

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANA RÚBIA BATISTA RIBEIRO

ESPECTROSCOPIA RAMAN APLICADA AO ESTUDO DA DIFERENCIAÇÃO
FUNCIONAL DE CÉLULAS: UMA AVALIAÇÃO SOBRE OS FENÓTIPOS M1 E
M2 DE MACRÓFAGOS

Maceió – AL
2021

ANA RÚBIA BATISTA RIBEIRO

ESPECTROSCOPIA RAMAN APLICADA AO ESTUDO DA DIFERENCIAÇÃO
FUNCIONAL DE CÉLULAS: UMA AVALIAÇÃO SOBRE OS FENÓTIPOS M1 E
M2 DE MACRÓFAGOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como
requisito final para a obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde, sob orientação do Prof. Emiliano
de Oliveira Barreto

Maceió – AL
2021

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

R484e Ribeiro, Ana Rúbia Batista.
Espectroscopia Raman aplicada ao estudo da diferenciação funcional de células: uma avaliação sobre os fenótipos M1 e M2 de macrófagos / Ana Rúbia Batista Ribeiro. – 2021.
43 f. : il. color.

Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 39-43.

1. Macrófagos. 2. Fenótipo. 3. Espectroscopia Raman. 4. Polarização de macrófagos. I. Título.

CDU: 543.424.2

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rosa e Rubinho, por sempre insistirem na educação como melhor caminho, por acreditarem e apoiarem cada passo, pelo cuidado de todos os dias. Cada degrau alcançado, sempre é por vocês.

Ao Professor Emiliano Barreto, pela orientação, paciência e confiança. Por sempre me ajudar a enxergar um caminho e me incentivar a continuar. Agradeço pela prontidão e pelo respeito, pelas valiosas correções e pela disponibilidade de sempre compartilhar seu vasto conhecimento.

Ao Professor Eduardo Fonseca; como chefe, pela compreensão e flexibilidade com as atividades de trabalho; como amigo, pelas palavras de incentivo e pela escuta de todas as aflições, por só me permitir desistir por um dia e por acreditar em mim todos os dias.

Às duas pessoas fundamentais, sem as quais esse trabalho não seria possível: Elaine Silva e Polliane Araújo. Elaine, por ser minhas mãos na física, por compartilhar seus conhecimentos sobre o Raman, pela paciência de me ensinar cada detalhe e ainda corrigir meus erros (que não foram poucos). Por estar sempre disponível em me auxiliar e melhorar meu trabalho por puro altruísmo, por me enviar gráficos infinitamente melhorados em pleno domingo à noite e por aturar as cobranças pelo artigo.

Polli, por ser minha tutora na biologia, me ensinando todos os detalhes da cultura de células e todas as metodologias que se seguiram, por estudar assuntos, apenas para poder me ajudar, por toda a paciência do mundo com a pessoa que “lava” fora as células do experimento.

Aos membros do Laboratório de Biologia Celular, que me acolheram depois de tantos anos fora da biologia: Fernanda, por passar várias garrafas e riscar todos os cadernos; Jordana, por todos os cálculos estequiométricos que permitiram que os experimentos acontecessem; Clarice, por sempre compartilhar seus macrófagos em tempos de dificuldade; Julianderson, pela paciência e ensinamentos; Návylla (que se foi cedo demais), Lilian, Liliane e Camila, por sempre terem uma palavra de carinho e me arrancarem um sorriso, mesmo durante um experimento que deu errado. A todos que não foram nomeados, mas sempre contribuíram da forma que puderam com meu trabalho.

À técnica Juliane, pelo carinho, cuidado e dedicação diários, por escutar e aconselhar sempre da forma mais doce. Às Professoras Jamylle e Salete, pelas inúmeras sugestões enriquecedoras, por se prontificarem em auxiliar na solução de problemas e pelo exemplo. À Professora Danielma, como amiga, colega de trabalho e pesquisadora, por aconselhar e torcer por cada conquista e por possibilitar o tão sofrido PCR.

Aos membros do Grupo de Óptica e Nanoscopia, pela paciência e compreensão em épocas de disciplinas e experimentos. Ao Professor Samuel Teixeira, pelos ensinamentos e sugestões, pela paciência em explicar cada ponto da melhor maneira. Ao Artur Sonsin, por me substituir nas análises quando precisei, mesmo levando minha paciência embora diariamente. À Mayra, Jennifer, Sendy e Fernanda, pelo auxílio nas análises do Raman, por ajudarem a não queimar as células.

Ao Instituto de Física, na figura do Professor Carlos Jacinto, por permitir meu afastamento temporário para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Alagoas, por possibilitar minha formação acadêmica, na graduação e agora, e permitir que eu retribua como funcionária. Que a educação pública possa resistir aos ataques e proporcionar esta realidade para muitas pessoas.

Aos amigos, pela compreensão, apoio e incentivo, em especial à Inaura Santos, que sempre me ajudou enxergar alternativas e soluções.

RESUMO

Os macrófagos são células envolvidas em vários eventos da resposta imunoinflamatória, sendo encontradas em diferentes tecidos e considerados as primeiras células de defesa. Os macrófagos possuem grande plasticidade funcional e são classificados dentro de um espectro fenotípico que inclui basicamente dois perfis de ativação denominados fenótipo M1 (ativação clássica) e fenótipo M2 (ativação alternativa). É de conhecimento que cada um destes fenótipos estão envolvidos com distintos processos fisiopatológicos, e que a sua identificação depende basicamente da quantificação de mediadores produzidos/secretados e/ou presença de marcadores de superfície típicos de cada fenótipo. Portanto, com propósito de desenvolver uma metodologia que permita a identificação rápida do fenótipo de macrófago sem a necessidade de marcação celular ou quantificação de citocinas, objetivamos neste estudo aplicar a técnica de espectroscopia Raman como uma ferramenta alternativa para distinguir os fenótipos M1 e M2 de macrófagos. Para isso, foi utilizada a linhagem de células J774.1 submetida a estimulação com LPS/IFN γ para diferenciação no perfil M1, e com IL-4 para diferenciação no perfil M2. Para certificação da diferenciação em cada fenótipo, as citocinas típicas de cada perfil M1 (IL-6) ou M2 (IL-10) foram quantificadas por ELISA. Além disso, determinamos ainda alterações morfológicas em cada perfil fenotípico utilizando microscopia eletrônica de varredura. Em seguida, as análises Raman foram realizadas em cada perfil já definido, sendo os resultados das variáveis avaliados a partir da análise de componentes principais (PCA). O aumento da produção das citocinas IL-6 e IL-10 confirmou o sucesso do protocolo de polarização para os perfis M1 e M2, respectivamente. Os espectros Raman submetidos à análise pela técnica de PCA permitiram distinguir os perfis M1 e M2. Em conclusão, o presente trabalho demonstrou que a polarização de macrófagos no perfil M1 e M2 pode ser identificado por espectroscopia Raman, abrindo possibilidade de aplicação desta técnica para distinção de outros tipos celulares que apresentem diferenciação fenotípica.

Palavras-chave: Análise espectral, PCA, espectroscopia vibracional, J774, polarização.

ABSTRACT

Raman spectroscopy applied to the study of functional cell differentiation: an evaluation on the macrophages phenotypes M1 and M2

Macrophages are important cells of the immune system, distributed by different tissues and considered the first cells of defense against aggressive agents, playing a fundamental role in the development of the inflammatory process. Macrophages have great functional plasticity and are classified within a phenotypic spectrum that basically includes two activation profiles called phenotype M1 (classical activation) and phenotype M2 (alternative activation). It is known that each of these phenotypes is involved with different pathophysiological processes, and that their identification basically depends on the quantification of secreted mediators and/or the presence of typical surface markers of each phenotype. Therefore, in order to develop a methodology that allows the rapid identification of the macrophage phenotype without the need to use staining or labeling techniques, we aim in this study to apply the Raman spectroscopy technique as an alternative tool to distinguish M1 and M2 of macrophages. For this, the cell line J774.1 was used, submitted to stimulation with LPS/IFN γ for differentiation in the M1 profile, and with IL-4 for differentiation in the M2 profile. To certify the differentiation in each phenotype, the cytokines typical of each M1 (IL-6) or M2 (IL-10) profile were quantified by ELISA. In addition, we also determined morphological changes in each phenotypic profile using scanning electron microscopy. Then, the Raman analyzes were performed on each profile already defined, with the results of the variables being evaluated from the principal component analysis (PCA). The increased production of cytokines IL-6 and IL-10 confirmed the success of the polarization protocol for profiles M1 and M2, respectively. The morphological analysis of the groups observed a significant change only with regard to the M2 profile. The Raman spectra submitted to the analysis by the PCA technique allowed to distinguish the M1 and M2 profiles. In conclusion, the present study demonstrated that the polarization of macrophages in the M1 and M2 profile can be identified by Raman spectroscopy, opening the possibility of applying this technique to distinguish other cell types that show phenotypic differentiation.

Keywords: Spectral analysis, PCA, vibrational spectroscopy, J774, polarization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Polarização funcional dos macrófagos para o perfil M1 e M2.....	25
Figura 2.	Avaliação da capacidade responsiva do perfil M1 de macrófagos estimulados com LPS.....	26
Figura 3.	Avaliação da capacidade responsiva do perfil M2 de macrófagos estimulados com LPS.....	27
Figura 4.	Expressão gênica de marcadores de diferenciação de macrófagos.....	28
Figura 5.	Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura de macrófagos submetidos à polarização funcional.....	29
Figura 6.	Espectros Raman de perfis de polarização M0, M1 e M2 de macrófagos.....	30
Figura 7.	Espectro Raman de perfis de macrófagos polarizados e estimulados.....	31
Figura 8.	Análise de componentes principais (PCA) de perfis de polarização M0, M1 e M2 de macrófagos.....	32
Figura 9.	Análise de componentes principais (PCA) de perfis de polarização M0E, M1E e M2E de macrófagos polarizados e estimulados com LPS.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atribuição dos picos de deslocamento Raman encontrados nos espectros celulares e sua atribuição de acordo com a literatura.....	35
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPM	Erro Padrão da Média
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
IL	Interleucina
INF- γ	<i>Interferon-γ</i>
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NK	Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PCA	Análise do Componente Principal
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
ROS	Espécies Reativas do Oxigênio
SBF	Soro Bovino Fetal
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
TAM	Macrófagos Associados ao Tumor
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 Macrófagos	14
3.1.1 Histórico	14
3.1.2 Diferenciação	15
3.2 Função dos macrófagos	16
3.3 Ativação de Macrófagos	17
3.4 Espectroscopia Raman	19
3.5 Análise de Componentes Principais	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Linhagens celulares	21
4.2 Ativação de macrófagos	21
4.3 Quantificação de citocinas	21
4.4 Análise da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (PCRq)	23
4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	23
4.6 Espectroscopia Raman	23
4.7 Análise Espectral	24
4.8 Análise Estatística	24
5. RESULTADOS	25
5.1 Caracterização do perfil funcional M1 e M2 em macrófagos	25
5.2 Expressão de genes marcadores para o perfil de macrófagos M1 e M2	27
5.3 Análise da morfologia das células submetidas a polarização funcional	28
5.4 Espectros Raman de macrófagos polarizados	29
5.5 Classificação espectral baseada no PCA	31
6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÃO	38
8. REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

Os macrófagos são importantes células fagocíticas do sistema imune, descritos pela primeira vez em 1893 por Elie Metchnikoff, numa série de experimentos em estrelas-do-mar, que levaram ao desenvolvimento da teoria da fagocitose (SARADNA *et al.*, 2018). Estas células estão distribuídos por diferentes tecidos e compõem uma das primeiras linhas de defesa do hospedeiro contra agentes agressores por possuir uma rápida capacidade de resposta contra inúmeros estímulos do ambiente, o que a torna uma célula fundamental no desenvolvimento do processo inflamatório e na resposta imune inata e adaptativa (LAVIN *et al.*, 2014).

Macrófagos tem sua origem a partir da diferenciação de monócitos circulantes ou de macrófagos primitivos observados no saco vitelino embrionário e no fígado fetal (SARADNA *et al.*, 2018). Devido à sua plasticidade funcional, e dependendo do ambiente e estímulos a que estão submetidos, os macrófagos se apresentam em um espectro de fenótipos entre dois extremos, identificados como macrófagos M1 e M2, caracterizados pela expressão de marcadores específicos da superfície celular e pela secreção de diferentes citocinas (FEITO *et al.*, 2019). Estas células estão relacionadas com diversos processos patológicos como em doenças degenerativas, cardiopatias e câncer (BERTANI *et al.*, 2017; LAVIN *et al.*, 2014).

Os macrófagos associados ao tumor (*tumor-associated macrophages* - TAMs) são um importante componente celular da inflamação relacionada ao câncer, podendo exercer dupla influência na doença dependendo da ativação. Macrófagos polarizados classicamente (M1) apresentam funções antitumorais, enquanto aqueles polarizados alternativamente (M2) apresentam funções pró-tumorais (ALLAVENA *et al.*, 2008; CHANMEE *et al.*, 2014; YANG; ZHANG, 2017).

Os TAMs podem afetar desde a promoção da angiogênese associada ao tumor, até o desenvolvimento de metástases (RIABOV *et al.*, 2014). Desta forma, essas células aparecem como um alvo clínico potencial de novas estratégias de imunoterapia do câncer (BERTANI *et al.*, 2017; QIAN; POLLARD, 2010) ressaltando a importância da caracterização do papel destas na doença. O desenvolvimento de modelos avançados *in vitro* para coletar dados relevantes sobre o envolvimento de macrófagos no microambiente tumoral também está ganhando atenção crescente (BAI *et al.*, 2015; ZERVANTONAKIS *et al.*, 2012).

Atualmente, métodos citomorfológicos e imunodiagnósticos são utilizados no estudo da diferenciação celular e no diagnóstico funcional de diferentes tipos celulares (BERTANI *et al.*, 2017). No entanto, a possibilidade de monitorar e diferenciar células sem alterar suas características de ativação e sem marcação mostra-se ainda como um desafio, e constitui um dos objetivos de várias abordagens metodológicas. Neste cenário, abrem-se novas perspectivas para testes com fármacos, terapia celular e imunoterapia personalizada.

A espectroscopia Raman vem demonstrando seu potencial como uma ferramenta importante na análise de amostras biológicas por apresentar como características a alta sensibilidade, além de ser um método não destrutivo e não invasivo. As aplicações da técnica em amostras biológicas são numerosas, incluindo, diagnóstico de câncer (TSAO *et al.*, 2018), avaliação de efeitos de fármacos sobre células e tecidos (DA SILVA *et al.*, 2019) e identificação de partículas estranhas em amostras biológicas (CAMPION *et al.*, 2018).

Considerando o potencial de aplicação da espectroscopia Raman no entendimento de fenômenos biológicos, o presente trabalho buscou avaliar a diferenciação de macrófagos para o perfil funcional M1 e M2 *in vitro*, a partir da aplicação da espectroscopia Raman como técnica alternativa para a caracterização dessa diferenciação celular.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Este estudo teve como objetivo geral avaliar, através da espectroscopia Raman, o perfil funcional de macrófago *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos:

1. Implantar no Laboratório de Biologia Celular do ICBS-UFAL a técnica *in vitro* de diferenciação funcional de macrófagos M1 e M2.
2. Empregar a técnica de espectroscopia Raman para distinguir o perfil de ativação funcional em macrófagos M1 e M2.
3. Analisar os resultados de caracterização funcional dos macrófagos obtidos com a espectroscopia Raman pela técnica da Análise de Componentes Principais (PCA, *Principal Component Analysis*).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Macrófagos

3.1.1 Histórico

Em 1893, o biólogo russo Ilya Metchnikoff observou fagócitos circundando e tentando devorar uma lasca de espinho que ele havia introduzido em uma larva de estrela-do-mar (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014). Metchnikoff classificou então esses fagócitos em macrófagos (“grandes comedores”) e micrófagos (“comedores pequenos”, posteriormente conhecidos como neutrófilos). Através destas observações, Metchnikoff desenvolveu a teoria da fagocitose, onde explicava que o fagócito possuía funções no desenvolvimento e na fisiologia do organismo (SARADNA *et al.*, 2018). Metchnikoff demonstrou que os dois subtipos de fagócitos desempenhavam importante papel na resposta do indivíduo a infecções, uma vez que essas células ingeriam e digeriam bactérias, considerando-as como a primeira linha de defesa do organismo. (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014).

Em 1924, Ludwig Aschoff descrevia o Sistema Retículo-Endotelial, definido como uma rede de células residentes fagocíticas presente nas proximidades do endotélio vascular de vários órgãos (SARADNA *et al.*, 2018). Na década de 1960, diversos estudos foram realizados buscando entender e classificar as células fagocíticas, até ser proposto um sistema nomeado Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM). O SFM considerava a morfologia, função e cinética de produção dos fagócitos para classificar as células mononucleares fagocíticas e seus precursores (VAN FURTH *et al.*, 1972).

O SFM abrangeria pro-monócitos e seus precursores, monócitos circulantes na corrente sanguínea, macrófagos e células dendríticas residentes nos diversos tecidos, formando assim, uma linhagem celular originada na medula óssea (HUME, 2006). No entanto, nos últimos anos, a origem dos macrófagos foi compreendida de uma nova maneira, estudos demonstram que muitos macrófagos residentes de tecidos são estabelecidos durante o desenvolvimento embrionário e persistem na idade adulta, independentemente da entrada de monócitos no estado estacionário (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014).

3.1.2 Diferenciação

Os macrófagos são células do sistema imunológico que apresentam grande diversidade e são essenciais na manutenção da homeostase; especializados em fagocitose e com grande capacidade de responder a inúmeros sinais ambientais (LAVIN *et al.*, 2014). Quando diferenciadas em macrófago, as células apresentam-se com grande espalhamento, citoplasma volumoso, com projeções e inúmeros vacúolos, além de um núcleo grande (SMIT, *et al.*, 2008).

Através da fagocitose, eles degradam patógenos microbianos, objetos estranhos, detritos de células mortas e células cancerígenas; também regulam as respostas imunes inata e adaptativa, recrutando outras células do sistema imune, como os linfócitos, além de realizarem a apresentação de antígenos para estes (LEE, 2019).

Macrófagos são encontrados em duas populações diferentes, onde uma população é residente no tecido enquanto a outra circula na corrente sanguínea na forma de células precursoras hematopoéticas, conhecidas como monócitos (DELAVALLEY *et al.*, 2011). Embora os macrófagos e monócitos tenham origem da mesma linhagem celular, eles têm papéis cruciais, mas distintos, na homeostase do tecido.

Os monócitos precursores estão altamente envolvidos durante a inflamação e a eliminação de patógenos, enquanto os macrófagos residentes no tecido são responsáveis pelo desenvolvimento, homeostase tecidual e resolução da inflamação. Além disso, os macrófagos residentes em tecidos têm papéis diferentes, dependendo do tecido em que se encontram (LAVIN *et al.*, 2014).

Até recentemente, acreditava-se que os macrófagos residentes nos tecidos dependiam do recrutamento constante de monócitos sanguíneos (GINHOUX *et al.*, 2016). No entanto, entende-se atualmente que cada órgão tem sua própria composição de subconjuntos de macrófagos embrionários e daqueles derivados, embora estes últimos possam substituir, até certo ponto, os macrófagos residentes nos tecidos (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014).

Na primeira fase de desenvolvimento dos macrófagos, os monócitos recrutados para o sítio de infecção são diferenciados em macrófagos pelo estímulo de fatores de crescimento, como o Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF). Durante esse recrutamento, os macrófagos são expostos

a várias concentrações de citocinas provenientes do processo fisiopatológico, induzindo a uma segunda fase, denominada *priming*. Este processo modula o potencial inflamatório dos macrófagos e sua resposta a outros estímulos (GORDON; MARTINEZ, 2010).

Durante a terceira fase, os macrófagos alcançam um fenótipo funcional maduro em resposta a estímulos, tais como complexos de anticorpos e lipopolissacarídeos (LPS). Passado o processo inflamatório, ocorre a desativação ou resolução. O potencial inflamatório é desativado e o macrófago sofre alterações funcionais adquirindo uma maior afinidade para a limpeza e reparação (GORDON; MARTINEZ, 2010).

3.2 Função dos macrófagos

A fagocitose consiste no processo no qual células mortas e partículas estranhas são capturadas e ingeridas por fagócitos, como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. A habilidade fisiológica de efetuar a fagocitose é obtida durante a diferenciação dos fagócitos, podendo ser modulada por citocinas, glicocorticoides e estímulos microbianos, por exemplo (GORDON, 2016; VARIN *et al.*, 2010). A fagocitose envolve o reconhecimento e ligação das partículas por meio de receptores na superfície celular e é um dos principais mecanismos de suporte da imunidade inata e adaptativa, e também está envolvida na homeostase e remodelamento tecidual (GORDON, 2016).

O processo fagocítico leva a ativação dos macrófagos e à indução na liberação de uma série de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e TNF, que são benéficas ao organismo, mas podem se tornar tóxicas quando produzidas de forma desregulada, podendo provocar dano tecidual (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014). A resposta inflamatória pode ser seguida por uma liberação de mediadores anti-inflamatórios, evitando dano tecidual e conduzindo a um equilíbrio (FLANNAGAN; JAUMOUILLÉ; GRINSTEIN, 2012). A fagocitose realizada pelos macrófagos está envolvida na mediação da degradação microbiana, na inflamação e reparo, bem como na lesão tecidual. Após a morte celular por apoptose, a célula (ou seus corpos apoptóticos) é rapidamente fagocitada e eliminada por macrófagos, o que pode levar à produção de mediadores anti-inflamatórios e a imunossupressão (SAVILL *et al.*, 2002).

Os macrófagos reconhecem, fagocitam e degradam patógenos, para, posteriormente, efetuarem apresentação antigênica aos linfócitos T. Estes antígenos podem ser expostos na 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+ (GORDON, 2016; SAVILL *et al.*, 2002). A interação com as células T deflagra sua ativação e a secreção de citocinas, que modulam a atividade macrofágica (FLANNAGAN; JAUMOUILLÉ; GRINSTEIN, 2012). Assim, o macrófago é uma célula que se comporta como agente da resposta inata, mas também como efetor da resposta adaptativa.

3.3 Ativação dos macrófagos

As diversas funções dos macrófagos estão ligadas à sua capacidade de exibir um espectro de diferentes fenótipos em resposta a diferentes estímulos/sinais. Devido à sua plasticidade funcional, os macrófagos apresentam um espectro de fenótipos entre dois extremos identificados como macrófagos M1 (pró-inflamatórios ou classicamente ativados) e M2 (reparativos ou alternativamente ativados), caracterizados pela expressão de marcadores específicos da superfície celular e pela secreção de diferentes citocinas (FEITO *et al.*, 2019). Estes dois fenótipos são distintos em sua expressão do receptor, na produção de citocinas e quimiocinas, bem como na função efetora; e seu modelo *in vitro* tem sido útil em termos de descrição da resposta imune durante infecções agudas, asma e alergias (XUE *et al.*, 2014).

Os termos M1 e M2 foram vinculados aos perfis de macrófagos por serem entendidos como análogos na resposta das células T: o *interferon gama* (IFN γ), derivado da célula T auxiliar Th1 na imunidade mediada por células, na infecção intracelular, e a *interleucina 4* (IL-4), derivada de Th2, na infecção extracelular (MARTINEZ; GORDON, 2014). Outras classificações de M2 foram feitas (M2a, M2b, M2c e M2d), mas essas classificações corroboram a idéia de que a ativação de macrófagos existe em um espectro, ao invés de ser definida em grupos (MURRAY *et al.*, 2014).

Estímulos inflamatórios, como LPS, IFN γ e GM-CSF, induzem a ativação clássica (M1), caracterizada por suas propriedades antimicrobianas e tumorícidias e envolvidos na resposta da Th1 à infecção (DELAVERY *et al.*, 2011; GINHOUX *et al.*, 2016). Os macrófagos M1 produzem moléculas pró-inflamatórias, incluindo fator

de necrose tumoral α (TNF α) e interleucinas (IL-1, IL-6, IL-12, IL-23) (LEE, 2019) e são críticos para a proteção contra vírus e bactérias intracelulares durante infecções agudas ou tumores, produzindo reagentes microbicidas e tumorícidias, como óxido nítrico (NO) ou espécies reativas de oxigênio (ROS) (MARTINEZ; GORDON, 2014; SICA *et al.*, 2008).

A principal citocina associada à ativação do macrófago M1 é o IFN γ , que é produzido pelas células Th1, mas também pelas células *natural killer* (NK) e por outros macrófagos (LEE, 2019). A ativação de IFN γ leva à expressão gênica específica de receptores de citocinas como IL12RA e IL6R, marcadores de ativação celular como CD38 e CD69 e moléculas de adesão como ICAM1 (LEE, 2019; MARTINEZ; GORDON, 2014).

O LPS é a sinalização para M1 mais bem estudada e, após sua ligação ao Receptor *Toll-like 4* (TLR4), leva à expressão de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IL-12, TNF, IL-6, IL-1 β , IFN- β), quimiocinas e complexos apresentadores de antígenos como o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (MARTINEZ; GORDON, 2014).

Na ativação alternativa (M2), o estímulo é proveniente da IL4 ou IL-13, devido a características anti-inflamatórias, incluindo supressão de respostas inflamatórias e indução da cicatrização de feridas (DELAVARY *et al.*, 2011). A IL-4 é produzida por células Th2, eosinófilos, basófilos ou macrófagos. A transcrição de citocinas anti-inflamatórias, como IL-1 e IL-10, é induzida e estas sinalizam aos macrófagos para diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 e também a atividade geral dos macrófagos (LEE, 2019).

A ativação M2, geralmente, orienta ao remodelamento e reparo tecidual, resistência a parasitas, regulação da imunidade e promoção tumoral; também estão envolvidos em doenças infecciosas crônicas (BENOIT; DESNUES; MEGE, 2008; MANTOVANI *et al.*, 2004).

Os macrófagos M2 foram divididos em subtipos (M2a, M2b, M2c e M2d) com base nos estímulos aplicados e nas alterações transcricionais (MANTOVANI *et al.*, 2004; TAMAS, 2015). As características comuns dessa subpopulação são altos níveis de IL-10 e baixos de IL-12, e a produção de arginase-1 (Arg-1); onde o alto nível de Arg-1 esgota a L-arginina, prejudicando a proliferação de células T e a produção de IFN γ (LEE, 2019). O nível aumentado de Arg-1 compete ainda mais

com Óxido Nítrico Sintases (iNOS) pela L-arginina e reduz a produção de NO (TAMAS, 2015).

Atualmente, os métodos empregados para detecção da diferenciação macrofágica incluem a quantificação de citocinas (ELISA - ensaio de imunoabsorção enzimática), análise de marcadores de superfície (citometria de fluxo) ou análise de expressão gênica (PCR quantitativo) (BERTANI *et al.*, 2017). Diante deste cenário, a busca por novas metodologias que possam monitorar e diferenciar células sem alterar suas características de ativação e sem que seja necessária a marcação celular, mostra-se essencial e constitui um dos objetivos de abordagens metodológicas, tanto no desenvolvimento de pesquisas, quanto na elaboração de novos métodos diagnósticos.

3.4 Espectroscopia Raman

Quando a luz incide sobre algum material, a energia emitida pode ser absorvida, refletida, atravessar a matéria ou ser espalhada. A Espectroscopia Raman é uma medida do espalhamento inelástico da luz, descrito pela primeira vez em 1928 (RAMAN; KRISHNAN, 1928). Os físicos indianos Chandrasekhara Venkata Raman e Kariamanickam Srinivasa Krishnan descreveram a observação de um 'novo tipo de radiação secundária' após experimentos que envolveram amostras excitadas com luz solar focada através de uma lente. Eles observaram a luz dispersa com um comprimento de onda diferente do comprimento de onda incidente original; essa dispersão é agora conhecida como espalhamento Raman.

Quando ocorre mudança no estado vibracional da molécula durante o espalhamento, ocorre também transferência da energia emitida. Estas alterações vibracionais com transferência de energia são localizadas nas ligações químicas e, uma vez que cada espécie molecular tem seu próprio conjunto exclusivo de vibrações moleculares, o espectro Raman de uma espécie consiste em uma série de picos deslocados por uma das frequências vibracionais características dessa molécula (HANLON *et al.*, 2000).

Na última década, a aplicação mais ampliada da espectroscopia Raman referiu-se ao estudo de células e tecidos para análises farmacêuticas e de diagnóstico e, em particular, seu uso na análise da dinâmica celular (SMITH; WRIGHT; ASHTON, 2016). Uma das principais vantagens da espectroscopia Raman é a capacidade de determinar a estrutura química de uma célula: proteínas,

lipídios e DNA podem ser visualizados de acordo com seus espectros vibracionais e, dessa forma, as células não precisam ser marcadas ou coradas antes da análise (PALONPON; SODEOKA; FUJITA, 2013).

Outra vantagem vem do fato da água possuir um sinal Raman fraco, possibilitando que as células possam ser visualizadas em ambientes aquosos, ou seja, a análise pode ser realizada em células vivas, em condições fisiológicas normais (SMITH; WRIGHT; ASHTON, 2016). A utilização da técnica requer mínimo ou nenhum preparo prévio de amostras, além de ser uma técnica não destrutiva e não-invasiva (BERTANI *et al.*, 2017; FARHANE; BONNIER; BYRNE, 2018). Além disso, a Espectroscopia Raman possui alta precisão, alta sensibilidade e curto tempo de aquisição das análises (CAMPION *et al.*, 2018; HANLON *et al.*, 2000).

3.5 Análise de Componentes Principais

Espectros Raman contêm informações bioquímicas ricas, no entanto, macromoléculas biológicas (proteínas e ácidos nucleicos, por exemplo) são complexas e geram picos numerosos que podem se sobrepor uma banda larga (ONG; LIM; LIU, 2012). Desta forma, o volume de informações obtidos a partir da análise é grande, fazendo-se necessário o uso de um método matemático capaz de extrair informações relevantes a partir de um grande conjunto de dados (RASHID *et al.*, 2014).

Uma técnica amplamente utilizada na atualidade no campo da prospecção de dados multivariados é a Análise de Componentes Principais (PCA, *Principal Component Analysis*) (DA SILVA *et al.*, 2019; DITTA *et al.*, 2019; FRANCO *et al.*, 2017; RASHID *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2019). Com esta técnica é possível reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados onde há um grande número de variáveis inter-relacionadas, de forma que o máximo de variância (informação contida nos dados matemáticos) presente nos dados seja mantido (DITTA *et al.*, 2019).

A técnica possibilita a diminuição do tamanho do conjunto de dados, mantendo ainda assim o máximo possível de informações. Essa redução se dá pela obtenção de um novo e diminuído conjunto de variáveis não correlacionadas, chamadas componentes principais, dispostas em ordem decrescente de variância relativo às variáveis originais (FRANCO *et al.*, 2017).

Como resultados, os dados originais podem ser representados por um número menor de variáveis. Isso é bastante útil em conjunto de dados espectroscópicos, facilitando a análise e classificação dos dados, separação de variáveis importantes e identificação de padrões entre as amostras, mesmo quando não são facilmente percebidas por análise superficial dos mesmos dados (ONG; LIM; LIU, 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens celulares

A linhagem de macrófagos murinos J774A.1, obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ/UFRJ), foi utilizada para a realização dos experimentos. As células foram mantidas em meio de cultura DMEM, suplementado com soro fetal bovino (SBF) a 10%, penicilina/estreptomicina (1%) e L-glutamina (2 mM), mantidas em estufa de CO₂ a 37°C. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias e passagens foram realizadas a cada 5 dias.

4.2 Ativação de macrófagos

As células de J774A.1 foram semeadas (5×10^5 células/poço) em lamínulas de vidro de 13 mm dispostas em placas de 24 poços, em meio de cultura DMEM (SBF 2%) e mantidas em estufa de CO₂ a 37°C. Após 24 horas de incubação, os poços foram separados em grupos para diferenciação dos perfis M1 e M2 e outros que não foram diferenciados (M0). A diferenciação para macrófagos M1 foi realizada utilizando 5 ng/mL de IFN γ recombinante murino e 1 μ g/mL de LPS. Para macrófagos M2 foram utilizados 20 ng/mL de IL-4 recombinante murino. As células foram mantidas nestas condições incubadas em estufa por 24 horas. Este experimento foi realizado em triplicatas. Para obtenção dos grupos estimulados, o procedimento acima foi repetido e em todos os poços foi adicionado LPS (100 ng/mL) e as células foram encubadas por mais 24 horas.

4.3 Quantificação de citocinas

Os níveis de citocinas presentes no sobrenadante das células foram quantificados através do ensaio de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). O sobrenadante das células submetidas ao experimento de diferenciação foi recolhido e a quantificação seguiu as instruções do fabricante (Peprotech®, Rocky Hill, New Jersey, EUA) e a leitura da absorbância realizada em leitor de microplacas (Polaris, Celer Biotecnologia S.A.). Foram quantificados os níveis de IL-10 e IL-4, tanto dos grupos estimulados, quanto dos grupos que não receberam estímulo.

4.4 Análise da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (PCRq)

As células J774 foram semeadas em placas de 6 poços, no qual foram estimuladas ou não com LPS (LPS 100 ng/mL e IFN- γ 30 ng/mL) e IL-4 (100 ng/mL) por 24 horas. Após o tratamento, o RNA foi extraído com auxílio do Kit de Extração PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies) conforme descrição do fabricante. Após extração do RNA, o mesmo foi quantificado com auxílio do NanoDrop One e tratado com a enzima DNase, para garantir a eliminação de qualquer resíduo de DNA genômico, em seguida, o RNA foi transcrito reversamente para obtenção do DNA complementar (cDNA). A reação de PCRq foi realizada através da utilização do equipamento QuantiStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise morfológica das amostras foi realizada em um Microscópio Eletrônico de Varredura, modelo Super Scan SSX-550 (Shimadzu) do Grupo de Óptica e Nanoscopia (GON) do Instituto de Física/ UFAL. As amostras foram fixadas com glutaraldeído (5%) durante 5 minutos e lavadas com PBS. As lamínulas foram colocadas em dessecador contendo sílica gel por 24 horas para retirada de umidade. Após esse período, as lamínulas foram fixadas em um porta-amostras circular de aço, com auxílio de fita de carbono e foram recobertas com filme de ouro através da técnica de *sputtering* (10 mA, durante 5 minutos).

4.6 Espectroscopia Raman

As lamínulas de vidro foram lavadas com PBS, fixadas com glutaraldeído (1%) durante 5 minutos e lavadas novamente com PBS. As lamínulas foram colocadas em dessecador contendo sílica gel por 24 horas para eliminação da umidade. Após esse tempo, a análise de espectroscopia foi realizada em temperatura ambiente no Sistema de Microscopia por Varredura de Sonda com espectrômetro Raman integrado, do Grupo de Óptica e Nanoscopia (GON) do Instituto de Física/ UFAL.

Os espectros foram obtidos através de um espectrômetro XploRA (Horiba) acoplado a um microscópio Olympus, e provido de laser de 532 nm. O laser foi focalizado na região nuclear das células através de uma objetiva de 100 $\times$ (NA =0,9); buscando obter melhor sinal e causar menor dano a mesma lente objetiva foi usada

para coletar a luz espalhada após a interação com a amostra. Para a calibração da frequência foi utilizada uma amostra padrão de silício, possuindo como referência a banda vibracional de 520 cm^{-1} . Nas mesmas condições, foram medidos os espectros de 100 células para cada grupo na faixa espectral de $700\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$. As aquisições utilizaram 5 acumulações em 3 segundos, totalizando 15 segundos de exposição por amostra. A grade de difração utilizada no espectrômetro possuía 1200 linhas/mm, o que resultou em uma resolução espectral de $1,5\text{ cm}^{-1}$.

4.7 Análise espectral

Antes de realizar a análise espectral, todos os espectros foram suavizados, tiveram ajuste de seu background e foram normalizados usando um algoritmo implementado no software Matlab® (Mathworks Inc., EUA). Esta metodologia escolhe automaticamente uma ordem polinomial para corrigir os espectros de *background*, evitando a intervenção do usuário e permitindo um melhor ajuste de linha de base. Cada espectro foi normalizado com sua intensidade máxima, pelo Matlab® (Mathworks Inc., EUA), e pela área, através do *aje - UV-Vis-IR Spectral Software 2.2 (FluorTools)*. A região espectral escolhida para análise corresponde aos principais modos de impressão digital vibracional de amostras biológicas ($700\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$).

4.8 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). Comparação estatística entre os grupos foi realizada por análise de variância One-way ANOVA seguida pelo pós-teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando os valores de $p < 0,05$ usando o programa GraphPad Prism® 7.0 (Software Inc., San Diego, CA, EUA).

Na análise estatística dos espectros obtidos através da Espectroscopia Raman, após remover o fundo de fluorescência dos espectros, foi realizada a análise de componentes principais (PCA). Os gráficos de escores do PCA foram construídos com os três primeiros componentes principais (PC1, PC2 e PC3), visto que essas componentes são as que mais explicam a porcentagem da variância total dos dados. Esses métodos foram realizados utilizando algoritmos desenvolvidos no Matlab® (Mathworks Inc., EUA).

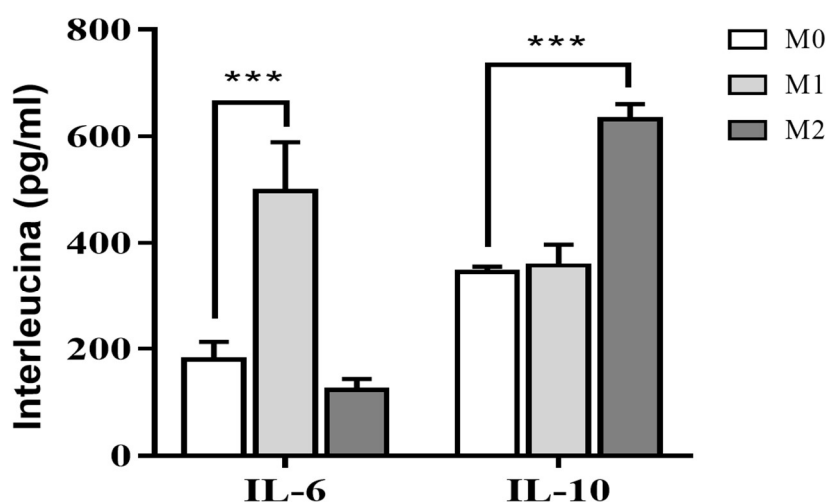
5. RESULTADOS

5.1 Caracterização do perfil funcional M1 e M2 em macrófagos

Inicialmente, buscou-se realizar a diferenciação funcional dos macrófagos a partir da quantificação de citocinas inflamatórias consideradas típicas para o perfil M1 e M2, tais como a produção de IL-6 para macrófagos de perfil M1 e IL-10 para macrófagos de perfil M2. Tais quantificações foram realizadas através do ensaio de ELISA. Para atingir cada perfil funcional, os macrófagos foram cultivados com IFN- γ /LPS para diferenciação no perfil M1 ou com IL-4 diferenciação no perfil M2 (Figura 1).

Como demonstrado Figura 1, macrófagos mantidos em sistema de cultivo sob tratamento com IFN- γ /LPS por 24 h exibiram níveis aumentados de IL-6, o que caracteriza o fenótipo funcional M1. Já macrófagos mantidos em cultura sob tratamento de IL-4 por 24 h passaram a apresentar um perfil característico do fenótipo M2 devido a produção elevada de IL-10. Tais resultados demonstram a polarização funcional dos macrófagos nos perfis M1 e M2.

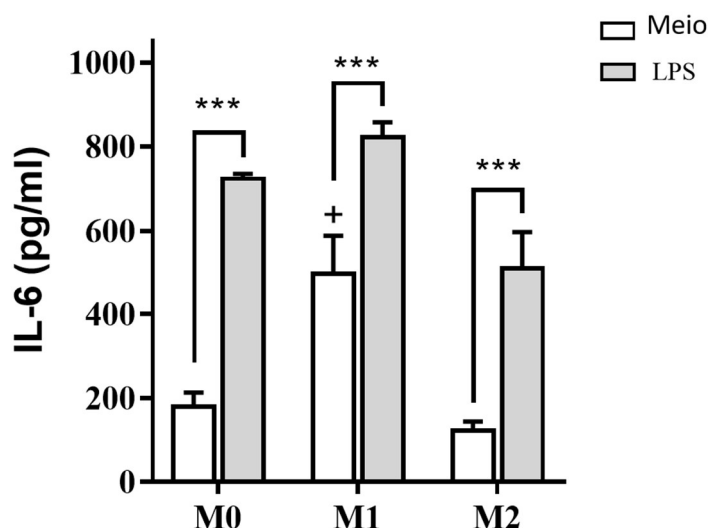
Figura 1 – Polarização funcional dos macrófagos para o perfil M1 e M2.



As barras representam os níveis de citocinas produzidas por macrófagos submetidos ao tratamento com IFN- γ /LPS para diferenciação no perfil M1, e ao tratamento com IL-4 para diferenciação no perfil M2. (***) representa $p < 0,001$, quando comparado ao respectivo grupo de células sem tratamento (M0).

Com propósito de verificar a reatividade funcional das células após a diferenciação, cada fenótipo foi submetido a ativação com LPS (100 ng/mL) por 24 h. Após este tempo, foi quantificado os níveis de interleucinas típicas para cada fenótipo. Confirmando os dados anteriores, macrófagos tratados com IFN- γ /LPS produziram elevados níveis de IL-6, enquanto que o tratamento com IL-4 não induziu elevação nos níveis de IL-6, caracterizando o fenótipo funcional M1 (Figura 2). Quando as células polarizadas para M1 (tratados com IFN- γ /LPS) foram estimuladas com LPS os níveis de IL-6 mantiveram-se elevados. Já as células polarizadas para M2 (tratadas com IL-4) passaram a produzir IL-6 após estimulação com LPS, confirmando a capacidade responsiva do fenótipo M1 (Figura 2).

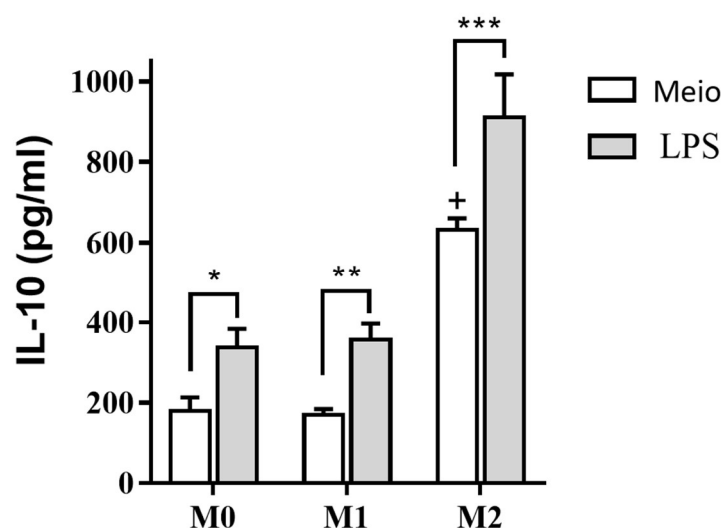
Figura 2 – Avaliação da capacidade responsiva do perfil M1 de macrófagos estimulados com LPS.



As barras representam o nível de IL-6 produzidas por macrófagos submetidos ao tratamento com IFN γ /LPS ou IL-4, estimulados ou não com LPS (100 ng/mL). A quantificação de IL-6 foi realizada no sobrenadante das células 24 h após o estímulo com LPS. (***) $p < 0,001$ quando comparado ao grupo mantido com meio DMEM sem estímulo (M0).

Na Figura 3, macrófagos tratados com IL-4 produziram elevados níveis de IL-10, enquanto o tratamento com IFN- γ /LPS não induziu a produção de IL-10, caracterizando o fenótipo funcional M2. Quando as células polarizadas para M2 (tratados com IL-4) foram estimuladas com LPS os níveis de IL-10 mantiveram-se elevados. Já as células mantidas com IFN- γ /LPS passaram a produzir IL-10 após estimulação com LPS, confirmando a capacidade responsiva do fenótipo M2 (Figura 3).

Figura 3 – Avaliação da capacidade responsiva do perfil M2 de macrófagos estimulados com LPS.

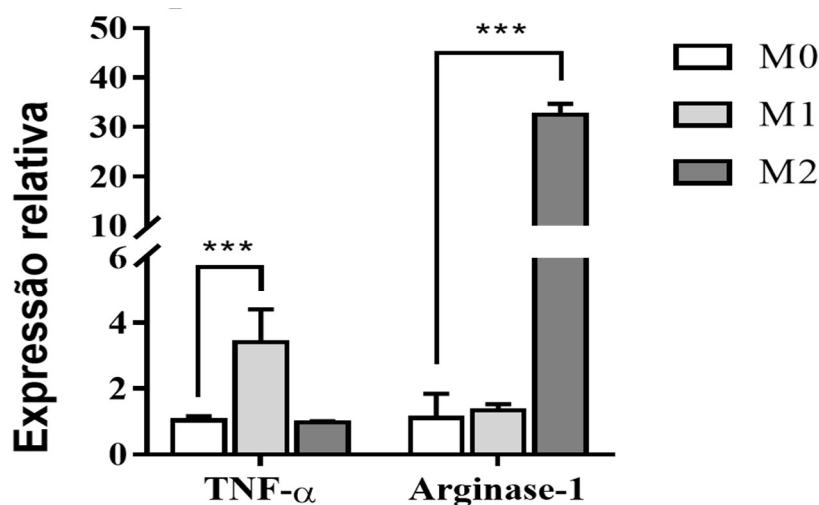


As barras representam o nível de IL-10 produzidas por macrófagos submetidos ao tratamento com IFN γ /LPS ou IL-4, estimulados ou não com LPS (100 ng/mL). A quantificação de IL-10 foi realizada no sobrenadante das células 24 h após o estímulo com LPS. (+) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ quando comparado ao grupo mantido com meio DMEM sem estímulo (M0).

5.2 Expressão de genes marcadores para o perfil de macrófagos M1 e M2

Para confirmar a polarização em nível transcricional, foi realizado o ensaio de PCRq em tempo real. Como apresentado na Figura 4, a polarização para ambos perfis foi obtida com sucesso, no qual os genes Tnf- α (típico do perfil M1) e Arg1 (típico do perfil M2) exibiram níveis aumentados após diferenciação fenotípica.

Figura 4 – Expressão gênica de marcadores de diferenciação de macrófagos

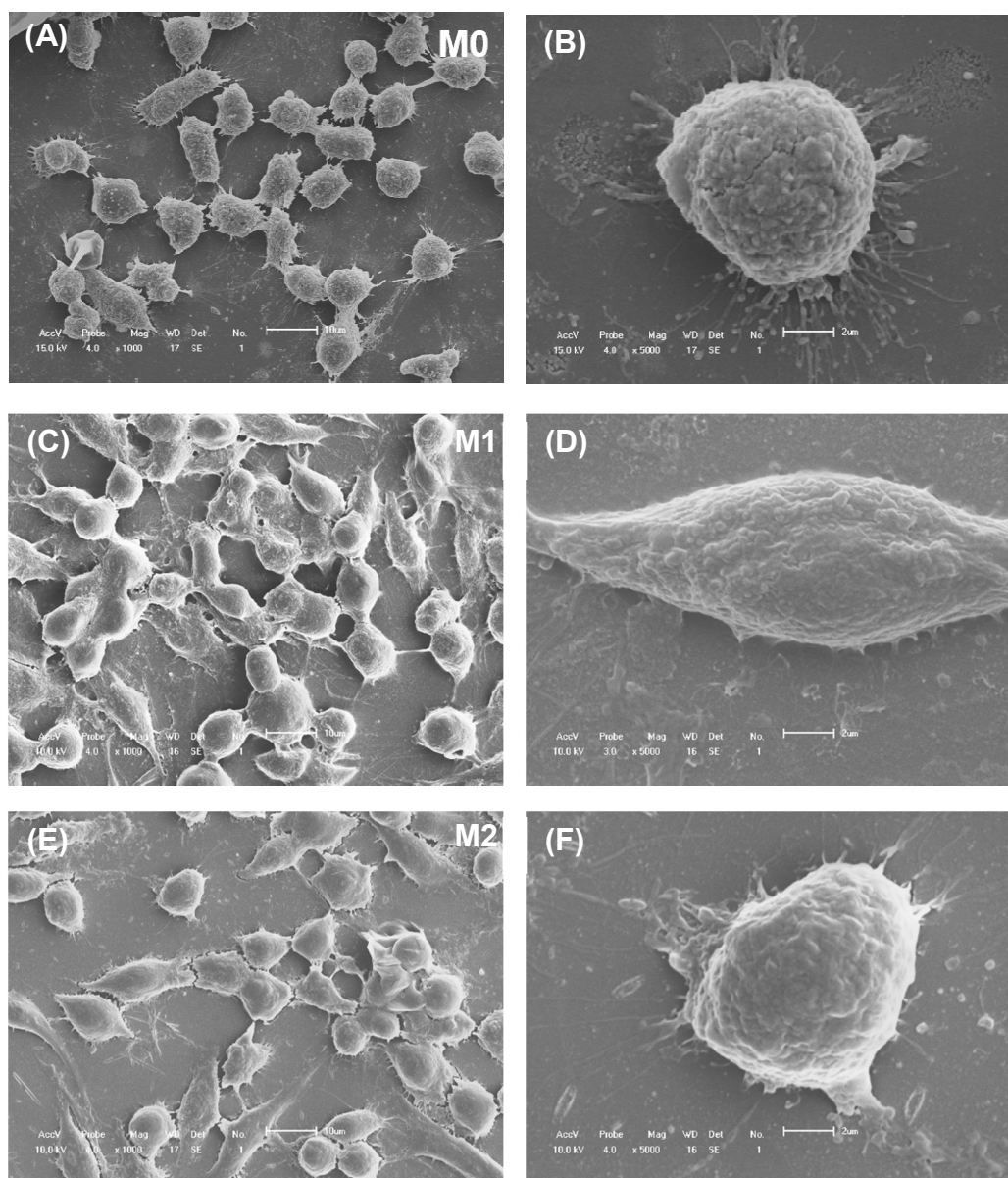


Perfil de expressão gênica em macrófagos J774 polarizados. As células foram estimuladas LPS + IFN- γ (para o perfil M1) ou com IL-4 (para o perfil M2) por 24 horas. (A) Dados apresentados por média $\pm$ E.P.M., as análises estatísticas foram detectadas por One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, onde (*) $p < 0,001$ quando comparado como a expressão basal do gene.

5.3 Análise da morfologia das células submetidas a polarização funcional

Em seguida, com propósito de dispor de mais informações sobre a diferenciação funcional de macrófagos M1 e M2, seguimos para avaliar as alterações morfológicas destas células utilizando a microscopia eletrônica de varredura. Conforme apresentado na Figura 5, observamos que os macrófagos M1 e M2 exibiram morfologias distintas. A diferenciação no perfil M1 proporcionou que as células apresentassem uma forma mais elíptica, fusiforme e com ramificações, perfil distinto das células controle não diferenciadas (M0), mais arredondadas e ligeiramente menores. Por outro lado, a polarização para o perfil M2 produziu células maiores mantendo uma morfologia mais arredondadas com semelhança morfológica as células M0 (Figura 5).

Figura 5 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura de macrófagos submetidos à polarização funcional.



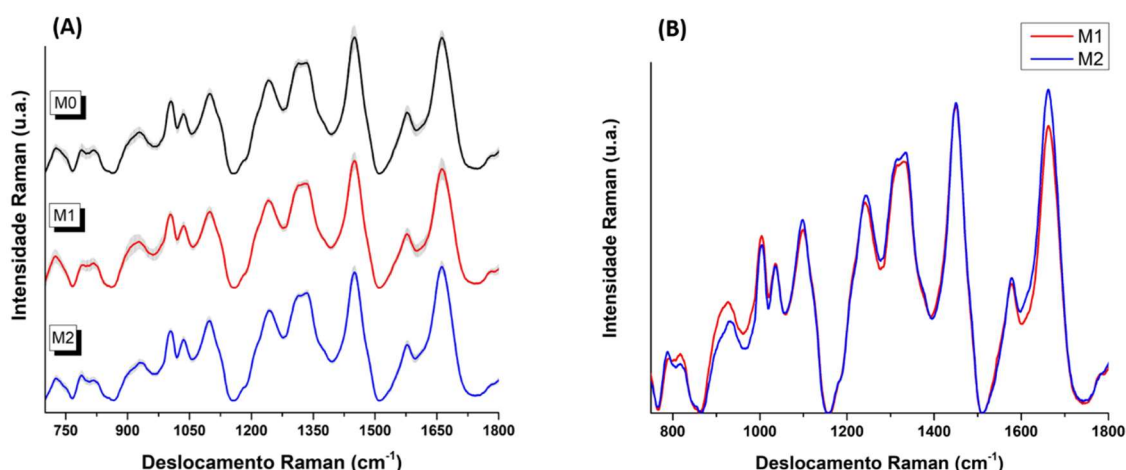
Micrografia de varredura evidenciando diferenças entre os diferentes fenótipos de polarização. Perfil M0 em aumento de 1000x (A) e 5000x (B). Perfil M1 em aumento de 1000x (C) e 5000x (D). Perfil M2 em aumento de 1000x (E) e 5000x (F).

5.4 Espectros Raman de macrófagos polarizados

A análise dos espectros Raman em macrófagos submetidos à diferenciação para os fenótipos M1 ou M2 permitiu avaliar o perfil das alterações bioquímicas nos

macrófagos. A Figura 6A mostra os espectros Raman médios dos três grupos de células após o pré-processamento, com os respectivos desvios padrão sobrepostos (região sombreada). Os três grupos apresentaram espectros bastante semelhantes, com pequenas diferenças apenas na intensidade de alguns picos. Mesmo quando comparados os espectros médios dos perfis M1 e M2 (Figura 6B), as variações ocorrem apenas nas intensidades das bandas, não sendo possível visualizar o surgimento/desaparecimento de picos, ou até mesmo seu deslocamento. Isso mostra que, mesmo após a diferenciação, as mudanças na bioquímica celular parecem não ter afetado de forma significativa os espectros Raman.

Figura 6 – Espectros Raman de perfis de polarização M0, M1 e M2 de macrófagos.



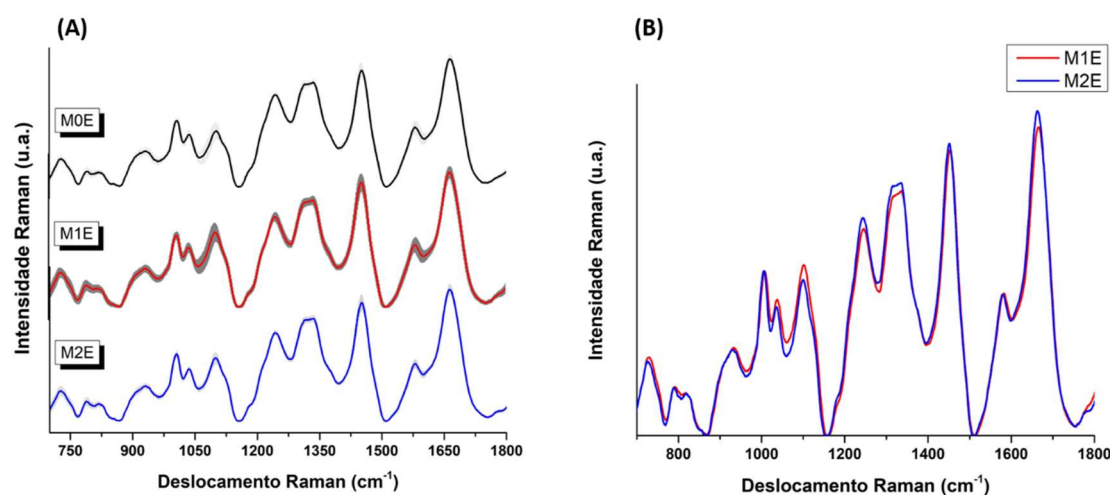
Os espectros são das médias de 100 células para cada grupo na região de impressão digital (700-1800 cm^{-1}). As áreas sombreadas representam o desvio padrão das médias dos perfis de polarização M0, M1 e M2 (A). Sobreposição dos espectros médios dos grupos celulares M1 e M2 (B).

As principais bandas de ácido nucleico estão presentes em 788 cm^{-1} (bandas fosfodiéster de DNA) e em 1662 cm^{-1} . Uma banda típica de marcadores de proteínas (anel simétrico da fenilalanina), pode ser encontrado em 1004 cm^{-1} . Assinaturas relacionadas a colágeno são encontradas em 817 cm^{-1} , 1035 cm^{-1} , 1243 cm^{-1} , 1324 cm^{-1} e 1336 cm^{-1} . Assinaturas de lipídios podem ser visualizadas em 1101 cm^{-1} e 1449 cm^{-1} .

Após a diferenciação, os macrófagos foram estimulados com LPS e seus espectros Raman também foram avaliados, e divididos em três grupos: (i) células

estimuladas M0E, (ii) células estimuladas M1E e (iii) células estimuladas M2E, a Figura 7A mostra os espectros Raman médios desses três grupos. Novamente, foi possível observar espectros bastante semelhantes, com diferenças apenas na intensidade de alguns picos. Mesmo após o estímulo com o LPS, as alterações na composição celular não evidenciaram alterações espectrais significativas que pudessem ser notadas apenas com a observação dos espectros. Na comparação entre os perfis M1E e M2E (Fig. 7B), as diferenças foram ainda mais sutis do que as observadas na comparação M1/M2 (Fig. 6B).

Figura 7 - Espectro Raman de perfis de macrófagos polarizados e estimulados.



Os espectros são das médias de 100 células para cada grupo na região de impressão digital (700-1800 cm^{-1}). As áreas sombreadas representam o desvio padrão das médias dos perfis de polarização M0E, M1E e M2E (A). Sobreposição dos espectros médios dos grupos celulares M1E e M2E (B).

5.5 Classificação espectral baseada no PCA

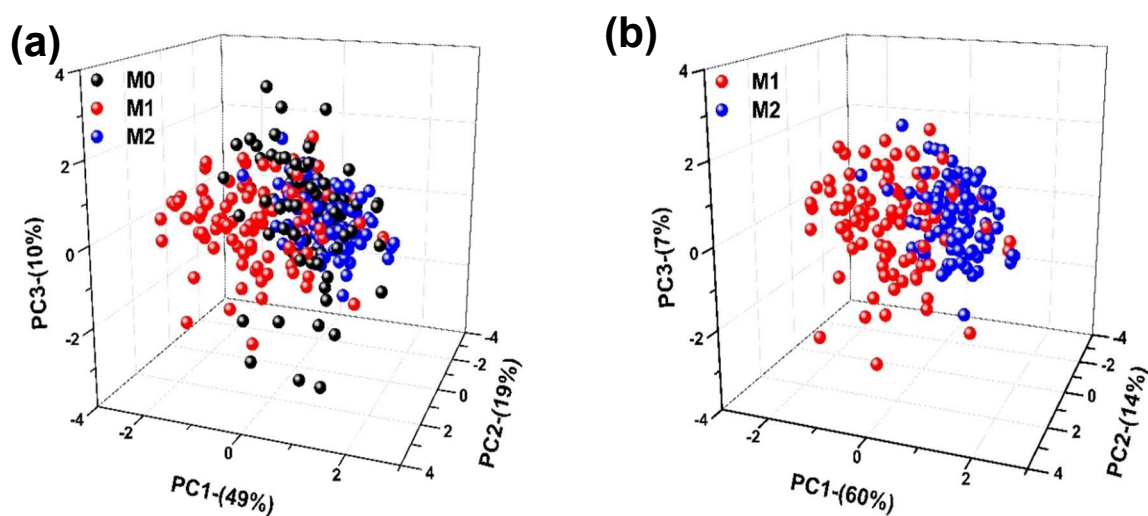
Mesmo pequenas diferenças nos espectros Raman podem ser suficientes para distinguir diferentes grupos celulares submetidos a algum tipo de processo como, por exemplo, a diferenciação. Isso é possível através do uso conjunto da espectroscopia Raman com a análise de componentes principais. Essa abordagem pode ser capaz de revelar informações úteis sobre o processo de diferenciação dos macrófagos.

O PCA foi utilizado para fazer a discriminação/classificação dos grupos celulares e confirmar os resultados obtidos pelos ensaios biológicos, ressaltando a hipótese de que de fato ocorreu a diferenciação das células. Inicialmente, essa análise foi realizada nos espectros das células pré-processadas dos grupos M0, M1

e M2, e os escores dos três primeiros PCs (PC1, PC2 e PC3) foram analisados através de gráficos tridimensionais.

Conforme ilustrado na Figura 8A, as células dos grupos M0, M1 e M2 foram classificadas por meio dos três primeiros PCs, que representaram 78% da variância total dos dados. A análise mostrou uma grande região de sobreposição das amostras, evidenciando o fato de que muitos espectros são semelhantes. No entanto, ao fazer uma comparação direta entre os grupos M1 e M2 (Fig. 8B), é possível observar que o principal discriminante foi o escore do PC1, responsável por 60% da variância total, onde as células do grupo M1 apresentaram, em sua maioria, escores negativos e as células do grupo M2, escores positivos. Com base nesses resultados, pode-se afirmar que há uma clara distinção entre esses grupos celulares. Os três primeiros PCs usados nesta comparação representaram 81% da variância entre os espectros Raman obtidos desses dois grupos celulares.

Figura 8 - Análise de componentes principais (PCA) de perfis de polarização M0, M1 e M2 de macrófagos.

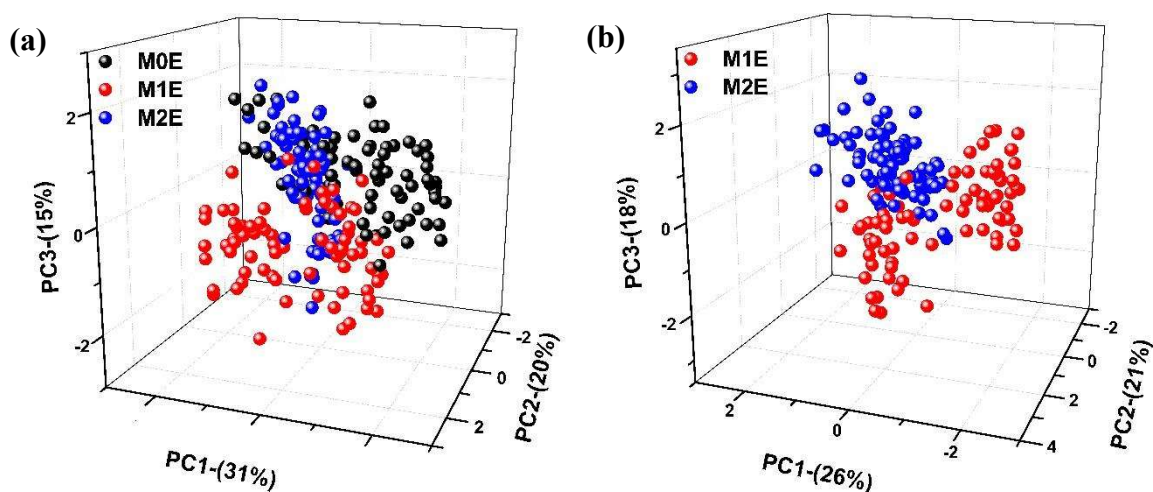


Gráficos de escores para as células dos grupos (a) M0, M1 e M2; e (b) M1 e M2.

Posteriormente, o PCA foi utilizado para fazer a discriminação dos macrófagos estimulados com LPS após a polarização. Essa análise foi realizada nos espectros das células pré-processadas dos grupos M0E, M1E e M2E, e os escores dos três primeiros PCs também foram analisados. Conforme ilustrado na Figura 8A, as células dos grupos M0E, M1E e M2E foram classificadas por meio dos três primeiros PCs, que representaram 66% da variância total dos dados.

Apesar da análise mostrar uma grande quantidade de amostras sobrepostas, ainda assim é possível fazer a classificação dos grupos celulares em três *clusters* distintos. A comparação direta entre os grupos M1E e M2E é apresentada na Figura 9B. Nessa análise, os três primeiros PCs explicaram 65% da variância do conjunto de dados original, com PC1 descrevendo 26%, PC2 descrevendo 21% e PC3 descrevendo 18% da variância total.

Figura 9 - Análise de componentes principais (PCA) de perfis de polarização M0E, M1E e M2E de macrófagos polarizados e estimulados com LPS.



Gráficos de escores para as células dos grupos (a) M0E, M1E e M2E, e (b) M1 e M2.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, utilizamos células J774, consideradas modelos úteis para explorar mecanismos de polarização de macrófagos. Nossos resultados revelaram que a metodologia de polarização padronizada obteve sucesso, uma vez que, tanto as citocinas relacionadas aos perfis de ativação M1 (IL-6) e M2 (IL-10) se mostraram comparativamente aumentadas na avaliação de quantificação; quanto a análise da expressão gênica dos genes *Tnf- α* (típico do perfil M1) e *Arg1* (típico do perfil M2) exibiram níveis aumentados após diferenciação fenotípica; resultado amparado pela literatura (LEE, 2019; MARTINEZ; GORDON, 2014).

Na análise morfológica foi possível constatar uma pequena diferença entre os perfis M1 e M2, entre os perfis M0 e M2 essa diferença foi ainda mais reduzida. Tais diferenças foram observadas com o emprego da Microscopia Eletrônica de Varredura, uma vez que esta técnica fornece uma maior ampliação do que quando utilizado microscópio óptico.

Estudos de macrófagos em cultura sugerem que os perfis não estimulados (M0) possuem morfologia pequena e arredondada, sem grandes extensões citoplasmáticas, os M1 são caracterizados por uma forma um pouco aumentada com corpos alongados e aumento das extensões citoplasmáticas na superfície celular, enquanto os de perfil M2 demonstram heterogeneidade, com dois tipos celulares presentes: um alongado e com extensões citoplasmáticas nas extremidades apicais dos corpos celulares, e um tipo com células gigantes multinucleadas com abundantes projeções citoplasmáticas na superfície celular (HEINRICH et al., 2017).

Não foi possível observar este último tipo do perfil M2 e nem diferenças tão marcadas entre os demais grupos, provavelmente pelo tempo do estudo, no presente trabalho as células foram observadas após 24 horas de estímulo e este período pode não ser suficiente para evidenciar maiores alterações visuais. No entanto, quanto mais prolongado o período nas placas de cultura, maiores são as perdas de células, levando a uma quantidade insuficiente para as demais análises propostas por este estudo.

Utilizado como ativador de monócitos e macrófagos, o LPS é um componente da membrana externa das bactérias Gram-negativas que desencadeia nestes a secreção de citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α etc). A exposição de macrófagos ao LPS

bacteriano inicia uma cascata que leva ao aumento da produção de nitrito, secreção de citocinas pró-inflamatórias e aquisição de atividade bactericida/tumoricida aprimorada, características de um macrófago ativado (MENG; LOWELL, 1997).

Tendo em vista a atuação do LPS, este foi utilizado com intuito de acionar um perfil ativo dos grupos celulares. Os grupos que receberam estímulo com LPS após a polarização apresentaram uma menor diferença entre si na quantificação de IL-6 (Fig. 2).

Uma vez que os espectros foram tomados com o laser focalizado na região nuclear da célula, buscando obter melhor sinal e causar menor dano, a informação é relacionada principalmente a esta região. Foi possível identificar intensa atividade relacionada a proteínas e lipídios associada ao pico da fenilalanina (PRATS MATEU *et al.*, 2017). Também foi identificada alta atividade relativa ao colágeno (relativamente aumentada no perfil M2), relacionado divisão celular e o reparo tecidual (PATEL *et al.*, 2017; SICA; MANTOVANI, 2012).

Os espectros Raman dos grupos foram muito semelhantes, com diferenças sutis em intensidades de picos específicos (Tabela 1). As variações observadas nas regiões espectrais de ácidos nucleicos e proteínas sugeriam uma distinção entre fenótipos M1 e M2, mas não eram suficientes para confirmação.

As atribuições das bandas Raman utilizadas na interpretação das características espectrais foram realizadas com base em literatura publicada (MONDOL *et al.*, 2019; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007).

TABELA 1 – Atribuição dos picos de deslocamento Raman encontrados nos espectros celulares e sua atribuição de acordo com a literatura.

Pico Raman (cm ⁻¹)	Atribuição
725	Modos de respiração dos anéis das bases de DNA/RNA
788	Bandas de fosfodiéster O-P-O DNA
817	Estiramento C-C (atribuição de colágeno)
918	Prolina, hidroxiprolina
928	Aminoácidos
1004	Fenilalanina

1035	Colágeno
1101	Estiramento da ligação CC, banda associada a lipídios, proteínas e ácidos graxos
1243	Amida III (colágeno); fosfato assimétrico proveniente dos grupos fosfodiéster dos ácidos nucleicos
1245	Amida III: β -sheet
1324	Colágeno e bases purinas de DNA
1336	Guanina; colágeno
1449	Lipídios; proteínas de membrana
1577	NADH
1662	Ácidos nucleicos

Fonte: Modificado a partir de (MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2007)

Desta forma, optou-se pela utilização do PCA. Essa análise conjunta da espectroscopia Raman com métodos estatísticos multivariados vem sendo bastante utilizada em estudos para discriminação de amostras biológicas, devido às aplicações bem-sucedidas na classificação de células (ARAÚJO *et al.*, 2019; BERTANI *et al.*, 2017; DA SILVA *et al.*, 2019; PRATS MATEU *et al.*, 2017).

Através do PCA foi possível observar que os três grupos são distinguíveis, o que é ainda mais evidenciado quando se trata dos perfis M1 e M2, no qual a análise apresentou PC1 com 60% da variância total. No entanto, os perfis não estão tão distantes entre si, provavelmente por se tratarem de células em cultura, com condições semelhantes sem exposição a fatores como fármacos ou patógenos (ARAÚJO *et al.*, 2019; DA SILVA *et al.*, 2019).

A avaliação do PCA nos grupos estimulados com LPS após a polarização (Fig. 8) demonstrou que os três grupos apresentavam um menor coeficiente de distinção entre si, como já observado na quantificação de citocinas, corroborando o fato dos fenótipos M1/M2 estarem mais relacionados a um espectro de fenótipos do que a dois grupos distintos (FEITO *et al.*, 2019) e podendo até mesmo sugerir o início de uma repolarização para o perfil M1 (ARORA *et al.*, 2018).

Embora as diferenças espectrais observadas tenham sido pequenas, estas foram reproduzíveis e consistentes. Como mostrado aqui, com base nessas

diferenças, os modelos multivariados foram capazes de discriminar entre as células. Nos espectros Raman, a polarização não foi associada a uma ou algumas bandas marcadoras selecionadas. Pelo contrário, a polarização foi considerada um processo complexo multifatorial, com pequenas alterações na abundância, mas modificações composicionais principalmente relacionadas a ácidos nucleicos.

Este estudo demonstra a sensibilidade da técnica de espectroscopia Raman utilizada em conjunto com a análise de componentes principais para fornecer uma ferramenta de discriminação de células únicas com base em suas assinaturas biomoleculares.

A espectroscopia Raman é uma ferramenta de investigação e diagnóstico promissora que pode auxiliar na compreensão da base molecular de doenças, fornecendo informações moleculares objetivas e quantificáveis para diagnóstico e avaliação de tratamento. É uma metodologia cada vez mais empregada em estudos envolvendo diferentes tipos tumorais, como mieloma (FRANCO *et al.*, 2017), câncer de mama (GONZÁLEZ-SOLÍS; LUÉVANO-COLMENERO; VARGAS-MANCILLA, 2013), câncer cervical (RASHID *et al.*, 2014); e diversas outras patologias como a hepatite C (DITTA *et al.*, 2019) e a dengue (REHMAN *et al.*, 2012).

Ainda no campo biológico, a técnica não se limita ao estudo de patologias, como demonstrado no presente trabalho, a espectroscopia Raman é uma poderosa aliada no estudo de tipos celulares, avaliando, por exemplo, o padrão de diferenciação de linfócitos T e B do sistema imune (ICHIMURA *et al.*, 2016) e os mecanismos da proliferação celular (SHORT *et al.*, 2005).

Os dados adquiridos em estudos como o nosso fornecem base para os futuros desafios da espectroscopia Raman: o desenvolvimento de bancos de dados espectrais abrangentes e o estabelecimento de metodologias de classificação que possam ser equiparáveis aos padrões ouro atuais. Auxiliando também no aprimoramento de técnicas de processamento, aquisição e classificação de dados.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho permitiu estabelecer o modelo *in vitro* de polarização de macrófagos no Laboratório de Biologia Celular da UFAL, abrindo perspectivas para o estudo dos aspectos celulares e moleculares envolvendo a diferenciação celular. Além disso, foi demonstrado que a espectroscopia Raman se mostra como uma ferramenta útil para distinguir perfis de polarização de macrófagos, a partir das alterações bioquímicas e moleculares das células, se firmando como técnica de alternativa para o estudo de diferenciação celular.

8. REFERÊNCIAS

- ALLAVENA, Paola *et al.* The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 1–9, 2008.
- ARAÚJO, Morgana V. *et al.* Flavonoids induce cell death in: *Leishmania amazonensis*: In vitro characterization by flow cytometry and Raman spectroscopy. **Analyst**, [s. l.], v. 144, n. 17, p. 5232–5244, 2019.
- ARORA, Shweta *et al.* Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. **Immunobiology**, [s. l.], v. 223, n. 4–5, p. 383–396, 2018.
- BAI, Jing *et al.* Contact-dependent carcinoma aggregate dispersion by M2a macrophages via ICAM-1 and β 2 integrin interactions. **Oncotarget**, [s. l.], v. 6, n. 28, p. 25295–25307, 2015.
- BENOIT, Marie; DESNUES, Benoît; MEGE, Jean-Louis. Macrophage Polarization in Bacterial Infections. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 181, n. 6, p. 3733–3739, 2008.
- BERTANI, Francesca R. *et al.* Classification of M1/M2-polarized human macrophages by label-free hyperspectral reflectance confocal microscopy and multivariate analysis. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.
- CAMPION, Alan *et al.* Identification of Foreign Particles in Human Tissues Using Raman Microscopy. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 90, n. 14, p. 8362–8369, 2018.
- CHANMEE, Theerawut *et al.* Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. **Cancers**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 1670–1690, 2014.
- DA SILVA, Elaine Cristina Oliveira *et al.* Drug-induced anti-inflammatory response in A549 cells, as detected by Raman spectroscopy: A comparative analysis of the actions of dexamethasone and: p -coumaric acid. **Analyst**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 1622–1631, 2019.
- DELAVERY, Babak Mahdavian *et al.* Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology**, [s. l.], v. 216, n. 7, p. 753–762, 2011.
- DITTA, A. *et al.* Principal components analysis of Raman spectral data for screening of Hepatitis C infection. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 221, p. 117173, 2019.
- DUQUE, Guillermo Arango; DESCOTEAUX, Albert. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 5, n. OCT, p. 1–12, 2014.
- EPELMAN, Slava; LAVINE, Kory J.; RANDOLPH, Gwendalyn J. Origin and Functions of Tissue Macrophages. **Immunity**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 21–35, 2014.
- FARHANE, Zeineb; BONNIER, Franck; BYRNE, Hugh J. An in vitro study of the interaction of the chemotherapeutic drug Actinomycin D with lung cancer cell lines using Raman micro-spectroscopy. **Journal of Biophotonics**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–

12, 2018.

FEITO, María José *et al.* Characterization of M1 and M2 polarization phenotypes in peritoneal macrophages after treatment with graphene oxide nanosheets. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 176, n. September 2018, p. 96–105, 2019.

FLANNAGAN, Ronald S.; JAUMOUILLÉ, Valentin; GRINSTEIN, Sergio. The cell biology of phagocytosis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, [s. l.], v. 7, n. June 2014, p. 61–98, 2012.

FRANCO, Domenico *et al.* Raman spectroscopy differentiates between sensitive and resistant multiple myeloma cell lines. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 187, p. 15–22, 2017.

GINHOUX, Florent *et al.* New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 34–40, 2016.

GONZÁLEZ-SOLÍS, J. L.; LUÉVANO-COLMENERO, G. H.; VARGAS-MANCILLA, J. Surface enhanced Raman spectroscopy in breast cancer cells. **Laser Therapy**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 37–42, 2013.

GORDON, Siamon. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. **Immunity**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 463–475, 2016.

GORDON, Siamon; MARTINEZ, Fernando O. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. **Immunity**, [s. l.], v. 32, n. 5, p. 593–604, 2010.

HANLON, E. B. *et al.* Prospects for in vivo Raman spectroscopy. **Physics in Medicine and Biology**, [s. l.], v. 45, n. 2, 2000.

HEINRICH, Franziska *et al.* **Morphologic, phenotypic, and transcriptomic characterization of classically and alternatively activated canine blood-derived macrophages in vitro.** [s.l: s.n.]. v. 12

HUME, David A. The mononuclear phagocyte system. **Current Opinion in Immunology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 49–53, 2006.

ICHIMURA, Taro *et al.* Non-label immune cell state prediction using Raman spectroscopy. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. June, p. 1–7, 2016.

LAVIN, Yonit *et al.* Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. **Cell**, [s. l.], v. 159, n. 6, p. 1312–1326, 2014.

LEE, Kun Yeong. M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. **Medical Biological Science and Engineering**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 1–5, 2019.

MANTOVANI, Alberto *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, [s. l.], v. 25, n. 12, p. 677–686, 2004.

MARTINEZ, Fernando O.; GORDON, Siamon. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. **F1000Prime Reports**, [s. l.], v. 6,

n. March, p. 1–13, 2014.

MENG, Fanyang; LOWELL, Clifford A. Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 185, n. 9, p. 1661–1670, 1997.

MONDOL, Abdullah Saif *et al.* New perspectives for viability studies with high-content analysis Raman spectroscopy (HCA-RS). **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

MOVASAGHI, Zanyar; REHMAN, Shazza; REHMAN, Ihtesham U. Raman spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, [s. l.], v. 42, n. 5, p. 493–541, 2007.

MURRAY, Peter J. *et al.* Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. **Immunity**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 14–20, 2014.

ONG, Yi Hong; LIM, Mayasari; LIU, Quan. Comparison of principal component analysis and biochemical component analysis in Raman spectroscopy for the discrimination of apoptosis and necrosis in K562 leukemia cells: errata. **Optics Express**, [s. l.], v. 20, n. 22, p. 25041, 2012.

PALONPON, Almar F.; SODEOKA, Mikiko; FUJITA, Katsumasa. Molecular imaging of live cells by Raman microscopy. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 708–715, 2013.

PATEL, Urmi *et al.* Macrophage polarization in response to epigenetic modifiers during infection and inflammation. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 186–193, 2017.

PRATS MATEU, Batirtze *et al.* Label-free live cell imaging by Confocal Raman Microscopy identifies CHO host and producer cell lines. **Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2017.

QIAN, Bin Zhi; POLLARD, Jeffrey W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. **Cell**, [s. l.], v. 141, n. 1, p. 39–51, 2010.

RAMAN, C. V.; KRISHNAN, K. S. A new type of secondary radiation. **Nature**, [s. l.], v. 121, n. 3048, p. 501–502, 1928.

RASHID, Nosheen *et al.* Raman microspectroscopy for the early detection of pre-malignant changes in cervical tissue. **Experimental and Molecular Pathology**, [s. l.], v. 97, n. 3, p. 554–564, 2014.

REHMAN, A. *et al.* Dengue blood analysis by Raman spectroscopy. **Laser Physics**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 1085–1089, 2012.

RIABOV, Vladimir *et al.* Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 5 MAR, n. March, p. 1–13, 2014.

SARADNA, Arjun *et al.* Macrophage polarization and allergic asthma. **Translational Research**, [s. l.], v. 191, p. 1–14, 2018.

SAVILL, John *et al.* A blast from the past: Clearance of apoptotic cells regulates immune responses. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 2, n. 12, p. 965–975, 2002.

SHORT, Kurt W. *et al.* Raman spectroscopy detects biochemical changes due to proliferation in mammalian cell cultures. **Biophysical Journal**, [s. l.], v. 88, n. 6, p. 4274–4288, 2005.

SICA, Antonio *et al.* Macrophage polarization in tumour progression. **Seminars in Cancer Biology**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 349–355, 2008.

SICA, Antonio; MANTOVANI, Alberto. Plasticity and Polarization. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 122, n. 3, p. 787–795, 2012.

SMIT, Eureka *et al.* Differentiation of human monocytes in vitro following exposure to canova iSMIT, Eureka *et al.* Differentiation of human monocytes in vitro following exposure to canova in the absence of cytokines. **Ultrastructural Pathology**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 147–152. **Ultrastructural Pathology**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 147–152, 2008.

SMITH, Rachael; WRIGHT, Karen L.; ASHTON, Lorna. Raman spectroscopy: An evolving technique for live cell studies. **Analyst**, [s. l.], v. 141, n. 12, p. 3590–3600, 2016.

TAMAS, Roszer. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. **Mediators of inflammation**, [s. l.], v. 2015, p. 16–18, 2015.

TSAO, Simon Chang Hao *et al.* Characterising the phenotypic evolution of circulating tumour cells during treatment. **Nature Communications**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–44, 2018.

VAN FURTH, R. *et al.* The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. **Bulletin of the World Health Organization**, [s. l.], v. 46, n. 6, p. 845–852, 1972.

VARIN, Audrey *et al.* Alternative activation of macrophages by IL-4 impairs phagocytosis of pathogens but potentiates microbial-induced signalling and cytokine secretion. **Blood**, [s. l.], v. 115, n. 2, p. 353–362, 2010.

XUE, Jia *et al.* Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. **Immunity**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 274–288, 2014.

YANG, Li; ZHANG, Yi. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. **Journal of hematology & oncology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 58, 2017.

YANG, Li *et al.* Flavonoids induce cell death in: *Leishmania amazonensis*: In vitro characterization by flow cytometry and Raman spectroscopy. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 5232–5244, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.018>>

ZERVANTONAKIS, Ioannis K. *et al.* Three-dimensional microfluidic model for tumor cell intravasation and endothelial barrier function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 109, n. 34, p.

13515–13520, 2012.