

# DIFERENCIAÇÃO DE MONÓCITOS-MACRÓFAGOS DE *GALLUS GALLUS*: UMA ABORDAGEM MORFOLÓGICA

**Marco Cesar Cunegundes Guimarães**

D.Sc., professor do departamento de morfologia da Universidade Federal do Espírito Santo, Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer Humano

[marco.cunegundes@gmail.com](mailto:marco.cunegundes@gmail.com)

**Reubes Valério da Gama Filho**

D.Sc., professor de fisiologia da Universidade Salgado de Oliveira.

## Resumo

Monócitos – macrófagos, células pertencentes ao sistema mononuclear fagocítico, são considerados como a primeira linha de defesa imunológica. Macrófagos participam da imunidade inata, servindo como células fagocíticas. Essas células surgem na medula óssea e, posteriormente, entram na circulação sanguínea como monócitos sanguíneos. Ao migrarem para vários tecidos, os monócitos se maturam e se diferenciam em macrófagos teciduais. Estes macrófagos passam a desempenhar atividades relacionadas ao processamento e apresentação de antígenos. Os macrófagos desempenham um papel importante na modulação da resposta inflamatória. Estas células são responsáveis pela produção e secreção de um número de agentes pró-inflamatórios. O presente trabalho procurou demonstrar as diferenças morfológicas de macrófagos ativados e não-ativados de galinha e, relacioná-los com resultados de diferenciação em camundongos. Para obtenção dos resultados foram utilizados ferramentas de microscopia óptica e eletrônica de varredura.

**Palavras-chave:** Monócito, macrófago, mudança morfológica, *Gallus gallus* e microscopia.

## Abstract

Monocytes-macrophages, cells belonging to the mononuclear phagocytic system, are considered as the first line of immunological defense. Being mobile scavenger cells, macrophages participate in innate immunity by serving as phagocytic cells. These cells arise in the bone marrow and subsequently enter the blood circulation as blood monocytes. Upon migration to various tissues, monocytes mature and differentiate into tissue macrophages. Macrophages then initiate the 'acquired' immune response in their capacity as antigen processing and presenting cells. While responding to their tissue microenvironment or exogenous antigenic challenge, macrophages may secrete several immunoregulatory cytokines or metabolites. This study aimed to demonstrate the morphological differences of activated macrophages and non-activated chicken, and relate them to results of differentiation in mice. To obtain the results were tools used light microscopy and scanning electron.

**Keywords:** Monocytes, macrophages, morphological changes, *Gallus gallus* and microscopy.

## Introdução

Macrófagos desempenham um papel chave na regulação do sistema imunológico, orientando as respostas imunes inatas e específicas [1]. Em estágios iniciais de invasão microbiana ou de injúrias teciduais, macrófagos defendem a homeostase local e sistêmica iniciando uma complexa série de eventos celulares e bioquímicos. Esses ajustes patofisiológicos são mediados por uma extensa variedade de moléculas comunicantes, incluindo citocinas, inibidores de citocinas, hormônios endócrinos, eicosanóides, neurotransmissores e intermediários reativos de oxigênio [1,2].

A diferenciação de macrófagos depende inicialmente da formação de monócitos que ocorre na medula óssea. Monócitos são diferenciados a partir de células tronco hematopoiéticas precursoras [3]. Os Monócitos circulam na corrente sanguínea durante cerca de um a três dias e, em seguida, movem-se para os tecidos por todo o corpo. Constituem entre 3-8% dos leucócitos no sangue. Nos tecidos, monócitos maduros se diferenciam em vários tipos de macrófagos em variadas localizações anatômicas [4, 5].

O processo de migração de monócitos, pela corrente sanguínea, para outros tecidos, permite a diferenciação em macrófagos residentes [6]. Macrófagos de diferentes tecidos são conhecidos por diferir com respeito às funções desenvolvidas [7, 8].

Os macrófagos podem ser classificados basicamente em residentes e ativados. Macrófagos obtidos de organismos normais, ou seja, não infectados e sem inflamação são denominados residentes, apresentando capacidade mínima de destruir microrganismos, secretando proteases em baixa quantidade, e pouca capacidade para responder a citocinas [9, 10, 11].

Embora os monócitos e macrófagos residentes sejam fagócitos efetivos, podem ser facilmente ativados de forma que suas funções sejam significativamente potencializadas [12].

Em geral, o sistema imune de aves funciona nos mesmos princípios gerais que o sistema imune de mamíferos [13]. Uma estimulação antigênica inicia a resposta imune que envolve cooperação celular entre macrófagos, linfócitos B e linfócitos T [14].

Em aves, o desenvolvimento de fagócitos mononucleares parece ser o mesmo que em mamíferos [15, 16, 17]. Funcionalmente, macrófagos e monócitos de aves são avidamente fagocíticos, especialmente frente a bactérias opsonizadas [18, 19, 20].

Este trabalho visa demonstrar as mudanças morfológicas desenvolvidas durante o processo de ativação de macrófagos.

### **Metodologia**

#### ***Animais***

A ave utilizada nesse experimento foi da espécie Lehorn Branca, oriunda da estação experimental de pesquisa agropecuária do estado do Rio de Janeiro (PESAGRO).

#### ***Obtenção de monócitos de aves***

Para a obtenção da cultura de monócitos de aves utilizou-se a metodologia descrita por DaMatta [21]. Brevemente, 1 mL de sangue foi coletado da veia da asa da galinha. A seringa estava com anticoagulante. A amostra foi diluída com meio Hank's na proporção de 1:1 e colocado sob um colchão de percoll 60% (índice de refração 1.347). Este tubo foi centrifugado a 600g, 25°C por 20 minutos. Após a centrifugação formou-se um anel de leucócitos, que foi aspirado com pipeta Pasteur e colocado em outro tubo. As células foram lavadas com Hank's duas vezes e ressuspensas em DMEM. Os monócitos foram contados na câmara de Neubauer e sua concentração ajustada para  $2 \times 10^7$  células/mL. As células foram semeadas em placas de cultura por 4 dias em estufa a 37°C e 5.0% de CO<sub>2</sub> para obtenção de macrófagos após a diferenciação.

#### ***Cultivo e ativação das células***

Após o plaqueamento das células, monócitos foram cultivados durante 4 dias em DMEM, 8% de SFB e 2% de soro de galinha, em estufa de CO<sub>2</sub> para se diferenciarem em macrófagos. Então, no quarto dia de cultivo, os macrófagos foram ativados com 1µg/mL de LPS e interferon de galinha (25% do volume de cultivo era de meio condicionado de célula de baço com concanavalina A). O INF-γ de galo foi obtido através da cultura de células do baço.

#### **Microscopia óptica**

A alteração morfológica das células foi investigada por microscopia óptica. As células foram observadas com microscópio Zeiss Axioplan equipado com contraste interferencial (DIC), usando a objetiva de 100x.

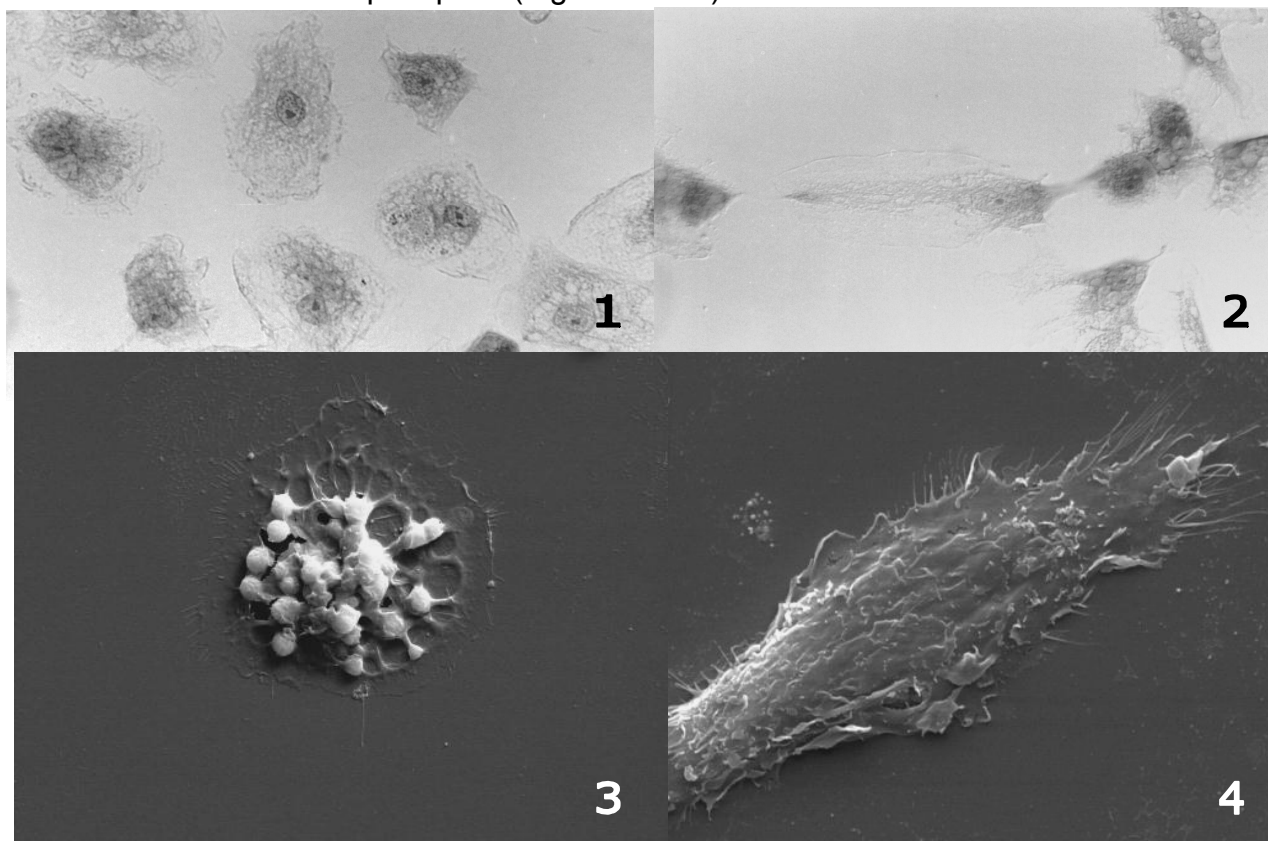
Para a análise morfológica os macrófagos foram fixados com Bouin, corados com Giemsa, desidratados e montados em Entellan. Estas foram observadas e fotografadas no microscópio óptico.

#### **Microscopia eletrônica de varredura**

Para a análise de macrófagos ativados e não ativados foram fixados com 4% de formaldeído e 2% de glutaraldeído em 0,1M de tampão cacodilato, pH 7,2. As células foram lavadas e pós-fixadas em 1% de tetróxido de ósmio, desidratado em etanol, seco pelo ponto crítico (CO<sub>2</sub>), recoberto com ouro e observado num microscópio eletrônico de varredura ZEISS 964.

#### **Resultados e Discussão**

Percebeu-se que após a ativação ocorreram mudanças morfológicas dos macrófagos. A caracterização na microscopia óptica mostrou que macrófagos não ativados possuem uma forma mais arredondada (Figura 1). Após a ativação ocorre um alongamento dos macrófagos (figura 2). A microscopia de varredura confirmou os dados obtidos com a microscopia óptica (Figuras 3 e 4).



**Figura 1 e 2.** Caracterização de macrófagos de galinha derivados de monócitos ativados e não-ativados por microscopia óptica. 1) Macrófagos não-ativados corado por Giemsa. 2) Macrófago ativado corado por Giemsa. **Figuras 3 e 4.** Caracterização de macrófagos de galinha derivados de monócitos ativados e não-ativados por microscopia eletrônica de varredura. 3) Macrófago não-ativado. 4) Macrófago ativado.

Nossos resultados mostram que macrófagos de galinha se espalham mais após a ativação, provavelmente em razão das alterações morfológicas e metabólicas para realização do processo de fagocitose. Estes dados indicam que macrófagos derivados de monócitos se comportam de forma similar a macrófagos de camundongo ativados.

Pode-se concluir, portanto, que apesar das semelhanças estruturais são necessários mais estudos para confirmar e entender melhor essas diferenças.

### **Referências Bibliográficas**

Glick B, Sato K, Cohenour F. Comparison of the phagocytic ability of normal and bursectomized birds. *J Reticuloendothel Soc* 1964;1:442-49.

Sabet T, Hsia WC, Stanisiz M, Dxomeiri A, Van Alten P. A simple method for obtaining peritoneal macrophages from chickens. *J Immunol Meth* 1977;11:103-10.

Qureshi MA, Dietert RR, Bacon LD. Genetic variation in the recruitment and activation of chicken peritoneal macrophages. *Proc Soc Exp Biol Med* 1986;181:560-8.

Trembicki KA, Qureshi MA, Dietert RR. Avian peritoneal exudate cells: a comparison of stimulation protocols. *Devel Comp Immunol* 1984;8:395-402.

Harmon BG, Glisson JR, Nunnally JC. Turkey macrophage and heterophil bactericidal activity against *Pasteurella multocida*. *Avian Dis* 1992;36:986-91.

Qureshi MA, Dietert RR. Bacterial uptake and killing by macrophages. In: Burleson GR, Dean J, Munson A, editors. *Methods in immunotoxicology*, vol. 2. NY:Wiley-Liss, 1995. p. 119-31.

Qureshi MA, Miller L, Lillehoj HS, Ficken MD. Establishment and characterization of a chicken mononuclear cell line. *Vet Immunol Immunopath* 1990;26:237-50.

Beug H, Kirchbach A, Doderlein G, Conscience JF, Graf T. Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell* 1979;18:375-90.

Qureshi MA, Marsh JA, Dietert RR, Sung Y-J, Nicholas-Bolnet C, Petite JN. Profiles of chicken macrophage effector functions. *Poult Sci* 1994;73:1027-34.

Hussain I, Qureshi MA. The expression and regulation of inducible nitric oxide synthase gene differ in macrophages from chickens of different genetic background. *Vet Immunol Immunopathol* 1998;61:317-29.

Bombara CJ, Taylor Jr. RL. Signal transduction events in chicken interleukin-1 production. *Poult Sci* 1991;70:1372-80.

Cieszynski JA, Qureshi MA, Taylor Jr. RL. Calcium role in chicken IL-1 secretion. *Poult Sci* 1999;78:70-4.

Kaspers B, Lillehoj HS, Lillehoj EP. Chicken macrophages and thrombocytes share a common cell surface antigen defined by a monoclonal antibody. *Vet Immunol Immunopath* 1993;36:333-46.

Trembicki KA, Qureshi MA, Dietert RR. Monoclonal antibodies reactive with chicken peritoneal macrophages: identification of macrophage heterogeneity. *Proc Soc Exp Biol Med* 1986;183:28-41.

Jeurissen SHM, Janse EM. Distribution and function of non-lymphoid cells in liver and spleen of embryonic and adult chickens. In: Bhogal BS, Koch G, editors. *Recent advances in avian immunology research*. NY: Alan R. Liss, 1989. p. 149-57.

Chu Y, Dietert RR. The chicken macrophage response to carbohydrate-based irritants: temporal changes in peritoneal cell populations. *Dev Comp Immunol* 1988;12:109-19.

Qureshi MA, Bloom SE, Hamilton JW, Dietert RR. Toxic effects of methylmethanesulfonate (MMS) on activated macrophages from chickens. *Environ Molec Mutagenes* 1989;13:253-62.

Dietert RR, Golemboski KA, Bloom SE, Qureshi MA. The avian macrophage in cellular immunity. In: Sharma JM, editor. *Avian cellular immunology*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1991. p. 71-95.

Qureshi MA, Miller L. Signal requirements for the acquisition of tumoricidal competence by chicken peritoneal macrophages. *Poult Sci* 1991;70:530-8.

Biozi G, Stiffel C, Mouton D, Bouthillier Y, Decreusefond C. Cytodynamics of the immune response in two lines of mice genetically selected for 'high' and 'low' antibody synthesis. *J Exp Med* 1972;135:1071-94.

DaMatta R, Manhães LDS, Seabra SH, De Souza W. Coculture of chicken thrombocytes and monocytes: morphological changes and lectin binding. *Biocell*, 22(1):45-52, 1998.