos que atuam na apresentação de antígeno às células T além de produzirem citocinas reguladoras como TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-6 INF- $\alpha/\beta$  que estão envolvidos na regulação da hematopoiese (BELGE *et al.*, 2002; DALE *et al.*, 2008). Essas três importantes funções (apresentação de antígenos, fagocitose e imunomodulação), tornam as células mononucleares fundamentais para o sucesso da resposta imune (DALE *et al.*, 2008). Em monócitos e macrófagos, a produção de citocinas têm início com a estimulação

através dos receptores Toll- like (HEITBROCK, 2007). A ativação desses receptores por meio de um estímulo vai promover uma cascata de sinalização que culminará com a síntese de citocinas como TNF que regula a resposta imune por meio da ativação celular, aumento da expressão de proteínas receptoras, além de regular a produção de outras citocinas (BELGE *et al.*, 2002).

Belge *et al.* (2002) observaram uma produção expressiva de TNF (pró-inflamatório) e uma baixa produção de IL-10 (antiinflamatória) em monócitos não clássicos ( $CD14^+CD16^+$ ), após estímulo com LPS (lipopolissacarídeo oriundo de bactérias Gram-negativas) e Pam3Cys (lipopeptídeos presente bactérias em Gram-negativas e Gram-positivas). Em função dessas propriedades, esse subgrupo é referido como monócitos “pró-inflamatórios” (MIZUNO *et al.*, 2005; SERBINA *et al.*, 2008). Em um estudo comparativo entre células  $CD14^{++}CD16^-$  e  $CD14^+CD16^+$ , foi detectado níveis elevados de IL-12 e TNF, além de produção significativa de NO através da enzima iNOS em  $CD14^+CD16^+$  (não clássicos), exibindo maior atividade citotóxica contra células tumorais (SZAFLARSKA *et al.*, 2004). Em um estudo utilizando monócitos clássicos e não clássicos infectados com fungos *A. fumigatus* foi observada a inibição de conídios e ausência da produção de TNF por monócitos clássicos infectados, enquanto que os monócitos não clássicos não suprimiram a germinação de conídios e produziram altos níveis de citocinas inflamatórias, mostrando as diferentes contribuições desses subgrupos na infecção fúngica. Em conjunto, essas informações sugerem que os subgrupos monocíticos possuem papéis diferentes na resposta inflamatória.

Essa diferença entre os subgrupos de monócitos na resposta inflamatória, pode ter relação com elevação significativa de monócitos  $CD14^+CD16^+$  em várias doenças infecciosas e inflamatórias como, asma, sepse, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana e progressão da AIDS, o que pode constituir uma importante ferramenta na terapêutica dessas doenças (SOARES *et al.*, 2005; HEITBROCK, 2007).

### 1.1.3-Macrófagos

Macrófagos são importantes células da imunidade inata potencialmente capazes de fagocitar microrganismos invasores, apresentar antígenos às células T e secretar citocinas imunomodulatórias (HEINSBROEK & GORDON, 2009; CRUVINEL *et al.*, 2010). Devido a sua importância na defesa do organismo no combate a agentes diversos, são consideradas as células centrais da imunidade (CHANG *et al.*, 2010) e juntamente com neutrófilos, constituem as principais células fagocíticas do organismo (CRUVINEL *et al.*, 2010).

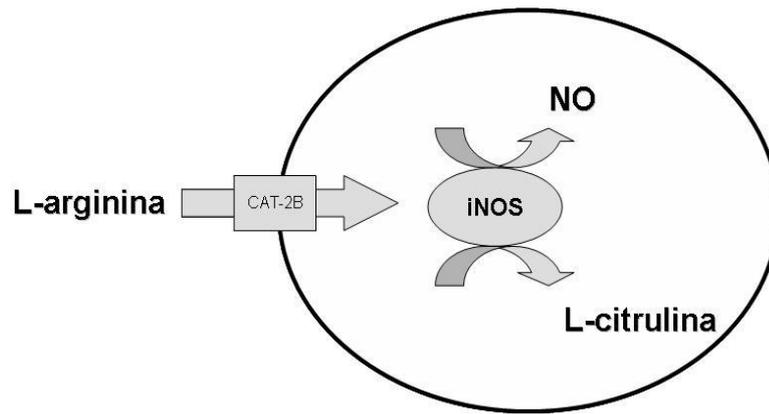
Os macrófagos juntamente com os neutrófilos, desempenham um papel crucial na imunidade inata contra patógenos intra e extracelulares (SILVA *et al.*, 2010). Entretanto, fagócitos mononucleares tem um ciclo de vida muito mais duradouro que neutrófilos. Esta é uma característica clinicamente muito importante dos mononucleares, pois protege indivíduos de infecções fatais quando a produção de neutrófilos está temporariamente interrompida, como ocorre em pacientes submetidos a quimioterapia do câncer, reações idiossincrásicas a diversas drogas, e transplante de células tronco hematopoiéticas (DALE, *et al.*, 2008). Quando o organismo é invadido por agentes estranhos, monócitos circulantes são recrutados para o local da infecção, onde sofrerão diferenciação em macrófago/ célula dendrítica (FAIRWEATHER & CIHAKOVA, 2009). Entretanto, diferentemente das células dendríticas que capturam antígenos nos tecidos e se deslocam para gânglios linfáticos específicos distais para ativar células T, os macrófagos teciduais são células residenciais, desempenhando um importante papel na ativação de respostas localizadas (CASSETTA *et al.*, 2011).

Macrófagos teciduais diferenciados, se originam de monócitos recrutados a partir do sangue. Após a diferenciação, essas células passam a ter um longo ciclo vital e desenvolvem funções especializadas (DAIGNEAULT *et al.*, 2010). São considerados células fagocíticas profissionais, que utilizam a fagocitose como um importante mecanismo de contenção do patógeno (MAY & MACHESKY, 2001). A ativação de macrófagos se dá por meio de estímulos gerados por agentes diversos, assim como por produtos de seu metabolismo como as endotoxinas. Durante o processo de ativação, esses estímulos interagem inicialmente com os receptores expressos na superfície dos fagócitos como o Toll-like (TLR) e Fc $\gamma$ , que desencadeiam uma cascata de sinalizações que resultarão em uma série de modificações morfológicas e fisiológicas na célula (DALE *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2010; YU *et al.*, 2010). Uma importante modificação observada é a reorganização do citoesqueleto, que está relacionada com o espraiamento celular, formação de prolongamentos citoplasmáticos, reconhecimento do patógeno, fagocitose e formação do fagolisossomo ( HEINSBROEK & GOR-

DON, 2009). A fagocitose é um mecanismo de englobamento de partículas, que ocorre por meio da polimerização da actina (MAY & MACHESKY, 2001) e tem início a partir da ligação do patógeno aos receptores de superfície. Após fagocitose do patógeno, o parasito fica contido no interior do fagossomo, que após fundir com lisossomos, culminará com a formação dos fagolisossomos, compartimentos ricos em hidrolases potencialmente capazes de degradar o parasito fagocitado (LOPES *et al.*, 2006; HEINSBROEK & GORDON, 2009).

Outros mecanismos microbicidas são verificados em macrófagos. Após o processo de ativação, ocorre a produção de compostos de oxigênio com potencial citotóxico que inclui espécies reativas de oxigênio (ROS), como ânions superóxidos ( $O_2^-$ ), radicais hidroxila ( $OH^\cdot$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (OLIVEIRA *et al.*, 2006). A produção das ROS constitui o *burst oxidativo*, um importante mecanismo de defesa verificado em fagócitos (EL-BENNA *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2006). Esse metabolismo oxidativo é mediado por um complexo enzimático formado por sete subunidades, chamado nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato - hidrogênio (NADPH). Quando os fagócitos são expostos a estímulos adequados, as sete subunidades se unem e o complexo rapidamente se ativa, resultando na síntese de ROS (EL-BENNA *et al.*, 2005).

Outras moléculas classificadas como “radicais intermediários”, com potencial microbicida, também são sintetizadas por macrófagos ativados. Nessa classe de moléculas se destaca o óxido nítrico (NO), um importante radical que além de sua ação microbicida, assume várias outras funções no organismo, como na neurotransmissão, inflamação e imunorregulação. A produção do NO em macrófagos é dependente da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS-uma isoforma da óxido nítrico sintase- NOS) que converte o aminoácido L-arginina em NO e L-citrulina (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000) (Figura 4).



**Figura 4:** Desenho esquemático da ação da enzima iNOS. A L-arginina é transportada por uma proteína de membrana para o interior da célula, sendo convertida em NO e L-citrulina pela enzima iNOS.

Além da liberação de hidrolases, ROS e NO, macrófagos ativados produzem uma série de citocinas pró-inflamatórias, dentre as quais destacam-se IL-12 e TNF- $\alpha$ , que atuam no recrutamento de outras células, como macrófagos residentes para o local da infecção, além de possuírem efeitos bactericida e citostático (CHANG *et al.*, 2010).

#### 1.1.4- Células Dendríticas (DCs)

As células dendríticas (DCs) são células apresentadoras de antígeno e potencialmente capazes de estimular linfócitos T. Estão presentes em todos os tecidos periféricos não linfóides atuando como “sentinelas” do sistema imune inato (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998). Nos tecidos, DCs sofrem diferenciação, e tornam-se capazes de processar antígenos (Ags) e apresentá-los por meio de proteínas expressas em sua superfície, que compõe o complexo total de histocompatibilidade (MHC) (SATTHAPORN & EREMIN, 2001).

Constituem um grupo celular heterogêneo, que se origina de células precursoras da linhagem linfóide ou mielóide. Em cultura, podem se originar também a partir de monócitos sob estímulo de IL-4, fator GM-CSF e TNF- $\alpha$  (SATO, 2010).

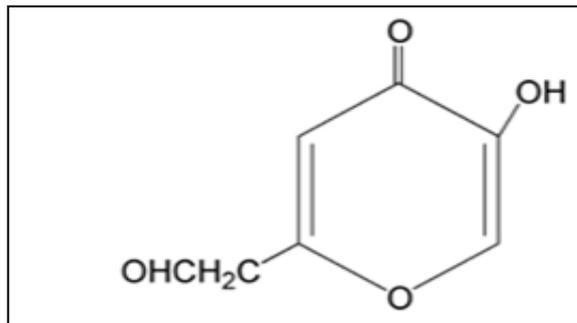
As DCs são essenciais para o início e regulação da resposta imune adaptativa e formação da memória imunológica. Na maioria dos tecidos, as DCs encontram-se no estado “imaturado” e incapazes de estimular células T. Contudo, durante a invasão do organismo por agentes diversos, as DCs se dirigem ao local da infecção, fagocitam os agentes invasores, sofrem maturação sob estímulo dos antígenos fagocitados e posteriormente se dirigem aos linfonodos e baço, onde apresentam antígeno às células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e desencadeiam a resposta imune. Todo esse processo de reconhecimento antigênico e ativação celular envolve receptores TCR dos linfócitos T, que reconhecem os antígenos ligados ao complexo total de

histocompatibilidade (MHC) classe I e II presente na superfície de DCs, resultando na ativação linfocitária (SATTHAPORN & EREMIN, 2001).

Além das DCs atuarem como eficientes células apresentadoras de antígenos, são importantes na modulação da resposta imune por meio da produção de citocinas, pois quando ativadas, desencadeiam uma resposta imune Th1 protetora, com produção de IL-12 e TNF- $\alpha$ , citocinas importantes na resposta contra diversos patógenos (FAVALI *et al.*, 2007).

### 1.2- 5-HIDROXI-2-HIDROXIMETIL- $\gamma$ -PIRONA (HMP)

O 5-hidroxi-2-hidroximetil- $\gamma$ -pirona (HMP) ou ácido kójico (AK) (Figura 5), é um metabólito secundário sintetizado por algumas espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Acetobacter* e *Penicillium* (BURDOCK *et al.*, 2001; PARVEZ *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2010). Sua produção ocorre durante a fermentação envolvendo vários tipos de substratos que atuam como fonte de carbono (RHO *et al.*, 2007; MOHAMAD *et al.*, 2010).



**Figura 5:** Estrutura química do ácido kójico.

Fonte: Mohamad *et al.*, 2010.

O HMP possui uma versatilidade de aplicações industriais (MOHAMAD *et al.*, 2010), sendo usado como antioxidante (NIWA & AKAMATSU, 1991; SANDER 2010), como aditivo alimentar (BENTLEY, 2006; CHUSIRI *et al.*, 2011), inibidor de tirosinase em hiperpigmentações (LIM, 1999; SATO *et al.*, 2007; SMIT *et al.*, 2009), como cosmético (LIN *et al.*, 2007), como agente de proteção contra radiações (EMAMI *et al.*, 2007) e antitumoral (CHUSIRI *et al.*, 2011).

Uma importante aplicabilidade do HMP tem sido descrita no tratamento de melasma, uma hiperpigmentação em que há intensa produção da melanina (LIM, 1999; PARVEZ *et al.*, 2006). A melanina é produzida nos melanócitos e armazenada nos melanosomos dos queratinócitos. Sua produção é regulada pela enzima tirosinase presente nos melanosomos. O melasma é assim uma disfunção do sistema pigmentar em que há intensificação da ação da tiro-

sinase, resultando no surgimento de manchas marrons na pele (GUPTA *et al.*, 2006; SMIT *et al.*, 2009). O HMP atua como inibidor da tirosinase, promovendo a redução da produção de melanina (GUPTA *et al.*, 2006; SATO *et al.*, 2007; MOHAMAD *et al.*, 2010).

A utilização do HMP em cosméticos como cremes e pomadas também é uma outra importante aplicabilidade dessa substância. A utilização em cosméticos com ação clareadora tem sido verificada devido sua ação inibitória da tirosinase (LIN *et al.*, 2007). Atualmente é utilizado como componente fundamental em formulações de cremes de clareamento de pele, loções protetoras de radiação UV e para tratamento de sardas e manchas de idade, sabões de branqueamento e até mesmo produtos de clareamento dentário (MOHAMAD *et al.*, 2010).

Além disso, o HMP é tradicionalmente utilizado na culinária japonesa como aditivo alimentar em alimentos como miso (pasta de soja), shoyu (molho de soja) e saquê (BURDOCK *et al.*, 2001; BENTLEY, 2006). É utilizado nos alimentos como antioxidante e intensificador de sabores (BURDOCK *et al.*, 2001; MOHAMAD *et al.*, 2010).

O HMP também vem sendo utilizado no tratamento de tumores. Moto *et al.*, (2006) demonstraram atividade proliferativa de hepatócitos em camundongos que sofreram hepato-tomia e foram tratados com alimentos contendo 3% HMP. Higa *et al.*, 2007 induziram o aparecimento de lesões na pele e ao trataram com um creme contendo 3% de HMP, não observaram a formação de nódulos. Chusiri *et al.*, (2011) em estudo *in vivo* com camundongos sobre hepatocarcinogênese constataram que em concentrações inferiores a 0,5% o HMP não possui efeito genotóxico.

A ação do HMP em patógenos foi mostrada para helmintos e em algumas espécies de fungos. Fitzpatrick *et al.*, (2007) verificaram que *Schistosoma mansoni* tratado com o metabólito sofreram inibição da tirosinase 1 e 2. Essas enzimas são importantes para a produção e formação da membrana do ovo desses helmintos. Assim, a inibição da tirosinase 1 e 2, resultou na redução do número de ovos fenotipicamente normais do parasito. Além disso, Chee & Lee (2003) constataram a ação microbicida do HMP em fungos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Trichophyton rubrum*, considerados importantes patógenos humanos. Esse estudo mostrou que o HMP inibiu a produção de melanina em *Cryptococcus neoformans*, que atua como importante fator de virulência para o fungo. A ação fungicida do HMP constitui uma importante aplicabilidade adicional à indústria de cosméticos que utiliza esse metabólito em cremes despigmentantes (CHEE & LEE, 2003).

O primeiro trabalho descrito na literatura demonstrando os efeitos do HMP em leucócitos foi realizado por Niwa & Akamatsu (1991) que mostraram a ação antioxidante do metabólito em neutrófilos. Entretanto, mostraram também que houve uma potencialização da pro-

dução intrínseca de radicais de oxigênio, possivelmente através da enzima NADPH oxidase. Outra descoberta importante foi o aumento da produção de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, um importante íon relacionado com a ativação celular. O aumento da atividade fagocítica em neutrófilos também foi observado nesse estudo.

A ação do HMP em macrófagos peritoneais murino foi descrita recentemente pelo nosso grupo. Rodrigues *et al.*, (2011) ao tratarem macrófagos residentes com  $50\mu\text{g/mL}$  do metabólito, observaram uma reorganização do citoesqueleto, associada a um maior espalhamento celular. Além disso, foi observado um aumento da capacidade fagocítica das células tratadas quando comparado com células não tratadas. Esse mesmo estudo mostrou que a droga foi capaz de induzir a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), mas não de Óxido nítrico (NO).

Assim, os autores mostraram que o HMP é capaz de modular a resposta imune mediada por macrófagos, atuando assim como um ativador dessas células. Contudo, até o presente momento não existem dados na literatura no que se refere a ação do metabólito em monócitos humanos.

## 2- JUSTIFICATIVA

Os monócitos são importantes células do sistema fagocítico e desempenham funções essenciais no combate aos patógenos, como fagocitose, produção de radicais de oxigênio/nitrogênio, imunomodulação e apresentação de antígenos. Algumas substâncias são utilizadas em laboratório para promover a diferenciação celular, como o M-CFS que diferencia e ativa células mononucleares. Entretanto, essas substâncias são extremamente citotóxicas (ABUD, *et al.*, 2006). Assim, é constante a busca pelo uso de medicamentos em baixas doses, com baixa citotoxicidade, que estimulem a resposta microbicida de células hospedeiras e que, ainda seja capaz de destruir um patógeno intracelular.

Alguns trabalhos demonstraram que o HMP possui uma variedade de aplicações (NIWA & AKAMATSU, 1991; BURDOCK, *et al.*, 2001; FITZPATRICK, *et al.*, 2007; MOTO, *et al.*, 2006). Contudo, poucos trabalhos na literatura científica demonstram a ação do HMP sobre agentes infecciosos e parasitários, bem como a sua ação sobre os principais fagócitos humanos.

A ação do HMP na ativação de macrófagos peritoneais murinos foi recentemente mostrada pelo nosso grupo (Laboratório de Parasitologia-ICB-UFPA). Em células tratadas com 50µg/mL do metabólito, ocorreu uma reorganização do citoesqueleto, associada a um maior espaçamento celular. Além disso, foi observado um aumento da capacidade fagocítica das células tratadas quando comparado com células não tratadas, produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), mas não de Óxido nítrico (NO). Outros estudos também realizados por nosso grupo, mostraram que o HMP apresentou atividade leishmanicida sobre formas promastigotas e amastigotas de espécies de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Contudo, até o presente momento não existem dados na literatura no que se refere a ação do metabólito em monócitos humanos.

Desta forma, o presente trabalho visa dar continuidade aos estudos realizados no Laboratório de Parasitologia/Biologia Estrutural para verificar seu efeito imunomodulador em monócitos humanos.

### **3-OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL:**

Analisar o efeito do metabólito 5-hidroxi-2-hidroximetil- $\gamma$ -pirona (HMP) sobre monócitos humanos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- (1) Purificar células mononucleares (PBMC) do sangue periférico humano;
- (2) Analisar a viabilidade de monócitos humanos após o tratamento com HMP através dos métodos Thiazolyl Blue (MTT), Vermelho Neutro (VN), Potencial de membrana mitocondrial (JC-1) e Azul de Tripán;
- (3) Analisar alterações estruturais e ultraestruturais de monócitos humanos tratados com HMP por Microscopia Óptica, Microscopia Eletrônica de Transmissão e Microscopia Eletrônica de Varredura.
- (4) Analisar por imunofluorescência a expressão de proteínas de superfície de macrófagos em monócitos humanos tratados com HMP.

## 4-MATERIAL E MÉTODOS

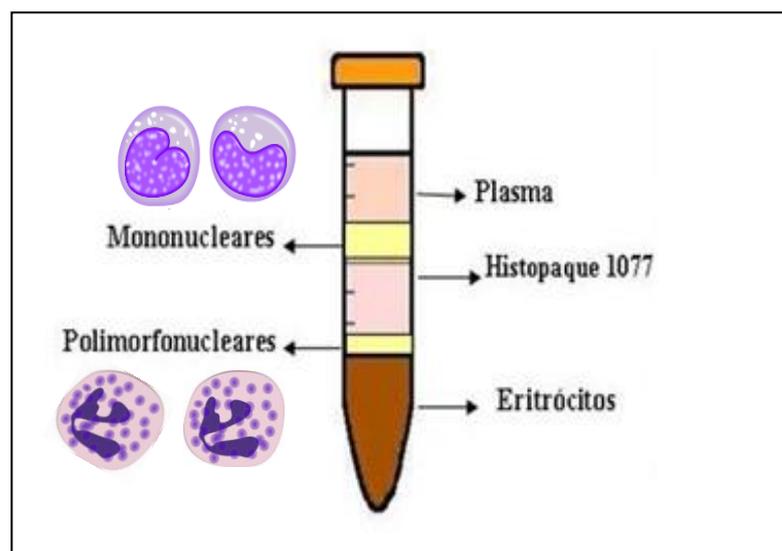
### 4.1-OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS HUMANAS MONONUCLEARES

Monócitos humanos foram obtidos a partir de bolsas de leucócitos fornecidas pela Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (HEMOPA).

A purificação das células mononucleares foi realizada em gradiente HISTOPAQUE<sup>®</sup>-densidade 1077 (Sigma Chem Co, St Louis, MO, U.S.A) conforme descrito anteriormente por Smit *et al.* (2008). Este método consiste em uma mistura de polissacarídeos hidrofílicos de alta densidade que se dissolvem em solução aquosa. Quando o sangue é sobreposto neste reagente e a solução é centrifugada, as células mononucleares concentram-se na interface plasma-reagente (Figura 7).

O sangue foi adicionado a tubos contendo Histopaque na proporção de 5,0 ml de Histopaque/10,0 ml de sangue, sendo centrifugados (1700 rpm), em temperatura ambiente por 30 minutos .

A camada de células mononucleares foi coletada com o auxílio de micropipeta e posteriormente, foram lavadas em solução salina de fosfato estéril (PBS) pH 7.2 através de centrifugação (1000 rpm, 5 min temperatura ambiente). Este procedimento foi repetido até a remoção total de eritrócitos remanescentes. Em seguida, o sedimento de células foi ressuscitado em 1,0 ml de meio de cultura DMEM sem soro. A viabilidade celular foi avaliada pela técnica de exclusão com azul de Tripán, sendo utilizadas apenas amostras com mais de 80% de viabilidade.



**Figura 6:** Esquema ilustrativo da separação de monócitos a partir de concentrado de leucócitos.

A contagem das células foi feita em câmara de Neubauer e a concentração ajustada de acordo com o número de células utilizadas em cada experimento. Os monócitos foram então transferidos para placas de cultura de 24 poços ou garrafas de cultura e incubados a 37 °C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub>, durante duas horas para adesão. Após esse período foi feita uma lavagem com solução salina de fosfato estéril (PBS pH 7.2) para remoção de células que não aderiram e, em seguida adicionado meio DMEM suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF). As células foram então tratadas e mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As bolsas cedidas pelo HEMOPA foram acondicionadas em recipientes plásticos apropriados e descartadas em containeres para coleta seletiva de material biológico.

#### **4.2 OBTENÇÃO DO METABÓLITO HMP**

O HMP foi obtido no laboratório de Desenvolvimento de Fármacos por meio do método biotecnológico. Para aumentar a produção do metabólito, os fungos foram cultivados em laboratório. Para tanto, foram utilizados 5 mL da suspensão de esporos de fungo do gênero *Aspergillus*, em frascos contendo 400 mL de meio de cultura Czapek. Posteriormente, foram realizados repiques a fim de aumentar o crescimento dessa cultura em frascos contendo 500 mL de meio líquido Czapek-Dox (pH 5,5) suplementados com 6% (m/v) de amido de mandioca devidamente esterilizado (121 °C / 15 min). Os frascos foram colocados em incubadora com agitação e temperatura fixadas (120 rpm a 28 °C). A fase líquida obtida do meio de cultura foi submetida à filtração e em seguida à liofilização para obtenção do material bruto concentrado. O conteúdo foi transferido para frascos, foi adicionada uma solução de etanol: água (80 : 20). Extrações consecutivas foram realizadas e os produtos resultantes foram concentrados por evaporação. O produto final foi obtido por cristalização.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear foi utilizada para caracterizar o HMP. A pureza foi avaliada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), sendo considerado puro o material cristalizado com pureza acima de 95%. A estrutura da substância foi caracterizada por ultravioleta (UV) utilizando os filtros com comprimentos de onda de 269 nm, para detecção do HMP e 580 nm, para detecção dos derivados complexados com ferro (Fe).

### 4.3 DILUIÇÃO DO HMP

O HMP foi preparado em uma concentração estoque de 1 mg/mL em meio DMEM. A concentração final utilizada para cada experimento foi obtida a partir dessa solução.

### 4.4 TRATAMENTO DOS MONÓCITOS COM HMP.

O tratamento teve início logo após o período de adesão das células (2 horas). O HMP foi adicionado em placas de cultura ou garrafas de cultura nas concentrações de 50 e 100 µg/mL diluídas em meio de cultura (DMEM) para o teste de viabilidade MTT e nas concentrações de 50 e 100 µg/mL para os demais ensaios. As células foram incubadas a 37 °C em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> durante diferentes tempos de tratamento. Os procedimentos foram realizados após o término de cada tempo de tratamento (24, 48 e 72 horas de tratamento). Nos grupos correspondentes a 48 e 72 horas de tratamento, o HMP foi adicionado às culturas a cada 24 horas até o final de cada ensaio. Monócitos não tratados foram utilizados como controles.

### 4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS TRATADAS COM HMP

Para análise do efeito do HMP sobre a viabilidade de monócitos humanos, as células foram tratadas com 50 e 100 µg/mL da droga por 24, 48 e 72 horas. Foram utilizados quatro testes: Thiazolyl blue (MTT), detecção do potencial da membrana mitocondrial-  $\Delta\Psi$  (JC1); Azul de Tripán e Vermelho Neutro.

#### 4.5.1-Método do *Thiazolyl Blue* (MTT)

O MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (SIGMA) é um sal tetrazolium que, após sofrer clivagem por desidrogenases mitocondriais é convertido em cristais azuis de formazan, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. O produto formazan é impermeável às membranas celulares, acumulando-se em células viáveis (FO-TAKIS *et al.*, 2006). Com a adição de dimetilsulfóxido (DMSO), os cristais de formazan sofrem solubilização e o produto final da reação é lido por espectrofotometria.

Monócitos foram cultivados como descrito no item 4.1 em placas de 96 poços e submetidos ao tratamento com o HMP nas concentrações de 50 e 100 µg/mL por 24, 48 e 72

horas. O sobrenadante foi retirado e os poços lavados com PBS. Logo após a lavagem, foi adicionado 0,5 mg/mL MTT diluído em PBS sendo, posteriormente, incubados à 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 3 horas. Após o término da incubação, foi retirado o sobrenadante, lavado 1 vez com PBS e adicionado 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço para solubilização dos cristais de formazan e incubado em agitação por 10 minutos. Posteriormente, a solução resultante foi lida em leitor de ELISA (BIO-RAD Model 450 Microplate Reader) em um comprimento de onda de 570 nm (FOTAKIS *et al.*, 2006). Como controles da reação, foram utilizadas células não tratadas e células que foram mortas com solução de 10% de formol em PBS.

#### **4.5.2 Detecção do Potencial da Membrana Mitocondrial- $\Delta\Psi_m$ (JC1)**

O potencial de membrana mitocondrial,  $\Delta\Psi_m$ , é um importante parâmetro da função mitocondrial usado como um indicador de viabilidade celular. O JC-1 é um marcador fluorescente que mensura o potencial da membrana mitocondrial das células. A perda de potencial de membrana mitocondrial é utilizada como indicador de apoptose. O JC-1 possui vantagens sobre outros corantes catiônicos, pois pode penetrar na mitocôndria conforme variações no potencial de membrana. JC-1 possui formas conhecidas como “J- agregados” que coram células não-apoptóticas com fluorescência vermelha intensa. Por outro lado, em células apoptóticas com baixo  $\Delta\Psi_m$ , permanecem na forma monomérica, apresentando apenas fluorescência verde.

Monócitos humanos foram cultivados em placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas e submetidos ao tratamento por 24, 48 e 72 horas com 50 e 100 µg/mL de HMP. Ao final de cada um dos tratamentos mencionados, as células foram incubadas por 30 min com 10 mM de JC-1 (SIGMA) à 37°C, lavados com PBS, observados e fotografados em Microscópio Confocal LSM 5 Pascal Zeiss.

#### **4.5.3-Teste do Vermelho Neutro (VN)**

O Vermelho Neutro é um corante vital, solúvel em água e passa através da membrana celular, concentrando-se nos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. Assim, o teste do vermelho

neutro (VN) baseia-se na capacidade de células viáveis incorporarem este corante vital e acumularem em lisossomos.

Alterações na membrana lisossomal resultam numa redução da incorporação do VN, e desta forma é possível fazer a distinção entre células viáveis e não viáveis pela medida de intensidade de cor da cultura celular (BABICH *et al.*, 1991; ROGERO *et al.*, 2003; MAMACA *et al.*, 2005). O teste foi realizado segundo o protocolo de Fotakis *et al* (2006) com algumas modificações.

Monócitos foram cultivados como descrito anteriormente, submetidos ao tratamento com HMP nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Após o tratamento as células foram lavadas 2 vezes com PBS e incubadas com 1,7 µL/mL da solução VN (10 mM) diluído em DMEM e, posteriormente, incubados à 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 3 horas. Em seguida o sobrenadante foi retirado e desprezado e as células foram novamente lavadas com PBS. Após lavagem, foi adicionado 200 µL da solução de eluição contendo acetona: ácido acético (50:1) para solubilização dos cristais, seguido de incubação em agitação por 10 minutos. Posteriormente, a solução resultante foi transferida para placa de 96 poços e lida por espectrofotometria em leitor de ELISA (BIO-RAD Model 450 Microplate Reader) em um comprimento de onda de 570 nm. Como controle negativo, as células foram mortas com solução de formol a 10% em PBS.

#### **4.5.4- Azul de Tripán**

Azul de Tripán é um outro corante vital utilizado em testes de viabilidade celular. Esse cromóforo, é carregado negativamente e não interage com a célula, a menos que a membrana esteja danificada. Por conseguinte, todas as células que excluem o corante são viáveis. Desta forma o teste de exclusão, através da coloração com azul de Tripán, baseia-se na capacidade de células não viáveis tornarem-se permeáveis ao corante, o que pode ser observado por microscopia óptica.

Monócitos foram cultivados como descrito no item 4.1 em tubos e foram submetidos ao tratamento com HMP nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Após o tratamento, foi retirado um volume de 10 µl de cada tubo que foi somado a 90 µl de azul de tripan 0,2%. A mistura foi colocada em Câmara de Neubauer para contagem celular. Foram contadas as células viáveis em relação à quantidade de células presentes nos quatro campos mais externos da câmara de Neubauer. O ensaio foi repetido três vezes para cada tubo. Células não tratadas foram utilizadas como controle.

## 4.6 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DE MONÓCITOS TRATADOS COM HMP

### 4.6.1 Microscopia Óptica

Monócitos foram cultivados e tratados por 24, 48 e 72 horas com 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  de HMP em placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas como descrito no item . Ao final de cada tratamento nos tempos mencionados, o sobrenadante foi retirado e as lamínulas lavadas com PBS pH 8.0. Em seguida, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% em tampão PHEM 0,1 M por 1 hora e, lavadas posteriormente com PBS. A coloração foi feita com o corante Panótico, com imersão das lamínulas por 2 minutos no corante. Após isso, as lamínulas foram lavadas em água destilada para retirada do excesso de corante, secas e montadas em lâminas de vidro, tendo *Entellan* como meio de montagem. A análise morfológica foi feita em microscópio óptico Olympus BX41.

### 4.6.2 Microscopia Óptica de Fluorescência- avaliação da expressão de proteínas de superfície específicas de macrófago (F4/80)

Monócitos foram cultivados em placas de cultura de 24 poços ( $2 \times 10^6$ ) e tratados por 48 e 72 horas nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . As células foram fixadas em paraformaldeído 4% em tampão PHEM 0,1 M por 1 hora. Em seguida as células foram lavadas em PBS e os sítios de ligação foram bloqueados com solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50mM. Para bloqueio dos radicais aldeído, as células foram incubadas com tampão glicina a 0.1 M por 15 minutos em PBS. Foram realizadas lavagens com PBS suplementado com 1 e 3% de BSA. Para detecção das proteínas de superfície F4/80 específicas de macrófago, as células foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-F4/80 (BM8) (Santa Cruz Biotechnology®) diluído 1:50 em PBS com 1% de BSA durante 1 hora, seguido de lavagens sucessivas em PBS para total remoção de anticorpos não ligantes. Após isso, as células foram incubadas com anticorpo secundário policlonal fluorescente marcado com Ficoeritrina (PE) (594nm), com diluição de 1:50 (abcam®) por 40 minutos, seguido de sucessivas lavagens em PBS. As células foram incubadas com DAPI diluído 1:10 em PBS por 15 minutos para marcação do núcleo, sendo lavadas em PBS e água. As lamínulas foram montadas em lâmina de microscopia contendo *ProLong Gold antifade reagent* (Molecular Probes Invitrogen®) e observadas em microscópio óptico de fluorescência. A marcação com DAPI foi analisada em filtro de 365 nm. A análise das células foi realizada utilizando Microscópio Óptico Axiophot Zeiss. Como controles da reação, utilizou-se macrófagos peritoneais de camundongos que foram incubados com o anticorpo

monoclonal anti-F4/80 (BM8) (Santa Cruz Biotechnology®) seguindo os procedimentos mencionados para monócitos humanos.

#### **4.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Monócitos humanos foram cultivados como descrito no item 4.1, tratados por 24, 48 e 72 horas e processados em lamínulas de vidro. A desidratação foi realizada em uma série de etanol (Merck) em água a 30, 50, 70, 90% (10 minutos cada etapa) e 100% (3 vezes durante 10 minutos). As amostras foram secas pelo método do ponto crítico (Modelo K 850 - Marca EMITECH) usando CO<sub>2</sub>. As lamínulas foram fixadas em suporte apropriado (*stub*) e metalizadas com uma película de ouro de aproximadamente 2 nm de espessura, usando o aparelho *Emitech K550-England*. As células foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura LEO 1450VP. Como controles foram utilizados monócitos sem tratamento.

#### **4.6.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Monócitos foram cultivados em garrafas de cultura como descrito no item 4.4 e tratados por 24, 48 e 72 horas com HMP nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Posteriormente, foram fixados em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído a 25%, 4% de paraformaldeído, 2,5% de sacarose, em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2. Após a fixação as células foram lavadas 3 vezes em Tampão cacodilato 0.1 M e posteriormente incubadas em solução contendo: 1% tetróxido de ósmio, ferrocianeto de potássio 0,8% por 1 hora à temperatura ambiente. As células foram lavadas três vezes em tampão cacodilato 0,1 M e então desidratadas em série crescente de acetona durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após desidratação as células foram lentamente impregnadas em resina Epon nas seguintes concentrações: 2:1, 1:1 e 1:2 (acetona 100%: Epon - 6 horas em cada etapa). A seguir o material foi colocado em Epon puro por 6 horas e depois no suporte para polimerização a 60° C por 48 horas. Os blocos polimerizados foram cortados em ultramicrótomo (Leica EM UC6) e os cortes obtidos foram contrastados durante 20 minutos com acetato de uranila 5%, e posteriormente durante 5 minutos com citrato de chumbo e observados em Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss EM 900 e EM906.

#### **4.6.5- ANÁLISE DE ÁREA CELULAR (MORFOMETRIA)**

A morfometria é um recurso útil para acompanhar por meio de medidas de estruturas celulares, o processo de maturação e diferenciação de monócitos em macrófagos, uma vez que macrófagos apresentam área citoplasmática duas ou três vezes maior que dos monócitos (SOKOL *et al*, 1987). Monócitos humanos foram cultivados como descrito no item 4.1, tratados por 24, 48 e 72 horas e processados em lamínulas de vidro para Microscopia eletrônica de varredura. As amostras foram então analisadas conforme descrito no item 4.6.3. Assim, a morfometria foi utilizada neste estudo para medir a área total da célula, para que se pudesse observar se a utilização do HMP em monócitos, estaria promovendo o aumento da área citoplasmática. Foram utilizadas três imagens de cada amostra para análise morfométrica (células do grupo controle e tratadas por 24, 48 e 72h) somando 27 células. Posteriormente a área total do citoplasma das células foi medida através do programa ImageJ.

#### **4.7- ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados obtidos foram analisados utilizando o Graph Pad Prism Versão 5.0. Para análise estatística foi utilizado análise de variância, ANOVA, seguido do Teste Tukey com  $p < 0,05$ .

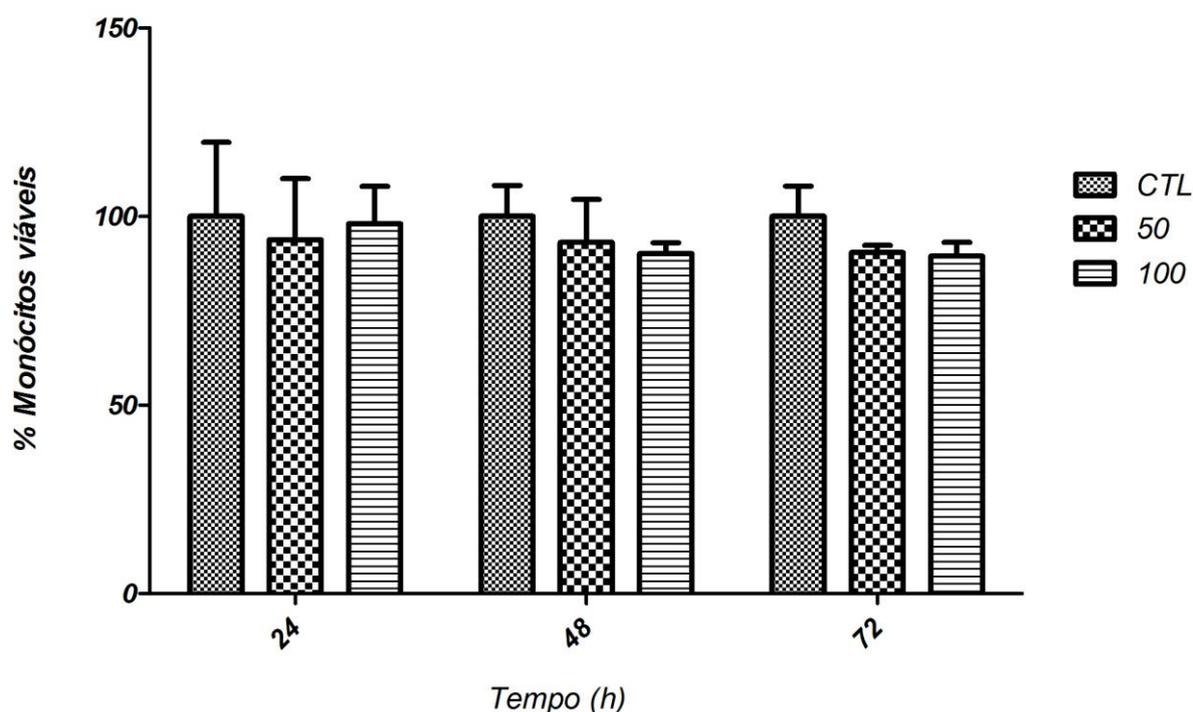
## 5-RESULTADOS

### 5.1. VIABILIDADE CELULAR

Primeiramente, foram realizados os ensaios de viabilidade em monócitos humanos tratados com HMP a fim de verificar se a droga apresenta ou não efeito citotóxico nessas células. Para tanto, foram utilizados quatro testes: MTT, JC-1, Azul de Tripan, e Vermelho Neutro.

#### 5.1.1- Método thiazolyl blue (MTT)

Pelo teste do MTT não foi observada citotoxicidade em monócitos tratados com concentrações de 50 e 100 $\mu$ g/mL (Figura 7). Sendo assim, com o teste de MTT foi possível observar que os monócitos tratados mantêm a viabilidade até mesmo na concentração máxima de HMP utilizada (100  $\mu$ g/mL). O teste mostrou também que em todos os tempos de tratamento as células mostraram-se viáveis.

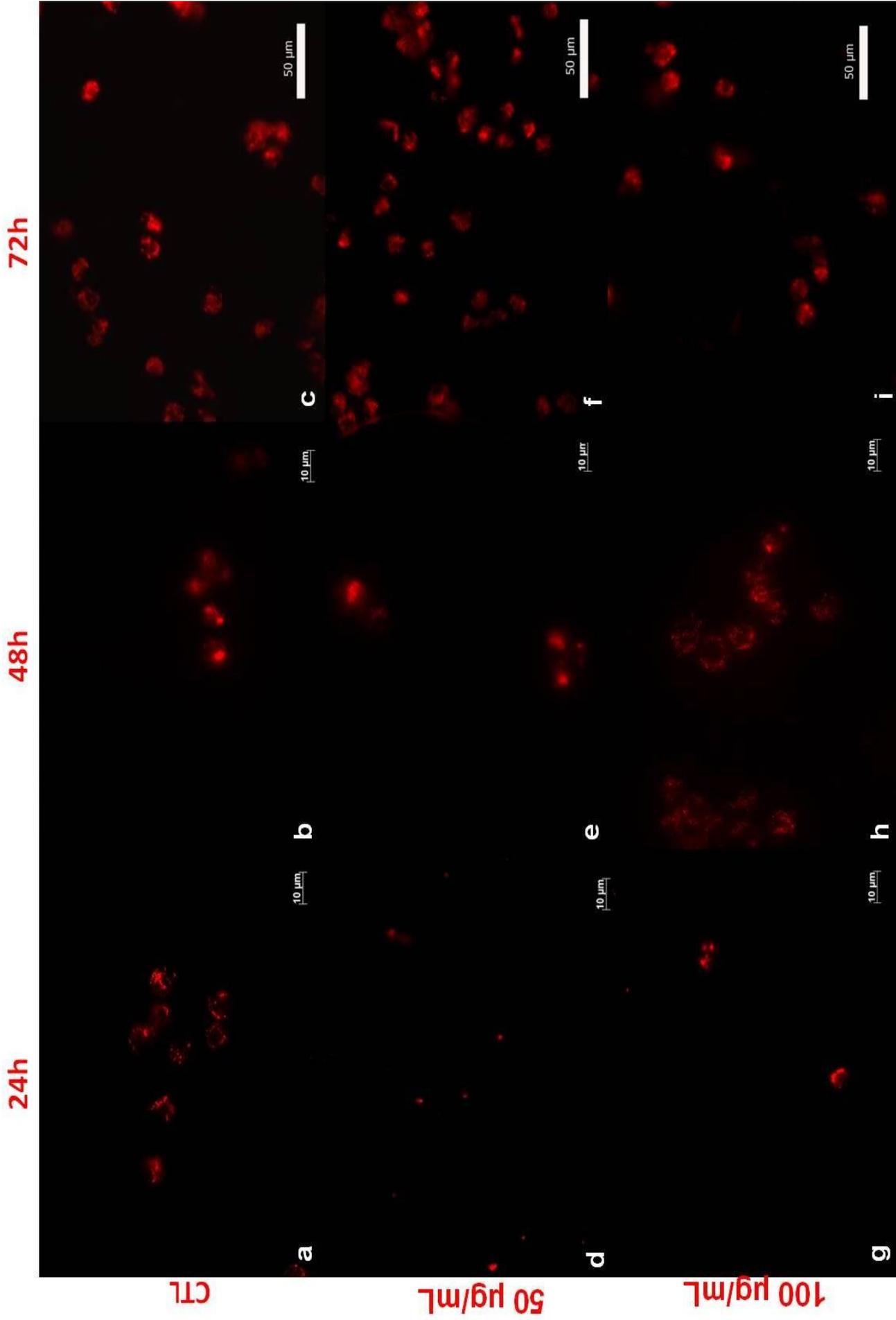


**Figura 7:** Análise da viabilidade celular pelo método MTT em monócitos tratados com o HMP nas concentrações de 50 a 100  $\mu$ g/mL por 24, 48 e 72 h. Observar que a viabilidade das células tratadas se mantém em todos os tempos de tratamento. CTL: controle, monócitos sem tratamento.

### **5.1.2- Detecção de Potencial da Membrana Mitocondrial- $\Delta\psi_m$ (JC1)**

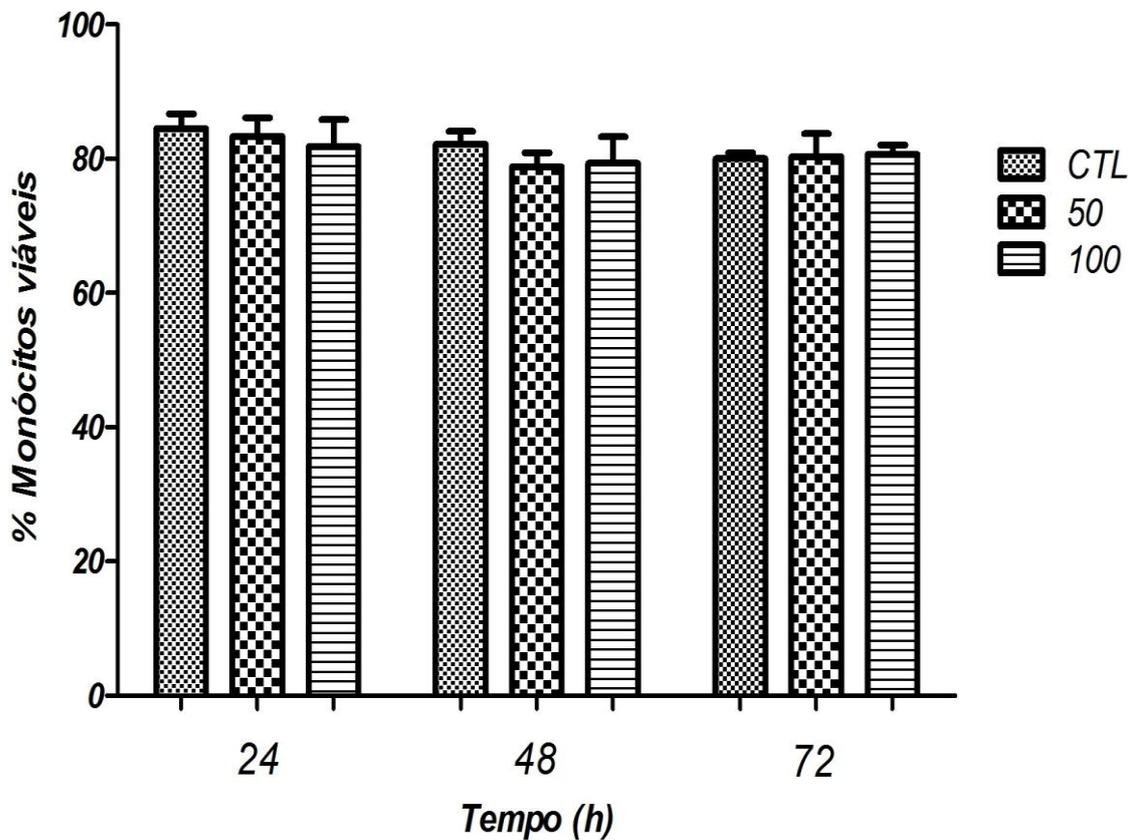
A viabilidade de monócitos tratados com HMP também foi avaliada pelo método JC-1 que é um corante fluorescente que mensura o potencial de membrana mitocondrial das células. Em células viáveis, o JC-1 fluoresce em vermelho. Foi possível observar que monócitos tratados com 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  de HMP por 24, 48 e 72 horas (Figura 8) mantiveram-se viáveis, indicando que a droga utilizada não interfere na viabilidade dos monócitos.

**Figura 8:** Análise da viabilidade celular pelo método JC-1 em monócitos tratados com o HMP por 24, 48 e 72h nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. (a), (b) e (c) controle sem tratamento. Observar fluorescência vermelha indicando viabilidade celular. (d), (e) e (f) monócitos tratados com 50 µg/mL de HMP. (g), (h) e (i) monócitos tratados com 100 µg/mL de HMP. Observar agregados com fluorescência vermelha em células tratadas, semelhante ao controle. Barras: 10 e 50 µm. CTL: controle, monócitos sem tratamento.



### 5.1.3- Azul de Tripán

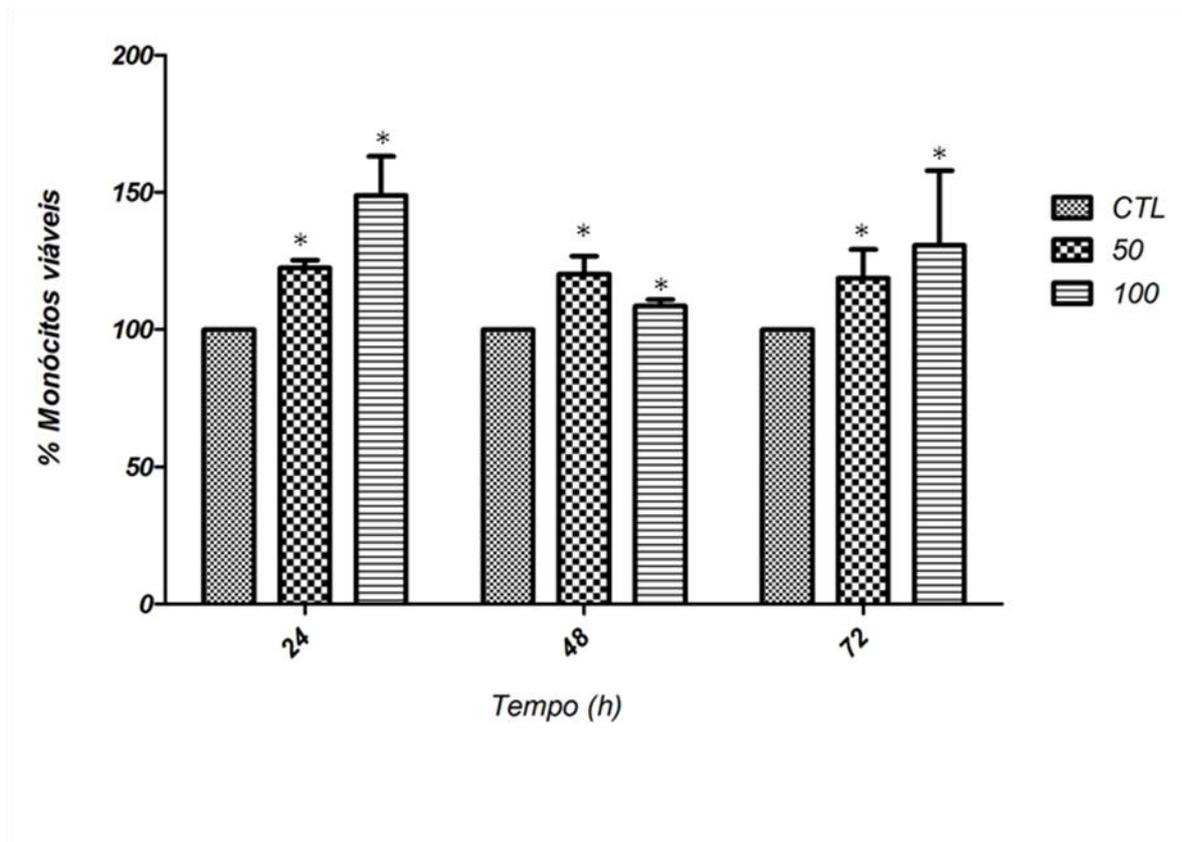
O teste de exclusão através da coloração com azul de tripan baseia-se na capacidade de células não viáveis incorporarem o corante. Esse corante vital é um cromoporo carregado negativamente e, só reage com as células quando a membrana plasmática encontra-se danificada. Assim, não foi observado uma redução significativa do número de monócitos viáveis após tratamento com HMP nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  em 24, 48 e 72 horas.



**Figura 9:** Viabilidade celular através do teste de exclusão Azul de tripan de monócitos tratados com o HMP durante 24 , 48 e 72h. . CTL: controle, monócitos sem tratamento.

#### 5.1.4-Teste do Vermelho Neutro

A integridade celular foi avaliada com o corante vital Vermelho Neutro. O VN é solúvel em água e passa através da membrana celular, concentrando-se nos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas e hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal de células viáveis. Não foi observada redução significativa da viabilidade de monócitos tratados com HMP.



**Figura 10:** Viabilidade celular através do método VN de monócitos tratados com o HMP durante 24, 48 e 72 horas. CTL: controle, monócitos sem tratamento. (\*)  $p < 0,05$  representa a diferença entre células tratadas e o controle sem tratamento.

## **5.2. ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ÓPTICA (MO), MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).**

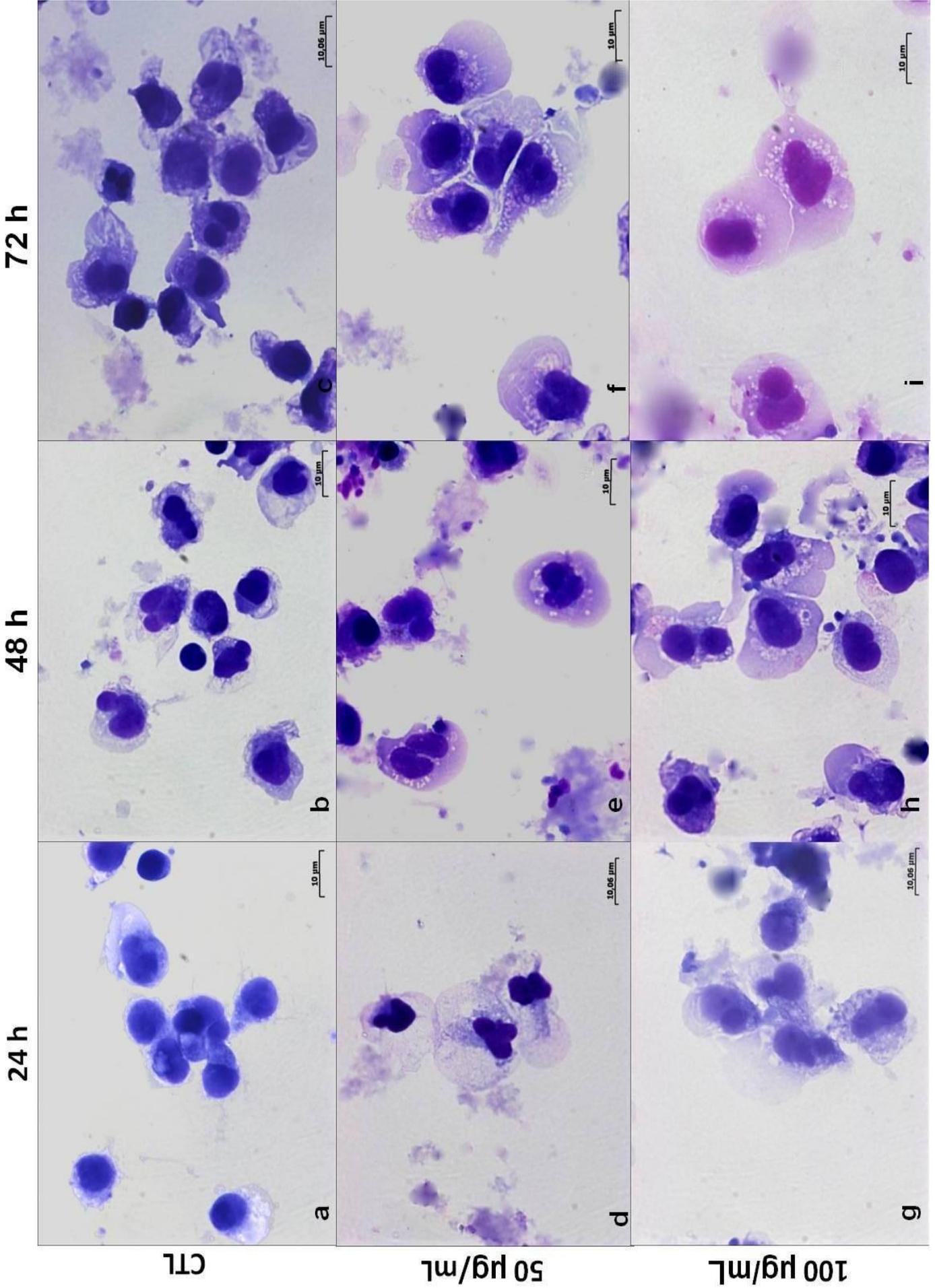
Para analisar a morfologia dos monócitos humanos tratados com HMP, foram utilizadas MO, MET e MEV.

### **5.2.1- Microscopia óptica**

Por meio da microscopia óptica de campo claro foi observado um aumento no espalhamento e maior número de filopódios nas células tratadas por 24 , 48 e 72 horas com HMP nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Além disso, foi possível observar aumento no volume das células tratadas quando comparadas ao controle.

**Figura 11.** Alterações morfológicas em monócitos tratados com 50 e 100µg/mL de HMP por 24 ( a,d,g ), 48 (b,e,h) e 72h (c,f,i) observadas por meio de MO. (a-c) monócitos sem tratamento. (d-f) monócitos tratados com 50µg/mL de HMP. (g-i) Células tratadas com 100µg/mL de HMP. Observar nas células tratadas maior espreadimento, vacuolização e aparente aumento de volume celular em comparação ao controle. Bars 10µm.

Figura 11

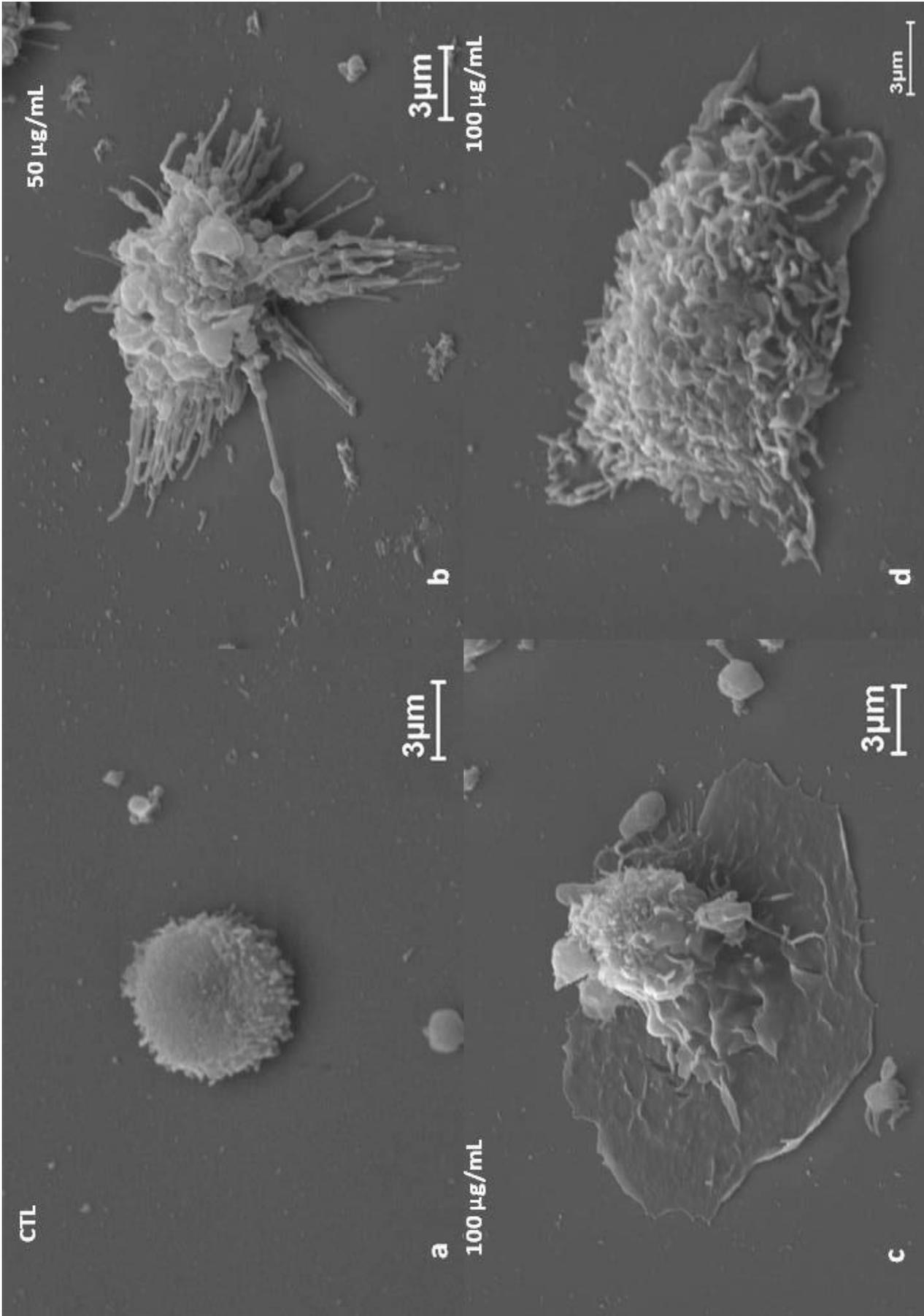


### **5.2.2- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Os resultados obtidos por MO foram confirmados através da análise por MEV. As células analisadas apresentaram aumento do volume celular, projeções citoplasmáticas e maior espraiamento após o tratamento com HMP por 24 (Figura 12), 48 (Figura 13 ) e 72 horas (Figura 14 ) nas concentrações de 50 e 100 µg/mL quando comparadas ao controle. As características observadas em células tratadas são sugestivas de células em processo de diferenciação para macrófago.

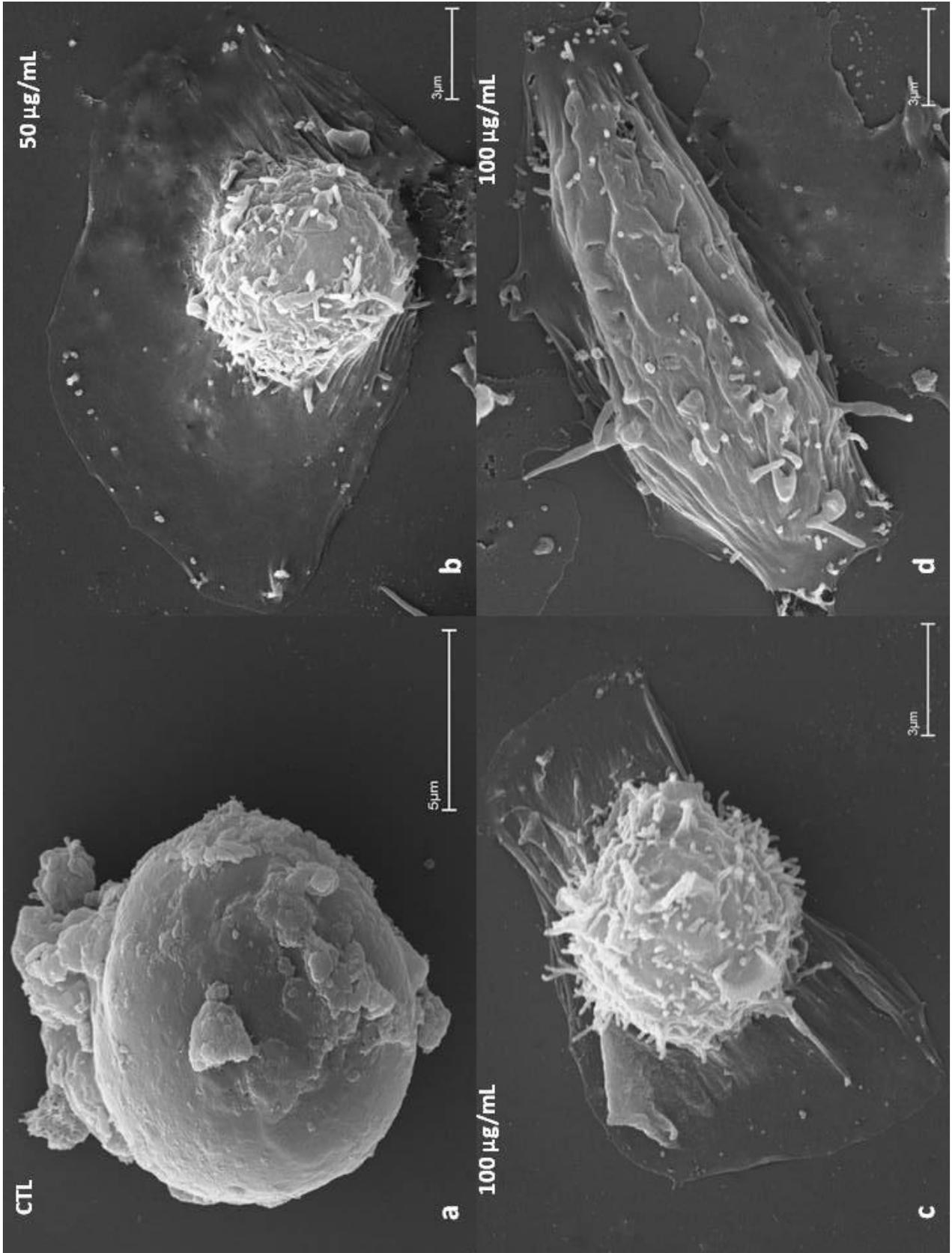
**Figura 12:** Microscopia Eletrônica de Varredura de monócitos humanos cultivados por 24h com 50µg/mL e 100µg/mL. Observar formato arredondado da célula, ausência de projeções citoplasmáticas e espraio no grupo controle, características de células indiferenciadas. Nas células tratadas, observa-se irregularidade na morfologia espraio celular e surgimento de longas projeções citoplasmáticas, sugestivo de célula diferenciada e ativada. Barra: 3 µm. CTL: controle, monócitos sem tratamento.

Figura 12



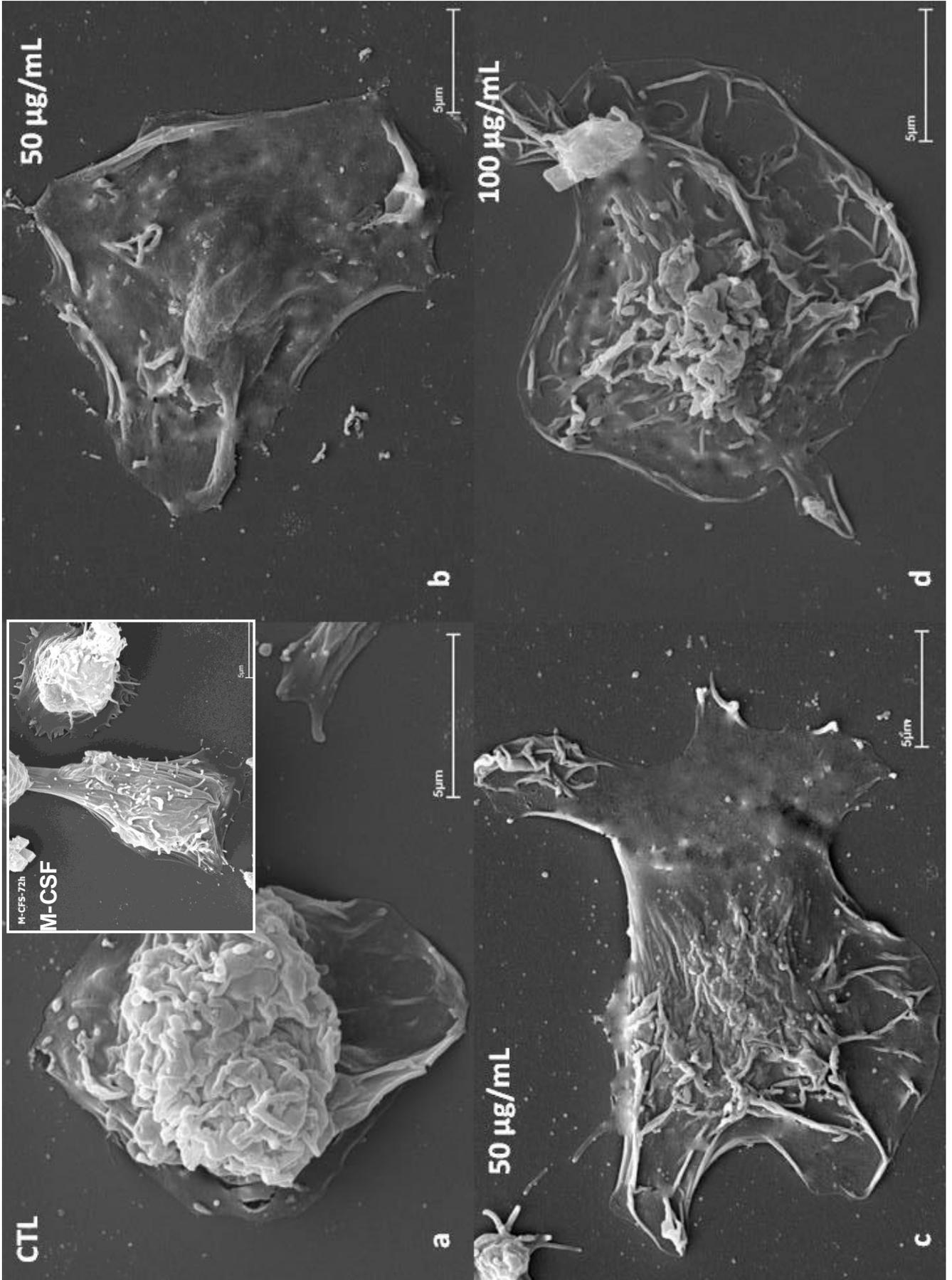
**Figura 13:** Microscopia Eletrônica de Varredura de monócitos humanos cultivados por 48h com 50 $\mu$ g/mL e 100 $\mu$ g/mL. Observar diferenças morfológicas entre células tratadas e não tratadas. Barra: 3  $\mu$ m. CTL: controle, monócitos sem tratamento.

Figura 13



**Figura 14:** Microscopia Eletrônica de Varredura de monócitos humanos tratados por 72 horas com 50µg/mL e 100µg/mL de HMP. Observar grande espraio celular nas células tratadas, sugestivos de células diferenciadas. *Inset:* Controle positivo, monócitos tratados com estímulo M-CFS. Barras: 30µm. CTL: controle, monócitos sem tratamento.

Figura 14

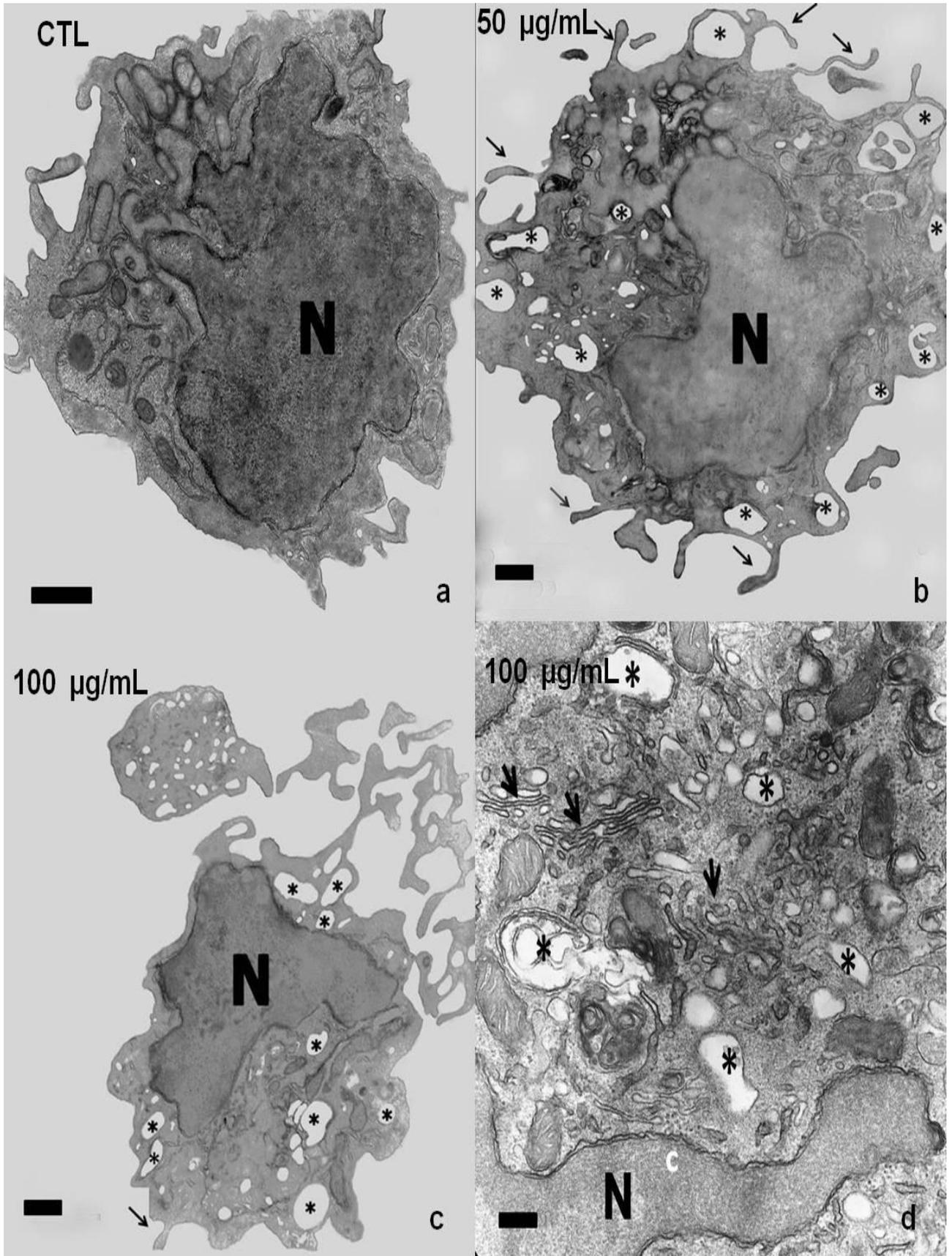


### **5.2.3- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Para observar as alterações ultraestruturais em monócitos tratados com HMP, as células foram observadas por Microscopia eletrônica de Transmissão. Os resultados obtidos mostraram que as células tratadas por 24 (figura 15), 48 (figura 16) e 72h (figura 17) com o metabólito apresentaram espraiamento, prolongamentos citoplasmáticos, intensa vacuolização e aparente aumento na quantidade de Complexo de Golgi e Retículos.

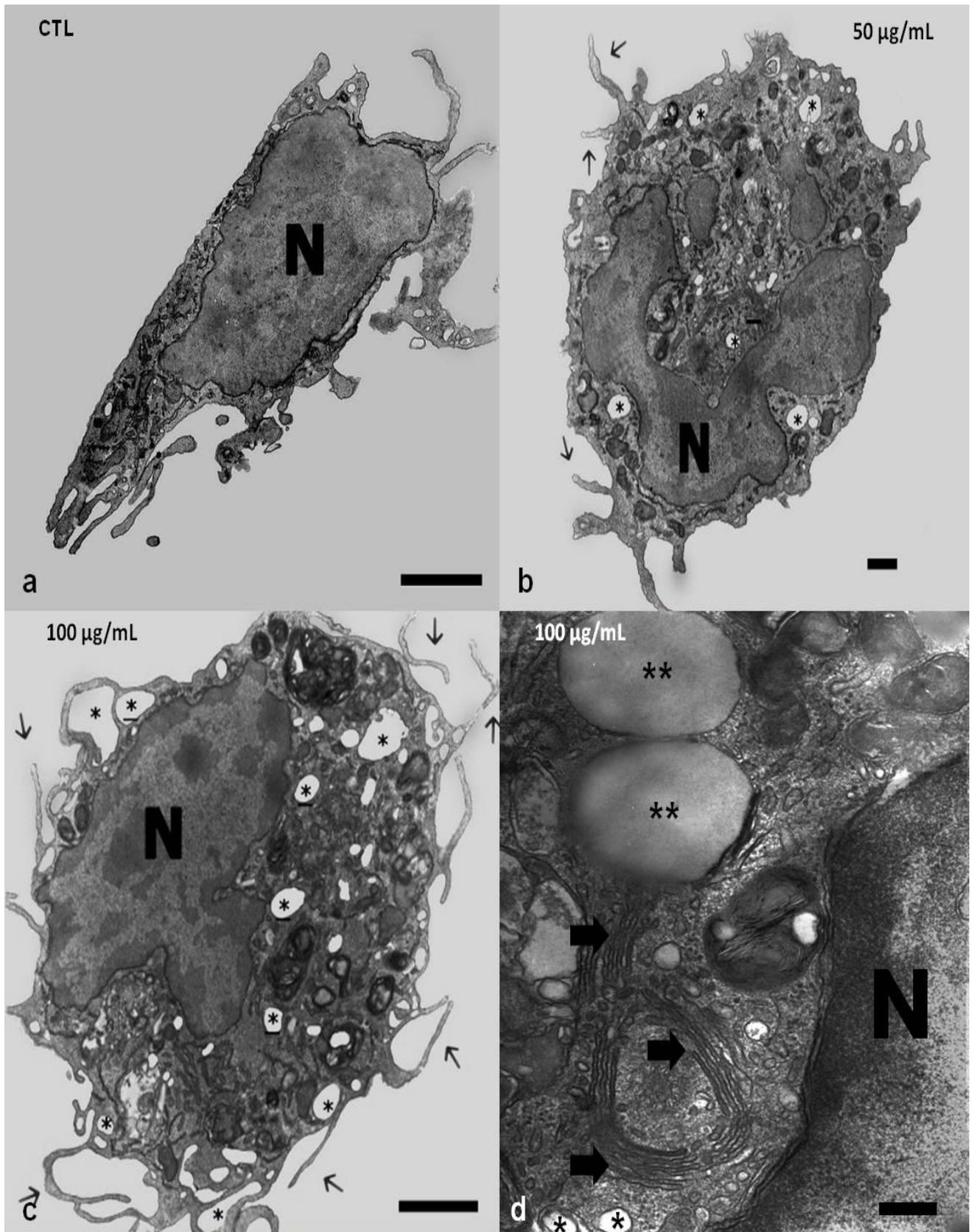
**Figura 15.** Alterações ultraestruturais de monócitos tratados com HMP por 24h e observados através de Microscopia Eletrônica de Transmissão . (a) Células não tratadas- formato regular, com poucas projeções citoplasmáticas e espraçamento, características sugestivas de monócito não diferenciado. Monócitos tratados com 50 (b) e 100  $\mu\text{g/mL}$  (c,d) demonstram morfologia diferente: intensa vacuolização, formação de filopódios, aparente aumento citoplasmático e maior número de complexo de Golgi. Vacuolização (\*), filopódios (seta menor), complexo de Golgi (seta maior) N-núcleo. CTL: controle, monócitos sem tratamento. Barras: 5 $\mu\text{m}$  (a,b,c), 0,5  $\mu\text{m}$  (c).

Figura 15



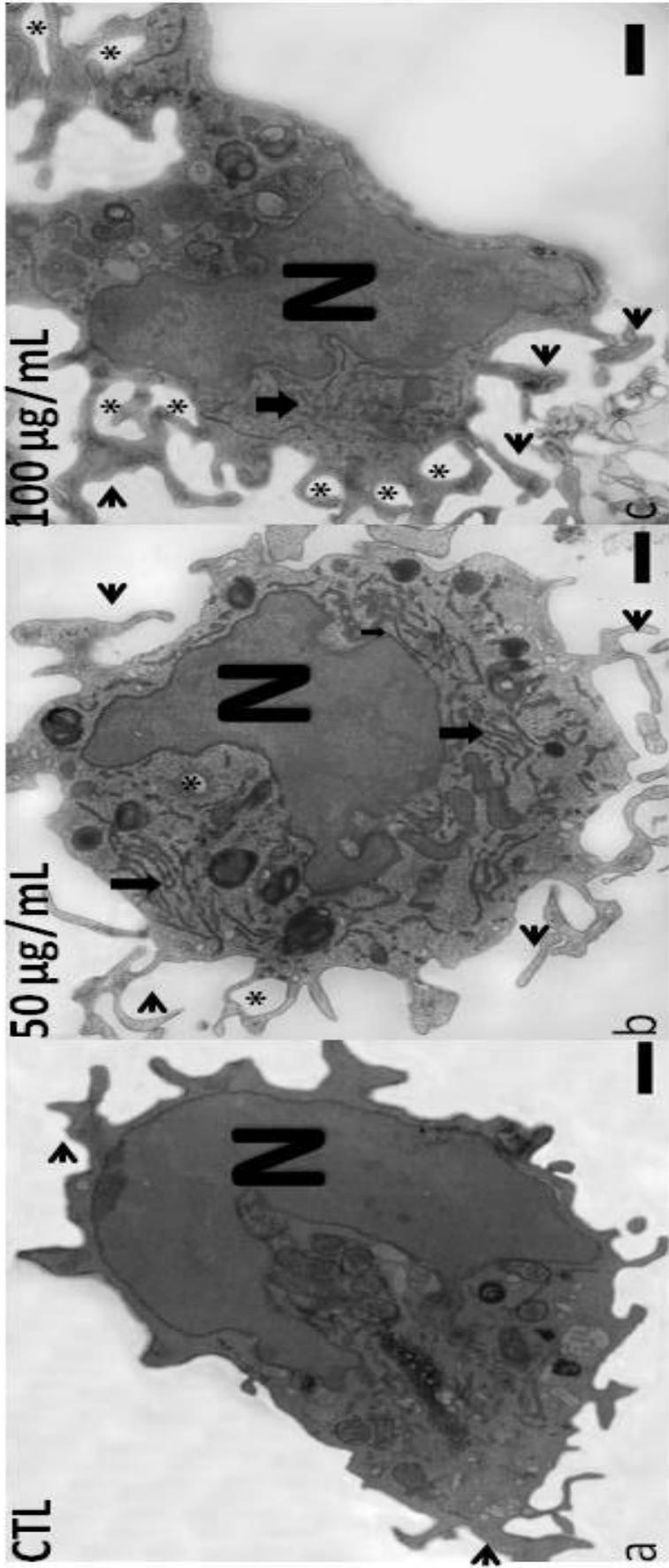
**Figura 16.** Alterações ultraestruturais de monócitos tratados com HMP por 48 h e observados através de Microscopia Eletrônica de Transmissão . Células não tratadas apresentam-se com formato regular (a), com poucas projeções citoplasmáticas e espraiamento, características sugestivas de monócito não diferenciado. (b-d) Observar vacuolização (\*), complexo de Golgi (seta maior), estruturas sugestivas de vesículas lipídicas (\*\*), filopódios (seta menor) e aparente aumento do volume citoplasmático em células tratadas. N-núcleo. CTL: controle, monócitos sem tratamento. Barras: (a-c) 5µm, (d) 0,5 µm .

Figura 16



**Figura 17.** Alterações ultraestruturais de monócitos tratados com HMP por 72 h e observados através de Microscopia Eletrônica de Transmissão . Células não tratadas (a) apresentam-se com poucas projeções citoplasmáticas e espraçamento, características sugestivas de monócito não diferenciado. Observar vacuolização (\*), filopódios (seta menor), maior quantidade de Retículo (seta maior) em células tratadas. N-núcleo. CTL: controle, monócitos sem tratamento. Barras: 2,5µm.

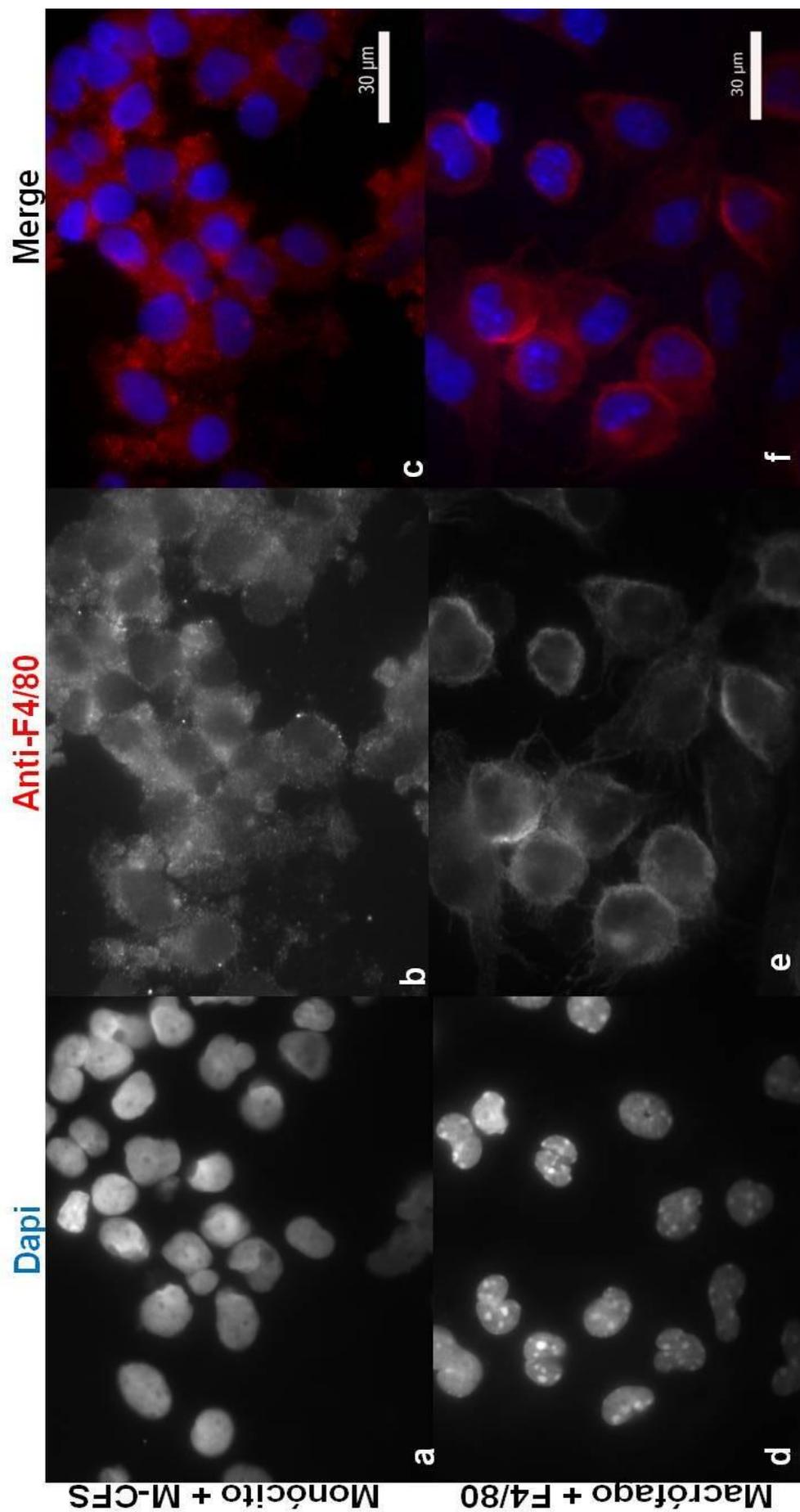
Figura 17



### 5.3. MICROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCÊNCIA

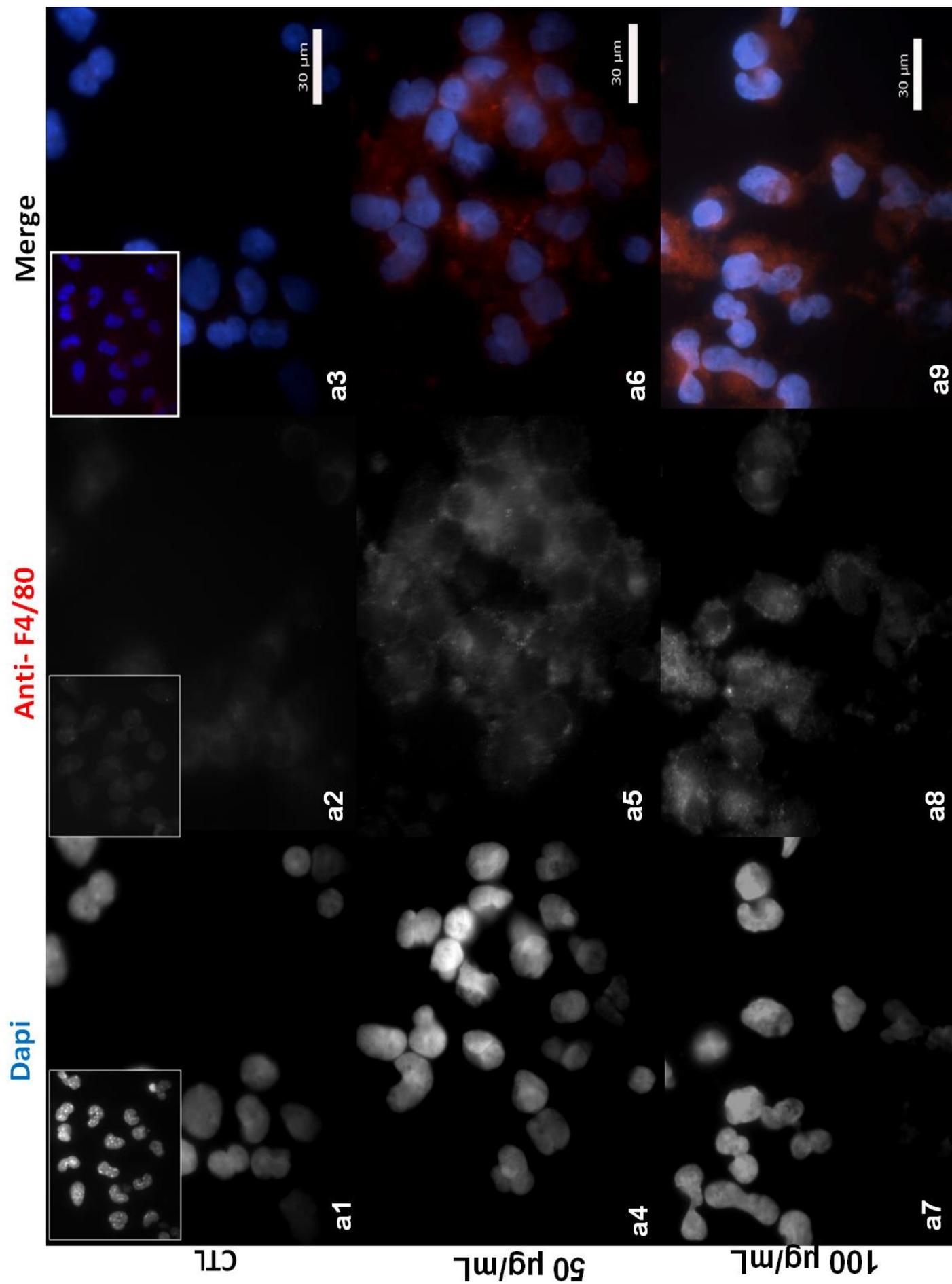
A Proteína de superfície F4/80 específica de macrófago foi investigada, para verificar se o HMP induziu a diferenciação de monócitos humanos em macrófagos. Assim, monócitos humanos tratados foram incubados com o anticorpo monoclonal anti-F4/80 (BM8) (Figuras 18, 19 e 20). Células não tratadas e cultivadas por 48 e 72h demonstraram características semelhantes a monócitos residentes (não diferenciados) por não expressarem a proteína F4/80 nos tempos de 48 (Figura 19 a1-a3 ) e 72 horas (Figura 20 b1-b3 ). Monócitos tratados com 50 e 100 µg/mL por 48 e 72h demonstraram um padrão de expressão da proteína F4/80 muito similar ao verificado nos controles positivos (Figura 18 ). O DAPI foi utilizado para identificação e análise de possíveis alterações nucleares. Não foi detectada nenhuma alteração significativa no núcleo. As células foram analisadas em Microscópio Óptico de Fluorescência Axiophot Zeiss.

**Figura 18. Detecção da expressão da proteína F4/80 em monócitos estimulados com M-CFS e macrófagos peritoneais).** (a-c) Monócitos tratados com M-CFS; ( d-f) Macrófagos peritoneais. Barra: 30µm



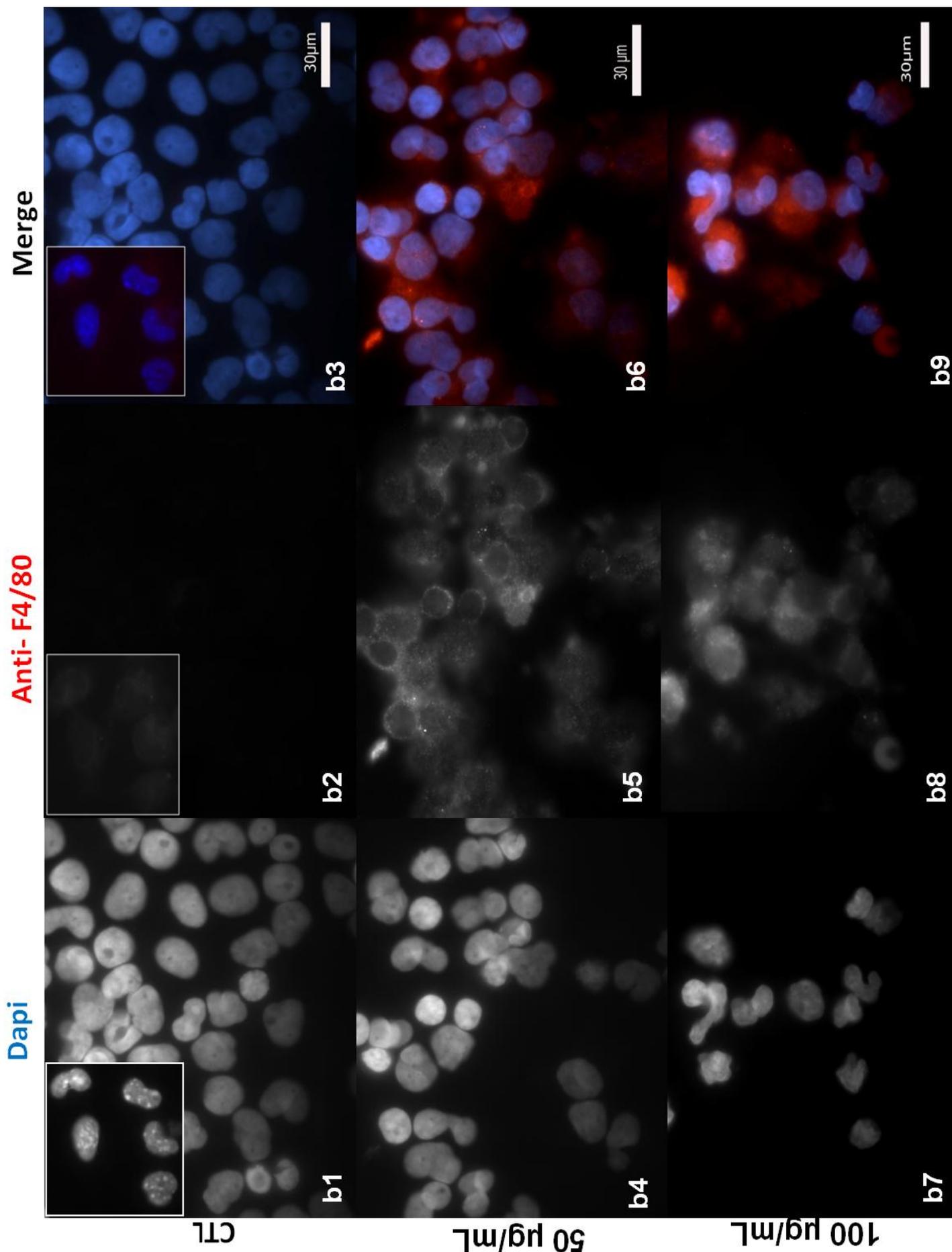
**Figura 19. Detecção da expressão da proteína F4/80 em monócitos tratados com 50 (b1-b3) e 100 µg/mL de HMP por 48h.**

Monócitos não tratados ( a1-a3) Monócitos tratados com 50 µg/mL. (a4-a6) Monócitos tratados com 100 µg/mL (a7-a9) de HMP. Observar a ausência de marcação no grupo controle e marcação nas células tratadas similar à verificada no controle positivo (Figura 18), indicando que os monócitos humanos sofrem diferenciação em macrófago por indução do HMP. *Inset*: Controle negativo, monócitos incubados somente com anticorpo secundário. Barra: 30µm.



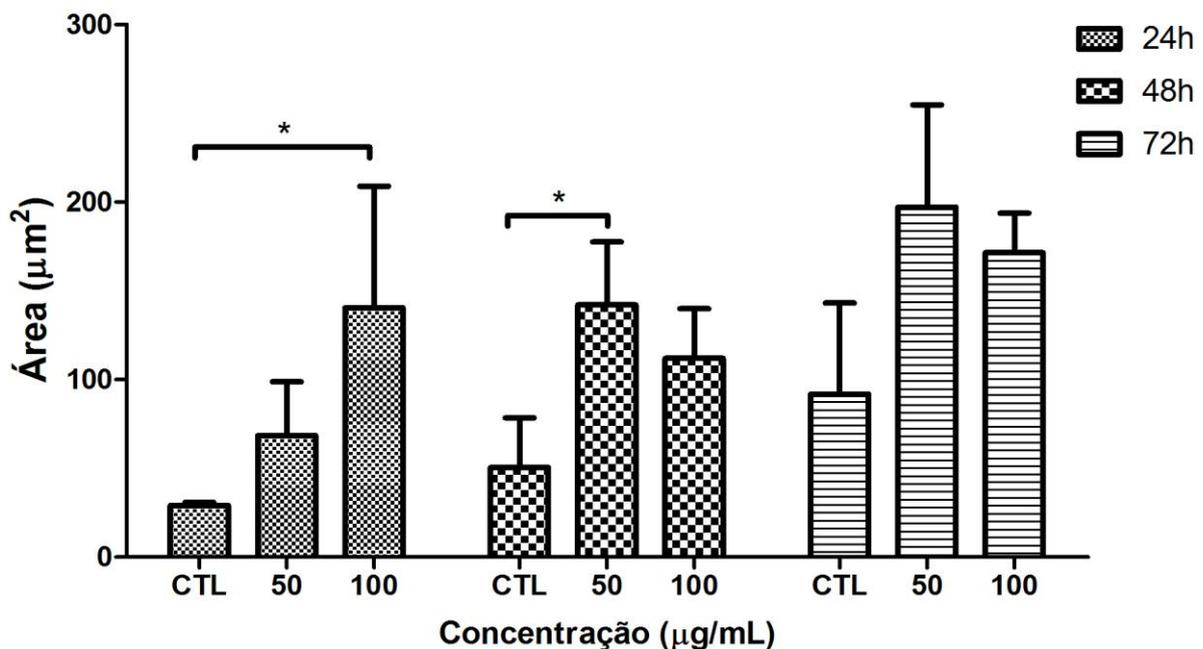
**Figura 20. Detecção da expressão da proteína F4/80 em monócitos tratados com 50 e 100 µg/mL de HMP por 72h.**

(b1-b3) Monócitos não tratados; (b4-b6) Monócitos tratados com 50; (b7-b9) Monócitos tratados com 100 µg/mL de HMP. Observar a ausência de marcação no grupo controle (b1-b3) e marcação em células tratadas (b4-b6; b7-b9) similar à verificada no controle positivo (Figura 18), indicando que os monócitos humanos sofrem diferenciação em macrófago por indução do HMP. *Inset*: Controle negativo, monócitos incubados somente com anticorpo secundário. Barra: 30µm.



#### 5.4 ANÁLISE DE ÁREA CELULAR (MORFOMETRIA)

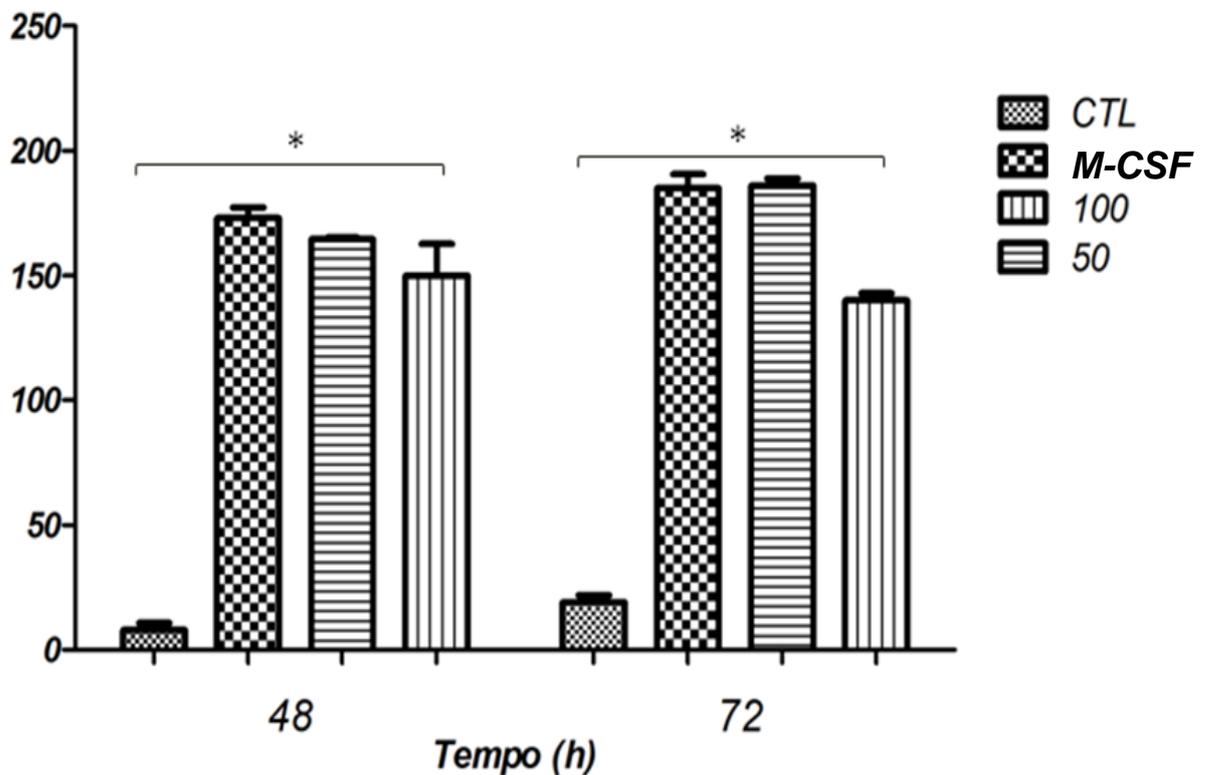
Para analisar se houve aumento de área citoplasmática de monócitos tratados com HMP, estas células foram analisadas por MEV e posteriormente a área total do citoplasma foi medida através do programa ImageJ. Assim, foi possível observar que monócitos tratados por 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  de HMP por 24 e 48h, sofreram aumento significativo da área citoplasmática em relação ao grupo controle, o que não foi observado no tempo de 72 horas (Figura 21).



**Figura 21:** Medida da área citoplasmática de monócitos tratados com HMP por 24, 48 e 72h, nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . Foi utilizado o teste estatístico Tukey (\*)  $p < 0,05$  representa a diferença entre células tratadas e o controle sem tratamento.

### 5.5. QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA F4/80 POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

A expressão da proteína específica de macrófago F4/80 foi quantificada por meio de contagem utilizando imagens obtidas por imunofluorescência no programa image-J. Desta forma, foi possível observar que células tratadas com 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  por 48 e 72h, apresentaram expressão significativa dessas proteínas em relação ao controle de monócitos não tratados com HMP. Entretanto não houve diferença significativa de expressão da proteína



**Figura 22:** Quantificação da expressão de proteínas de superfície em monócitos tratados com HMP por 48 e 72h, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . Como controles positivos foram utilizados macrófagos peritoneais (MØ peritoneais- dados não mostrados- e Monócitos humanos tratados com M-CFS). (\*)  $p < 0,05$  representa a diferença entre células tratadas e o controle sem tratamento.

## 6-DISCUSSÃO

Monócitos são fagócitos mononucleares do sangue periférico com capacidade para diferenciar-se em macrófagos (RANDOLPH & JAKUBZICK, 2008) e células dendríticas (CHOMARAT *et al.*, 2000; GEISSMANN *et al.*, 2010). São importantes células da imunidade, por desempenharem importantes funções antimicrobianas, além de participarem de mecanismos inflamatórios (AUFRAY *et al.*, 2007; AUFRAY *et al.*, 2009; SERBINA *et al.*, 2008).

A diferenciação de monócitos em macrófagos *in vivo* ocorre por volta do quarto dia após sua saída da medula (GUIMARAES & DA GAMA, 2009), e a diferenciação *in vitro* ocorre por volta do quinto dia de cultivo (SMIT *et al.*, 2008). A formação de macrófagos a partir das células progenitoras é dependente das citocinas específicas M-CFS e IL-6 (CHOMARAT *et al.*, 2000; CESAR *et al.*, 2008; POLANCEC *et al.*, 2012).

A ação de metabólitos de fungo sobre leucócitos humanos é pouco conhecida. Niwa & Akamatsu (1991) demonstraram um aumento da quantidade de  $Ca^{++}$  intracelular, íon envolvido na produção de mediadores inflamatórios e ativação celular, em neutrófilos tratados com HMP. Entretanto, não existem relatos na literatura referente à ação do metabólito sobre monócitos. Desta forma, no presente estudo, investigamos se o HMP, obtido de fungos do gênero *Aspergillus*, estimula a diferenciação *in vitro* de monócitos, provenientes do sangue periférico humano, em macrófagos.

Inicialmente foram analisados os aspectos morfológicos das células tratadas com HMP nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . Células tratadas por 24, 48 e 72h de cultivo nas concentrações mencionadas e analisadas por MO, apresentaram grande habilidade de espreado, maior número de projeções citoplasmáticas, aumento de volume e grande vacuolização. A presença de filopódios e espreado celular, além de aumento do volume citoplasmático também foram observados através de MEV, confirmando as observações obtidas por MO. Além disso, a análise por MET também foi realizada, para que fosse possível avaliar a morfologia das organelas. Assim, foi observado que células tratadas apresentaram considerável espreado, com grande número de vacúolos, formação de filopódios e um aparente aumento de retículo endoplasmático e complexo de Golgi, característicos de célula com elevada atividade metabólica. Além disso, a morfologia das células tratadas com HMP (principalmente aquelas tratadas por 48 e 72h) foi semelhante àquela apresentada por monócitos tratados com M-CFS, que favorece a diferenciação de monócito em macrófago (GEISSMANN *et al.*, 2010) sugerindo que a droga pode estar tendo ação similar ao fator no

processo de diferenciação de monócito em macrófago. Resultados semelhantes foram observados por Smit e colaboradores (2008), que ao tratarem monócitos humanos com o medicamento homeopático Canova®, observaram que essas células mantidas em cultura por 48h com 10% do medicamento, apresentaram morfologia semelhante àquelas mantidas em cultura por longos períodos e tratadas com o fator de diferenciação.

Um estudo recente realizado por nosso grupo (RODRIGUES *et al.*, 2011), mostrou que durante o tratamento de macrófagos murinos residentes com 50µg/mL de HMP, ocorreu uma reorganização do citoesqueleto associada à um maior espriamento celular. Esse mesmo estudo, por meio de análises ultraestruturais, mostrou aumento de vacuolização citoplasmática nas células tratadas, corroborando com os resultados obtidos neste estudo.

Os monócitos possuem formato regular, com poucas ou sem projeções citoplasmáticas (filopódios), núcleo em forma de rim, citoplasma pouco volumoso contendo poucas mitocôndrias, assim como complexo de Golgi e retículos endoplasmático liso e rugoso (DICKHOUT *et al.*, 2010; DAIGNEAULT *et al.*, 2010). Quando se diferenciam em macrófago apresentam uma morfologia bem distinta, com grande espriamento, citoplasma volumoso com expressivas projeções citoplasmáticas, além de um número maior de mitocôndrias, complexo de Golgi e retículos (SMIT, *et al.*, 2008). Há presença de inúmeros vacúolos no citoplasma, com redução da cromatina condensada no núcleo (DICKHOUT *et al.*, 2010). Assim, com base nesses estudos e nos resultados de microscopia obtidos na presente pesquisa, pode ser sugerido que monócitos humanos tratados com HMP nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL estão sofrendo diferenciação em macrófago por apresentarem morfologia característica deste tipo celular. Entretanto, o estudo da diferenciação celular, usando como parâmetros somente aspectos morfológicos, não é assegurada, devido às semelhanças existentes entre diferentes grupos celulares (SMIT *et al.*, 2008). Para confirmação dos resultados morfológicos, seria necessário fazer uma caracterização celular através da análise de expressão de moléculas de superfície como CD1a, CD11c, CD14, CD80, CD86, EMR1-F4/80 e HLA-DR (KÖLLER *et al.*, 2004; ABUD *et al.*, 2006; SMIT *et al.*, 2008; CEZAR *et al.*, 2008; SATO, 2010). A proteína EMR1-F4/80 é expressa especificamente na superfície de macrófagos e, por isso, é utilizada como um marcador para identificação destas células. A função dessa molécula de superfície ainda não é conhecida, mas acredita-se que esteja envolvida com eventos de adesão, migração, sinalização celular a partir do acoplamento à proteína G, estando também relacionada com a indução eferente de células T CD8 reguladoras (KHAZEN *et al.*, 2005).

Desta forma, além da avaliação morfológica por meio de MO, MEV e MET em monócitos tratados com HMP, este estudo avaliou também a expressão diferencial da proteína

EMR1-F4/80 na superfície dessas células. Foi observado que o HMP foi capaz de promover a expressão de EMR1-F4/80 em monócitos tratados por 48 e 72h de cultivo, sugerindo que a droga pode ter ação imunomoduladora estimulando a diferenciação de monócitos em macrófagos. Os dados encontrados no presente trabalho corroboram com aqueles descritos por SMIT *et al.* (2008) que observaram por citometria de fluxo, um aumento significativo na expressão da proteína co-estimulatória CD80, presente em macrófagos e células dendríticas, após tratar monócitos humanos com 10 e 20% do Canova<sup>®</sup>. Outros estudos realizados com células progenitoras de camundongo, também demonstram a ação do medicamento Canova<sup>®</sup> no processo de diferenciação celular. Abud e colaboradores (2006) constataram que células da medula de camundongo tratadas com Canova<sup>®</sup> tendem a se diferenciar predominantemente em macrófagos, além de se diferenciarem em menor proporção em células dendríticas. Um outro estudo realizado por Cesar e colaboradores (2008) mostrou que células mononucleares retiradas da medula de camundongos, também tratadas com Canova<sup>®</sup>, apresentaram alterações na morfologia com aumento do volume citoplasmático, maior número de mitocôndrias, complexo de Golgi e retículos. Além disso, também foi observada maior expressão de CD11b em células tratadas, mostrando que essas células sofreram diferenciação em monócitos/macrófagos por indução do medicamento homeopático.

A diferenciação de monócitos em macrófagos ou células dendríticas, é um processo que requer a presença de citocinas estimulatórias (SMIT, 2008). A diferenciação de monócitos em células dendríticas se faz na presença das citocinas IL-4 e GM-CSF, ao passo que a diferenciação de monócitos em macrófagos ocorre na presença de IL-6 e M-CSF (CHOMARAT *et al.*, 2000). Considerando que neste estudo, monócitos cultivados *in vitro* foram tratados somente com HMP, sem adição de citocinas estimulatórias, é possível inferir que o HMP tenha ação imunomoduladora sobre monócitos humanos, uma vez que ocorreu diferenciação celular sem adição de qualquer outro estímulo.

O processo de diferenciação de monócito em macrófago está associado com um aumento de algumas estruturas celulares como mitocôndria, retículos, além de ocorrer aumento de área citoplasmática em função do aumento do volume celular, podendo ser observado através de técnicas morfométricas (SOKOL *et al.*, 1987). Assim, no presente estudo foi realizada a medida da área total citoplasmática de monócitos tratados e não tratados com HMP. Os resultados revelaram que as células tratadas nas concentrações de 50 e 100 µg/mL por 24 e 48h apresentaram um aumento significativo de área citoplasmática em relação ao controle, entretanto o mesmo resultado não foi observado após o tratamento por 72h. Esses dados corroboram com os achados de Daigneaul e colaboradores (2010), que ao acompanharem a diferenci-

ação de monócitos humanos tratados com Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) observaram um aumento significativo no volume citoplasmático quando comparados aos monócitos não diferenciados.

Para avaliar se as alterações promovidas pela droga nas células tratadas não estavam interferindo na viabilidade celular, foram realizados os testes de MTT, JC-1, Vermelho Neutro e Azul de Tripan. O MTT e o JC-1 mostraram que o composto não afetou as desidrogenases e o potencial de membrana mitocondrial das células tratadas. Para Fotakis *et al.*, (2005), o teste do MTT parece ser mais sensível às injúrias sofridas pela célula em relação ao teste do LDH. As alterações na membrana lisossomal resultam numa redução da incorporação do VN, e desta forma, é possível fazer a distinção entre células viáveis e não viáveis (BABICH *et al.*, 1991; MAMACA *et al.*, 2005). Não foram detectadas alterações significativas na membrana dos lisossomos após o tratamento, o que também foi confirmado através do uso do azul de tripan.

Assim, a presença de alterações características de diferenciação celular como o aumento de volume celular, espraiamento, formação de projeções citoplasmáticas, aumento da quantidade de vacúolos e expressão de proteínas de superfície específicas de macrófago não estando associadas com a redução da viabilidade celular. Desta forma, o HMP poderia ser utilizado como possível agente imunomodulador promovendo a diferenciação celular e auxiliando no combate a microorganismos.

## 7- CONCLUSÕES

- ✓ O metabólito HMP foi capaz de promover alterações morfológicas em monócitos humanos, uma vez que observou-se maior espreadimento, aumento da área citoplasmática, quantidade de vacúolos e filopódios, aparente aumento de complexo de Golgi e retículos.
- ✓ O HMP induziu a diferenciação de monócitos em macrófagos, uma vez que houve expressão de proteínas específicas de macrófago em monócitos tratados.
- ✓ Não houve diminuição na viabilidade celular em monócitos tratados com o HMP.

## 8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUD, A.P.; CESAR, B.; CAVAZZANI, L.F.; DE OLIVEIRA, C.C.; GABARDO, J.; BUCHI, DDE F. Activation of bone marrow cells treated with Canova *in vitro*. **Int. Cell Biol.** **30**:808-16, 2006.
- AUFFRAY, C., FOGG, D.; GARFA, M.; ELAIN, G.; JOIN-LAMBERT, O.; KAYAL, S.; SARNACKI, S.; CUMANO, A.; LAUVAU, G.; GEISSMAN, F. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. **Science** **317**:666-670, 2007.
- AUFFRAY, C., SIEWEKE, M.H., GEISSMAN, F. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. **Annu Rev Immunol** **27**:669–92, 2009.
- AZADMEHR, A; AFSHARI, A; BARADARAN, B; HAJIAGHAE, R; REZAZADEH, S; MONSEF-ESFAHANI, H. Suppression of nitric oxide production in activated murine peritoneal macrophages *in vitro* and *ex vivo* by *Scrophularia striata* ethanolic extract. **J Ethnopharmacol.** **124**:166-9, 2009.
- BABICH, H. & BORENFREUND, E. Cytotoxicity of T-2 Toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay. **Ap and Environ Microbiology** **57**: 2101-2103, 1991.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. **Natureza** **392** (6673) :245-52, 1998.
- BELGE, K.U.; DAYYANI, F.; HORELT, A.; SIEDLAR, M.; FRANKENBERGER, M.; FRANKENBERGER, B.; ESPEVIK, T.; ZIEGLER-HEITBROCK, L. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. **Immunol** **168**:3536-42, 2002.
- BENTLEY, R. From *miso*, *sake* and *shoyu* to cosmetics: a century of science for kojic acid. **Nat Prod Rep** **23**:1046-62, 2006.
- BURDOCK, G. A.; SONI, M.G.; CARABIN, I. G. Evaluation of Health Aspects of Kojic Acid in Food. **Regul Toxicol Pharmacol** **33**:80-101, 2001.
- CASSETTA, L.; CASSOL, E.; POLI, G. Macrophage Polarization in Health and Disease **Scientific World Journal** **11**: 2391-2402, 2011.
- CESAR, B.; ABUD, A.P; DE OLIVEIRA, C.C.; CARDOSO, F.; GREMSKI, W.; GABARDO, J.; BUCHI, DDE F. Activation of mononuclear bone marrow cells treated *in vitro* with a complex homeopathic medication. **Micron** **39**: 461–470, 2008.

- CHANG, Z.Q.; LEE, J.S.;, GEBRU, E.; HONG, J.H.; JUNG, H.K.; JO, W.S.; PARK, S.C Mechanism of macrophage activation induced by beta-glucan produced from *Paenibacillus polymyxa* JB115. **Biochem Biophys Res Commun.** **391**:1358-62, 2010.
- CHEE, H.Y. & LEE, E.H. Fungistatic Activity of Kojic Acid Against Human Pathogenic Fungi and Inhibition of Melanin-production in *Cryptococcus neoformans*. **Mycobiology** **31**: 248-250, 2003.
- CHOMARAT, P.; BANCHEREAU, J.; DAVOUST, J.; PALUCKA. AK IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. **Nat Immunol.** **1**:510-4, 2000.
- CHUSIRI, Y.; WONGPOOMCHAI, R.; KAKEHASHI, A.;WEI, M.; WANIBUCHI, H.; VINITKETKUMNUAN, U.; FUKUSHIMA, S. Non-genotoxic mode of action and possible threshold for hepatocarcinogenicity of Kojic acid in F344 rats. **Food and Chemical Toxicology** **49**: 471–476, 2011.
- CRUVINEL, JUNIOR, D.M.; ARAÚJO, J.A. P.; CASTELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W. SILVA, N.P.; ANDRADE, L.E.D. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol** **50**: 434-61, 2010.
- DAIGNEAULT, M.; PRESTON, J.A.; MARRIOTT, H.M.; WHYTE, M.K.; DOCKRELL, D.H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. **Plos one.** **5**: 1-10, 2010.
- DALE, D.C.; BOXER, L.; LILES, W.C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, **112** : 934-945, 2008.
- DICKHOUT, J.G.; LHOTÁK, S.; HILDITCH, B.A.; BASSERI, S.; COLGAN, S.M.; LYNN, E.G.; CARLISLE, R.E.; ZHOU, J.; SOOD, S.K.; INGRAM, A.J.; AUSTIN, R.C. Induction of the unfolded protein response after monocyte to macrophage differentiation augments cell survival in early atherosclerotic lesions. **FASEB Journal** **25**: 1- 14, 2010.
- ECKER, J.; LIEBISCH ,G.; ENGLMAIER, M.; GRANDL, M.; ROBENEK, H.; SCHMITZ, G. Induction of fatty acid synthesis is a key requirement for phagocytic differentiation of human monocytes. **Proc Natl Acad Sci USA.** **107**:7817-22, 2010.
- EL–BENNA, MY–CHAN DANG, P.; GOUGEROT–POCIDALO, M.A.; ELBIM, C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. **Arch Immunol Ther Exp** **53**:199–206, 2005.

EMAMI, S.; HOSSEINIMEHR, S. J.; TAGHDISI, S. M.; AKHLAGHPoor, S. Kojic acid and its manganese and zinc complexes as potential radioprotective agents. **Bioorg Med Chem Lett** **17**:45-48, 2007.

FAIRWEATHER, D.; BALTERNATIVELY, D.C. Activated macrophages in infection and autoimmunity. **J Autoimm.** **33**:222–230, 2009.

FAVALI, C.;TAVARES, N.; CLARÊNCIO, J.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKY, C. Leishmania amazonensis infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. **J Leuk Biol.** **82**:1401-6, 2007.

FITZPATRICK, J.M.; HIRAI, Y.; HIRAI, H; HOFFMANN, K.F. Schistosome eggproduction is dependent upon the activities of two developmentally regulated tyrosinases. **FASEB J.** **21**:823-35, 2007.

FLORA FILHO, R. & ZILBERSTEIN, B.: Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev Ass Méd Bras** **46**: 265-271.

FOTAKIS, G. & TIMBRELL, J. A. in vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, vermelho neutro, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicol Lett** **160**:171-77, 2006.

GEISSMANN, F; MANZ, M. G.; JUNG, S.; SIEWEKE, M. H.; MERAD, M.; LEY, K.. Dendritic Cells Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. **Science** **327**: 656-661, 2010.

GUIMARÃES, M.C.C. & DA GAMA, F. R. V. Diferenciação de monócitos-macrófagos de Gallus gallus: uma abordagem morfológica. **WWW.perspectivasonline.com.br**: **3**: 200-204, 2009.

GUPTA, A.K.; GOVER, M.D; NOURI, K.; TAYLOR, S. He treatment of melasma: a review of clinical trials. **J Am Acad Dermatol** **55**:1048-65, 2006.

HEINSBROEK, S.E. & GORDON, S. The role of macrophages in inflammatory bowel diseases. **Expert Rev Mol Med** **May 14**:11-14, 2009.

HEITBROCK, L.Z. The CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> blood monocytes: their role in infection and inflammation. **J Leukoc Biol** **81**: 584–592; 2007.

HEITBROCK, L.Z.; ANCUTA, p.; CROWE, S.; DALOD, M.; GRAU, V.; HART, D.N.; LEENEN, P.J.M.; LIU Y.J.; PHERSON, M.G.; RANDOLPH, G. J.;SCHERBERICH, J.; SCHMITZ, J.; SHORTMAN, K.; SOZZANI, S.; STROBL, H.; ZEMBALA, M.; AUSTYN, J.M.; LUTZ, M.B. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **J Amer Soc Hematol** **6**: 74-80, 2010.

- HIGA, Y.; KAWABE, M.; NABAE, K.; TODA, Y.; KITAMOTO, S., HARA,.; TANAKA, N.; KARIYA, K.; TAKAHASHI, M. Kojic Acid – Absence of tumor-initiating activity in rat liver, and of carcinogenic and photo-genotoxic potential in mouse skin. **J Toxicol Sci** **32**:143-159, 2007.
- HUME, D.A.; ROSS, I. L.; HIMES, S. R.; SASMONO, R. T.; WELLS, C. A.; RAVASI, T. The mononuclear phagocyte system revisited. **J Leukoc Biol** **72**: 621-627, 2002.
- KANTARI, C.; PEDERZOLI-RIBEIL, M.; WITKO-SARSAT, V. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. **Contrib Microbiol** **15**:118-46, 2008.
- KATO, N.; SOGA, F.; NARA, T.; TAMAGAWA-MINEOKA, R.; NIN, M.; KOTANI, H.; MASUDA, K.; KISHIMOTO, S. Effect of serotonin on the differentiation of human monocytes into dendritic cells. **Clinical Experiment Immunol** **146**: 354–361, 2006.
- KHAZEN, W.; M'BIKA, J.P.; TOMKIEWICZ, C.; BENELLI, C.; CHANY, C.; ACHOUR, A.; FOREST, C. Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes. **FEBS letters** **579** : 5631-5634, 2005.
- KÖLLER, M.; ZWÖLFER, B.; STEINER, G.; SMOLEN, J.S.; SCHEINECKER, C. Phenotypic and functional deficiencies of monocyte-derived dendritic cells in systemic lupus erythematosus (SLE) patients. **Internat Immunol** **16**: 1595–1604, 2004.
- LIM, J.T. E. Treatment of melasma using kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid. **Dermatol Surg** **25**: 282-84, 1999.
- LIN, C.; WU, H.; HUANG, Y. Combining high-performance liquid chromatography with on-line microdialysis sampling for the simultaneous determination of ascorbyl glucoside, kojic acid, and niacinamide in bleaching cosmetics. **Anal Chim Acta** **581**:102-07, 2007.
- LOPES, L.; GODOY, L.M.F.; DE OLIVEIRA, C. C.; GABARDO, J.; SCHADECK, R.J.G.; BUCHI, D. F. Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. **Micron** **37**:277-87, 2006.
- LOPES, L.; GODOY, L.M.F.; DE OLIVEIRA, C. C.; GABARDO, J.; SCHADECK, R.J.G.; BUCHI, D. F. Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. **Micron** **37**:277-87, 2006.
- MAITY, P.C.; BHATTACHARIEE, S.; MAIUMDAR, S.; SIL, A.K. Potentiation by cigarette smoke of macrophage function against *Leishmania donovani* infection. **Inflamm Res** **58**:22-9, 2009.
- MAMACA, E.; BECHMANN, R. K.; TORGRIMSEN, S.; AAS, E.; BJØRNSTAD, A.; BAUSSANT, T.; LE FLOCH, S. The neutral red lysosomal retention assay and Comet assay

on haemolymph cells from mussels (*Mytilus edulis*) and fish (*Symphodus melops*) exposed to styrene. **Aquatic Toxicology** **75**: 191–201, 2005.

MAY, R.C. & MACHESKY, L.M. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. **J Cell Sci** **114**: 1061-1077, 2001.

MIZUNO, K.,; TOMA, T.; TSUKIJI, H.; OKAMOTO, H.; YAMAZAKI, H.; OHTA, K.; MOHAMAD, R.; MOHAMED, M.S.; SUHAILI, N.; SALLEH, M.M.; ARIFF, A.B. Kojic acid: Applications and development of fermentation process for production. **Biotechnol. Mol. Biol. Rev.** **5**: 24-37, 2010.

MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol** **8**:958-69, 2008.

MOTO, M.; MORI, T.; OKAMURA, M.; KASHIDA, Y.; MITSUMORI, K. Absence of liver tumor-initiating activity of kojic acid in mice. **Arch Toxicol** **80**: 299-304, 2006.

MOTO, M.; MORI, T.; OKAMURA, M.; KASHIDA, Y.; MITSUMORI, K. Absence of liver tumor-initiating activity of kojic acid in mice. **Arch Toxicol**, **80**: 299-304, 2006.

NAKAJIMA H. Role of Transcription Factors in Differentiation and Reprogramming of Hematopoietic Cells. **Keio J Med.** **60**:47-55, 2011.

NIWA, Y. & AKAMATSU, H. Kojic acid scavenges free radicals while potentiating leukocyte functions including free radical generation. **Inflammation** **15**:4, 1991.

OHTA, K.; KASAHARA, Y.; KOIZUMI, S.; YACHIE. Selective expansion of CD16<sup>high</sup>CCR2<sup>-</sup> subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. **Clin Exp Immunol.** **142**: 461–470, 2005.

OLIVEIRA, C.C.; OLIVEIRA, S.M.; GODOY, L.M.F.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Canova, a brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. **J Infect** **52**:420-32, 2006

PARK, H.J.; HONG, J.H.; KWON, H.J.; KIM, Y.; LEE, K.H.; KIM, J.B.; SONG, S.K. TLR4-mediated activation of mouse macrophages by Korean mistletoe lectin-C (KML-C). **Biochem Biophys Res Commun.** **396**:721-725, 2010.

PARVEZ, S.; KANG, M.; CHUNG, H.S.; CHO, C.; HONG, M.C; SHIN, MK , BAE H. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. **Phytother. Res.** **20**:921–934, 2006.

POLANCEC, D.S.; MUNIC KOS V.; BANJANAC M.; VRANCIC M.; CUZIC S.; BELAMARIC D.; PARNHAM M.J.; POLANCEC D.; ERAKOVIC HABER V. Azithromy-

- cin drives in vitro GM-CSF/IL-4- induced differentiation of human blood monocytes toward dendritic-like cells with regulatory properties. **J Leuk Biol** **91**:229-43, 2012.
- PUKA, J.; DE MATTOS, H.H. R.V.; GAVRON, A. C.; VIANNA, S.E.O.; VAZ, R.S. Origem e tipos de fócitos. **RUBS. 1**: 25-35, 2005
- RANDOLPH, G.J.; JAKUBZICK C.; Qu, C. Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. **Curr Opin Immunol.** **20**:52-60, 2008.
- RHO, H.S.; BAEK, H.S.;YOU, J.W.; KIM, S.; LEE, J.Y.; KIM, D.H.; CHANG, I.S. New 5-Hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one Derivative Has Both Tyrosinase Inhibitory and Antioxidant Properties. **Bull. Korean Chem. Soc.** **28**: 471-473, 2007.
- RODRIGUES, A.P.; CARVALHO, A.S.; SANTOS, A.S.; ALVES, C.N.; DO NASCIMENTO, J.L.N.; SILVA, E.O. Kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus sp.*, acts as an inducer of macrophage activation. **Cell Biol. Int.** **35**: 335–343, 2011.
- ROGACEV, K. S.; SEILER, S.; ZAWADA, A.M.; REICHART, B.; HERATH, E.; ROTH D .; ULRICH, C.; FLISER, D.; HEINE G. H. CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. **Eur Heart** **32** : 84-92, 2011.
- ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.I.; IKEDA, T.I.I.; CRUZ, I.A. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre duas Metodologias. **Materials Reserach** **6**: 317-320,2003.
- SAHA, P.; GEISSMANN, F. Toward a functional characterization of blood monocytes. **Immunol Cell Biol** **89**:2-4, 2011.
- SANDER, K.; KOTTKE, T.; WEIZEL, L.; STARK, H.. Kojic Acid Derivatives as Histamine H3 Receptor Ligands. **Chem. Pharm. Bull.** **58**:1353-1361, 2010.
- SATO, M. E.O.; PONTAROLO, F. G. R.; ANDREAZZA, I.F.; ZARONI, M. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** **43**: 195-203, 2007.
- SATO, P. K.. Estudo de células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com paracoccidiodomicose: expressão de moléculas de superfície e secreção de citocinas [dissertação]. **São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo**, 2010.
- SATTHAPORN, S. & EREMIN, O. Dendritic cells (I): Biological functions. **JR Coll Surg Edinb** **46**: 9-19, 2001.
- SERBINA, N. V.; MATHEW, C.; SHI, C.; BLEAU, S. A; COLLINS, N. H.; YOUNG, J. W.; PAMER, E.G. Distinct Responses of Human Monocyte Subsets to *Aspergillus fumigatus* Conidia. **J Immunol** **183**: 2678-2687, 2009.
- SERBINA, N.V.; JIA, T.; HOHL, T. M.; PAMER, E. G. .Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. **Annu Rev Immunol.** **26** : 421-452, 2008.

- SILVA, M.T. Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors of adaptive immunity against extracellular and intracellular microbial pathogens. **J Leukoc biol.** **87**:805-13, 2010.
- SMIT, E.; PRETORIUS, E.; ANDERSON, R.; OOMMEN, J.; POTJO, M.; Differentiation of Human Monocytes in Vitro Following Exposure to Canova in the Absence of Cytokines. **Ultrastructural Pathology** **32**:147–152, 2008.
- SMIT, N.; VICANOVA, J.; PAVEL, S. The Hunt for Natural Skin Whitening Agents. **Int. J. Mol. Sci.****10**: 5326-5349, 2009.
- SOARES, G.; BARRAL, A.; COSTA, J.M.; BARRAL-NETTO, M.; VAN WEYENBERGH, J. CD16+ monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased ex vivo levels and correlation with clinical data. **J Leukoc Biol.** **79**:36-9, 2005.
- SOKOL, R. J; HUDSON, G.; JAMES, N. T; FROST, I. J; WALES, J. Human macrophage development: a morphometric study. **J. Anat.** **151**:27-35, 1987.
- STRAUSS-AYAL, I .D; CONRAD, S.M; MOSSER, D.M.. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *Journal of Leukocyte Biology* **82**: 244-252, 2007.
- SZAFLARSKA, A.; BAJ-KRZYWORZEKA, M.; SIEDLAR, M.; WEGLARCZYK, K.; RUGGIERO, I.; HAJTO, B.; ZEMBALA, M. Antitumor response of CD14+/CD16+ monocyte subpopulation. **Exp hematol.** **32**:748-55, 2004.
- TACKE, F.; RANDOLPH G.J. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. **Immunobiology** **211**:609-18, 2006.
- YONA, S.; JUNG, S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. **Curr Op Hem** **17**:53–59, 2010.
- YU, T.; LEE, J.; LEE, Y.G.; BYEON, S.E.; KIM, M.H.; SOHN, E.H.; LEE, Y.J.; LEE, S.G.; CHO, J.Y. In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of ethanol extract from acer tegmentosum. **J Ethnopharmacol.** **128**:139-47, 2010.