

Emília Maria dos Santos Ferreira Trindade Neves

Macrófago: Biologia, Diversidade e Função

Universidade Fernando Pessoa

Porto

2015

Emília Maria dos Santos Ferreira Trindade Neves

Macrófago: Biologia, Diversidade e Função

Universidade Fernando Pessoa

Porto

2015

Emília Maria dos Santos Ferreira Trindade Neves

Macrófago: Biologia, Diversidade e Função

Assinatura:

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para
obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas

Sumário:

O macrófago é uma importante célula do sistema imunitário, proveniente da linhagem mieloide do sistema hematopoiético, tendo como precursor o monócito. Tem capacidade fagocítica estando envolvida na eliminação de células/partículas estranhas ao organismo. Esta célula encontra-se largamente distribuída pelo organismo, tomando diferentes designações de acordo com o local que ocupa, podendo apresentar diferentes fenótipos, dependentes da sua via de ativação, resultando em diferentes propriedades. O macrófago tem um importante papel na patogénese de algumas doenças, podendo ser estimulador ou inibidor da patologia. A presente revisão pretende fazer uma abordagem sobre as propriedades e funções relacionadas com este importante tipo celular, bem como sobre o seu papel em diferentes patologias.

Abstract:

Macrophages are important cells of the immune system, resulting from the myeloid lineage of the hematopoietic system, having monocytes as precursors. Macrophages show phagocytic capacity and are involved in eliminating foreign cells/particles. These cells are widely distributed throughout the body, having different designations according to the body site occupied. Macrophages may present different phenotypes, dependent upon its activation pathway, resulting in different properties. Macrophages have an important role in pathogenesis and may have either a stimulatory or inhibitory role in pathology. This revision aims to address some characteristics and functions of this important cell type, as well as its role in different pathologies.

Dedicatórias:

Queria agradecer todo o apoio e disponibilidade da minha orientadora a professora Amélia Assunção, que se mostrou sempre disponível, para me ajudar e me orientar durante todo o período de elaboração desta tese de dissertação.

Quero também agradecer a todos os meus professores que durante a minha vida académica me ajudaram a desenvolver os meus conhecimentos.

E por último quero agradecer a minha família que me apoiou sempre.

Índice

I. Introdução.....	1
II. Pressupostos Históricos.....	4
III. Células fagocíticas.....	5
IV. Hematopoiese	6
V. O Monócito	8
VI. Os Macrófagos	10
1. Estrutura intracelular	10
2. Recetores de superfície.....	10
3. Diversidade Fenotípica	14
VII. Função dos macrófagos.....	17
1. Fagocitose.....	17
2. Apoptose.....	18
4. Interação com a imunidade adaptativa	20
a) Imunidade inata e adaptativa	20
b) Papel do macrófago na interação com a imunidade adaptativa	21
VII. Relação com parasitas intracelulares.....	21
1. <i>Leishmania</i>	22
2. <i>M. Tuberculosis</i>	23
3. Vírus da imunodeficiência humana	24
1. Cancro.....	28
2. Doenças autoimunes	34
3. Associação com aterosclerose	36
IX. Conclusão	40
X. Bibliografia.....	41

Índice de Figuras:

Figura 1-Metchickoff e os seus desenhos.....	5
Figura 2-O macrófago e os seus percursores.....	7
Figura 3-Diferenças estruturais entre monócitos e macrófagos	9
Figura 4- Os diferentes membros da família de recetores toll-like	12
Figura 5-Famílias de recetores SR e outros funcionalmente relacionados.....	13
Figura 6-Via clássica de ativação	15
Figura 7-Subtipos de macrófagos M2	16
Figura 8-O equilíbrio entre macrófagos M1 e M2	17
Figura 9- A Importância da remoção de neutrófilos.....	19
Figura 10- O ciclo de vida da leishmânia	23
Figura 11-Transmissão do Nef às células B	25
Figura 12--Subtipos macrofágicos e a sua relação com diferentes doenças.....	28
Figura 13- O TAM e as suas ações promotoras do crescimento tumoral.....	31
Figura 14- O TAM e as suas ações contra o desenvolvimento tumoral	33
Figura 15-O macrófago e a lesão aterosclerótica	37

Índice de Tabelas:

Tabela 1-Exemplos de macrófagos tecidulares e suas diversas designações.....	2
Tabela 2-Os diferentes fenótipos de macrófagos e os seus estímulos.....	16

I. Introdução

O macrófago é uma importante célula do sistema imunológico que participa na imunidade inata e condiciona a adaptativa, através da fagocitose de partículas estranhas ao hospedeiro, da sua função de apresentação de antígenos, da sua ação microbicida (Elomaa *et al.*, 1998) e da sua capacidade de produzir mediadores que interferem na função imunológica (de la Torre *et al.*, 2008). É uma célula que tem associadas propriedades como a mobilidade, a promoção da citotoxicidade (Geissmann *et al.*, 2010) e a elevada capacidade biossintética (Appelberg, 2005), permitindo a secreção de uma vasta gama de citocinas (pequenas proteínas secretadas que promovem a comunicação célula-célula e podem atuar sobre o seu crescimento e diferenciação (Geissmann *et al.*, 2010)), fatores de crescimento, lisozimas, proteases, componentes do complemento, fatores de coagulação e prostaglandinas (Woods *et al.*, 2000). Desde a descoberta da sua finalidade na segunda metade do século XIX, o papel destas células tem-se vindo a revelar (Metchnikoff, 1989).

Os macrófagos são células hematopoiéticas fagocíticas proveniente da medula óssea, através da linhagem mieloide/fagocítica mononuclear, tendo como precursores os monócitos que circulam temporariamente na corrente sanguínea e que migram depois para os tecidos, onde se diferenciam (Appelberg, 2005). Apesar de muitas vezes os monócitos e os macrófagos serem considerados como um único tipo celular devido às suas muitas semelhanças, estas apresentam também diferenças das quais se destacam a potência da atividade fagocítica e o tamanho, tendo o macrófago, relativamente ao monócito, uma proporção maior e uma atividade fagocítica mais elevada, dependente do seu fenótipo (Pacheco e Cardoso, 2012).

Os macrófagos são importantes para assegurar um normal funcionamento do hospedeiro através do controlo dos processos inflamatórios (podendo inibi-los ou promovê-los), do desenvolvimento de tecidos e da sua cicatrização, bem como da morfogénese óssea (de la Torre *et al.*, 2008; Epelman *et al.*, 2014). Todas as ações desempenhadas pelos macrófagos encontram-se dependentes de sinais específicos, tais como condições de hipoxia, certos lípidos e citocinas (Woods *et al.*, 2000).

Apesar da sua importância, a ação dos macrófagos pode ter também um importante impacto no agravamento de certas patologias uma vez que alguns fenótipos promovem a angiogénese (importante no desenvolvimento de tumores) e a geração de tecido adiposo

(relacionada com a obesidade) podendo, no entanto, ter também uma ação anti-tumoral (Pollard, 2004; Obeid *et al.*, 2010).

Os macrófagos podem ser encontrados numa grande variedade de organismos, incluindo organismos multicelulares mais primitivos (Pacheco e Cardoso, 2012) e encontram-se amplamente distribuídos por quase todos os tecidos do organismo, estando presentes, nomeadamente, na medula óssea, no sangue, nos tecidos linfoides, no fígado e nos pulmões, adquirindo diferentes particularidades dependentes do microambiente tecidular onde se encontram (Zellforsch *et al.*, 2012). Consoante os tecidos que ocupam podem tomar diferentes designações (tabela 1) (Obeid *et al.*, 2010). A sua migração para os tecidos pode ser aumentada por estímulos inflamatórios, especialmente das quimiocinas geradas localmente por mecanismos humorais e celulares (Taylor *et al.*, 2005; Shi e Pamer, 2011; Koppensteiner *et al.*, 2012).

Tabela 1- Exemplos de macrófagos tecidulares e suas diversas designações (tabela adaptada de(Obeid et al., 2010)

Compartimento	Designação
Pulmões	Macrófagos alveolares
Fígado	Células de Kupffer
Rins	Células Mesenquiais
Sistema Nervoso	Células Microgliais
Tecido conjuntivo	Histiócitos

A função dos macrófagos está adaptada aos tecidos onde reside. Assim, as células de Kupffer presentes no fígado contribuem para a regeneração hepática após lesão, enquanto que as células de Langerhans na pele são células sentinela importantes mediando a vigilância imunológica. Os osteoclastos mediam a morfogênese óssea, a microglia presente no cérebro apoia o desenvolvimento e a manutenção de redes neuronais (Kedzierska e Crowe, 2014) e os macrófagos intestinais (órgão que constitui o maior reservatório destas células no organismo humano) são essenciais para a manutenção da mucosa, para a sua homeostasia face ao microbiota, para a renovação epitelial. Os macrófagos intestinais são também importantes componentes da imunidade protetora, encontrando-se envolvidos na patologia da doença inflamatória do intestino, quando a sua função está comprometida (Bain e Mowat, 2014).

O tempo de vida desta célula é muito variável, dependendo das suas funções imunológicas e da sua localização no tecido (Shi e Pamer, 2011), tendo os macrófagos inflamatórios, uma duração mais reduzida de apenas alguns dias, enquanto, os macrófagos alveolares e as células da microglia, podem apresentar uma duração que pode atingir anos (Koppensteiner *et al.*, 2012). O objetivo desta tese de dissertação é realizar uma revisão bibliográfica relativa aos principais aspetos da origem, diversidade e biologia dos macrófagos. Serão igualmente consideradas a grande diversidade de funções que este fagócito apresenta no sistema imunitário e a sua relação com algumas doenças das mais diversas etiologias.

Esta revisão foi alvo de grande motivação, uma vez que é relativa a uma importante célula do sistema imunitário que contribui para o perfeito funcionamento deste sistema. Para desenvolvimento desta revisão foi necessário realizar uma recolha exaustiva de dados provenientes, principalmente, de artigos científicos e livros que incidem sobre a temática descrita, utilizando fontes fidedignas e mais recentes.

II. Pressupostos Históricos

Os macrófagos começaram a ser descritos na segunda metade do século XIX, quando Elie Metchnikoff, um zoologista de nacionalidade russa (Pacheco, 2012), constatou durante as suas observações a larvas de estrelas-do-mar, que estas continham umas células que apresentavam um importante papel na luta contra microrganismos que as invadissem (Appelberg, 2005; Pacheco, 2012).

As células que Metchnikoff observou eram dotadas de capacidade de ingestão de partículas, nomeadamente infecciosas, tendo-as então denominado de micrófagos e macrófagos, de acordo com o seu tamanho (Pacheco, 2012).

Com estas observações Metchnikoff formulou uma nova teoria, baseada na capacidade dos macrófagos ingerirem partículas estranhas, mecanismo denominado de fagocitose. A sua teoria, batizada de teoria celular da imunidade, foi comprovada quando introduziu numa das suas larvas um espinho de roseira, verificando que após esta invasão o espinho ficou rodeado por macrófagos (Pacheco, 2012).

Na Figura 1, que representa Metchnikoff e os desenhos que este realizou para descrever as suas observações, podemos ver macrófagos rodeados por patógenos e também patógenos no interior dos macrófagos. Estas observações permitiram-lhe deduzir que os macrófagos tinham algum papel no sistema imune e que estes participavam ativamente na eliminação de partículas estranhas ao hospedeiro.

Metchnikoff verificou ainda que estas células fagocíticas se encontravam distribuídas no sistema circulatório e linfático e tinham a capacidade de migrarem para locais de inflamação, podendo também se encontrar fixas num local (Metchnikoff, 1989; Appelberg, 2005).

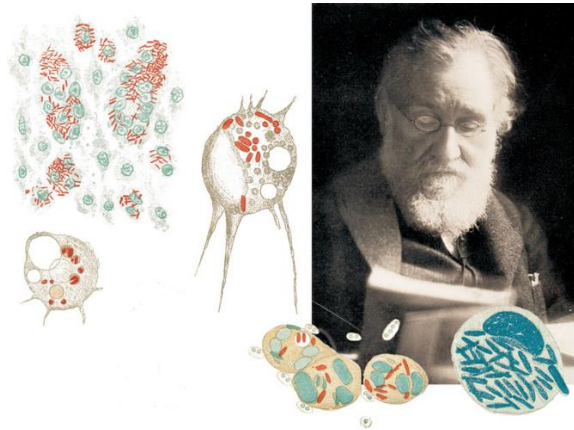


Figura 1-Metchickoff e os seus desenhos (figura adaptada de (Kaufmann, 2008))

Apesar de inicialmente esta teoria ter criado controvérsia por parte da comunidade científica, mais tarde foi aceite juntamente com a teoria humoral da imunidade, que tinha sido formulada anos antes por Paul Ehrlich e que era a teoria aceite nesse período (Pacheco, 2012). Ambas as teorias acabavam por se complementar (Metchnikoff, 1989; Kaufmann, 2008).

III. Células fagocíticas

Atualmente consideram-se quatro tipos de células fagocíticas, os monócitos, os macrófagos, as células dendríticas e os neutrófilos. Todas removem as células mortas, tecidos e partículas estranhas ao hospedeiro por sua incorporação e digestão (Strauss, 2010; Pacheco e Cardoso, 2012).

Os neutrófilos encontram-se no sangue periférico, embora a maior parte (90%) esteja em estreita relação com o revestimento endotelial dos vasos, podendo assim desta forma migrar facilmente para o espaço extravascular, atravessando o endotélio sempre que seja atraído por agentes químicos gerados nos focos da inflamação (Strauss, 2010). Além da sua função fagocítica, possuem mecanismos antimicrobianos muito eficazes, mas são células de vida curta, sobrevivendo apenas algumas horas. Os monócitos circulam igualmente no sangue periférico, onde para além da função fagocítica desempenham importantes funções fisiológicas, das quais se destaca a sua capacidade de se diferenciarem em macrófagos ou células dendríticas ao migrarem para os tecidos (Appelberg, 2005; Cardoso, 2012). Quer os macrófagos, quer as células dendríticas são

células de vida mais longa e desempenham a função da apresentação de antígeno aos linfócitos T, sendo designadas de células apresentadoras de antígeno (APC). A atividade das células fagocíticas é um fator primário dos mecanismos de defesa do hospedeiro, sendo a ação dos fagócitos controlada pelo sistema imunológico, nomeadamente pelos linfócitos T, uma vez que, como referido acima, aqueles possuem uma grande variedade de recetores à sua superfície, capazes de interagir com diferentes ligandos (Schindl *et al.*, 2006).

IV. Hematopoiese

Os macrófagos são um importante componente do sistema reticuloendotelial e têm a sua origem em órgãos hematopoiéticos, como o saco vitelino, a medula óssea e também o baço. Após o nascimento, a sua formação ocorre na medula óssea (Appelberg, 2005).

As células do sistema hematopoiético apresentam um tempo de vida relativamente curto, sendo necessária uma reposição contínua, garantida pelas células estaminais hematopoiéticas (Appelberg, 2005). Estas têm a capacidade de se renovarem e de originarem todos os tipos celulares, diferenciando-se num dado tipo celular quando convenientemente estimuladas, sendo por isso também designadas de células estaminais hematopoiéticas pluripotentes. Na medula óssea, o equilíbrio entre a auto renovação e a diferenciação celular tem de ser mantido (Domen *et al.*, 2011).

As células estaminais hematopoiéticas dão origem a células progenitoras multipotentes antes de se diferenciarem e se subdividirem em células progenitoras mieloides e células progenitoras linfoides (Domen *et al.*, 2011). A diferenciação é orientada por uma vasta rede de fatores de crescimento e citocinas (Rodtke *et al.*, 2013).

As duas linhagens celulares específicas, a linfoide e a mieloide, dão origem a células linfoides e mieloides, respetivamente, ocorrendo em paralelo a sua diferenciação (Douce *et al.*, 2010; Domen *et al.*, 2011).

Assim, os macrófagos e monócitos derivam de um tipo de célula estaminal hematopoiética (Domen *et al.*, 2011), que dá igualmente origem às células dendríticas, sendo a sua diferenciação dependente de TNF- α ("tumor necrosis factor-alpha") (Ryncarz e Anasetti, 1998; Geissmann *et al.*, 2010; Ley *et al.*, 2011) (Perdiguero e Geissmann, 2013).

O precursor linfoide pode dar origem às células B na própria medula óssea, mas pode também originar células T imaturas, que migram para o timo, onde vão ser sujeitas a um processo de seleção e maturação (Appelberg, 2005; Pacheco e Cardoso, 2012). O precursor mieloide dá origem à linhagem fagocítica-mononuclear, tendo como primeiro tipo celular os monoblastos. A sua divisão, com conseqüente diferenciação, origina promonócitos e posteriormente monócitos que são libertados para a corrente sanguínea, onde circulam temporariamente até migrarem para os tecidos, diferenciando-se aí em células dendríticas ou macrófagos, como se pode ver na figura 2 (Douce et al., 2010; Rodtke et al., 2013). A diferenciação em monócitos ocorre em resposta a citocinas hematopoiéticas, tais como a IL-3 (interleucina-3), GM-CSF ("granulocyte-macrophage colony-stimulating factor"), M-CSF ("macrophage colony-stimulating factor"), IL-1, IL-6 e TNF- α entre outras (Roldtke et al., 2013). O fator de transcrição mieloide (PU.1) é necessário para os primeiros passos de compromisso da linhagem mieloide das células estaminais hematopoiéticas e a sua ausência resulta em deficiência desta linhagem (Douce et al., 2010; Geissmann et al., 2010; Bain e Mowat, 2014).

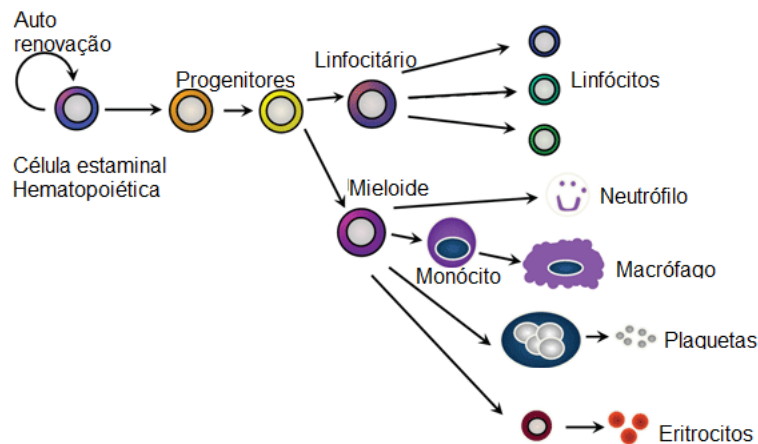


Figura 2-O macrófago e os seus precursores (figura adaptada de (King e Goodell, 2011))

Em algumas situações excepcionais, a diferenciação ocorre quase exclusivamente durante o desenvolvimento embrionário, como no caso dos macrófagos da microglia, que são diferenciados a partir do saco vitelino (Epelman *et al.*, 2014)

V. O Monócito

O monócito é, normalmente, a maior população de células brancas do sangue periférico, apresentando limites irregulares, com um núcleo igualmente irregular, muitas vezes lobulado, podendo o seu citoplasma ser vacuolizado. Comparativamente ao macrófago apresenta uma dimensão mais reduzida e ausência de expressão de CCR2 ("C-C chemokine receptor type 2") e L-seletinas, sendo contudo superior a expressão de recetores de quimiocinas e integrinas. Os monócitos são libertados da médula óssea para a corrente circulatória e linfática, quando estimulados por estímulos inflamatórios e imunológicos (Bain e Mowat, 2014).

Os monócitos são heterogéneos, podendo ser divididos em três subtipos baseados nos seus marcadores de superfície, especificamente os recetores CD14 e CD16 (Straus-Ayeli *et al.*, 2007). Cada subtipo exhibe funções específicas, diferenciando-se relativamente ao seu tamanho, tráfego, expressão de recetores imunes e capacidade de se diferenciarem quando estimulados. Apresentam também um papel distinto na fisiopatologia de determinadas doenças (Taylor *et al.*, 2005; Shi e Pamer, 2011).

Assim, temos os monócitos inflamatórios clássicos, com alta expressão de CD14 e baixa de CD16 (CD14⁺⁺CD16⁻) que são equipados por um conjunto de recetores TLR e que expressam genes envolvidos na angiogénese, na cicatrização de feridas, e na coagulação (Hallam e Hagemann, 2012; Yang *et al.*, 2014). Os monócitos inflamatórios não clássicos, também designados de pro-inflamatórios, apresentam uma expressão reduzida de CD14 e uma alta expressão de CD16, que leva a que produzam baixos níveis de IL-10 (Straus-Ayeli *et al.*, 2007). Os monócitos intermédios expressam largamente ambos os recetores, tendo associada uma reduzida capacidade fagocítica, uma vez que apresentam baixa expressão de citocinas pró-inflamatórias (Hallam e Hagemann, 2012; Yang *et al.*, 2014). Os subtipos inflamatórios são valiosos biomarcadores para doenças inflamatórias, onde se incluem as doenças cardiovasculares (Hilgendorf e Swirski, 2012).

Durante a diapedese os monócitos associam-se a células endoteliais vasculares através de interações com ligandos específicos. Nos tecidos encontram diferentes ambientes que levam a alteração da sua função e promovem a sua posterior diferenciação em macrófagos ou células dendríticas (Geissmann *et al.*, 2010; Shi e Pamer, 2011), dependendo dos estímulos a que esteja sujeito. De facto, os monócitos são precursores

hematopoiéticos bipotenciais, comprometidos com a linhagem de macrófagos e a de células dendríticas, esta dependente da exposição aos fatores $\text{TNF-}\alpha$ e IL-4 (Ryncarz e Anasetti, 1998; Geissmann *et al.*, 2010). Os monócitos são atraídos para os tecidos inflamados por mediadores quimiotáticos, tais como produtos da histamina, do complemento, leucotrienos, IP-10 ("Interferon-gamma-induced protein 10"), e MIP-1 e 2 ("macrophage-inflammatory protein-1 e 2"). A concentração destes fatores aumenta durante a inflamação (Woods *et al.*, 2000; Epelman *et al.*, 2014). O M-CSF é necessário para o processo de diferenciação em macrófagos e encontra-se igualmente envolvido na regulação da sobrevivência, da proliferação e diferenciação de fagócitos mononucleares (Gordon, 2003; Appelberg, 2005)

Quando o monócito se converte em macrófago ocorrem algumas transformações que lhe permitem assegurar importantes funções fisiológicas, aumentando a sua capacidade fagocítica e antimicrobiana, devido ao macrófago apresentar um maior número de lisossomas (Yang *et al.*, 2014).

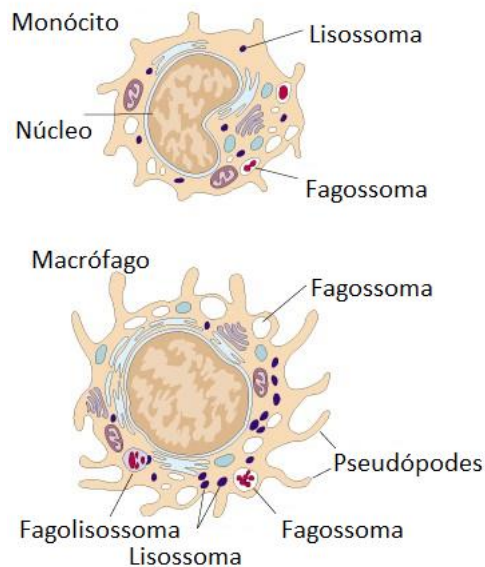


Figura 3-Diferenças estruturais entre monócitos e macrófagos (figura adaptada de (Herbein *et al.*, 2010))

VI. Os Macrófagos

1. Estrutura intracelular

Os macrófagos apresentam uma forma variável, geralmente oval, com contornos irregulares, núcleo numa posição descentrada e citoplasma abundante com grau de vacuolização variável, dependente da formação de vesículas de pinocitose ou fagocitose. Podem apresentar pseudópodes que resultam da emissão de sistemas de microtúbulos, conferindo-lhes um movimento ameboide e permitindo-lhes direcionar o seu movimento (Zellforsch *et al.*, 2012). Como células fagocíticas que são, apresentam no seu citoplasma uma quantidade apropriada de lisossomas, facilmente identificáveis, onde se acumulam numerosas enzimas hidrolíticas como sejam as lipases, as nucleases e as glicosilases, com atividade óptima a pH ácido, permitindo a digestão de partículas (Appelberg, 2005). Algumas enzimas permitem a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e azoto (RNI), também com atividade antimicrobiana. O seu núcleo pode-se apresentar uma forma ovalada ou irregular, sendo menos opaco quando comparado com as células epiteliais. O número de poros nucleares é limitado, e o material filamentoso do núcleo apresenta muitas vezes densidade moderada na região central, ocasionando pequenos grânulos (Pacheco e Cardoso, 2012; Zellforsch *et al.*, 2012). A estrutura dos macrófagos, bem como o seu perfil de citocinas secretadas, enzimas e marcadores de superfície, apresenta ligeiras variações que dependem da função e estágio de maturação. Contêm centríolos e complexos de Golgi, constituídos por sacos achatados rodeados por inúmeras vesículas lisas revestidas e não revestidas, de tamanho e densidade variável. Os ribossomas são numerosos, encontrando-se tanto na sua forma livre, como associados à superfície do retículo endoplasmático rugoso. Em menor número, encontram-se as mitocôndrias. O citoplasma contém ainda microfilamentos com cerca de 8-10 nm de diâmetro (Murray e Wynn, 2011; Zellforsch *et al.*, 2012). Os macrófagos são metabolicamente ativos, influenciando as funções locais e sistémicas pela secreção de uma grande diversidade de moléculas onde se incluem as citocinas, quimiocinas e factores de crescimento (Taylor *et al.*, 2005).

2. Recetores de superfície

Os recetores de superfície são importantes para a regulação de uma grande diversidade de funções e atividades celulares, incluindo a diferenciação, o crescimento e a sobrevivência celular, a adesão, a migração, a fagocitose, a ativação e o

desenvolvimento da citotoxicidade (Gordon, 2003; Taylor *et al.*, 2005). As famílias de recetores apresentam diferentes afinidades para os respetivos ligandos e uma diversidade muito ampla que lhes permite atuar até mesmo nos microambientes mais específicos (Taylor *et al.*, 2005; Londrigan *et al.*, 2011; Sieweke e Allen, 2013). Assim, existem recetores para reconhecimento de microrganismos, fatores de coagulação, componentes da matriz extracelular, diversas proteínas de transporte, fatores de crescimento, hormonas e citocinas, que conferem a capacidade de reconhecer e responder a uma grande variedade de estímulos (Ezekowitz e Gordon, 2006; Geissmann *et al.*, 2010). A colaboração entre as diferentes famílias de recetores influencia a resposta macrofágica (Perdiguero e Geissmann, 2013).

O reconhecimento dá-se quando o recetor reconhece um determinado estímulo, levando a alterações na superfície celular de modo a promover a captação de uma partícula, ou a sinalização e a expressão de determinados genes. Este reconhecimento contribui para a homeostase e defesa do hospedeiro, uma vez que vai resultar em processos como a eliminação de células apoptóticas ou microrganismos, bem como a captação de lipoproteínas modificadas, que contribuem para o processo inflamatório e para a reparação associada a aterosclerose (Woods *et al.*, 2000; Teo, 2003; Taylor *et al.*, 2005; Ezekowitz e Gordon, 2006; Geissmann *et al.*, 2010).

Os macrófagos expressam uma ampla gama de PRR ("pattern-recognition receptors") que medeiam interações do tipo recetor-ligando com antigénios microbianos (Appelberg, 2005; Taylor *et al.*, 2005). Destes, muitos pertencem à família de recetores "Toll-like" (TLR).

Os recetores TLR são uma grande família de recetores transmembranares, com cerca de onze membros, distribuídos diferencialmente pela célula, encontrando-se envolvidos na imunidade inata (Taylor *et al.*, 2005). São importantes para a detecção da invasão de agentes patogénicos microbianos e transdução de sinais moleculares. O reconhecimento via TLR promove a iniciação de vias de transdução de sinal, que podem estar envolvidas no desenvolvimento da imunidade adquirida e resposta inflamatória (Takeda e Akira, 2005). Os diferentes membros da família TLR apresentam domínios semelhantes às imunoglobulinas e desempenham papéis importantes no reconhecimento de componentes microbianos específicos derivados de organismos patogénicos, incluindo bactérias, fungos, protozoários e vírus (Peters *et al.*, 2005). O recetor TLR2 reconhece uma grande variedade de componentes microbianos, onde se inclui o

peptidoglicano, o TLR3 está implicado no reconhecimento de dsRNA viral, enquanto que o TLR4 reconhece LPS, o TLR5 reconhece flagelina (componente dos flagelos bacterianos), o recetor TLR6 dimeriza com o TLR2 e reconhece lipoproteínas, os TLR7 e TLR8 e estão implicadas no reconhecimento de ssRNA viral, e o TLR9 é essencial para o reconhecimento de DNA (Takeda e Akira, 2005). Os recetores TLR1, TLR2 e TLR4 a 6 são expressos na superfície da célula. Em contraste, os recetores TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são expressos em compartimentos intracelulares, tais como endossomas (Figura 4) (Peters *et al.*, 2005; Takeda e Akira, 2005). A estimulação destes recetores despoleta a expressão de diversos genes que estão envolvidos na resposta imunitária, induzindo a produção de citocinas inflamatórias, tais como a TNF- α , a IL-6 e a IL-12. (Takeda e Akira, 2005).

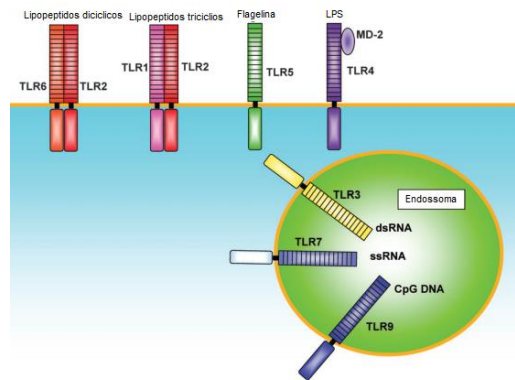


Figura 4- Os diferentes membros da família de recetores toll-like (figura adaptada de (Takeda e Akira, 2005))

Outras moléculas de adesão incluem as integrinas, selectinas e recetores para fatores de crescimento. Controlam a migração de células do sangue através do endotélio, estando também envolvidas nas interações com outras células, como sejam linfócitos e outros fagócitos (Gordon, 2003; Appelberg, 2005)

O recetor macrofágico de manose (MR) é importante para a manutenção dos níveis desta glicoproteína endógena e para a eliminação de hidrolases lisossomais em condições normais e inflamatórias (Taylor et al 2005). Está também envolvido no reconhecimento de patógenos e na apresentação de antígenos. É modulado positivamente pela IL-4, IL-13 e IL-10 e negativamente pelo IFN- γ (Taylor *et al.*, 2005).

Os "scavenger receptors" (SR) são importantes receptores não opsonicos de lipoproteínas de baixa densidade, tendo um papel na formação de células de espuma

(macrófagos modificados, com elevado teor lipídico) e no desenvolvimento da aterogénese (Taylor *et al.*, 2005). Os SR estão também envolvidos na defesa do hospedeiro, e a sua expressão é aumentada por M-CSF ("macrophage colony-stimulating factor"). Um dos membros desta família é o recetor MARCO, também induzido, facilmente, por microrganismos e outros estímulos (Elomaa *et al.*, 1998).

Na figura abaixo encontram-se representados alguns tipos de receptores SR e outros funcionalmente relacionados (Taylor *et al.*, 2005).

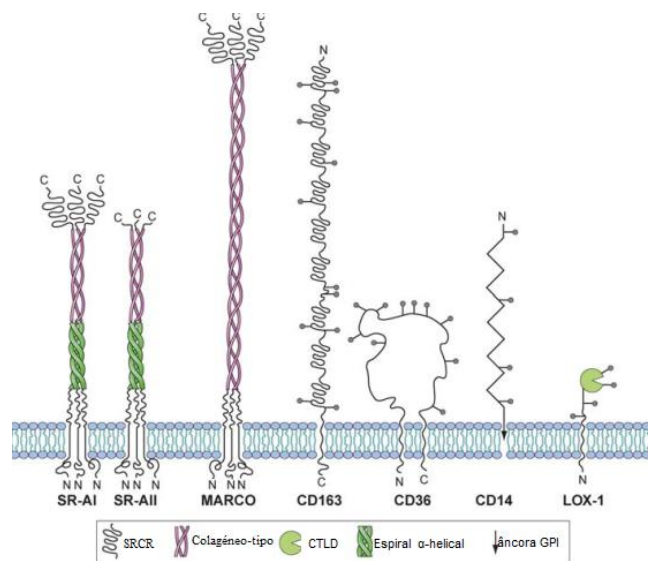


Figura 5-Famílias de receptores SR e outros funcionalmente relacionados (figura adaptada de (Taylor *et al.*, 2005))

A família dos receptores transmembranares "7-span" (TM) é a maior família de receptores, compreendendo cerca de 1% dos genes do genoma humano e estão envolvidos na transdução de sinal de uma grande variedade de estímulos, incluindo produtos microbianos, peptídeos e derivados de aminoácidos (Taylor *et al.*, 2005; Londrigan *et al.*, 2011).

Os macrófagos apresentam ainda outros receptores envolvidos no reconhecimento de patógenos, como os receptores de reconhecimento de ácido siálico e de lectina tipo C, bem como receptores hormonais, de citocinas e quimiocinas e receptores que reconhecem complemento e o fragmento Fc das imunoglobulinas, importantes para a fagocitose de partículas opsonizadas, ou seja, que se apresentam revestidas por imunoglobulinas e/ou fragmentos de componentes do sistema de complemento (Schindl *et al.*, 2006). Às

moléculas (imunoglobulinas e complemento) que facilitam a fagocitose chamam-se opsoninas (Shi e Pamer, 2011; Yang *et al.*, 2014).

Os macrófagos apresentam também antigénios das duas classes do complexo major de histocompatibilidade (MHC), importantes para a apresentação de antigénios a linfócitos (Yang *et al.*, 2014).

3. Diversidade Fenotípica

Os macrófagos podem ser estimulados a aumentar as suas funções efetoras (Solinas *et al.*, 2009). Essa ativação é necessária para que os monócitos circulantes terminem a sua diferenciação em macrófagos, quando recrutados pelos tecidos, sendo os monócitos muito suscetíveis de sofrerem alterações quando sujeitas a algum estímulo (Benoit *et al.*, 2008). O estado de ativação é altamente flexível e depende da localização do tecido e do microambiente (Pixley e Stanley, 2004; Solinas *et al.*, 2009).

Os macrófagos podem ser ativados por duas vias distintas, a via clássica e a via alternativa (Solinas *et al.*, 2009). Estas duas vias dão origem a macrófagos com diferentes designações e finalidades, devendo se encontrar num estado de equilíbrio para um conveniente funcionamento do sistema imunitário. Os macrófagos podem tomar a designação de macrófagos M1 ou macrófagos M2, consoante a ativação ocorrer pela via clássica ou pela via alternativa (Mosser e Edwards, 2008; Geissmann *et al.*, 2010). Os macrófagos M1 desempenham um papel preponderante na proteção a agentes patogénicos intracelulares e a células cancerígenas em virtude da sua grande atividade citotóxica e da resposta imune que despoletam (Solinas *et al.*, 2009; Geissmann *et al.*, 2010). A ativação clássica (M1) é mediada por estímulos como IFN- γ , TNF- α , recetores TLR e lipopolissacáridos (LPS), enquanto que a alternativa é mediada pela interleucina-4 (IL-4) e IL-13, atuando através do receptor IL-4R (Gordon, 2003). A ativação clássica leva a produção de IL-1, IL-12, IL-23, TNF- α e CXCL10, bem como de ROS e RNI, como o óxido nítrico (NO), com uma potente atividade microbicida. Além disso, os macrófagos M1 expressam altos níveis de antigénios das classes I e II do MHC, o que lhes permite funcionar como células apresentadoras de antigénios (Clark *et al.*, 2007).

Na Figura 6 encontra-se uma representação esquemática da ativação de macrófagos pela via clássica, como resultado da presença de IFN- γ e de patogéneos, levando à libertação de fatores citotóxicos.

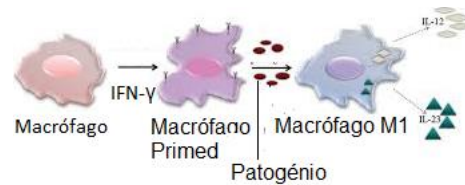


Figura 6-Via clássica de ativação (figura adaptada de (Solinas et al., 2009))

A ativação alternativa do macrófago origina o macrófago M2, considerado o trabalhador do hospedeiro uma vez que promove a limpeza de possíveis detritos. Este segundo modo de ativação é importante para a resolução da inflamação e tem sido implicado na tumorigênese, uma vez que promove crescimento de tumores e o desenvolvimento de metástases. Os macrófagos M2 estão também envolvidos no aumento da contratibilidade do músculo liso, o que contribui para a expulsão de patógenos (Pixley e Stanley, 2004; Chanmee *et al.*, 2014; Nathan, 2014).

A ativação alternativa dá-se quando os macrófagos estão expostos a um microambiente constituído por interleucinas do tipo IL-4, IL-13, IL-10 ou corticosteroides, podendo ter a influência de TGF- β ("transforming growth factor-beta") e de PGE2 (prostaglandina E2). Esta via de ativação leva a secreção de interleucinas (IL-10, IL-1ra) e das quimiocinas CCL17 e CCL22, bem como a expressão aumentada do recetor IL-1R "decoy", dos recetores de manose e dos recetores scavenger e da galactose (Solinas *et al.*, 2009). Este subtipo de macrófago apresenta alterações em algumas vias metabólicas, como no metabolismo de arginina, levando a que haja uma produção de ornitina e poliamina em vez da produção de citrulina e NO, o que seria de esperar normalmente. Os macrófagos M2 apresentam também uma baixa capacidade para promoverem a apresentação de antígenos e a cicatrização (Mosser e Edwards, 2008; Solinas *et al.*, 2009). As células ativadas por via alternativa podem-se ainda subdividir em três classes distintas. Essas classes tomam a designação de M2a, M2b e M2c quando o monócito ou macrófago é estimulado, respetivamente, pelas IL-4 e IL-13 (M2a), pelos complexos imunes e ligandos TLR (M2b), e pelas IL-10 e glucocorticoides (M2c), estando o último subtipo relacionado com a supressão da inflamação como se pode ver representado na figura abaixo (Montovani *et al.*, 2002; Obeid *et al.*, 2010).

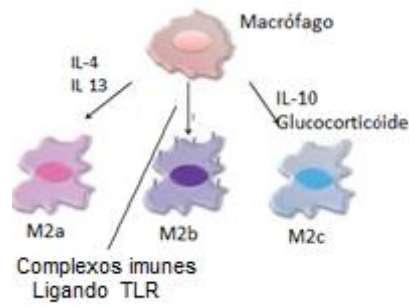


Figura 7-Subtipos de macrófagos M2 (figura adaptada de (Obeid et al., 2010))

A tabela abaixo representa de modo esquemático os diferentes fenótipos e os estímulos envolvidos na sua diferenciação.

Tabela 1-Os diferentes fenótipos de macrófagos e os seus estímulos

Fenótipo de macrófago	Indutores
M1	<ul style="list-style-type: none"> • IFN-γ • TLR • LPS
M2a	<ul style="list-style-type: none"> • IL-4 • IL-13
M2b	<ul style="list-style-type: none"> • TLR • Complexos imunes
M2c	<ul style="list-style-type: none"> • Il-10 • Glucocorticoides

As populações de macrófagos M1 e M2 devem ser equilibradas para um correto funcionamento do organismo e proteção do hospedeiro, originando em caso de desequilíbrio situações patológicas. Se o desequilíbrio pender para um número de células M1 superior, leva a indução de doença inflamatória crónica; no entanto, se o desequilíbrio se der no sentido contrário proporciona imunossupressão, como se pode observar na figura abaixo representada (Mosser e Edwards, 2008; Pollard, 2009).

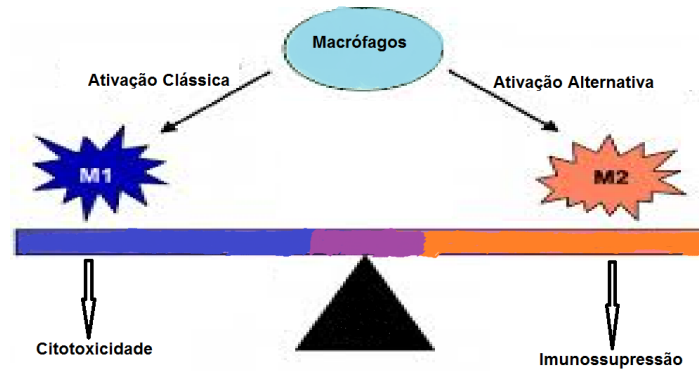


Figura 8-O equilíbrio entre macrófagos M1 e M2 (Figura adaptada de (Miron et al., 2013))

Além destes dois subtipos, pode existir um terceiro subtipo denominado de M3, que exerce um papel na produção de PGE2 (de la Torre *et al.*, 2008).

VII. Função dos macrófagos

1. Fagocitose

A fagocitose é um dos principais mecanismos de suporte da imunidade inata e é um processo onde células mortas e partículas estranhas são captados e posteriormente ingeridos por células fagocíticas, sendo também um processo importante para a eliminação de células tumorais (Pacheco, 2012). Apenas os fagócitos profissionais são funcionalmente dotados de capacidades fagocíticas importantes. A ligação aos recetores SR, MR e TLR, bem como a ligação de partículas opsonizadas a recetores de complemento e do fragmento Fc, estimulam a fagocitose. No entanto, este processo é regulado negativamente por outros recetores, tais como os recetores para a cisteína, bem como por alguns patógenos que inibem este mecanismo dos macrófagos (Takeda e Akira, 2005; Ezekowitz e Gordon, 2006). Durante a fagocitose é desencadeada a degradação do patógeno e posterior apresentação dos seus antígenos, associados ao MHC, conduzindo ao desenvolvimento da imunidade adquirida (Teo, 2003; Strauss, 2010).

A fagocitose é um processo que ocorre seguindo uma série de etapas. Esta é iniciada, por um processo não dependente de energia, quando se dá a ligação de uma determinada partícula à membrana da célula fagocítica. Após esta ligação pode-se dar ou não a transmissão de um sinal que leva (ou não) a posterior ingestão da partícula que se adere

ao fagócito. Os antígenos microbianos são reconhecidos por PRR, como os TLR, e uma ampla gama de recetores não-opsónicos. Quando se dá a ingestão resultante da interação entre recetores da e a superfície da partícula, ocorre a emissão de pseudópodes (extensões provenientes do citoplasma, constituídos por filamentos de actina e miosina) que envolvem a partícula, resultando na fusão que origina um vacúolo fagocítico, no interior da célula. O vacúolo fagocítico (fagossoma) passa por um processo de maturação até, num estádio final, fundir com lisossomas, onde as enzimas hidrolíticas, ROS e RNI contribuem para a degradação microbiana (Appelberg, 2005; Pacheco e Cardoso, 2012).

A fagocitose leva a ativação dos macrófagos e à indução da libertação de uma série de moléculas onde se incluem as citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e TNF, bem como outras toxinas mediadoras que promovem o dano nos tecidos, se produzidas em excesso. Normalmente, a resposta inflamatória é seguida por uma resposta anti-inflamatória, conduzindo a um equilíbrio (Pacheco e Cardoso, 2012).

Durante a fagocitose ocorre a estimulação de uma série de processos bioquímicos e metabólicos, onde se inclui o aumento da utilização da glucose e do consumo de oxigênio (Schindl *et al.*, 2006).

2. Apoptose

A apoptose é um processo natural, que pode tomar a designação de morte celular programada e que se desenrola durante o desenvolvimento, promovendo a remodelação tecidular e o desenvolvimento da homeostase. De facto, a apoptose é essencial para a regulação do número de células no hospedeiro, de modo a haver um equilíbrio entre o número de células eliminadas e as que sofrem divisão celular. É também importante para o a função do sistema imunitário e, particularmente no desenvolvimento embrionário (Elmore, 2007).

O processo da apoptose recorre a uma série de mecanismos bioquímicos e alterações morfológicas (Albert *et al.*, 2002; Elmore, 2007). Depende de uma família de proteases, as quais apresentam um grupo cisteína no seu local ativo. Estas proteínas são proteases que clivam outras proteínas nos locais que contêm resíduos de ácido aspártico e tomam a designação de caspases. A ação das caspases na degradação de porções específicas da célula, num processo contínuo, envolvendo a ativação em cascata de diversas caspases (Albert *et al.*, 2002). Com o avançar do processo a célula vai tomando

dimensões mais reduzidas, ocorre fragmentação nuclear, o citoplasma fica mais denso e os organelos ficam mais agrupados, levando a formação de corpos apoptóticos, após formação e libertação de "bolhas" a partir da membrana das células (Elmore, 2007).

Após a morte celular por apoptose, a célula ou seus corpos apoptóticos é rapidamente fagocitada e eliminada por macrófagos (Savill *et al.*, 2002). Embora seja comum afirmar que este é um processo neutral sob o ponto de vista imunológico, existem evidências que contrariam essa afirmação. De facto, a fagocitose das células apoptóticas pode levar à produção de mediadores anti-inflamatórios e a imunossupressão (situações de deficiente eliminação de células apoptóticas, podem conduzir a doenças autoimunes e inflamatórias). Por outro lado, noutras situações a remoção de células apoptóticas pode levar a exacerbação da inflamação (Savill *et al.*, 2002; Teo, 2003).

Se a taxa de apoptose exceder a capacidade de remoção pelos macrófagos, as células apoptóticas podem tornar-se necróticas, resultando na libertação do conteúdo celular, levando ao dano no tecido envolvente, sendo a depuração um passo essencial para a resolução deste processo (Teo, 2003).

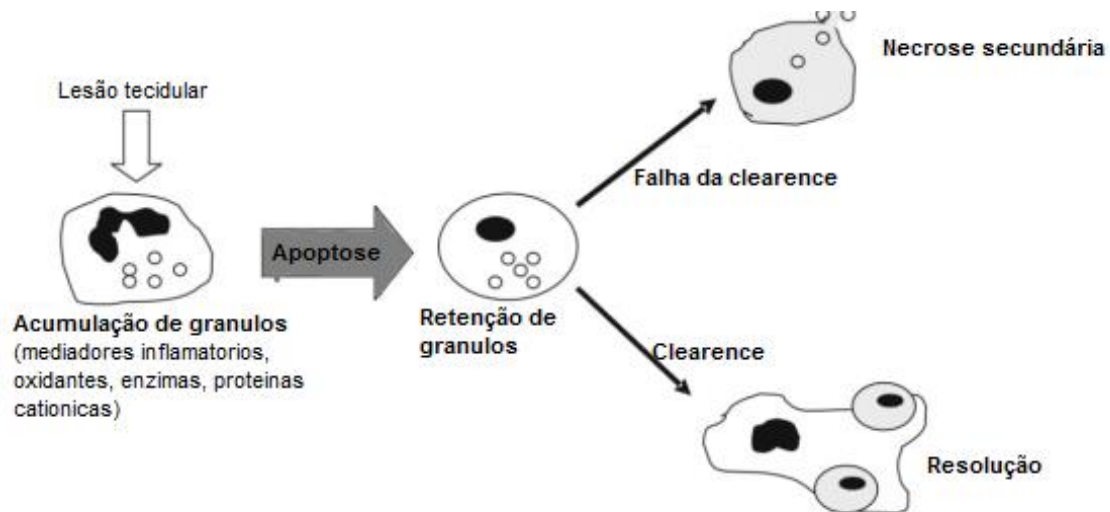


Figura 9- A Importância da remoção de neutrófilos (figura adaptada de (Teo, 2003))

Esta figura demonstra a importância da remoção de neutrófilos apoptóticos pelos macrófagos, pois se os neutrófilos entram em necrose derramam o conteúdo dos seus grânulos e causam uma inflamação extensa. Os macrófagos ao fagocitarem os neutrófilos impedem essa inflamação e ainda aumentam o seu arsenal microbicida, recebendo o conteúdo granular dos neutrófilos (TEO,2003). Este processo (cooperação

neutrófilo-macrófago) desempenha um importante papel nos mecanismos de defesa contra infecções (Appelberg, 2005; Pacheco e Cardoso, 2012).

4. Interação com a imunidade adaptativa

a) Imunidade inata e adaptativa

A imunidade caracteriza-se como sendo a capacidade de resistir à invasão de microrganismos e à formação de células tumorais, que poderiam levar, numa última fase, ao desenvolvimento de dano. O grau de imunidade pode ser reduzido por vários fatores tais como um ambiente higiénico, a fadiga, a exposição a temperaturas anormais, variações na dieta, determinados fármacos, certas patologias e lesões (McConnell., 2014). O baço é um órgão central na imunidade às bactérias e fungos. Encontra-se no abdómen associado ao estômago, a sua estrutura permite a remoção de microrganismos de um modo eficiente e a sua localização permite que tenha uma exposição precoce aos patogénos, levando à promoção da homeostase imune. (Mebius e Kraal; Chanmee *et al.*, 2014).

O processo de reação do sistema imunológico compreende dois tipos de resposta que se relacionam entre si. Uma delas é de largo espectro, designada de resposta imunológica inata ou natural. É mais imediata e com um espectro de ação alargado, atuando na presença de estruturas moleculares conservadas presentes em agentes patogénicos, os PAMP ("pathogen-associated molecular patterns" - ex. LPS), presentes à superfície dos microrganismos e que são reconhecidos pelos PRR (Appelberg, 2005; Takeda e Akira, 2005). A segunda é uma resposta imunológica mais específica designada de resposta imunológica adaptativa ou adquirida, levando mais tempo a desenvolver-se e é resultado da ativação de uma série de células (nomeadamente linfócitos) e moléculas solúveis, que interagem e funcionam de uma forma sinérgica e específica para eliminar ou apenas neutralizar um estímulo agressor (Pacheco e Cardoso, 2012). A imunidade adaptativa é adquirida após o nascimento e pode ser activa ou passiva. A imunidade adaptativa ativa resulta da ação das células do hospedeiro na destruição de bactérias ou neutralização dos seus produtos, após infecção acidental ou inoculação de um patógeno atenuado, tal como na vacinação. A imunidade adaptativa passiva é obtida pela introdução do soro de um animal imunizado no organismo de um indivíduo, não imune (Woods *et al.*, 2000; Teo, 2003).

b) Papel do macrófago na interação com a imunidade adaptativa

Os patógenos induzem o desenvolvimento da imunidade inata e adaptativa, estando a primeira relacionada com o desenvolvimento da segunda. Aquando de uma infeção desenvolve-se a resposta inflamatória através do extravasamento de componentes plasmáticos para os tecidos (exsudação) e simultânea migração de monócitos, que se convertem, ao chegar ao foco da inflamação, em macrófagos inflamatórios. Ao fagocitarem neutrófilos senescentes, conforme referido acima, aumentam o seu arsenal antimicrobiano (Appelberg, 2005; Pacheco e Cardoso, 2012). Os macrófagos reconhecem os patógenos, opsonizados ou não, fagocitando-os e degradando-os para posterior apresentação antigénica aos linfócitos T (Takeda e Akira, 2005; Revie e Salahuddin, 2014). Estes antígenos peptídicos podem ser expostos à superfície conjugados com moléculas do MHC-II, levando à interação com células T CD4+, ou com moléculas MHC-I, interagindo com células T citotóxicas, CD8+ (Koppensteiner *et al.*, 2012). A interação com as células T conduz à sua ativação e secreção de citocinas, que por sua vez vão modular a atividade macrofágica. Assim, o macrófago é uma célula que se comporta como agente da resposta inata, mas também como efetor da resposta adaptativa. Neste contexto, a existência de populações heterogéneas de macrófagos dá ao sistema imune plasticidade na resposta imunitária.

A resposta imunitária, de ambos os tipos pode ser também controlada pelo sistema nervoso central, através de neuropeptídeos libertados a partir de órgãos linfoides atuando como estimuladores ou inibidores da resposta imunológica. A sua concentração é aumentada na presença de LPS e citocinas (Ezekowitz e Gordon, 2006; Romeo *et al.*, 2010).

VII. Relação com parasitas intracelulares

Os macrófagos promovem a defesa do hospedeiro perante microparasitas (vírus e bactérias) e macroparasitas (protozoários unicelulares e pluricelulares) (Shi e Pamer, 2011). Neste capítulo apresentarei como exemplos um macroparásita (*Leishmania*) e dois microparasitas (*Mycobacterium tuberculosis* e vírus da imunodeficiência humana).

1. *Leishmania*

A leishmaniose é uma síndrome que engloba uma ampla gama de patologias resultantes da infecção dos macrófagos, resultando quer em lesões cutâneas (*L. major*, *L. mexicana*) quer em lesões em órgãos internos, variando desde a infecção assintomática até grave, apresentando associada uma morbidade variável (Sacks e Noben-Trauth, 2002), estando esta dependente das espécies de *Leishmania* que dão origem à infecção (Kumar *et al.*, 2014). O ciclo de vida deste parasita implica uma interação célula-a-célula e inicia-se com a infecção por promastigotas por via intradérmica transmitida pela picada de flebotomíneos fêmeas infetadas. Os promastigotas entram rapidamente nos macrófagos através da ligação entre o recetor de complemento CR3 destas células, e duas moléculas presentes abundantemente na membrana dos promastigotas, o lipofosfoglicano (GPL) e a metaloproteinase gp63 (Sacks e Noben-Trauth, 2002). Esta interação resulta na internalização e formação de vacúolos parasitóforos contendo *Leishmania*. Estas secretam proteofosfoglicano e replicam-se, tendo um período de cerca de uma semana para a formação de uma nova geração (Kumar *et al.*, 2014). Os macrófagos massivamente infectados acabam por lisar, libertando os parasitas que se dividem rapidamente em amastigotas (Sacks e Noben-Trauth, 2002). Este parasita durante o seu ciclo de vida alterna a forma amastigota e promastigota (Kumar *et al.*, 2014).

Este parasita apresenta como mecanismo de resistência à actividade microbicida dos macrófagos, a inibição da biogénese fagolisossomal, através da ação de uma metaloproteinase, designada de Gp63, que se encontra a superfície deste parasita quando este se encontra na fase promastigota, que atua no bloqueio do SNARs (N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor), que tem como finalidade coordenar o trafico através da membrana e quando alterado conduz a uma alteração no processo de biogénese do fagolisossoma, interrompendo deste modo a apresentação antigénica. Um outro mecanismo é através da metilação do DNA, ou seja a adição de grupos metilo, que leva ao silenciamento de genes que controlam a atividade microbicida dos macrófagos (Arango-Duque e Descotaux, 2015).

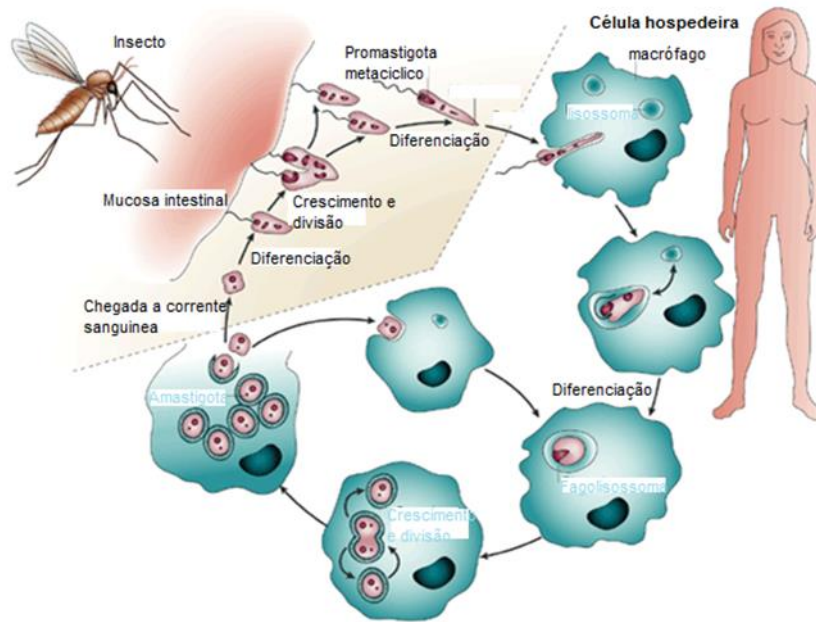


Figura 10- O ciclo de vida da leishmânia (figura adaptada de (Sacks e Noben-Trauth, 2002))

2. *M. Tuberculosis*

O *M. tuberculosis* é responsável por a patogênese de uma doença bacteriana infecciosa, que afeta preferencialmente os pulmões. Esta é transmitida pelo contacto com pessoas afetadas, podendo ser também resultante de uma nutrição pobre, bem como pelo contacto com baixas condições de higiene, contudo se o sistema imunitário se encontrar em pleno estado pode não conduzir ao desenvolvimento de doença. Os sintomas característicos são a tosse, a expectoração, podendo em alguns casos vir acompanhada por sangue, dores no peito, fraqueza, febre e perda de peso (Vyas, 2014).

O *M. tuberculosis* é um patógeno predominantemente respiratório (Shi e Pamer, 2011) que infeta o macrófago, impedindo a fusão fagolisossomal (importante para promover a destruição do patógeno) e replicando-se nos seus fagossomos (McDonough *et al.*, 1993; Behar *et al.*, 2010). *M. tuberculosis* tem a capacidade de inibir a apoptose dos macrófagos, através da atuação sobre a dinâmica da cascata de caspases, levando ao estabelecimento de necrose com a finalidade de facilitar a difusão e transmissão bacteriana (Butler *et al.*, 2012). No entanto, nem todas as estirpes apresentam a mesma virulência. A virulência das estirpes afecta o nível de atuação sobre a morte celular do macrófago e sobre a capacidade para inibir a apoptose (Behar *et al.*, 2010; Butler *et al.*,

2012), bem como a capacidade de estimulação da produção de iNOS e TNF (Shi e Pamer, 2011).

3. Vírus da imunodeficiência humana

A doença crônica causada por um dos vírus com grande impacto na sociedade é a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Este vírus é um membro do gênero lentivírus e para realizar o seu ciclo viral necessita de uma célula hospedeira, mas também de determinadas proteínas virais que desempenham uma importante função na patogênese viral, nomeadamente através da modulação da sinalização celular (Herbein et al., 2010). Existem dois tipos, HIV1 e HIV2, sendo o tipo 1 o mais disseminado.

A SIDA caracteriza-se por uma diminuição do número de linfócitos T e pela presença de uma população de células CD4+ com o vírus latente, podendo estas células serem do tipo células T CD4+ e/ou pertencerem a linhagem monócito/macrófago (Douce *et al.*, 2010; Koppensteiner *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2014). Estas células são o principal alvo da ação do HIV, uma vez que apresentam à sua superfície o receptor CD4 e o co-receptor CCR5 ou CXCR4 (Benoit *et al.*, 2008; Douce *et al.*, 2010; Kedzierska e Crowe, 2014). Os monócitos e os macrófagos são mais resistentes ao efeito citopático do HIV, persistindo ao longo do curso da infeção. São um importante reservatório para o HIV e como se encontram amplamente representados na maioria dos sistemas do organismo permitem a disseminação do vírus (Douce *et al.*, 2010; Koppensteiner *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2014). A persistência em monócitos e macrófagos é resultado da forte expressão de um fator inibidor da replicação viral nestas células e também em células dendríticas, identificado como SAMHD1 ("SAM domain and HD domain-containing protein 1") (Koppensteiner *et al.*, 2012).

Os reservatórios são células infetadas que apresentam o vírus na sua forma latente ou com baixos níveis de replicação. Nestas células, não se dá a produção de partículas virais infecciosas, podendo esta ser ativada após um dado estímulo (Koppensteiner *et al.*, 2012; Kedzierska e Crowe, 2014; Kumar *et al.*, 2014)

Os macrófagos criam um ambiente protetor para o patógeno, por criação de um compartimento albergando o vírus no seu interior, que o tornam inacessível a

anticorpos. Promovem também a expansão do vírus uma vez que secretam citocinas e quimiocinas (MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1 e CCL-5) que atraem linfócitos que poderão ser infectados, e também induzem resistência a apoptose nas células infectadas (Douce et al., 2010; Koppensteiner et al., 2012).

Os macrófagos podem conter o genoma do HIV integrado no cromossoma ou na sua forma circular, não integrada. A indução da replicação do vírus, no interior desta célula, é regulada por citocinas e outros estímulos extracelulares. A maioria dos macrófagos infectados parece corresponder a um fenótipo M2, que embora possa contribuir para uma inibição da resposta imune efetora, não permite a replicação viral no interior do macrófago. No entanto, certos estímulos externos podem levar à conversão do fenótipo M2 em M1, os quais permitem a conclusão do ciclo viral (Koppensteiner *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2014) Kedzierska e Crowe, 2014)

As proteínas virais do vírus da imunodeficiência humana (Nef, Tat, Vpr, e gp120) são libertadas por células infectadas pelo vírus e têm a capacidade de entrarem em macrófagos e de modularem as suas funções, sobretudo aquelas que afetam o ciclo de vida do vírus. A proteína viral Nef, ao atuar sobre os macrófagos infectados pelo HIV, induz a formação de projeções citoplasmáticas, permitindo aos vírus transferir essa proteína a outras células, nomeadamente às células B. A transmissão de Nef a estas células inibe as suas funções imunológicas, comprometendo a produção de IgG2a e IgA (Fig. 11). (Rudnicka e Schwartz, 2009; Herbein *et al.*, 2010). A estimulação fisiológica de macrófagos através do recetor CD40 ou da proteína viral Nef conduz também à ativação do fator NF-kappaB que induz a libertação das formas solúveis de CD23 e ICAM, as quais vão interagir com os seus ligandos presentes nos linfócitos T, tornando-os permissivos à infeção, uma vez que permitem a entrada do vírus e a expressão de novas proteínas virais (Rudnicka e Schwartz, 2009).

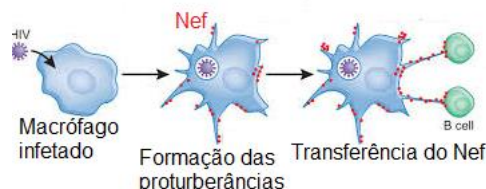


Figura 11-Transmissão do Nef às células B (figura adaptada de (Rudnicka e Schwartz, 2009)

O HIV altera as funções realizadas pelos macrófagos, modificando a fagocitose, a quimiotaxia e a produção de citocinas, contribuindo tais alterações para a patogênese

da doença e permitindo o desenvolvimento de infecções oportunistas. As alterações permitem também a infecção e replicação viral (Koppensteiner *et al.*, 2012). Os macrófagos desempenham um papel em duas vertentes nesta patologia: numa fase aguda da infecção, permitem o estabelecimento da infecção nos locais de entrada viral, e a disseminação do vírus; por outro lado, estão também envolvidos no estabelecimento da resposta imune celular e humoral adaptativa que ajuda a diminuir a carga viral. (Douce *et al.*, 2010; Koppensteiner *et al.*, 2012).

Os macrófagos da mucosa genital são das primeiras células a contactarem com o vírus e a serem infetadas, promovendo o desenvolvimento da resposta imune e transmitindo o vírus através de contacto de célula-célula durante a apresentação dos antígenos HIV. Estes macrófagos da mucosa recrutam células T CD4⁺ e contribuem para o estabelecimento da infecção. As células da microglia, apresentam um especial significado clínico nesta infecção uma vez que, quando infetadas durante a fase aguda, são responsáveis pela neuropatogénese e pela patogénese da demência associada ao HIV. Estas células tem um tempo de vida longo (vários anos), sendo um importante reservatório em pacientes infetados (Koppensteiner *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2014). Os macrófagos intestinais induzem uma regulação negativa dos receptores de superfície envolvidos na adesão viral (CD4 e CCR5), levando a latência. Como são também APC, podem estar envolvida na orquestração da resposta primária de anticorpos que suprimem as cargas virais de HIV-1 no início da fase crónica (Douce *et al.*, 2010; Koppensteiner *et al.*, 2012; Kedzierska e Crowe, 2014; Kumar *et al.*, 2014).

Na fase mais avançada da infecção desenvolve-se o estadio de SIDA caracterizado por uma desregulação do sistema imunológico e pela perda da sua capacidade em controlar o vírus, resultante do esgotamento da maioria das células T CD4⁺ e da presença de uma quantidade considerável de reservatórios, incluindo em macrófagos (Koppensteiner *et al.*, 2012).

A terapêutica atualmente utilizada nesta patologia é a terapêutica HAART (Highly active antiretroviral Therapy) consistindo na associação de vários fármacos tendo como alvo as diferentes fases do ciclo de vida do vírus. Esta terapêutica melhorou significativamente a qualidade de vida dos indivíduos infetados, diminuindo a carga viral. No entanto, se a terapêutica for interrompida é retomado o nível viral inicial, devido aos reservatórios, uma vez que os fármacos não os alcançam, tendo assim esta terapêutica que ser utilizada durante toda a vida. Uma vez que os reservatórios são o principal

obstáculo do tratamento, o desafio é atuar sobre a persistência para deste modo se tentar encontrar uma cura. Assim, um objetivo primordial será a eliminação dos vírus que se encontram nos reservatórios, impedindo também a formação destes reservatórios (Douce *et al.*, 2010; Koppensteiner *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2014).

Tem-se considerado associar à terapêutica HAART fatores de restrição atuando em diferentes etapas do ciclo de replicação viral. Um exemplo é o interferão- α que exerce uma forte atividade antiviral (Koppensteiner *et al.*, 2012). Um dos repressores da transcrição que tem sido considerado é o CTIP2 ("Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-interacting protein 2"), que atua no estabelecimento da latência uma vez que reprime a transcrição do DNA viral. Uma forma alternativa que tem sido considerada é o uso de agentes farmacológicos que induzam a apoptose em células reservatório (Douce *et al.*, 2010). Contudo, sendo os macrófagos relativamente resistentes a apoptose e uma vez que os macrófagos infetados apresentam alterações nos genes relacionados com a morte celular programada, esta alternativa terá que ser avaliada muito detalhadamente (Douce *et al.*, 2010; Koppensteiner *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2014). Combinando essas estratégias em desenvolvimento com o tratamento HAART poderia ser possível ter uma melhor perspectiva para o encontro de uma cura (Kumar *et al.*, 2014).

VIII. Relação com patologias

Em determinadas condições, a função macrofágica está relacionada com o desenvolvimento de patologias com diferentes etiologias. O microambiente a que o macrófago está sujeito aquando da sua diferenciação (induzindo uma população M1 ou M2) é um importante fator que pode contribuir para o desenvolvimento destas patologias (figura 12).

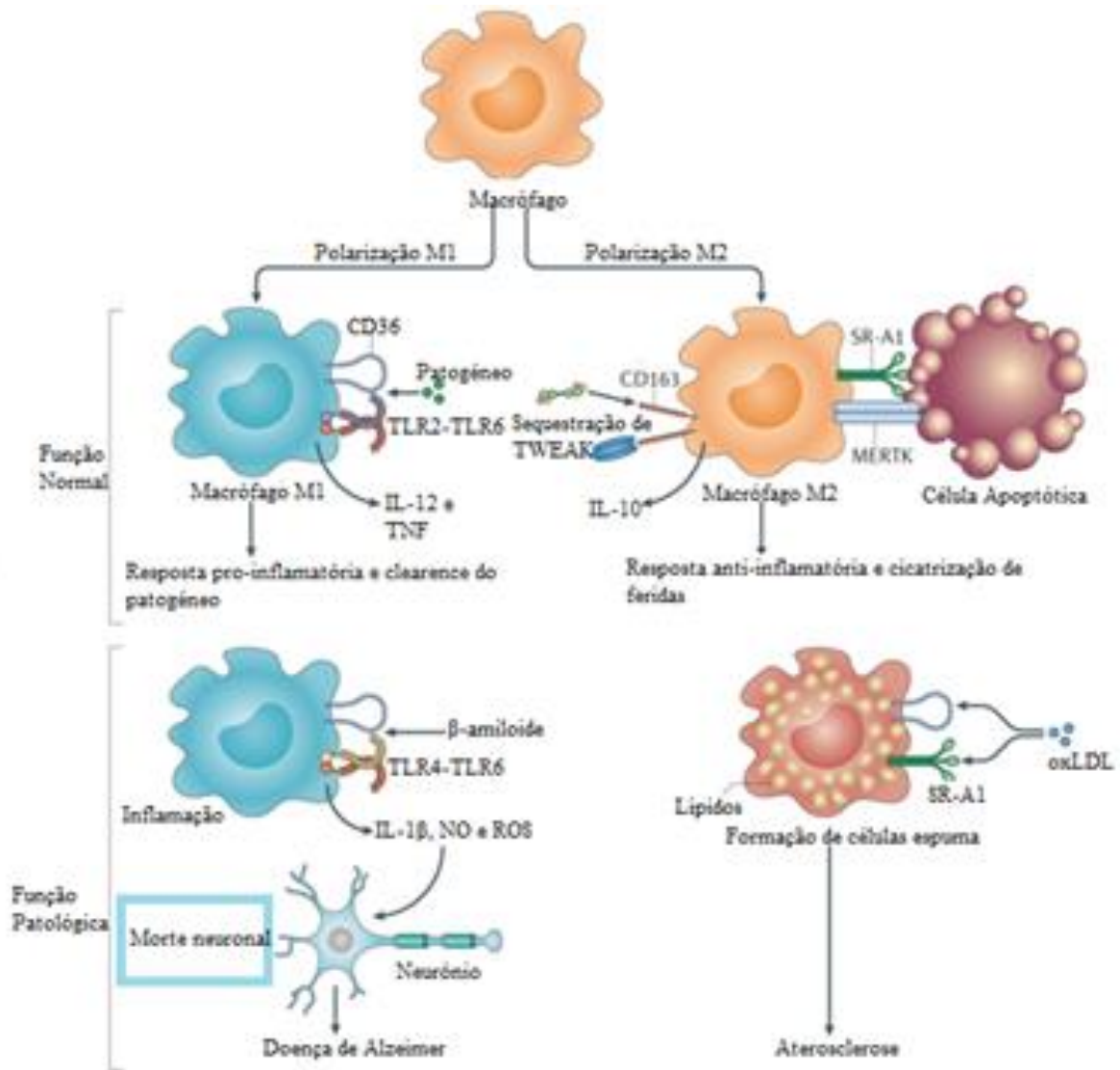


Figura 12--Subtipos macrófágicos e a sua relação com diferentes doenças (Figura adaptada de (Canton et al., 2013))

1. Cancro

O cancro encontra-se associado a um processo inflamatório resultante da infiltração de glóbulos brancos (leucócitos) e de uma grande diversidade de citocinas e quimiocinas (Montovani *et al.*, 2008). As células tumorais distinguem-se das células normais pela expressão de antígenos resultantes da instabilidade genómica, levando a que a expressão génica seja aberrante, tornando-as alvo dos linfócitos do hospedeiro (Clark *et al.*, 2007). As células neoplásicas proliferam principalmente pela ativação da via arginase, levando a produção de altos níveis de prostaglandina E2 (PGE2) que promove a produção de fatores de crescimento endotelial, e deste modo a vascularização (de la Torre *et al.*, 2008). As células tumorais produzem várias enzimas que podem degradar a

matriz extracelular (ECM), e os produtos da degradação desta matriz agem como estímulos inflamatórios para o recrutamento de células do sistema imunológico inato e para a expressão de genes promotores da inflamação (Chanmee *et al.*, 2014), que suprimem a resposta iniciada contra as células tumorais, permitindo-lhes crescer e dividir-se. Tais enzimas incluem várias metaloproteinases (por exemplo, MMP-2 e MMP-9) (Shih *et al.*, 2006a; Clark *et al.*, 2007). A dissolução do ECM leva a clivagens através das quais as células tumorais podem levar ao desenvolvimento de metástases e a angiogênese, estando relacionado com um prognóstico desfavorável em determinados tumores (Obeid *et al.*, 2010; Chanmee *et al.*, 2014). Os processos que levam ao aumento da agressividade dos tumores incluem a angiogênese, a hipoxia, a interação entre os recetores de membrana e as citocinas do microambiente do tumoral, bem como a degradação da membrana basal.

A massa tumoral que se forma apresenta uma constituição com uma grande diversidade de tipos celulares, constituindo os macrófagos cerca de metade dessa massa, podendo também estar presentes células neoplásicas com origem na linhagem fagocítico-mononuclear, fibroblastos, células endoteliais, células mielóides com atividade imunossupressora que interagem entre si, apresentando um estroma reativo resultante da presença de uma grande abundância de mediadores inflamatórios e enzimas proteolíticas (Solinas *et al.*, 2009). Essa elevada quantidade de macrófagos desempenha um papel de grande relevância na patogênese dos tumores (Goerdts e Orfanos, 1999; Pollard, 2009; Solinas *et al.*, 2009).

O microambiente do tumor desempenha um importante papel na agressividade dos tumores sólidos malignos, fornecendo todos os estímulos necessários para a viabilidade, crescimento e capacidade de invasão tumoral. O estado inflamatório crônico do microambiente tumoral é um promotor de dano genómico, levando a que a falta da imunovigilância impulsione a tumorigênese. As células T CD8 +, que se pensa serem mediadores da imunidade antitumoral, são escassas em tumores recentes, mas encontradas num grupo restrito de tumores avançados (Clark *et al.*, 2007).

As células supressoras do sistema imunológico do hospedeiro aparecem precocemente durante a tumorigênese, compensando a imunidade anti-tumoral e contribuindo para a progressão da doença. A gênese tumoral é iniciada por eventos genéticos e estimulada

pelo microambiente antitumoral, incluindo tanto a imunidade inata como adaptativa (Clark *et al.*, 2007; Chanmee *et al.*, 2014).

Durante a progressão do tumor os macrófagos são recrutados sob a influência de quimiocinas, tais como CCL2 e de citocinas, tais como o CSF-1 ("colony-stimulating factor-1"), produzidas pelas células tumorais, alterando o microambiente tumoral e acelerando a progressão do tumor (Chanmee *et al.*, 2014)

Os macrófagos e as células neoplásicas estabelecem uma relação que promove o crescimento do tumor, através de um processo contínuo de deposição de matriz e sua consequente remodelação (Hagemann *et al.*, 2004). Esta promoção da disseminação do tumor resulta na invasão das células tumorais malignas.

Os macrófagos associados a tumores (TAMs) são macrófagos ativados por via alternativa de fenótipo M2, e são os que mais influenciam a progressão tumoral, melhorando a progressão tumoral e o desenvolvimento de metástases (Shih *et al.*, 2006a)(Colombo e Mantovani, 2005; Li e Flavell, 2008). Como tal, na origem dos tumores infiltrantes ocorre o recrutamento de macrófagos resultantes dos monócitos circulantes ou de uma população local de macrófagos. Para este recrutamento contribuem a quimiocina CCL2 bem como as CCL5, CCL7, CXCL8 e a CXCL12, e também citocinas como VEGF, PDGF ("platelet-derived growth factor") e M-CSF (Li e Flavell, 2008). Os macrófagos recrutados são modulados por estímulos, tais como fatores de crescimento, a baixa tensão de oxigênio, ou antigénios tumorais solúveis, e influenciam a migração de células tumorais e a sua capacidade invasiva, bem como a angiogénese tumoral, promovendo a progressão tumoral (Pollard, 2004; de la Torre *et al.*, 2008; Obeid *et al.*, 2010). De facto, certas moléculas secretadas por macrófagos desempenham uma ação pro-neoplásica, tais como o EGF ("epidermal growth factor"), que influencia positivamente o crescimento das células tumorais (Montovani *et al.*, 2008; Pollard, 2009).

A diminuição da tensão de oxigênio na massa tumoral como resultado da acumulação de tecido necrótico no tumor, induz a expressão de HIF-1 (fatores de indução de hipoxia), que leva a que os TAM migrem, alastrando o tumor (Knowles e Harris, 2007; Montovani *et al.*, 2008). Os TAM expressam elevados níveis do fator de transcrição NF-κB que regula a inflamação, induzindo modificações que potenciam a agressividade

dos tumores pela insensibilização a fatores que inibem o crescimento tumoral, a promoção da resistência a sinais apoptóticos e da angiogênese (Dunn *et al.*, 2004; Bingle *et al.*, 2006; Naugler e Karin, 2008). O papel pro-tumoral dos TAM vai diminuindo com a progressão do tumor uma vez que com o desenvolvimento da imunidade adaptativa os TAM expressam níveis de NF- κ B mais baixos, devido à presença de fatores que anulam o NF- κ B (p50), sendo tal anulação resultado de uma mudança do microambiente tumoral pela secreção de proteínas da matriz e uma grande variedade de proteases (serina, MMPs e catepsinas) (Montovani *et al.*, 2002; Gocheva e Joyce, 2007; Naugler e Karin, 2008).

Os níveis de TAM permitem tirar conclusões relativamente ao prognóstico da doença, estando um nível elevado associado a um mau prognóstico. De facto, existe uma relação entre o elevado nível de TAM e o aumento do processo de metástases, pela ação da IL-1. (Figura 9) (Shih *et al.*, 2006b; Clark *et al.*, 2007; Solinas *et al.*, 2009).

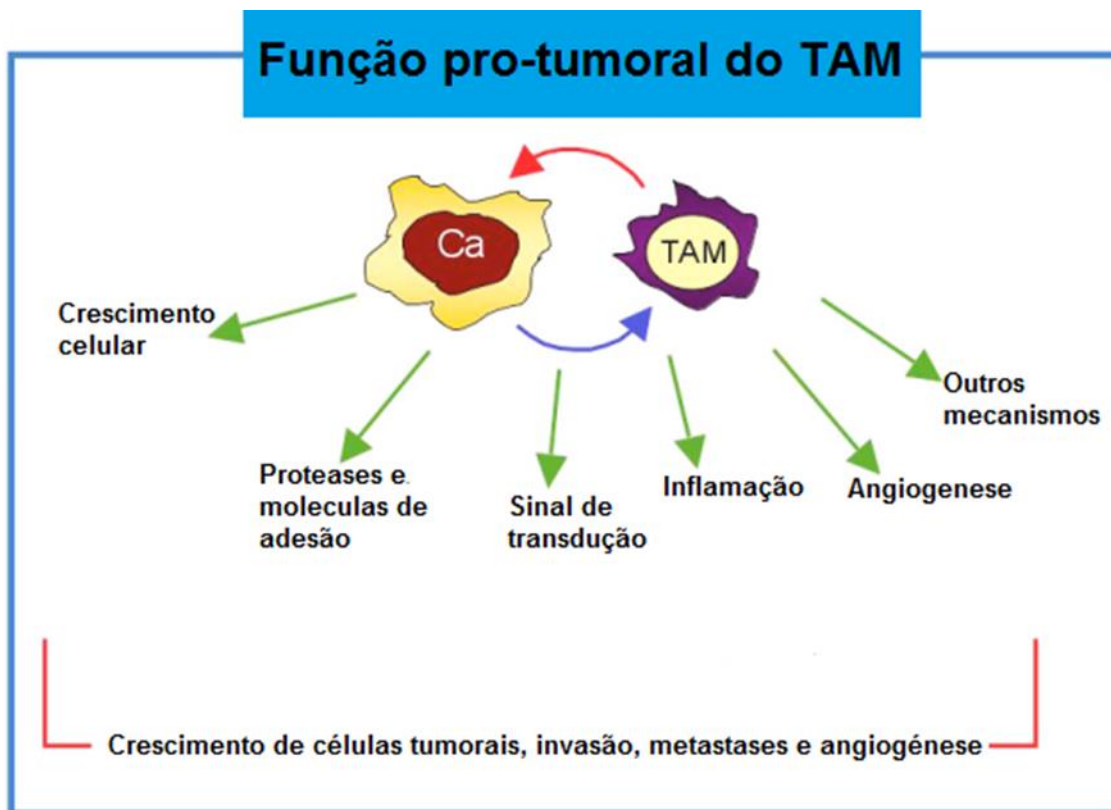


Figura 13- O TAM e as suas ações promotoras do crescimento tumoral (Figura adaptada de (Chen *et al.*, 2005)

Os TAM estão envolvidos na angiogénese, pela secreção de fatores pró-angiogénicos (como VEGF) que levam ao desenvolvimento de uma rede de vasos que fornecem

alimentação às células tumorais, bem como de fatores que levam à diminuição da resposta pró-inflamatória antitumoral local. A hipoxia no microambiente tumoral é um fator atrativo para os macrófagos, uma vez que está normalmente associada a necrose, produzindo fragmentos celulares. Aquando da hipoxia, é induzida a expressão de VEGF em macrófagos, como resultado da sobre-regulação dos fatores de transcrição HIF-1 α e HIF-2 α , aumentando a vascularização. Em condições de hipóxia, os TAM produzem também níveis altos de IL-10, o que inibe as células T efetoras (Obeid *et al.*, 2010; Chanmee *et al.*, 2014).

Os TAM podem também promover a metastização, através da secreção de MIF ("migration inhibitory factor"), estimulada pela sobre-regulação do fator HIF-1 α . O MIF libertado induz a produção de MMP9, o qual vai contribuir para a degradação da membrana basal (Shih *et al.*, 2006a; Obeid *et al.*, 2010). Outras citocinas implicadas na tumorigénese são o MCP-1 (frequentemente produzida por células tumorais) e o TNF- α (Lin e Gordon, 2012).

Nos estágios iniciais os TAM podem adotar o fenótipo M1, de modo a inibir a angiogénese e ativar a imunidade, embora posteriormente mudem para um estado M2, com as características referidas acima (Obeid *et al.*, 2010; Chanmee *et al.*, 2014). (Clark *et al.*, 2007; Obeid *et al.*, 2010) (Shih *et al.*, 2006a).

A modulação da imunidade adaptativa, vai também apresentar um importante impacto na progressão da doença (Shih *et al.*, 2006a; Lin e Gordon, 2012). As células linfoides influenciam o desenvolvimento do tumor, encontrando-se relacionadas com a indução de tolerância (Lin e Gordon, 2012). Os TAM produzem IL-10 e as quimiocinas CCL17 e CCL22, que atraem populações de células T sem qualquer ação citotóxica (Treg e Th2) (Egeblad e Werb, 2002; Mantovani, 2004). As células T naive são captadas pela quimiocina CCL8 mas no microambiente ficam anérgicas.

Um aumento do número de células T reguladoras são comumente encontrados em vários tumores. Estas neutralizam a resposta imune mediada pelos macrófagos M1, através de vários mecanismos, onde se inclui a inibição da proliferação de células T e da citotoxicidade das células NK. Sem a ação pró-tumoral dos TAM de subtipo M2, o sistema imune eliminaria o tumor através da função das células TCD8⁺, NK e

macrófagos M1. A figura abaixo representa a ação anti-tumoral dos TAM (Chanmee *et al.*, 2014).

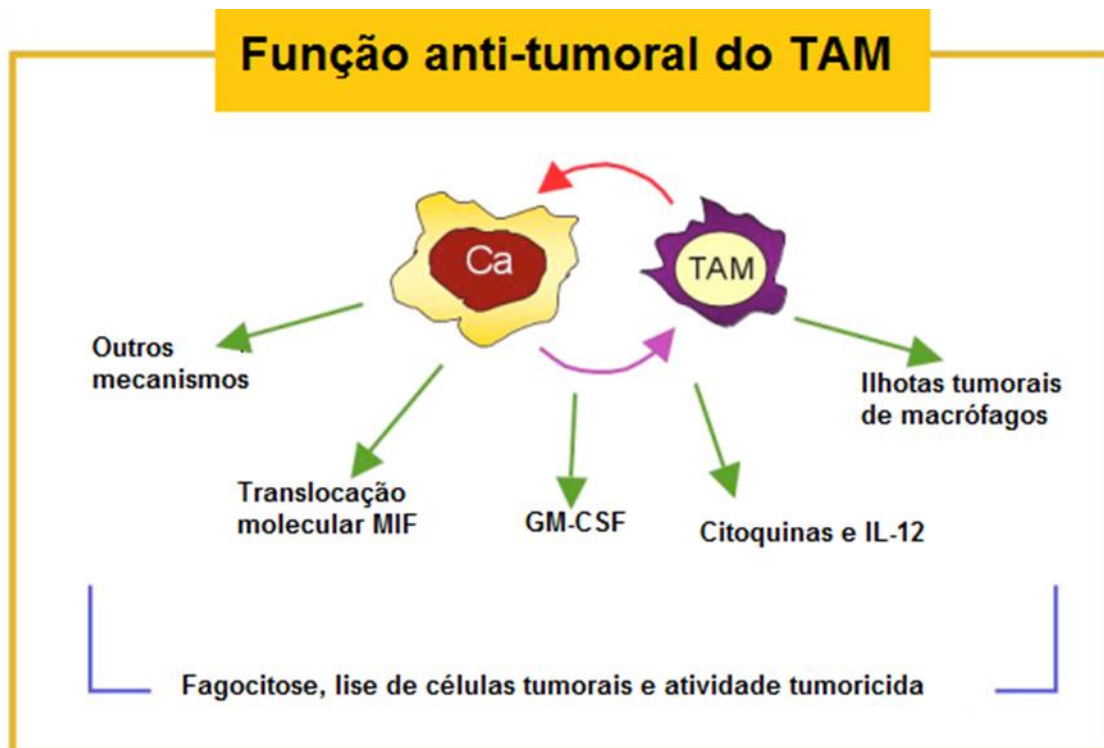


Figura 14- O TAM e as suas ações contra o desenvolvimento tumoral (Figura adaptada de (Chen *et al.*, 2005)

Devido ao grande envolvimento dos macrófagos na progressão de tumores, têm sido estudadas formas de atuar em alguns mecanismos associados a estas células. O objetivo é desenvolver terapêuticas que limitem a disseminação metastática, atuando exclusivamente sobre os TAM e os produtos da sua atividade, sem influenciar de qualquer forma os macrófagos presentes em outros locais do organismo, em particular os macrófagos M1 (Solinas *et al.*, 2009). Dentro dos métodos considerados incluem-se a inibição do recrutamento de macrófagos, a conversão do fenotipo pró-tumorigénico M2 para o fenótipo anti-tumoral M1 e a supressão da sobrevivência dos TAM, por indução da sua apoptose, utilizando fármacos químicos ou sintéticos (Obeid *et al.*, 2010; Chanmee *et al.*, 2014) (Krieg, 2006).

Para a inibição do recrutamento de macrófagos, tem sido considerada a atuação sobre alguns recetores das quimiocinas. Quando foi administrado um antagonista para o recetor da quimiocina CCL5 em modelos murinos de cancros mamários, foi observada uma diminuição considerável do tamanho da massa tumoral devido a uma diminuição

da infiltração de macrófagos (Robinson *et al.*, 2003). A inibição de VEGF levou também a uma diminuição da infiltração de macrófagos em alguns tumores (Dineen *et al.*, 2008). Fármacos com um mecanismo de ação anti-CCL2 têm também sido utilizados como estratégia para o tratamento tumores, diminuindo a infiltração de macrófagos (Solinas *et al.*, 2009).

Relativamente a fármacos já existentes o fármaco trabectedina usado como anti-tumoral tem um efeito citotóxico seletivo em macrófagos (incluindo os TAM) e em monócitos (Allavena *et al.*, 2005). A talidomina, a linomida, o pentoxifilina, a genisteina e outros antiangiogénicos tem demonstrado eficácia na inibição do recrutamento de macrófagos levando a uma redução do tamanho da massa tumoral (Vukanovic e Isaacs, 1995) e os inibidores de MMP (ácido zoledrónico bifosfato) levam a uma diminuição da função secretória dos TAM, diminuindo a velocidade de crescimento do tumor (Giraud *et al.*, 2004).

Por outro lado, como os macrófagos infiltram naturalmente os tumores tem sido pensada a sua utilização como vetores terapêuticos. A administração de macrófagos geneticamente modificados com um vetor de expressão constitutiva de IL-12 num modelo murino de cancro da próstata, levou a uma redução do crescimento do tumor (Satoh *et al.*, 2003). Os macrófagos podem também ser utilizados como potenciadores do sistema imunitário. (Carta *et al.*, 2001).

2. Doenças autoimunes

As doenças auto-imunes são condições crónicas, que se iniciam com a perda de tolerância imunológica a auto-antígenos. Os mecanismos que conduzem a essa condição envolvem alterações no processo de apoptose, resultando em deficiências na morte celular ou na remoção de células apoptóticas. Esta classe patológica representa uma ampla variedade de transtornos que afetam múltiplos sistemas. A tipologia do fenótipo auto-imune encontra-se dependente da célula alvo e do órgão afetado. A natureza crónica dessas doenças leva a que tenha associada uma carga significativa de cuidados médicos e uma alteração considerável da qualidade de vida. As doenças auto-imunes afetam ambos os géneros, no entanto as mulheres são mais afetadas, uma vez que tendem a ter uma idade de início mais precoce e uma atividade da doença diferente devido, maioritariamente, a fatores hormonais. Os fatores desencadeantes e a idade de

início (período de tempo em que o indivíduo experimenta os primeiros sintomas de uma doença) destas patologias são variáveis. A idade de início pode surgir durante a infância, a idade adulta ou numa fase mais tardia. O aparecimento numa idade precoce corresponde a um pior prognóstico para algumas patologias, tais como o lúpus eritematoso sistêmico (LES) e a diabetes mellitus tipo 1 (DM1). Em alguns casos (sobretudo em mulheres) pode ocorrer o risco de poliautoimunidade definida pela presença de mais de uma doença auto-imune, podendo ser também designada de síndrome auto-imune (Anaya, 2012; Kieseier *et al.*, 2012).

As doenças auto-imunes têm diferente evolução em diferentes pacientes, uma vez que a ascendência genética contribui para a heterogeneidade clínica. Em cada paciente a patologia ocorre em diferentes fases, incluindo sintomas tais como artralgia, artrite, alopecia, fadiga e fotossensibilidade (Anaya, 2012).

As células do sistema imunológico podem danificar diretamente os tecidos, ao destruir células, ou indiretamente, ao libertarem citocinas citotóxicas, prostaglandinas, RNI e ROS. Na imunidade adquirida, os linfócitos B e T envolvidos reconhecem antígenos próprios como estranhos. (Takeda e Akira, 2005). As populações de linfócitos que mais contribuem para a patogénese desta classe de patologias são as células T efectoras (Th1, Th17 e Th9). Estas células produzem citocinas pró-inflamatórias em níveis elevados (IL-1, IL-6, IL-10, IL-17). Por outro lado, as células T reguladoras (CD25+CD4+) que se encontram em tecidos periféricos, são importantes no controlo da inflamação e da resposta auto-imune. Estas células secretam citocinas anti-inflamatórias que inibem a resposta imune Th1 e Th17, reduzindo assim a inflamação e o desenvolvimento destas patologias (Anaya *et al.*, 2012). A presença de autoanticorpos, que acontece muito tempo antes do aparecimento de sintomas clínicos, proporciona um bom indicador de previsibilidade do desenvolvimento de doença autoimune (Anaya, 2012). Alguns patógenos têm vindo a ser implicados no desenvolvimento de patologia auto-imune por apresentarem antígenos semelhantes a outros antígenos humanos, implicando também nestas patologias o reconhecimento por recetores TLR (Takeda e Akira, 2005; Anaya, 2012).

Os macrófagos podem atuar quer como apresentadores de antígenos para iniciar uma resposta auto-imune, quer como células efectoras citotóxicas através da citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos. Também produzem citocinas que

recrutam outras células e induzem inflamação (Anaya, 2012; Kieseier *et al.*, 2012). Actualmente, as opções terapêuticas são limitadas, envolvendo a aplicação de anticorpos monoclonais humanizados, tais como rituximab ou alemtuzumab, que são anticorpos monoclonais, que atuam respetivamente sob os linfócitos B e os linfócitos maduros, tendo fornecido resultados clínicos promissores. Podem também ser utilizados outros imunomoduladores e fármacos imunossupressores (Kieseier *et al.*, 2012).

3. Associação com aterosclerose

A aterosclerose é uma doença cardiovascular inflamatória crónica na qual os macrófagos desempenham um papel central, uma vez que promovem o desenvolvimento da resposta inflamatória na placa aterosclerótica (Ley *et al.*, 2011). Esta patologia pode ter diferentes etiologias onde se incluem respostas a antigénios exógenos (infecções) ou endógenos, tais como LDL (Chávez-Sánchez *et al.*, 2010; Hilgendorf e Swirski, 2012).

O proteoglicano presente no tecido conjuntivo adjacente à parede vascular tem uma variedade de funções importantes nessa parede. Pela organização da ECM, contribui para a estrutura e manutenção das propriedades viscoelásticas da parede vascular. Deficiências nos processos de regulação da adesão, migração e proliferação celulares, bem como da regulação do metabolismo de lipoproteínas, contribuem para a formação de células espuma e o desenrolar da aterosclerose (Chang *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014).

Os macrófagos são as células mais abundantes na placa aterosclerótica e estão presentes como resultado da infiltração desta pelos monócitos, que posteriormente se diferenciam. Estes monócitos fixam-se inicialmente através das P- e E-selectinas presentes na sua superfície e usam de seguida a integrina VCAM-1 ("vascular cell adhesion protein 1") para uma adesão mais firme. Após ligação à placa diferenciam-se em macrófagos, contribuindo para a inflamação (Shi e Pamer, 2011).

Os monócitos, os macrófagos e as células dendríticas são fundamentais na iniciação, progressão e complicações associadas a aterosclerose, levando a acumulação de lípidos e à secreção de várias citocinas inflamatórias e de fatores de crescimento (Shi e Pamer, 2011; Chang *et al.*, 2012). O seu recrutamento para a parede da artéria, a sua

diferenciação para macrófagos, e seus fenótipos podem ser moduladas por fatores presentes no interior do microambiente da parede arterial, incluindo lípidos oxidados, ligandos de TLR, fatores de crescimento hematopoiético, citocinas e quimiocinas (Ley *et al.*, 2011; Shi e Pamer, 2011; Chang *et al.*, 2012). A formação de espuma celular é o evento que inicia a formação de placas ateroscleróticas e é o resultado da acumulação excessiva de lípidos nos macrófagos da parede vascular. Os macrófagos são recrutadas para estrias gordurosas (as primeiras lesões ateroscleróticas visíveis, que consistem em depósitos de lípidos e infiltração de células nas artérias) em artérias ateroscleróticas e tornam-se, eventualmente, células espuma lípido-densas através de um processo de absorção de LDL modificado e efluxo de colesterol e outros lípidos (Ley *et al.*, 2011; Shi e Pamer, 2011). As células de espuma podem migrar de volta para a circulação, atravessando o endotélio da parede vascular em sentido inverso. Os macrófagos encontram-se na região adventícia para além da íntima, da membrana do vaso celular, onde podem participar na apresentação de antígenos e na produção de citocinas e expressam altos níveis de 12/15-lipoxigenase (12 /15-LO) (Ley *et al.*, 2011).

A figura abaixo representada(figura...) representa o papel do macrófago na acumulação de células que promovem a formação da placa aterosclerótica.

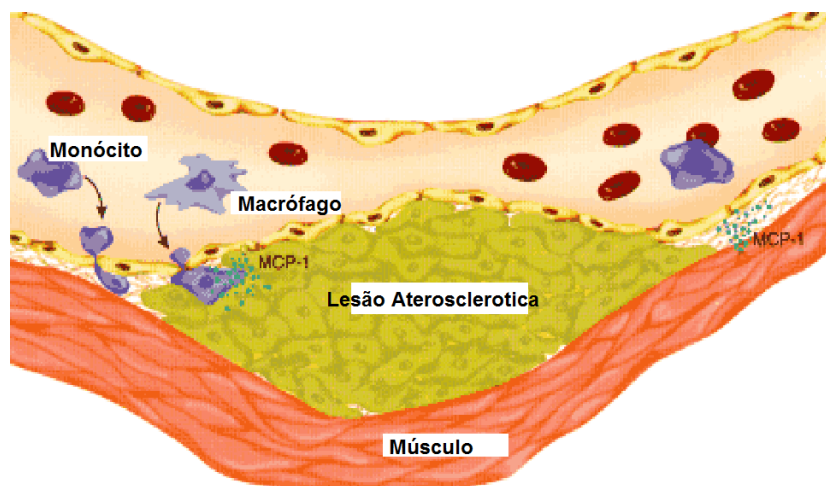


Figura 15-O macrófago e a lesão aterosclerótica (figura adaptada de (Ley *et al.*, 2011)

O antígeno endógeno mais envolvido é o LDL. Através da ligação aos recetores de superfície CD14, TLR4, e TLR2 presentes nos macrófagos, o LDL induz a produção de IL-1 α , IL-6, e IL-10 apresentando por essa razão um importante papel na gênese da placa de aterosclerótica. O co-recetor CD14 é necessário para a secreção de IL-1 α e IL-

6, com ação pró-inflamatória, o receptor TLR2, participa no desenvolvimento da placa aterosclerótica pela indução da secreção do fator TNF- α , uma molécula promotora da aterogênese. O receptor TLR4 reconhece LDL oxidado. A regulação da ativação de TLR, é um elemento essencial no reconhecimento de ligandos endógenos que pode conduzir a um equilíbrio pro- e anti-inflamatório adequado, demonstrando um papel do LDL oxidado na inflamação associada a aterosclerose (Chávez-Sánchez *et al.*, 2010). Os macrófagos são o principal produtor das citocinas pró-inflamatórias que podem ativar as células endoteliais, levando a indução da expressão de quimiocinas, que recrutam os monócitos para a área da lesão. Alternativamente podem levar à regulação positiva de moléculas de adesão, as quais facilitam a adesão de leucócitos a células endoteliais. (Appelberg, 2005; Chávez-Sánchez *et al.*, 2010). O excesso de LDL que se acumula nos macrófagos é mediado por receptores transportadores do tipo ABC, que são transportadores que necessitam de energia (ATP) e que podem desempenhar um importante papel na proliferação da linhagem mieloide. Os transportadores ABCA1 e ABCG1 regulam o efluxo de colesterol durante o processo inflamatório e atuam durante a diferenciação dos macrófagos. Durante a aterogênese várias enzimas são induzidas, incluindo a 5-LO e 12/15-LO. Os ácidos gordos oxidados produzidos nos macrófagos contribuem para a formação de LDL e dependendo do microambiente a enzima 12/15-LO pode conferir um papel ateroprotetor ou ser pró-aterogénica (Ley *et al.*, 2011).

A polarização do macrófago está envolvida na patogénese da aterosclerose. Durante a fase inicial de ativação, os macrófagos secretam citocinas pró-inflamatórias e na segunda fase apresentam uma produção gradual de IL-10 (Benoit *et al.*, 2008; Chávez-Sánchez *et al.*, 2010; Ley *et al.*, 2011). Dentro de placas ateroscleróticas, a modulação dinâmica de fenótipos macrofágicos afeta a progressão da aterosclerose por modulação das respostas inflamatórias em curso no seio da parede do vaso. O aumento da expressão de CD36 e SR-A1 em macrófagos M2 pode resultar na absorção acelerada de LDL e na acumulação intracelular de colesterol, contribuindo, assim, para a formação de células espumosas (Canton *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014). O controlo da renovação celular por apoptose no interior do desenvolvimento de placa é importante, pois o equilíbrio entre apoptose, eferocitose (fagocitose de células apoptóticas) e necrose secundária determina a progressão da aterosclerose e a sua gravidade. A apoptose está associada a uma redução da progressão. A eferocitose reduz os mediadores pró-inflamatórios presentes no local e induz mediadores anti-inflamatórios, tais como IL-10.

A sua falha leva à necrose secundária dos macrófagos, e libertação dos seus conteúdos celulares, incluindo detritos, lipídios oxidados, e mediadores pró-inflamatórios, amplificando a resposta inflamatória e conduzindo ao desenvolvimento de um núcleo necrótico na placa, como está representado na figura abaixo (Ley *et al.*, 2011).

Como resultado do impacto dos macrófagos na formação das placas ateroscleróticas, a modulação do seu fenótipo tem-se demonstrado um atraente alvo terapêutico para a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares. não sendo a eliminação de monócitos e macrófagos uma alternativa viável como opção terapêutica devido ao papel essencial dessas células na imunidade (Ley *et al.*, 2011; Hilgendorf e Swirski, 2012).

IX. Conclusão

Ao longo do desenvolvimento desta tese de dissertação, foi possível constatar que os macrófagos são uma importante célula do sistema imunológico, que têm uma vasta gama de particularidades que a tornam única e essencial para o correto funcionamento do hospedeiro. Esta função tem vindo a ser aprofundada desde a descoberta da sua primeira finalidade, permitindo um conhecimento cada vez mais alargado.

O macrófago tem características únicas que levam a que seja uma célula singular nos mais vastos sistemas onde se encontra envolvida, tomando diferentes designações consoante o tecido onde está presente e diferentes características, apresentando grande diversidade em cada um desses tecidos, nomeadamente do ponto de vista morfológico e do tempo de vida.

Após diferenciação esta célula necessita de ser ativada/polarizada, estando dependente, para tal, de estímulos presentes no microambiente onde esta ocorre, desenvolvendo-se macrófagos com particularidades distintas, relacionadas com a sua via de ativação, podendo tomar uma via clássica ou uma via alternativa.

Para um pleno funcionamento da ação dos macrófagos do hospedeiro é necessário que exista uma relação de equilíbrio entre os subtipos de macrófagos, colmatando um dos subtipos as ações do outro e vice-versa. Um desequilíbrio nesta relação leva a um dano que pode levar ao desenvolvimento de patologias, com graus de gravidade variáveis, podendo este equilíbrio ser utilizado como modo de tratamento destas patologias.

A realização desta dissertação permitiu-me aprofundar os meus conhecimentos relativos aos macrófagos e tomar conhecimento do importante papel destas células. (Metchnikoff, 1989)

X. Bibliografia

Albert, B.; Johnson, A.; Lewis, J., et al. (2002). *Molecular biology of the Cell*.

Allavena, P.; Signorelli, M.; Chieppa, M., et al. (2005). Anti-inflammatory properties of the novel antitumor agent yondelis (trabectedin): inhibition of macrophage differentiation and cytokine production. *Cancer Res.*, 65, pp. 2964-2971.

Anaya, J. M. (2012). Common mechanisms of autoimmune diseases (the autoimmune tautology). *Autoimmunity Reviews*, 11, pp. 781-784.

Appelberg, R. (2005). As células Fagocíticas. In C. Avevedo. *Biologia Celular e molecular*. Lisboa, LIDEL:pp. 491-502.

Arango-Duque, G. e Descotaux, A. (2015). Leshmania survival in the macrophages: where the ends justify the means. *curr opin Microbiology*, 26, pp. 32-40.

Bain, C. C. e Mowat, A. M. (2014). Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunological Reviews*, 260, pp. 102-117.

Behar, S.; Divangahi, M. e Remold, H. (2010). Evation of inate immunity by Mycobacterim tuberculosis: is death an exit strategy? *Nat Rev Microbiology*, 8, pp. 668-674.

Benoit, M.; Desnues, B. e Mege, J.-L. (2008). Macrophage Polarization in Bacterial Infection. *The Journal of Immunology*, 181, pp. 3733-3739.

Bingle, L.; Lewis, C. E.; Corke, K. P., et al. (2006). Macrophages promote angiogenesis in human breast tumor spheroids in vivo *Br. J. Cancer*, 94, pp. 101-107.

Butler, R. E.; Brodin, P.; Jang, J., et al. (2012). The balance of apoptotic and Necrotic Cell Death in Mycobacterium tuberculosis infected macrophages is not dependent on bacterial virulence. *Plos*.

Canton, J.; Neculai, D. e Sergio, G. (2013). Scavenger receptors in homeostasis and immunity *Nature Reviews Immunology* 13, pp. 621-634.

Cardoso, E. M. (2012). Visão Global do sistema imunológico. In F. A. Arosa; Cardoso, E. M. e Pacheco, F. C. *Fundamentos de imunologia*. Lisboa, LIDEL:pp. 31-56.

Carta, L.; Pastorino, S.; Melillo, G., et al. (2001). Engineering of macrophages to produce IFN- γ in response to hypoxia. *J. Immunol*, 166, pp. 5374-5380.

Chang, M. Y.; Chan, C. K.; Braun, K. R., et al. (2012). Monocyte-to-Macrophage Differentiation. *J Biol Chem.*, 287, pp. 14122-14135.

Chanmee, T.; Ontong, P.; Konno, K., et al. (2014). Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. *Cancers* 6, pp. 1670-1690.

Chávez-Sánchez, L.; Chávez-Rueda, K.; Legorreta-Haquet, M. V., et al. (2010). The activation of CD14, TLR4, and TLR2 by mmLDL induces IL-1 β , IL-6, and IL-10 secretion in human monocytes and macrophages. *Lipids in Health and Disease*, 9:117, pp. 1-6.

Chen, J. J.; Lin, Y. C.; Yao, P. L., et al. (2005). Tumor-associated macrophages: The double-edge sword in cancer progression. *J. Clin. Oncol.*, 23, pp. 953-964.

Clark, C. E.; Hingorani, S. R.; Mick, R., et al. (2007). Dynamics of immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer Research*, 67, pp. 9518-9527.

Colombo, M. P. e Mantovani, A. (2005). Targeting myelomonocytic cells to revert inflammation-dependent cancer promotion. *Cancer Res.*, 65, pp. 9113-9116.

De La Torre, E.; Genaro, A. M.; Ribeiro, M. L., et al. (2008). Proliferative actions of muscarinic receptors expressed in macrophages derived from normal and tumor bearing mice. *Biochimica et Biophysica*, pp. 82-89.

Dineen, S. P.; Lynn, K. D.; Holloway, S. E., et al. (2008). Vascular endothelial growth factor receptor 2 mediates macrophage infiltration into orthotopic pancreatic tumors in mice. *Cancer Res.*, 68 pp. 4340-4346.

Douce, V. L.; Herbein, G.; Rohr, O., et al. (2010). Molecular mechanisms of HIV-1 persistence in monocyte-macrophage lineage. *Retrovirology*, 7, pp. 32.

Dunn, G. P.; Old, L. J. e Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21, pp. 137-148.

Egeblad, M. e Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, pp. 161-174.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, 35, pp. 395-516.

Elomaa, O.; Sankala, M.; Pikkarainen, T., et al. (1998). Structure of the Human Macrophage MARCO Receptor and Characterization of Its Bacteria-binding Region. *The journal of biological chemistry* 273, pp. 4530-4538.

Epelman, S.; Lavine, K. J. e Randolph, G. J. (2014). Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity*, 41, pp. 21-35.

Ezekowitz, R. e Gordon, S. (2006). Interaction and regulation of macrophage receptors. In D. Evered e Nugent, J. *Biochemistry of macrophages*. London:pp. 127-136.

Geissmann, F.; Manz, M. G.; Jung, S., et al. (2010). Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science*, 327 (5966), pp. 656-661.

Giraudou, E.; Inoue, M. e Hanahan, D. (2004). An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J. Clin. Invest.*, 114, pp. 623-633.

Gocheva, V. e Joyce, J. A. (2007). Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle* 6, pp. 60-64.

Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*, 3, pp. 23-35.

Hagemann, T.; Robinson, S. C.; Schulz, M., et al. (2004). Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-dependent upregulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis*, 25, pp. 1543-1549.

Hallam, S. e Hagemann, T. (2012). TAM: A Moving Clinical Target. In T. Lawrence e Hagemann, T. *Tumour-Associated Macrophages*. New York:pp. 63-73.

Herbein, G.; Gras, G.; Kkan, K. A., et al. (2010). Macrophages signaling in HIV infection. *Retrovirology*, 7:34, pp. 1-13.

Hilgendorf, I. e Swirski, F. K. (2012). Making a difference: Monocyte Heterogeneity in Cardiovascular Disease. *Curr Atheroscler Rep*, 14(5), pp. 450-459.

Kaufmann, S. H. E. (2008). Elie Metchnikoff and his drawings of bacterial phagocytosis by macrophages. *Nature Immunology*, 9, pp. 705-712.

Kedzierska, K. e Crowe, S. M. (2014). The role of Monocytes and Macrophages in the Pathogenesis of HIV-1 infection. *Current Medicinal Chemistry*, 9, pp. 1893-1903.

Kieseier, B. C.; Lehmann, H. C. e Hörste, G. M. (2012). Autoimmune diseases of the peripheral nervous system. *Autoimmunity Reviews* 11, pp. 191-195.

King, K. Y. e Goodell, M. A. (2011). Direct conversion of skin cell into blood: Alchemy or science. *Molecular Therapy*, 19, pp. 227-228.

Knowles, H. J. e Harris, A. L. (2007). Macrophages and the hypoxic tumor microenvironment. *Front. Biosci.* , 12, pp. 4298-4314.

Koppensteiner, H.; Brack-Werner, R. e Schindler, M. (2012). Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection. *Retrovirology*, 9:82, pp. 1-11.

Krieg, A. M. (2006). Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5, pp. 471-484.

Kumar, A.; Abbas, W. e Herbein, G. (2014). HIV-1 Latency in Monocytes/Macrophages. *Viruses*, 6, pp. 1837-1860.

Ley, K.; Miller, Y. I. e Hedrick, C. C. (2011). Monocyte and Macrophage Dynamics During Atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* pp. 1506-1516.

Li, M. O. e Flavell, R. A. (2008). Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor- β and interleukin-10. *Immunity*, 28, pp. 468-476.

Lin, H.-H. e Gordon, S. (2012). Macrophage Phenotype in Tumours. In T. Lawrence e Hagemann, T. *Tumour-Associated Macrophages*. New York: pp. 3-16.

Londrigan, S. L.; Tate, M. D.; Brooks, A. G., et al. (2011). Cell-surface receptors on macrophages and dendritic cells for attachment and entry of influenza virus. *Journal of Leukocyte Biology* 92, pp. 1-10.

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation

and polarization. *Trends Immunol.*, 25, pp. 667-686.

McConnell., G. (2014). *A Manual Of Pathology*.

McDonough, K. A.; Kress, Y. e Bloom, B. R. (1993). Pathogenesis of tuberculosis: infection of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infection and immunity*, 61, pp. 2763-2773.

Mebius, R. E. e Kraal, G. Structure and function of the spleen

Nature, 5, pp. 606-617.

Metchnikoff, E. (1989). On the present state of the question of immunity in infectious diseases. *Scandinavian Journal of Immunology*, 30 (4), pp. 387-398.

Miron, V. E.; Boyd, A.; Zhou, J. W., et al. (2013). M2 macrophages support remyelination. *Nat. Neurosci*, pp. 1-12

Montovani, A.; Allavena, P.; Sica, A., et al. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454, pp. 436-444.

Montovani, A.; Sozzani, S.; Locati, M., et al. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*, 23, pp. 549-555.

Mosser, D. M. e Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation *Nature Reviews Immunology* 8, pp. 958-969.

Murray, P. J. e Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.*, 11(11), pp. 723-737.

Nathan, C. (2014). Secretory products of macrophages: twenty-five years on. *The Journal of Clinical Investigation*, 10, pp. 1-30.

Naugler, W. E. e Karin, M. (2008). NF- κ B and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 18, pp. 19-26.

Obeid, E.; Nanda, R.; Fu, Y.-X., et al. (2010). The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression *International journal of oncology*, 43, pp. 5-12.

Pacheco, F. C. (2012). Prespetiva histórica da imunologia. In F. A. Arosa; Cardoso, E. M. e Pacheco, F. C. *Fundamentos de Imunologia*. Lisboa, LIDEL; pp. 1-30.

Pacheco, F. C. e Cardoso, E. M. (2012). Imunidade inata e inflamação. In F. A. Arosa; Cardoso, E. M. e Pacheco, F. C. *Fundamentos de imunologia*. Lisboa, LIDEL; pp. 57-102.

Peters, C.; Aebischer, T.; Stierhof, Y., et al. (2005). The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. *Journal of Cell Science* 108, pp. 3715-3724.

Pixley, F. G. e Stanley, E. R. (2004). CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cells biology*, 14, pp. 628-638.

Pollard, J. W. (2004). Tumour-educated macrophages promote progression and metastasis. *Nature Rewiews Cancer*, 4, pp. 71-78.

Pollard, J. W. (2009). Trophic macrophages in devevelopment and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 9, pp. 259-270.

Revie, D. e Salahuddin, S. Z. (2014). Role of macrophages and monocytes in hepatitis C virus infections. *World J Gastroenterol* 20, pp. 2777-2784

Robinson, S. C.; Scott, K. A.; Wilson, J. L., et al. (2003). A chemokine receptor antagonist inhibits experimental breast tumor growth *Cancer Res.*, 63, pp. 8360-8365.

Romeo, D.; Schneider, C.; Gennaro, R., et al. (2010). The regulation of macrophages activities: Role of the energydenpent intracellular Ca²⁺ Buffering systems. In M. R. Escobar e Friedman, H. *Macrophages and Lymphocytes*. New York; pp. 37-52.

Rudnicka, D. e Schwartz, O. (2009). Intrusive HIV-1 infected cells. *Nature Immunology*, 10, pp. 933-934.

Ryncarz, R. E. e Anasetti, C. (1998). Expression of CD86 on Human Marrow CD34+ Cells Identifies Immunocompetent Committed Precursors of Macrophages and Dendritic Cells. *Blood*, 91, pp. 10-18.

Sacks, D. e Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice *Nature Reviews Immunology*, 2, pp. 845-858.

Satoh, T.; Saika, T.; Ebara, S., et al. (2003). Macrophages transduced with an adenoviral vector expressing interleukin 12 suppress tumor growth and metastasis in a preclinical metastatic prostate cancer model. *Cancer Res.*, 63, pp. 7853-7860.

Savill, J.; Dransfield, I.; Gregory, C., et al. (2002). A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 2, pp. 965-975.

Schindl, M. J.; Millar, A. M.; Redhead, D. N., et al. (2006). The Adaptive Response of the Reticuloendothelial System to Major Liver Resection in Humans. *Annals of Surgery* 243,

Shi, C. e Pamer, E. G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 11(11), pp. 762-774.

Shih, J.-Y.; Yuan, A.; Chen, J. J.-W., et al. (2006a). Tumor-Associated Macrophage: Its Role in Cancer Invasion and Metastasis. *J. Cancer Mol*, 2, pp. 101-106.

Shih, J.-Y.; Yuan, A.; Chen, J. J. W., et al. (2006b). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion and metastasis. *Cell*, 124, pp. 263-266.

Sieweke, M. H. e Allen, J. E. (2013). Beyond stem cells: self renewal of differentiated macrophages. *Science*, 342(6161), pp. 1242-974.

Solinas, G.; Germano, G.; Montovani, A., et al. (2009). Tumor-associated macrophages (TAM) as major player of cancer-related inflammation. *Journal of Leukocyte biology*, 86, pp. 1065-1073.

Straus-Ayeli, D.; Conrad, S. M. e Masser, D. M. (2007). Monocytes subpopulation and their differentiation patterns during infection. *Journal of Leukocyte biology*, 82, pp. 244-252.

Strauss, R. R. (2010). Association of some metabolic activities of leukocytes with the immune response. In M. R. Escobar e Friedman, H. Macrophages and Lymphocytes. pp. 2-19.

Takeda, K. e Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 17, pp. 1-14.

Taylor, P.; Martinez-Pomares, L.; Stacey, M., et al. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 23, pp. 901-944.

Teo, Z. W. P. (2003). The Role of Macrophages in Apoptosis: Initiator, Regulator, Scavenger. *Reviews in Undergraduate Research*, 2, pp. 7-11.

Vukanovic, J. e Isaacs, J. T. (1995). Linomide inhibits angiogenesis, growth, metastasis, and macrophage infiltration within rat prostatic cancers. *Cancer Res.*, 55, pp. 1499-1504.

Vyas, J. M. (2014). Pulmonary tuberculosis [Em linha]. Disponível em <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000077.htm>. [Consultado em 27.07.2015].

Woods, J. A.; Lu, Q.; Cedddia, M., et al. (2000). Exercise-induced modulation of macrophage function. *Immunology and Cell Biology*, 78, pp. 545-553.

Yang, J.; Zhang, L.; Yu, C., et al. (2014). Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker Research*, 2, pp. 1-14

Zellforsch, Z.; Jessen, H. e Moe, H. (2012). The Fine Structure of Macrophages in the Enamel Organ, with Special Reference to the Microtubular System. 126, pp. 188-466.