THAIS FERNANDA DE ALMEIDA GALATRO

**Perfil de expressão gênica da micróglia humana e
suas alterações relacionadas ao glioma**

SÃO PAULO

2016

THAIS FERNANDA DE ALMEIDA GALATRO

**Perfil de expressão gênica da micróglia humana e
suas alterações relacionadas ao glioma**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Neurologia
Orientadora: Profa. Dra. Suely Kazue
Nagahashi Marie

SÃO PAULO

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Galatro, Thais Fernanda de Almeida

Perfil de expressão gênica da micróglia humana e suas alterações relacionadas ao glioma / Thais Fernanda de Almeida Galatro. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Neurologia.

Orientadora: Suely Kazue Nagahashi Marie.

Descritores: 1.Micróglia 2.Glioma 3.Glioblastoma 4.Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala 5.Mutação 6.Expressão gênica 7.Citometria de fluxo

USP/FM/DBD-306/16

Nada na vida deve ser temido, apenas compreendido. Agora é a hora de compreender mais para temer menos.

Marie Curie

Para minha mãe,
minha companheira nessa
aventura.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus.

Agradeço a toda minha família, pelo amor e apoio incondicional que demonstram tanto e sempre. À minha mãe Creusa, maior fonte de sabedoria e inspiração que irei conhecer, agradeço tanto e por tantas coisas que me faltam palavras. Obrigada pelo voto de confiança na minha empreitada além-mar, por suportar a saudade e as 12 horas de viagem para cruzar o Oceano Atlântico. À minha irmã Barbara (Babosa), pelo entusiasmo, companhia e espírito de aventura, obrigada! À minha irmã Cintia (Quica), por sempre zelar pelo meu bem, custe o que custar. À minha adorável sobrinha Nasta, pelos tão necessários momentos de descontração! Obrigada a todas pelo apoio na realização de um sonho!

Agradeço à Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie, minha orientadora, por todas as oportunidades concedidas, pela confiança, por todos os ensinamentos – os científicos e os não-científicos –, por toda a ajuda pelo carinho ao longo dos anos. Sua contribuição para meu crescimento científico, profissional e pessoal é inestimável. Em especial, gostaria de agradecer a oportunidade de executar parte desse trabalho em uma instituição internacional. Sua confiança e apoio durante esse período foram cruciais. Muito obrigada!

To my dear co-promotor, Dr Bart Eggen, I thank you for your kindness, for being so welcoming and partially responsible for the success of my time abroad. You have taught me a great deal and I miss our daily – not so scientific – talks quite a lot. You have pushed me to thrive for the best and I hope to have made you proud. Again, thank you!

Agradeço à Dra. Sueli Mieke Oba-Shinjo, minha conselheira para assuntos aleatórios e a quem devo mais – e mais e mais – do que algumas almas. Obrigada por todo auxílio, todos os conselhos nas horas de maior necessidade e por sempre transmitir sua serenidade quando mais precisei.

Agradeço às colegas de trabalho e amigas do LIM-15: Isabele e Clarisse, os elfos livres, sem as quais esse trabalho não seria possível, eu agradeço toda a ajuda, sempre descontraída, mesmo na hora do aperto. À Paula, agradeço todo apoio técnico, imprescindível para a realização desse trabalho, mas agradeço principalmente por sempre fazer meus dias mais descontraídos. Vou sentir sua falta! Às amigas Roseli, Laís, Daiane e Amanda, agradeço pelo apoio, descontração e por participarem de forma ativa e benéfica da minha jornada ao longo dos anos. Aos novos membros do nosso

grupo, Mariana, Kadu, Stella, Juliana Bri e Juliana Kap, obrigada por estarem sempre dispostos a ajudar e fazerem meus dias mais engraçados! Agradeço também ao grupo de Biologia Celular e Molecular do LIM-15 como um todo, em especial Rosa, Luís Lucas e Eliene, que tanto auxiliaram e contribuíram para meu bem-estar pessoal e profissional. Agradeço ao colega Túlio por seu incomparável comprometimento ao projeto. Muito obrigada!

Agradeço aos amigos de longa data, Franciele e Rodrigo. À primeira, por compartilharmos tudo, pensamentos, ideias, sentimentos, opiniões e o peso dos 30. E ao segundo, meu parceiro no crime há mais de vinte anos, agradeço suas palavras, presentes em todos os momentos desde a primeira infância. Vocês me fazem entender melhor o que é amizade a cada dia que passa. Aos amigos Daniele Barbosa, Diego, Matheus, Rafael e Thiago: sua mera presença e lembrança tornam a vida mais colorida. Agradeço às amigas Gisele, Ester, Bruna e Nádila, obrigada por fazerem parte da minha história científica e por continuarem alegrando meus dias.

To the Medical Physiology group, you have my uttermost gratitude, for making my experience abroad so fruitful. Nieske, you have been with me every step of the way, both here and there. Thank you for being an inspiration. Inge, my fellow collaborator, thank you for your partnership and professionalism. Ilia, Mr Vainchtein, also a collaborator, my days would not have been the same without you. Corein and Rianne, I cherish our friendship dearly and I miss you terribly. I cannot thank you enough for everything. I hope to see you soon! To Koen, Duco, Michel, Marissa, Betty, Evelyn, Loes, Harry, Henk, Tjalling, Rob, Inge, Trix (lovely Trix!), Armagan, Marcin, Wandert, Suss, Hilmar and Sjef, it was great to have been with you. My special thanks to Profs Dr Erike Boddeke and Dr Jon Laman, for giving me the opportunity to enjoy this experience abroad. Às amigas Thaiany e Clarissa, obrigada por dividirem essa experiência comigo e tornarem o tempo longe de casa mais divertido.

Agradeço ao Departamento de Anatomia Patológica, ao Grupo de Cirurgia de Epilepsia e ao Grupo de Tumores Encefálicos e Metástases da Divisão de Clínica Neurocirúrgica do Instituto Central do Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Aos neurocirurgiões Dr André Bianco e Egmond Alves, pelo profissionalismo e comprometimento, muito obrigada. Em especial, gostaria de agradecer ao Prof Carlos Pasqualucci, pelo apoio e por permitir a realização desse projeto, e a toda a equipe do Sistema de Verificação de Óbito. À Dra Mariana Veras, muito obrigada pela sua colaboração.

E por último, e não menos importante, a todos os pacientes incluídos neste projeto e suas famílias, que mesmo através do sofrimento, têm fé na Ciência e esperança no futuro, permitindo a realização deste trabalho. Sem eles, este estudo não seria possível.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	vi
SUMMARY	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. REVISÃO DA LITERATURA	2
1.1.1. Tumores do Sistema Nervoso Central	2
1.1.1.1. Astrocitoma Pilocítico	3
1.1.1.2. Gliomas difusos	4
1.1.1.3. Astrocitomas difusos	5
1.1.1.4. Oligodendrogliomas	6
1.1.1.5. Glioblastomas	6
1.1.2. Microambiente de Gliomas	10
1.1.3. Micróglia	10
1.1.3.1. Origem e desenvolvimento da micróglia	11
1.1.3.2. Funções da micróglia no cérebro normal	13
1.1.3.3. Micróglia em condições patológicas	15
1.1.3.4. Monócitos e macrófagos infiltrados	15
1.1.3.5. Ativação de Micróglia, MAGs e seu papel em gliomas	16
2. OBJETIVOS	20
3. METODOLOGIA	21
3.1. Casuística	21
3.1.1. Gliomas e tecido não-neoplásico proveniente de procedimento cirúrgico	21
3.1.2. Amostras do tecido encefálico humano post-mortem	22
3.2. Isolamento de micróglia humana de tecido post-mortem e amostras tumorais	23
3.3. Extração de DNA e RNA	24

3.4. Síntese de DNA complementar (cDNA) - Transcrição Reversa para qRT-PCR	25
3.5. Desenho de primers para qRT-PCR	25
3.6. PCR Quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	26
3.7. Quantificação relativa de expressão gênica	27
3.8. Pesquisa de mutações somáticas para subclassificação de GBM	28
3.9. Sequenciamento de RNA (RNA-seq)	28
3.10. Análise do RNA-seq de amostras de micróglia de autópsia	29
3.11. Análise do RNA-seq de amostras de micróglia tumoral	31
3.12. Imunohistoquímica	33
3.13. Análise por microscopia óptica	34
3.14. Imunofluorescência	34
3.15. Análises estatísticas para dados de expressão provenientes de qRT-PCR	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Expressão de marcadores de ativação de micróglia em gliomas	36
4.2. Estratificação molecular de glioblastomas	38
4.3. Expressão de marcadores de ativação de micróglia na subclassificação dos glioblastomas	39
4.4. Distribuição de marcadores de ativação em GBMs estratificado	43
4.5. Estratégia de sorting de micróglia humana	45
4.6. Isolamento agudo de micróglia pura de amostras de tecido post-mortem	46
4.7. Identificação da assinatura de expressão gênica da micróglia humana	47
4.8. Efeito do tempo post-mortem (PMD), gênero e idade na expressão gênica da micróglia humana	55
4.9. O perfil de expressão gênica da micróglia humana difere de macrófagos e monócitos	58
4.10. Os marcadores de micróglia humana encontrados são estáveis em condições patológicas	63
5. DISCUSSÃO	67

5.1. O perfil de ativação da micróglia/macrófagos em astrocitomas tende ao perfil anti-inflamatório	68
5.2. O subtipo Proneural de GBM apresenta um fenótipo misto de ativação da micróglia, enquanto que os subtipos Clássico e Mesenquimal apresentam um fenótipo anti-inflamatório	68
5.3. O perfil da expressão gênica da micróglia humana apresenta grande diferença do perfil murino e é caracterizado por genes de neuroproteção e manutenção da homeostase	69
5.4. Mudanças na expressão gênica da micróglia humana ao longo do envelhecimento estão relacionadas a sua função de neuroproteção	72
5.5. Diferenças entre gêneros na expressão gênica da micróglia humana estão restritas a genes dos cromossomos X e Y	73
5.6. Identificação de marcadores específicos e estáveis da micróglia humana	73
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
8. ANEXOS	90
8.1. Anexo 1	91
8.2. Anexo 2	99
8.3. Anexo 3	101
8.4. Anexo 4	103
8.5. Anexo 5	104
8.6. Anexo 6	106
8.7. Anexo 7	120

LISTA DE ABREVIATURAS

AGI Astrocitoma pilocítico ou grau I
AGII Astrocitoma de baixo grau ou grau II
AGIII Astrocitoma anaplásico ou grau III
ATP Adenosina Trifosfato
CD133 prominina 1
cDNA Ácido desoxirribonucléico complementar
C-terminal Carboxil-terminal
DNA ácido desoxirribonucléico
dNTP Deoxinucleotídeos trifosfatados
EDTA Ácido etilenodiaminotetracético
FMUSP Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GBM Glioblastoma multiforme
HC Hospital das Clínicas
HCl Ácido clorídrico
H&E Hematoxilina-eosina
KCl Cloreto de potássio
kDa Kilodalton
mg Miligrama
mM Milimolar
mRNA RNA mensageiro
NaCl Cloreto de sódio
Nanog Nanog homeobox
ng Nanograma
N-terminal Amino-terminal
OMS Organização mundial da saúde
p Braço curto do cromossomo
p Probabilidade
pb Pares de bases
PBS Solução tampão fosfato salina
PCR Peação em cadeia polimerase

pH Potencial de hidrogênio
q Braço longo do cromossomo
qRT-PCR PCR quantitativo em tempo real
r Coeficiente de correlação
RNA Ácido ribonucléico
rpm Rotações por minuto
RT-PCR Transcriptase Reversa PCR
SDS Dodecil sulfato de sódio
SNC Sistema nervoso central
TAE Tris-acetato EDTA
TE Tris-EDTA
μL Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Nova classificação dos gliomas

Figura 2: Principais vias de sinalização afetadas em GBM.

Figura 3: Os subtipos moleculares de GBM.

Figura 4: Ontogenia de macrófagos e micróglia.

Figura 5: Estados morfológicos da micróglia.

Figura 6: Ativação da micróglia.

Figura 7: Diferenças entre a micróglia e MAGs em gliomas.

Figura 8: Gráficos de dispersão representando a expressão dos genes CD11b (A), CD163 (B) e IL1B (C) em amostras de gliomas.

Figura 9: Distribuição da classificação molecular dos GBM.

Figura 10: Gráficos de dispersão representando a expressão dos genes CD11b, CD163 e IL1B em GBM de acordo com a estratificação molecular

Figura 11: Gráfico de Kaplan Meier ilustrando a diferença no tempo de sobrevida dos pacientes com GBM do subtipo Clássico.

Figura 12: Secções de corte da imunohistoquímica dos casos de GBM.

Figura 13: Ilustração do procedimento de obtenção, isolamento e sequenciamento da micróglia humana.

Figura 14: Sequenciamento do mRNA da micróglia isolada e do córtex correspondente.

Figura 15: Análise de clustering da correlação dos valores de RNA-seq entre amostras.

Figura 16: Heat map de expressão de genes microgliais, do córtex e da micróglia murina.

Figura 17: Heat map de expressão comparando os genes da assinatura restrita da micróglia humana com a assinatura murina.

Figura 18: Análise de vias associadas aos genes da assinatura da expressão gênica da micróglia humana.

Figure 19: Genes de diversas famílias imunes na comparação de expressão entre a micróglia humana e o córtex.

Figura 20: Rede de interação proteica dos genes pertencentes à assinatura restrita da micróglia humana. Mapa preditivo onde quatro compartimentos celulares são mostrados (espaço extracelular, membrana plasmática, citoplasma e núcleo).

Figura 21: Número de genes diferencialmente expressos em relação às variáveis idade, PMD e gênero

Figura 22: Heat map de expressão dos genes da micróglia associados a diferenças entre os gêneros.

Figura 23: Diferenças na expressão gênica da micróglia ao longo do envelhecimento.

Figura 24: Análise de clustering de correlação entre amostras de micróglia e outras células mielóides

Figura 25: Análise de clustering de correlação entre amostras de micróglia e outras células mielóides

Figura 26: Análise de vias associadas aos genes da assinatura específica da expressão gênica da micróglia humana e de monócitos/macrófagos.

Figura 27: Genes de diversas famílias imunes na comparação de expressão entre a micróglia humana, monócitos e macrófagos

Figura 28: Marcadores específicos da micróglia humana e macrófagos infiltrados.

Figura 29: Cortes seriais de uma amostra representativa de GBM.

Figura 30: Análise preliminar da comparação do transcriptoma da micróglia humana de glioma e de autópsia

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências de primers analisados por qRT-PCR

Tabela 2. Anticorpos primários utilizados para imunohistoquímica e especificações

Tabela 3. Correlação dos genes de perfil inflamatório em amostras de GBM

Todas as tabelas com resultados complementares citadas no texto (1, 2, 3 e 4) podem ser acessadas em *Tabelas Suplementares - TESE DE DOUTORADO THAIS FERNANDA DE ALMEIDA GALATRO - SÃO PAULO 2016*, pelo link abaixo:

<http://tinyurl.com/tabelas-suplementares>

Resumo

Galatro TFA. Perfil de expressão gênica da micróglia humana e suas alterações relacionadas ao glioma [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

A micróglia é essencial para a homeostase do Sistema Nervoso Central (SNC), função neuro-imune inata, e exerce papel importante na neurodegeneração, envelhecimento cerebral e tumorigênese. Gliomas difusos são tumores cerebrais primários caracterizados por crescimento infiltrativo e altas taxas de heterogeneidade, o que torna a doença praticamente incurável. Avanços em análises genéticas caracterizaram alterações moleculares relacionadas ao tempo de sobrevida e à resposta clínica desses pacientes, especialmente em glioblastomas (GBM). No entanto, a tumorigenicidade dos gliomas não é controlada unicamente por suas alterações genéticas. As interações entre as células tumorais, a micróglia residente e os macrófagos/monócitos infiltrados desempenham um papel crucial na modulação do crescimento e agressividade do glioma. Neste estudo, analisamos o fenótipo de ativação da micróglia/macrófagos em gliomas, incluindo astrocitomas e oligodendrogliomas de diferentes graus de malignidade, apresentamos o perfil de expressão gênica da população pura de micróglia cortical e do tecido cerebral total correspondente. Usando sequenciamento de DNA de alta performance, classificamos as amostras de GBM em Proneural, Clássico e Mesenquimal. Em seguida, avaliamos os status de ativação da micróglia/macrófagos dessas amostras. Apesar do alto grau de heterogeneidade, pudemos observar níveis mais altos dos marcadores mielóides (IBA1, CD11b and CD68) em tumores astrocíticos comparados a tumores de origem oligodendrocítica e ao tecido não-neoplásico. Marcadores de anti-inflamação, como CD163, foram mais abundantes em astrocitomas, bem como em GBMs do subtipo Mesenquimal e Clássico; enquanto que marcadores de pró-inflamação, como IL1-beta, mostraram uma expressão mais heterogênea entre as amostras. Em seguida, micróglia foi isolada de 25 amostras de córtex parietal provenientes de autópsia de indivíduos cognitivamente preservados e foi feito o RNA-seq. Os resultados foram comparados à micróglia de camundongo e a outras células mielóides. Boa parte dos genes expressos pela micróglia humana foram similares àqueles expressos pela micróglia murina, como CX3CR1, P2YR12 e ITGAM. Porém, foram identificados genes de característica imune, abundantemente expressos na micróglia humana e não identificados na micróglia de camundongos, como TLR, Fcγ, receptores do tipo SIGLEC, e fatores de transcrição NLRC5 e CIITA. A comparação dos dados de expressão gênica da micróglia com monócitos e macrófagos identificou novos marcadores que distinguem a micróglia humana de outras células mielóides. Nossos dados sobre a micróglia em gliomas sugerem características de imunossupressão e de pró-crescimento em tumores de pior prognóstico, ligado a um fenótipo específico de ativação das células mielóides. Este é o primeiro estudo a identificar o transcriptoma da micróglia humana pura, demonstrando que ela é claramente diferente da micróglia murina e de outras células mielóides. Esses resultados abrem portas para estudos de populações específicas de células mielóides em gliomas.

Descritores: micróglia, glioma, glioblastoma, sequenciamento de nucleotídeos em larga escala, mutação, expressão gênica, citometria de fluxo.

Summary

Galatro TFA. Human microglia expression profile and its alterations related to glioma [Thesis]. São Paulo: "Faculdade Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Microglia are essential for central nervous system (CNS) homeostasis and innate neuroimmune function, and play important roles in neurodegeneration, brain aging and tumorigenesis. Diffuse gliomas are primary brain tumors characterized by infiltrative growth and high heterogeneity, which renders the disease mostly incurable. Advances in genetic analysis have characterized molecular alterations leading to impact on patients' overall survival and clinical outcome, particularly in glioblastoma (GBM). However, glioma tumorigenicity is not controlled uniquely by its genetic alterations. The crosstalk between tumor cells, resident microglia and infiltrating monocytes/macrophages plays a crucial role in modulating glioma growth and aggressiveness. Here, we assess the activation status of microglia/macrophages in gliomas, including astrocytomas and oligodendrogliomas of different grades of malignancy, and present the gene expression profile of pure cortical human microglia and corresponding unsorted brain tissue. Using high-throughput DNA sequencing, we have classified GBM samples in Proneural, classical and mesenchymal. Next, we evaluated the activation status of microglia/macrophages within these samples. Despite the great heterogeneity, we observed higher levels of myeloid markers (IBA1, CD11b and CD68) in astrocytic tumors compared to oligodendrocytic ones and to non-neoplastic (NN) tissue. Anti-inflammation markers, such as CD163, are also more abundant in astrocytomas, as well as in the mesenchymal and classical GBM subtypes, while pro-inflammation markers, such as IL1-beta, show a more widespread expression throughout samples. Next, microglia were isolated from the parietal cortex of 25 autopsy samples of cognitively preserved humans and RNA sequenced. Overall, genes expressed by human microglia are similar to mouse microglia, such as CX3CR1, P2YR12, and ITGAM. Interestingly, a number of immune genes, not identified as mouse microglia signature genes, were abundantly expressed in human microglia, such as TLR, Fcγ and SIGLEC receptors and NLRC5 and CIITA transcription factors. Comparison of microglia to monocyte and macrophage expression data underscored the CNS-specific functions of microglia and new markers were identified that distinguish human microglia from other myeloid cells. Our glioma-related data suggests an immune-suppressive and growth supportive characteristic for tumors with worse clinical outcome, linked to an activation profile of myeloid cells. This data is the first comprehensive pure human microglia gene expression profile; human microglia clearly differ from mouse microglia and other myeloid cells. These results will help further studies focusing on pure myeloid cells populations in glioma.

Descriptors: microglia, glioma, glioblastoma, high-throughput nucleotide sequencing, mutation, gene expression, flow cytometry.

1.INTRODUÇÃO

A micróglia, célula imune do Sistema Nervoso Central, é essencial na manutenção da homeostase e proteção do cérebro. Por serem células extremamente plásticas, elas respondem prontamente à estímulos, tornando-se ativadas e exercendo funções inflamatórias. Gliomas, os tumores cerebrais mais comuns, possuem grandes quantidades dessas células em seu microambiente. A heterogeneidade intrínseca do glioma faz com que ele, dependendo do tipo do tumor, ele reaja de maneira diversa com as células ao seu redor. O avanço de técnicas de sequenciamento em larga escala permitiu a identificação e caracterização de subtipos moleculares desses tumores. No entanto, até o momento, houve pouco progresso nas opções de tratamento para a doença. Entender as relações entre as células do glioma e as células de seu microambiente pode contribuir para a identificação de novos alvos terapêuticos. Devido à grande quantidade de micróglia no microambiente tumoral, essas células são candidatas promissoras para estudo. Porém, um grande obstáculo é a falta de análises que caracterizem a micróglia normal, sem influências patológicas, em humanos.

Em parceria com o laboratório do Dr Bart J. L. Eggen, nós desenvolvemos esse projeto de forma a auxiliar no entendimento as alterações da micróglia em relação ao glioma. Analisamos seu fenótipo de ativação em grande casuística de gliomas, e correlacionamos os achados com as alterações genéticas encontradas nesses tumores. Além disso, caracterizamos o perfil de expressão gênica da micróglia humana em amostras de autópsia, correlacionando aspectos de idade e gênero, bem como comparando com os dados disponíveis de modelos animais murinos, algo ainda inédito na literatura.

Esse trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e na Universidade de Groningen, possibilitando a transferência de tecnologia entre os centros e novas colaborações que auxiliarão no desenvolvimento de projetos futuros.

1.1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1. Tumores do Sistema Nervoso Central

Os tumores do sistema nervoso central são raros, sendo a incidência mundial de tumores cerebrais primários de 7 indivíduos a cada 100.000 habitantes por ano (1). Eles representam um grupo bastante heterogêneo de neoplasias originárias de tecidos intracranianos e meninges. Variam em relação ao tecido de origem, quanto à localização, padrão de disseminação, quadro clínico, história natural, idade de ocorrência e prognóstico (2,3). Ainda que raros, esses tumores são extremamente agressivos, sendo que a porcentagem de sobrevivência 5 anos após diagnóstico pode chegar a 6,0% em alguns casos (1). A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece mais de 120 formas de tumores do SNC (4,5). Entre estes, os mais comuns são os gliomas.

Gliomas são um grupo heterogêneo de tumores primários neuroectodermais, que se originam de células gliais, como astrócitos e oligodendrócitos, ou de suas células progenitoras. Classificações prévias (4), subdividiam os gliomas em diferentes graus de malignidade (graus I-IV) baseadas principalmente na histologia, padrão de crescimento e comportamento dos tumores. A classificação mais atual mescla os padrões previamente utilizados com dados mutacionais, principalmente referente aos genes *IDH1* e *IDH2*, cujas alterações ocorrem muito cedo no processo da tumorigênese dos gliomas difusos (astrocitomas e oligodendrogliomas) (5,6). Desta forma, a classificação tornou-se mais dinâmica, baseada tanto no fenótipo quanto no genótipo dos tumores, agrupando marcadores de prognóstico similares e ajudando a guiar o tratamento para gliomas biológica e geneticamente similares. A nova classificação dos gliomas está exposta na Figura 1.

Figura 1: Nova classificação dos gliomas. Em 2016, a Organização Mundial de Saúde lançou a nova classificação para o diagnóstico de gliomas, baseando-se não somente na histologia, como também nas alterações moleculares desses tumores. Adaptado de Louis *et al*, 2016 (5). IDH, *isocitrate dehydrogenase (NADP(+))*; ATRX, *ATRX chromatin remodeler*; TP53, *tumor protein 53*.

1.1.1.1. Astrocitoma pilocítico

Os astrocitomas pilocíticos (AGI) são classificados como grau I pela OMS. Ocorrem principalmente no cerebelo de crianças (2). Ao contrário dos demais gliomas, apresentam-se circunscritos e com crescimento lento, podendo permanecer em grau I por anos e até décadas, o que mostra seu caráter menos maligno. Se a ressecção cirúrgica for possível, pacientes com esse tumor apresentam bom prognóstico (7).

Histologicamente, são caracterizados por baixa ou moderada celularidade, por um padrão bifásico com proporção variada de células bipolares compactadas com presença de fibras de Rosenthal e células soltas de estruturas multipolares com microcistos e corpos granulares (4). Proliferação vascular, proliferação celular, pleomorfismo, necrose não em paliçada e alguma atividade mitótica, ainda são consistentes com esse diagnóstico. Contudo, casos raros mostram alta atividade mitótica e necrose com formação em paliçada, que indicam comportamento de um tumor mais agressivo, sendo então classificado como astrocitoma pilocítico anaplásico (8).

A maioria desses tumores se desenvolve no cerebelo, e representam 10% dos astrocitomas cerebrais e 85% dos cerebelares. Outras regiões típicas

incluem estruturas como o nervo óptico e quiasma óptico, hipotálamo, tálamo, gânglios da base e tronco cerebral. Entretanto, astrocitomas pilocíticos também podem ser encontrados nos hemisférios cerebrais ou na medula espinhal. Macroscopicamente essas neoplasias apresentam-se como maleáveis, acinzentadas e, frequentemente, com lesões císticas (8).

A associação genética entre AGI e alterações no gene *NF1* (*neurofibromatosis type I*) é bem conhecida (9). *NF1* é um gene supressor de tumor que regula negativamente o oncogene *RAS*. Quando constitutivamente ativado, a proteína *RAS* leva à ativação subsequente da via de sinalização de *mTOR* (*mammalian target of rapamycin*) e de fatores de transcrição relacionados à proliferação celular.

A fusão entre os genes *KIAA1549* e *BRAF*, que leva a um ganho de 1,9MB no cromossomo 7q34, também está envolvida na biologia do astrocitoma pilocítico, e é a alteração molecular mais comum nesse tipo de tumor (10–12). O resultado dessa fusão é a perda do domínio amino-terminal da proteína *BRAF*, ativando constitutivamente sua atividade de quinase e aumentando a proliferação celular.

1.1.1.2. Gliomas difusos

Os gliomas difusos (graus II-IV, de acordo com a OMS (5)) são tumores de natureza invasiva e, por essa razão, ressecção cirúrgica completa é muito difícil de ser atingida. A presença de células tumorais residuais resulta na recorrência do tumor e na progressão maligna, ainda que a intervalos diferentes. Parte dos tumores de graus mais baixos irá recorrer ou progredir para um tumor de grau mais alto dentro de meses, enquanto que outra parte pode permanecer estável por anos. O mesmo pode ser dito para glioblastoma (GBM, grau IV), em que a taxa de recorrência é variável (13–15). Os fatores determinantes para um comportamento ou o outro ainda não foram totalmente elucidados.

1.1.1.3. Astrocitomas difusos

Os astrocitomas difusos, de grau II e III, são os mais comuns em adultos. Ao contrário do astrocitoma pilocítico, eles invadem o tecido encefálico normal, dificultando a ressecção cirúrgica e, portanto, apresentando pior prognóstico (15). Os astrocitomas de grau II e III podem progredir para grau IV (16), processo este de muita relevância clínica, já que pacientes com astrocitoma difuso (grau II) apresentam sobrevida média de 7 anos, tempo que cai pela metade em pacientes com astrocitoma anaplásico (grau III) e, no caso de pacientes com GBM, é menor que 15 meses (17).

Os astrocitomas difusos de grau II (AGII) são tumores bem diferenciados, que afetam adultos e podem estar localizados em qualquer região do SNC, mas preferencialmente nos hemisférios cerebrais. Os AGII são predominantes no gênero masculino, afetam frequentemente adultos jovens, com um pico na terceira década de vida, entre 30 e 40 anos (4). De pacientes com recidiva tumoral de AGII, a segunda amostra cirúrgica frequentemente mostra características de astrocitoma anaplásico, como hipercromasia, aumento de atipia nuclear, atividade mitótica, e, eventualmente, características de glioblastoma, como proliferação microvascular e/ou necrose.

Astrocitomas anaplásicos (AGIII) são caracterizados pelo aumento na proliferação e atipia celular, caminhando mais rapidamente para a letalidade. Os astrocitomas anaplásicos acometem preferencialmente homens adultos com idade média de 41 anos, apresentam anaplasia focal ou dispersa e um grande potencial proliferativo. Sua localização é semelhante à dos AGII, com preferência pelos hemisférios cerebrais (4). Esses tumores se originam da progressão de um astrocitoma de baixo grau, e, em um intervalo médio de aproximadamente 2 anos, possuem uma tendência intrínseca a progredirem para GBM. Assim, dos pontos de vista clínico, morfológico e genético, pode-se considerar que o astrocitoma anaplásico constitui um estágio intermediário na rota de progressão para um GBM (15).

Os astrocitomas difusos apresentam alterações moleculares características, que vieram à tona recentemente graças aos estudos genéticos

de alta performance (18,19). Mutações nos genes *IDH1/2* estão presentes na grande maioria dos casos, e foram listadas como cruciais para o diagnóstico dos gliomas no relatório mais recente da OMS (5). Mutações que inativam as funções de *ATRX* e *TP53* também são frequentes, sendo a primeira essencial para a diferenciação entre tumores. Alterações epigenéticas, como a metilação das ilhas CpG (G-CIMP), estão presentes em 55% dos casos de astrocitomas difusos (19).

1.1.1.4. Oligodendrogliomas

Os oligodendrogliomas (OD) correspondem à menos de 10% dos gliomas (1). Assim como os astrocitomas, ocorrem preferencialmente em adultos. Trata-se de tumores bem delimitados e mais circunscritos, mas que infiltram o tecido normal ao redor. Em cerca de 50% dos casos, há presença de calcificação. Microscopicamente, os oligodendrócitos neoplásicos são caracterizados por serem células monomórficas, com núcleo redondo e uniforme rodeado por halo (20). Estudos moleculares recentes de alta performance (18,19) identificaram a codeleção dos braços 1p/19q e mutações nos genes *TERT* e *FUBP1* como marcadores genéticos dos oligodendrogliomas. Juntamente com os dados sobre o *status* de mutação dos genes *IDH1* e *IDH2*, essas alterações formam a base para um melhor e mais completo diagnóstico desses tumores.

Pacientes com oligodendrogliomas possuem um melhor prognóstico do que aqueles com astrocitomas, com uma sobrevida média de 12-14 anos, sendo que o tumor pode permanecer silencioso por diversos anos. No entanto, em um número considerável de casos, há o desenvolvimento de tumores com características clínicas e histológicas mais agressivas, sendo esses classificados como anaplásicos (grau III) ou mesmo GBMs (5).

1.1.1.5. Glioblastomas

Glioblastomas (GBM), são os mais agressivos, mais malignos e mais frequentes dos gliomas, exibindo proliferação vascular, necrose e resistência ao

tratamento radioterápico e quimioterápico (21). GBMs ocorrem mais frequentemente na substância branca dos hemisférios cerebrais e podem se manifestar em qualquer idade, mas afetam preferencialmente homens adultos entre 45 e 70 anos de idade. Os GBMs podem originar-se *de novo* (GBM primários), o que ocorre na maioria dos casos, ou através da malignização de tumores pré-existentes (GBM secundários) (22). Os glioblastomas primários são mais frequentes em pessoas com mais idade (idade média de 55 anos), e se manifestam *de novo*, ou seja, sem qualquer evidência clínica ou histopatológica da existência de uma lesão menos maligna anterior. Já os glioblastomas secundários se desenvolvem tipicamente em pacientes mais jovens (idade média de 45 anos), através da progressão de um astrocitoma de baixo grau ou de um astrocitoma anaplásico. O tempo de evolução varia consideravelmente, com intervalos entre 1 ano ou mais de 10 anos (22).

Recentes avanços e aplicações de estratégias de sequenciamento em larga escala integradas permitiram a identificação de mutações características da gliomagênese e de progressão da doença (18,19,23–26) (Figura 2).

Figura 2: Principais vias de sinalização afetadas em GBM. Como é característico dos tumores malignos, GBMs apresentam alterações em vias de proliferação e controle da senescência, apoptose e ciclo celular. Adaptado de Brennan *et al*, 2013 (26). EGFR, *epithelial growth factor receptor*; PDGFRA, *platelet derived growth*; MET, *MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*; FGFR, *fibroblast growth factor receptor*; PTEN, *phosphatase and tensin homolog*; PIK(3)K, *phosphoinositide 3-kinase*; NF1, *neurofibromin 1*; MDM2, *MDM2 proto-oncogene*; MDM4, *MDM4 p53 reguklator*; CDKN2A/B/C, *cyclin dependent kinase inhibitor 2A*; CDK4/6, *cyclin-dependent kinase 4/6*; RB1, *RB transcriptional corepressor 1*.

Esses estudos permitiram a identificação de pelo menos 3 subtipos moleculares de GBM: Proneural, Neural, Clássico e Mesenquimal. O subtipo Proneural é caracterizado por alterações nos genes *IDH1/2*, *TP53* e *PDGFRA*. Pacientes com este tipo de GBM possuem um melhor prognóstico, sendo que foi previamente demonstrado que alterações em *IDH1/2* são fatores independentes de melhor prognóstico (27). Esses casos provavelmente advêm de GBMs secundários, que evoluíram de tumores de graus mais baixos. O subtipo neural não possui alterações genéticas específicas, e é melhor caracterizado por análises de expressão gênica. Encontram-se hiperexpressos nesse subtipo marcadores de neurônios normais, como *GABRA1* (*gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha1*) e *SYT1* (*synaptotagmin-1*), além de outros genes como *MBP* (*myelin basic protein*) e *SNCG* (*synuclein gamma*) (23).

Os outros dois subtipos, Clássico e Mesenquimal, apresentam um painel de alterações moleculares distinto, porém esses pacientes apresentam um prognóstico parecido, pior do que o subtipo Proneural. A identidade do subtipo Clássico é definida por amplificações no cromossomo 7, deleções no cromossomo 10 e principalmente por alterações no gene *EGFR*, com a presença da variante oncigênica *EGFRVIII*, em mais de 95% dos casos e deleção do gene *CDKN2A* (23). Já o subtipo Mesenquimal tem por característica mutações no gene *NF1* em 57% dos casos, mutações no gene *RB1* em 13% dos casos e aumento de expressão dos genes *CHI3L1* (*chitinase-3-like protein 1*) e *MET*, relacionados à transição epitélio-mesênquima e característico de um pior prognóstico (23,25).

Os estudos aqui citados possibilitaram a identificação de alterações características de cada subtipo, porém, não se pode ignorar a grande sobreposição que existe entre eles, como mostra a Figura 3. Vale lembrar que poucas dessas alterações acontecem em *hotspots* – regiões onde se concentram determinadas mutações (28) –, como as que ocorrem em *IDH1* e a variante oncogênica *EGFRVIII*, evidenciando a necessidade de uma análise global das alterações somáticas em GBM.

Figura 3: Os subtipos moleculares de GBM. Baseando-se em análises de alterações somáticas do DNA, foi possível identificar os diferentes subtipos moleculares de GBM. Com exceção do subtipo neural, nichos de alterações genéticas específicas foram encontradas para cada um. Del, deleção; Amp, amplificação; SNV, *single nucleotide variation*; G-CIMP, metilação das ilhas CpG. Adaptado de Brennan *et al*, 2013 (26). Para uma lista completa dos nomes referentes aos símbolos gênicos expostos na figura, referir ao trabalho de Brennan *et al*, 2013.

Ainda que as descobertas de grupos de alterações gênicas que caracterizam cada um desses subtipos tenham melhor elucidado a biologia dos glioblastomas e a complexidade de sua heterogeneidade intrínseca, opções de tratamento eficientes tornam-se cada vez mais difíceis devido à plethora de alvos terapêuticos a serem visados (29).

1.1.2. Microambiente tumoral de gliomas

A tumorigenicidade dos gliomas não é atribuída unicamente às suas alterações genéticas. As trocas que ocorrem entre as células tumorais e as células do microambiente em que o tumor se encontra exercem papel crucial na modulação do seu crescimento e agressividade. Fazem parte desse

microambiente células-tronco tumorais, células endoteliais, pericitos, as células normais do SNC, como astrócitos e neurônios, e leucócitos (30). A distribuição dessas células dentro do glioma leva à formação de nichos específicos, tornando o microambiente do glioma extremamente heterogêneo e possibilitando diferentes respostas à comunicação das células tumorais com essa gama de células neoplásicas e não-neoplásicas. Como consequência, há a manutenção do crescimento tumoral e sua resistência aos ataques do sistema imune e de tratamentos (31).

As células não-neoplásicas mais abundantes nesse microambiente tumoral, correspondendo a até 30% das células, são leucócitos pertencentes à linhagem mielóide, e compreendem a micróglia, residente do SNC, e monócitos/macrófagos infiltrados provenientes da corrente sanguínea (subsequentemente referidos como MAGs, monócitos/macrófagos associados ao glioma) (32). As próximas seções dessa revisão de literatura irão descrever essas células.

1.1.3. Micróglia

Micróglia são as células da imunidade inata do Sistema Nervoso Central (SNC), representando aproximadamente 10% das células totais do cérebro (33). Elas são especializadas, plásticas e versáteis em suas funções e altamente adaptadas ao SNC. Foram descritas pela primeira vez por Río Hortega, no início do século 20 (34), que detalhou sua morfologia, composta por um corpo celular e diversas ramificações. Durante o desenvolvimento, essas células exercem um papel crucial na delimitação das redes neuronais devido ao seu contínuo monitoramento de seu microambiente, função essa que continua no indivíduo adulto e é primordial na promoção da homeostase (35,36).

1.1.3.1. Origem e desenvolvimento da micróglia

À princípio, pensava-se que a micróglia era morfológica e molecularmente parecida com outros macrófagos tecido-residentes. Estudos de *fate mapping* – uma técnica de estudo para verificação da origem embrionária dos tecidos, que

estabelece a correspondência entre as células – mostraram que, na verdade, a micróglia possui uma ontogenia diferente desse macrófagos (37,38). Em camundongos, as células da micróglia desenvolvem-se unicamente a partir de uma célula progenitora microglial eritro-meilóide da vesícula vitelina e migram para o cérebro muito cedo durante o desenvolvimento, ao contrário dos outros macrófagos tecido-residentes, que têm um desenvolvimento mais tardio e passam pelo fígado fetal antes de migrar para seus tecidos específicos (39–42) (Figura 4). Esses estudos mostraram que a microgliogênese é altamente dependente de fatores como CSFR1 (*colony stimulating factor receptor 1*) e os fatores de transcrição PU.1 e IRF8 (*interferon regulatory factor 8*) (40).

Figura 4: Ontogenia de macrófagos e micróglia. Estudos com camundongos revelaram que as células de origem de macrófagos teciduais e monócitos passam por um período de maturação no fígado fetal antes de migrar para seus tecidos específicos. Já as células progenitoras microgliais migram diretamente da vesícula vitelina para o neuroepitélio, processo esse que ocorre antes do desenvolvimento e acúmulo no fígado fetal das células que darão origem aos macrófagos teciduais. Tempo medido em dias do estágio do desenvolvimento (E-7 a E11). Adaptado de Ransohoff, 2011 (43).

Após a infiltração dessas células progenitoras eritro-meilóides no cérebro, a micróglia torna-se autossuficiente e, em condições homeostáticas, não ocorre infiltração de monócitos/macrófagos circulantes (43,44). Estudo recente (45), onde houve a depleção das células microgliais do cérebro de camundongos utilizando-se inibidores de CSFR1, mostrou que essa população é substituída por uma nova micróglia uma semana após o fim da inibição, revelando a existência de uma população de células progenitoras microgliais positivas para

Nestina. Outro estudo que utilizou ablação gênica da micróglia (46) demonstrou que a micróglia forma aglomerados de células proliferativas que expressam altos níveis de IL1R1 (*interleukin 1 receptor 1*), e que esse grupo de células é responsável pela repopulação microglial do cérebro em camundongos.

Podemos concluir que a micróglia compreende um grupo celular diverso, com alta capacidade adaptativa às condições impostas pelo microambiente.

1.1.3.2. Funções da micróglia no cérebro normal

As funções da micróglia estão centradas tanto no aspecto imune quanto no aspecto neurobiológico. Seu papel de monitoramento durante a homeostase é bem estabelecido, bem como sua participação na defesa do SNC em caso de infecções bacterianas e virais, lesões, doenças neurodegenerativas e autoimunes (47). Durante a homeostase, a micróglia apresenta uma morfologia específica, com um corpo celular pequeno e ramificações extensas, que monitoram o ambiente ao seu redor, conectando-se a regiões de sinapses e extra-sinápticas (48). Quando ativada por estímulos, sejam eles fisiológicos ou patológicos, a micróglia retrai suas ramificações, tornando-se ameboide e iniciando suas ações de combate. Esse processo é muito rápido, dinâmico e reversível em qualquer estágio (49,50) (Figura 5).

Ramificada (quiescente)

Amebóide (ativada)

Figura 5: *Estados morfológicos da micróglia.* A micróglia, quando em estado quiescente, apresenta-se com grandes ramificações que monitoram o microambiente adjacente. Quando ativada por estímulos, essas ramificações são retraídas e a célula apresenta uma morfologia amebóide. Adaptado de Karperien *et al*, 2013 (50).

A micróglia é equipada com receptores capazes de detectar neurotransmissores e, assim, capazes de medir a atividade sináptica (51). Dessa forma, um papel para a essas células na remoção de sinapses fracas (poda sináptica) foi estabelecido (52,53). Ao mesmo tempo, estudos também propuseram a participação da micróglia em processos como a formação de sinapses, sobrevivência neuronal e crescimento axonal (54–56).

Como os fagócitos do SNC, as células microgliais são responsáveis pela identificação e remoção de células apoptóticas e agindo como a primeira linha de defesa do SNC contra patógenos (33). Elas possuem mecanismos especializados e muito sensíveis – principalmente através do receptor CX3CR1 (*C-X3-C motif chemokine receptor 1*) – capazes de responder a estímulos de localização e fagocitose emitidos por células em processo de morte, além de controlar o número de neurônios podendo, inclusive, induzir sua morte celular programada (57,58). Todos esses mecanismos evitam a ruptura do estado homeostático e conferem à micróglia o título de guardião do SNC.

1.1.3.3. Micróglia em condições patológicas

Assim como os macrófagos da periferia, a micróglia responde prontamente à estímulos patológicos, deixando o estado “quiescente” e assumindo um fenótipo ativado (59). Em consequência deste tipo de estímulo, as ramificações se retraem, a célula assume uma morfologia ameboide e passa a apresentar uma diversidade de fenótipos de ativação.

A participação da micróglia em doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (60) e o mal de Parkinson (61), e doenças autoimunes, como a esclerose múltipla (62), tem sido amplamente estudada. O foco do presente estudo é o comportamento adquirido pela micróglia no glioma, e os dados da literatura sobre o assunto são apresentados a seguir.

1.1.3.4. Monócitos e macrófagos infiltrados

Enquanto de SNC normal é ocupado apenas pela micróglia como célula mielóide, no advento de uma condição neuropatológica, a barreira hematoencefálica sofre rupturas, possibilitando a entrada de outras células mielóides provenientes da periferia. Essa infiltração já demonstrou ser prejudicial ao cérebro e inclusive contribuir para a progressão de doenças como a esclerose múltipla (63,64).

Os monócitos que infiltram o SNC têm origem nas células-tronco hematopoiéticas da medula-óssea (65) e, portanto, possuem uma ontogenia diferente da micróglia. No entanto, a diferenciação entre essas duas populações celulares em condições patológicas do SNC foi sempre muito trabalhosa, havendo falta de marcadores específico para cada uma e com sugestões de que os monócitos circulantes recrutados ao SNC lá permaneciam, adquirindo características da micróglia residente (66–68). Essas hipóteses foram banidas com experimentos murinos de parabiose – onde o sistema circulatório de dois camundongos é compartilhado entre eles –, e ficou comprovado que as células infiltradas no SNC desaparecem quando há remissão da doença (63). Para camundongos, a diferenciação dos monócitos infiltrados é feita com o marcador

Ly-6C, ausente na micróglia. Para humanos, até o momento não existem marcadores que façam essa diferenciação.

1.1.3.5. Ativação de Micróglia, MAGs e seu papel em gliomas

Correspondendo à até 40% dos componentes do microambiente do glioma, a micróglia residente e os MAGs respondem prontamente aos estímulos provenientes das células tumorais. Historicamente, classifica-se a resposta (ativação) sofrida por essas células em clássica e alternativa (69–71). A ativação clássica corresponde ao fenótipo pró-inflamatório (M1), caracterizada pela liberação de iNOS (*inducible nitric oxide synthase*), citocinas inflamatórias como TNF- α (*tumor necrosis fator alpha*) e IL1- β (*interleukin 1 beta*) e radicais livres. Já o fenótipo anti-inflamatório, característico da reparação tecidual, é representado pela ativação alternativa (M2), na qual há aumento de expressão de ARG-1 (*arginase 1*), de marcadores de superfície como CD163 e a liberação de fatores de transcrição como TGF- β (*transforming growth factor beta*) e HGF (*hepatocyte growth factor*). A citocina interferon (IFN)- γ , bem como produtos microbianos induzem a ativação clássica, enquanto que a ativação tipo M2 pode ser induzida por IL-4 (*interleukin 4*) ou pelo próprio TGF- β . Devido ao dinamismo com o qual micróglia e MAGs respondem a estímulos, existe muita controvérsia na polarização M1 e M2. No entanto, essa subdivisão é ainda amplamente usada e corresponde a alterações clínicas (72–75). A Figura 6 ilustra as ativações clássica e alternativa usando a micróglia como exemplo.

Figura 6: Ativação da micróglia. Ao ser confrontada por estímulos, sejam eles patológicos ou fisiológicos, a micróglia ativada responde com mudanças morfológicas, retraindo suas ramificações, e com a produção de uma série de fatores que são estímulo-dependentes. A polarização M1 e M2 é usada para caracterizar respostas pró- e anti-inflamatórias, respectivamente, cada qual com um efeito diferente no organismo. Adaptado de Nakagawa & Chiba, 2014 (75). Em gliomas, acredita-se que a micróglia e os MAGs apresentem um fenótipo M2. LPS, lipopolissacarídeo; CCL2/22, *C-C motif chemokine ligand 2*; TREM2, *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*.

Estudos demonstram que os macrófagos associados a tumores favorecem o crescimento tumoral tanto por mecanismos unicamente imunológicos como não-imunológicos; e que a maioria deles assume um fenótipo do tipo M2 (76–78). O mesmo é verdade para a micróglia e os MAGs (79). Os fatores secretados nesse tipo de ativação promovem, por exemplo, o aumento da angiogênese tumoral (80,81), da motilidade das células do glioma e da invasão (82) e também interagem com as células-tronco tumorais aumentando sua capacidade proliferativa e resistência terapêutica (83–85).

Como exposto acima, existe vasta literatura e diversas evidências do papel exercido pela micróglia em gliomas. Porém, a grande maioria dos estudos é feita em camundongos, sendo que a existência de marcadores específicos para diferenciar a micróglia dos MAGs facilita os estudos específicos de cada população, algo que não ocorre em humanos (Figura 7). Outro aspecto que prejudica a extrapolação dos resultados de estudos murinos para os humanos é o fato de que os gliomas murinos pouco se assemelham aos gliomas humanos no que diz respeito a sua origem histológica (se astrocítica ou oligodendrocítica)

e alterações moleculares (86). Os diferentes subtipos moleculares de glioblastoma, por exemplo, comportam-se clinicamente de maneira variada (87–89), podendo interagir de forma diversa com o microambiente. Além disso, avaliar a expressão dos marcadores de ativação da micróglia necessita de comparação com a população controle. No caso dos humanos, as amostras disponíveis para obter-se uma população pura de micróglia provêm, na grande maioria das vezes, de cirurgias de epilepsia. A micróglia associada à epilepsia possui um *status* inflamatório intrínseco que a distancia do fenótipo quiescente da micróglia normal (90,91). A utilização de amostras de tecido cerebral *post-mortem* é prejudicada pela falta de protocolos específicos e eficientes para o isolamento de uma população pura para a micróglia.

Figura 7: Diferenças entre a micróglia e MAGs em gliomas. Estudos murinos revelaram diferença na ontogenia desses grupos de células. Porém, no microambiente tumoral e em razão dos estímulos advindos das células tumorais, micróglia e MAGs compartilham muitas das proteínas de superfície, dificultando a obtenção de populações puras. Em humanos, essa diferenciação é ainda mais difícil. Adaptado de Hambardzumyan & Berger, 2015 (31).

Tendo em vista esses aspectos ainda não explorados do campo das associações entre a micróglia e os gliomas, e nossa recente colaboração com o laboratório do Dr Bart J. L. Eggen, nós nos propusemos a estudar a ativação da micróglia em gliomas de diferentes graus, origens e subtipos (GBMs). Iremos também propor um perfil de expressão gênica da micróglia humana adulta, levando em conta diferenças de idade e de gênero, que servirá para a identificação e diferenciação dessas células em estudos futuros.

2.OBJETIVOS

O principal objetivo deste estudo colaborativo entre a Universidade de Groningen e a Faculdade de Medicina da USP consiste em estudar o papel da ativação da micróglia em gliomas humanos e delinear o perfil da expressão genica da micróglia humana.

Os objetivos específicos são:

- I. Analisar o fenótipo de ativação da micróglia (M1/M2) em gliomas de diferentes graus e origens histológicas (astrocitomas e oligodendrogliomas);
- II. Análise da associação dos fenótipos de ativação da micróglia com os subtipos moleculares de glioblastomas humanos (Proneural, Clássico e Mesenquimal);
- III. Geração do perfil de expressão gênica da micróglia humana proveniente de tecido *post-mortem* por meio de comparação com o tecido cerebral total;
- IV. Comparação dos achados dessa assinatura microglial humana com a assinatura encontrada em dados prévios da literatura referentes à micróglia murina;
- V. Associação dos dados de expressão da micróglia com variáveis como tempo *post-mortem*, idade e gênero;
- VI. Comparar o perfil de expressão gênica da micróglia com o perfil de monócitos e macrófagos previamente estabelecido na literatura e com amostras de micróglia isolada de tumores;
- VII. Implementação das tecnologias transferidas por ambos os centros envolvidos nesse estudo

Em suma, os experimentos visaram estabelecer o fenótipo da micróglia associado ao tumor em gliomas de alto e baixo grau, dessa forma permitindo correlações com suas características patológicas e moleculares, e aprofundar o conhecimento do perfil de expressão da micróglia humana normal, ainda deficiente na literatura atual, por meio de metodologias de sequenciamento de alta performance.

3.METODOLOGIA

3.1. Casuística

3.1.1. Gliomas e tecido não-neoplásico proveniente de procedimento cirúrgico

Amostras de gliomas e tecido cerebral não-neoplásico foram coletados durante o procedimento cirúrgico e imediatamente congelados em nitrogênio líquido após ressecção pelo grupo de Tumores Encefálicos e Metástases da Divisão de Clínica Neurocirúrgica do Instituto Central do Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). As amostras de tecido não-neoplásico (NN) foram coletadas do lobo temporal de paciente com epilepsia durante procedimento cirúrgico realizado pelo grupo de Epilepsia. Todos os tecidos a serem utilizados no presente estudo possuem confirmação histopatológica da Divisão de Anatomia Patológica do HC-FMUSP, de acordo com a classificação da OMS, e fazem parte do biorrepositório de amostras coletadas durante o Projeto Genoma Clínico, aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP 3317, parecer 373/2002) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) sob o número de protocolo 830/01, com financiamento da FAPESP e do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (processos FAPESP #01/12898-4, 04/12133-6, 13/06315-3 e 13/07704-3).

A casuística total deste projeto consiste em 272 amostras de gliomas (109 GBM, 18 astrocitomas anaplásicos, 26 astrocitomas de baixo grau, 23 astrocitomas pilocíticos, 27 oligodendrogliomas de baixo grau, 12 oligodendrogliomas anaplásicos e 10 gliomas mistos); 22 amostras de tecido não neoplásico; 25 amostras de tecido cerebral normal provenientes de autópsia. Os dados clínicos referentes à casuística aqui estudada, como idade, sexo e sobrevida, encontram-se compilados no Anexo 1 e 2.

O presente estudo possui aprovação da CAPPesq 599/10 (Anexo 3). Os consentimentos pós-informados (Anexo 4) foram obtidos de todos os pacientes

com tumor e epilepsia ou seus responsáveis legais e estão sendo acompanhados clinicamente com protocolos padronizados para radioterapia e quimioterapia, bem como para análise da evolução por neuroimagem.

3.1.2. Amostras do tecido encefálico humano *post-mortem*

As amostras de tecido encefálico normal *post-mortem* foram coletadas do giro superior do córtex parietal direito de indivíduos cognitivamente normais ao longo do procedimento de autópsia de corpo inteiro, realizado rotineiramente no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital, e em casos especiais no *National Brain Bank* da Holanda. As autópsias foram acompanhadas por um médico patologista e técnicos especializados. Estas coletas foram supervisionadas pelo grupo do Banco de Encéfalos Humanos, pertencente ao Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral, cujos métodos já foram previamente descritos (92).

Os critérios de inclusão utilizados foram:

- Não possuir histórico de doença neurodegenerativa relatada em vida;
- Não preencher critérios neuropatológicos para doenças neurológicas.

Os registros da história do indivíduo foram revistos, a fim de obter-se uma amostra homogênea de indivíduos e evitar vieses nos resultados das análises moleculares, que pudessem estar relacionados a morbididades e uso de medicamentos. Além disso, anteriormente às abordagens moleculares utilizadas, foi realizado o diagnóstico neuropatológico de acordo com os critérios NINCDS-ADRDA (93) à fim de confirmar a integridade cognitiva dos indivíduos.

De ambos os centros, brasileiro e holandês, um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), foi obtido. Dados detalhados sobre idade, gênero, intervalo *post-mortem* encontram-se no Anexo 2.

3.2. Isolamento de micróglia humana de tecido *post-mortem* e amostras tumorais

Todo o procedimento, conduzido em gelo, foi feito de acordo com a metodologia desenvolvida no laboratório do Dr Bart Eggen e encontra-se descrito no artigo *Isolation of microglia and immune infiltrates from mouse and primate central nervous system* (Anexo 6). Amostras do tecido encefálico do córtex parietal direito foram coletadas em meio HBSS (Lonza, Suíça) suplementado com 15 mM HEPES (Lonza) e 0.6% glucose (Sigma-Aldrich, EUA) e mantido a 4°C. O tecido foi então dissociado de forma mecânica utilizando um homogeneizador de vidro para tecidos e em seguida filtrado (dois filtros de metal, de 106 e 300 µm), a fim de se obter uma suspensão de células únicas. De todas as estudadas coletadas, foi coletado também um pequeno fragmento de tecido cerebral total (subsequentemente chamado de “córtex”) em Qiazol (Qiagen), para subsequente extração de RNA. Essa suspensão foi centrifugada a 220 rcf por 10 minutos (aceleração: 9, *brake*: 9, 4°C). O pellet resultante foi ressuspensão em solução de 22% de Percoll (GE Healthcare, UK), 40 mM NaCl e 77% de tampão de gradiente mielínico (5.6 mM NaH₂PO₄·H₂O, 20 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 11 mM Glucose, pH 7.4). Uma camada de PBS adicionada no topo, e esse gradiente foi centrifugado a 950 rcf por 20 minutos (aceleração: 4, *brake*: 0, 4°C). A camada de mielina foi cuidadosamente removida e o pellet ressuspensão em solução 60% de Percoll, sobre a qual foi colocada uma solução de 30% de Percoll. Em seguida, foi colocada uma camada de PBS no topo e efetuada centrifugação a 800 rcf por 25 minutos (aceleração: 4, *brake*: 0, 4°C). A cama de células que se formou entre a interface dos gradientes 60-30% foi coletada com uma pipeta Pasteur previamente umedecida, lavada e centrifugada a 600 rcf por 10 minutos (aceleração: 9, *brake*: 9, 4°C). O pellet final foi ressuspensão em HBSS sem vermelho de fenol (Lonza) suplementado com 15 mM HEPES (Lonza) e 0.6% glucose (Sigma-Aldrich). Receptores de Fc da superfície celular foram bloqueados com um inibidor de receptores Fc humanos (eBioscience, Affymetrix, EUA) por 10 minutos. Para o isolamento da micróglia, as células foram incubadas por 20 minutos em gelo com anticorpos específicos para essa técnica e característicos

das células microgлияis. São eles: CD11b-PE, monoclonal de camundongo (clone ICR44, Biolegend, EUA) e CD45-FITC, monoclonal de camundongo (clone HI30, Biolegend). Subsequentemente, foi efetuada uma lavagem com HBSS sem vermelho de fenol. A suspensão de células foi passada por uma malha de nylon de 35µm e coletadas em tubos de vidro de fundo redondo (Corning, EUA). O isolamento foi efetuado em dois centros com equipamentos diferentes. No Brasil, foi utilizado FACS Aria II (BD Biosciences, EUA) (Núcleo de Estudos e Terapia Celular e Molecular da USP, NUCEL-NETCEM); na Holanda, foi utilizado MoFloAstrios (Beckman Coulter, EUA). As células foram separadas baseando-se na expressão de CD11b^{alto}/CD45^{int} e marcação negativa para DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride), que identifica células mortas. O detalhamento da estratégia de isolamento celular encontra-se no Anexo 6. Micróglia foi coletada em RNeasy Lysate (Qiagen, Alemanha) e centrifugadas a 5000 rcf por 10 minutos. Os pellets foram lisados em tampão RLT-plus (Qiagen) para subsequente extração de RNA.

3.3. Extração de DNA e RNA

A qualidade dos tecidos obtidos foi analisada através de criocortes de 6µm corados com Hematoxilina/Eosina. Áreas necróticas e de tecido normal (no caso de tumores) foram microdissecadas previamente à extração de RNA de tecidos tumorais. O DNA e o RNA total de tecidos congelados foram extraídos com o uso do AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA das células sorteadas foi extraído com o kit RNeasy Micro Kit (Qiagen) e do tecido total de autópsia cerebral utilizando o kit RNeasy Lipid Tissue Mini (Qiagen). A qualidade do RNA de todas as amostras foi avaliada utilizando o kit Agilent RNA 6000 (Agilent Technologies, EUA) e o Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

3.4. Síntese de DNA complementar (cDNA) - Transcrição Reversa para qRT-PCR

A síntese de cDNA das amostras de tumor e controle foi realizada, partindo-se de 1 µg de RNA total, utilizando enzima Superscript III (Thermo Fisher Scientific, EUA), oligo dT e *random primers* (Thermo Fisher Scientific) e inibidor de RNase (RNaseOUT, Thermo Fisher Scientific). Foi realizada inicialmente uma digestão com 3U de DNase (Roche, Basel, Suíça) para eliminar possível contaminação com DNA genômico, seguida de denaturação do RNA e pareamento dos primers, transcrição reversa, e digestão com RNase H para degradar as fitas híbridas RNA:DNA. O cDNA foi diluído em TE (Tris/EDTA) na proporção 1:50 e utilizado para as reações de análise de expressão gênica por PCR (reação em cadeia por polimerase) quantitativo em tempo real (qRT-PCR).

3.5. Desenho de *primers* para qRT-PCR

As sequências FASTA, correspondentes ao mRNA dos genes, foram obtidas através da base de dados *Gene*, do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Com o propósito de checar a expressão gênica, os pares de *primers* foram desenhados de forma que o produto a ser amplificado estivesse no intervalo de pelo menos uma junção de éxons. Para obter a posição das bases das junções, recorreu-se ao *Blat*, ferramenta do *UCSC Genome Bioinformatics* (Kent Informatics, EUA). Além deste, os critérios utilizados para desenho dos *primers* foram: I) maior proximidade da extremidade 3' do gene, evitando-se produtos com distância maior que 3.000 pares de bases (pb) da mesma; II) proporção CG em torno de 50% do total de bases; III) *primers* com tamanho entre 18-25bp; IV) temperatura de anelamento entre 58 e 60°C, com diferença preferencialmente até 1°C entre os pares; V) limite de 3 bases repetidas em sequência; VI) ausência de estruturas secundárias como “*hairpins*”, homo e heterodímeros; e VII) amplificação de um produto de tamanho entre 80-130pb. Todos estes critérios tiveram como objetivo garantir a eficiência e especificidade da reação. Para checagem de temperatura de anelamento, presença de estruturas secundárias e proporção CG, foi utilizado o programa

Primer Express 3.0. Os *primers* desenhados tiveram sua especificidade checada pelo *Blat* (94) e *Blast-n*, do NCBI. As sequências de *primers* foram específicas para cada gene estudado (tiveram o mesmo RefSeq) e foram sintetizados pela IDT (*Integrated DNA Technologies*, EUA).

3.6. PCR Quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Amostras de cDNA da casuística foram testadas quanto aos níveis de expressão de mRNA dos genes *CD11b*, *IL1B* e *CD163* através da técnica de qRT-PCR. A seleção dos genes controles ou de referência endógena foi realizada segundo os critérios que incluem: níveis de expressão semelhantes em diferentes tipos celulares, ausência de comprometimento do gene com ciclo celular ou ativação celular e estabilidade comparável aos demais genes do estudo. Os dados quantitativos referentes à análise de expressão na casuística foram normalizados relativamente à média geométrica de três genes endógenos: *HPRT* (*hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*), *TBP* (*TATA-box binding protein*) e *GUSB* (*beta glucuronidase*), conforme descritos por Valente *et al* (95). As reações foram realizadas no aparelho *ABI Prism 7500 Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific) pelo método de incorporação de *Sybr Green* (Thermo Fisher Scientific).

A reação foi feita em um volume final 12µL, contendo 3µL de cDNA, 6µL de Power SYBR Green I Master Mix (Thermo Fisher Scientific) e 3µL de solução com par de *primers* em uma concentração final de 150-400nM, que foi otimizada para cada gene. A concentração mínima de *primers* foi determinada pelo *cycle threshold* (Ct) mais baixo e eficiência de amplificação máxima, minimizando amplificação inespecífica. A amplificação de produto único foi confirmada através da análise de suas curvas de dissociação. Os produtos de PCR foram também analisados por eletroforese em gel de agarose, e corados com brometo de etídio, para confirmação da amplificação do tamanho correto do produto. Todas as amostras foram testadas em duplicatas, admitindo-se um desvio de até $\pm 0,4$ e, para cada gene em estudo, foram realizadas em paralelo reações controle sem cDNA.

Para todos os genes foram feitas curvas padrão de uma amostra de cDNA de *pool* de linhagens de GBM, com diluição seriada em cinco concentrações variando de 1/10 a 1/150. O cálculo de eficiência de amplificação foi baseado no *slope* obtido, pela fórmula $E = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$. As reações de PCR foram incubadas inicialmente a 50°C por 2 minutos, para ativação da uracil N-glicosilase, seguida de denaturação a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. Para todas as reações foi realizada uma etapa final de curva de dissociação.

As sequências dos *primers* e o número de bases de cada um encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências de *primers* analisados por qRT-PCR

Gene alvo	Número de bases	Sequência
<i>CD11b</i> F	22	TTCCAGAACAACCCTAACCCAA
<i>CD11b</i> R	20	GCTCTCGTACCACTTTGCGG
<i>IL1B</i> F	22	GGGACAGGATATGGAGCAACAA
<i>IL1B</i> R	21	TCAACACGCAGGACAGGTACA
<i>CD163</i> F	24	TGGTGCTACTTGAAGACTCTGGAT
<i>CD163</i> R	24	AACAGGCACTGAGAAGTAAGACCA

F, *forward*
R, *reverse*

3.7. Quantificação relativa de expressão gênica

Os valores de Ct foram obtidos utilizando-se o *threshold* determinado manualmente como 0,1 para todos os genes. As amostras foram testadas em duplicatas e considerou-se a média aritmética dos valores de Ct. A fórmula $2^{-\Delta CT}$ foi utilizada para calcular a expressão dos genes *CD11b*, *IL1B* e *CD163*, relativa aos *housekeepings*, que apresentaram *primers* com eficiência $E = 100 \pm 10\%$, onde $\Delta CT = \text{Ct gene alvo} - \text{média dos Ct dos genes normalizadores (GUSB, HPRT e TBP)}$ (96).

3.8. Pesquisa de mutações somáticas para subclassificação de GBM

Baseado em literatura prévia, que determinou a sub-classificação molecular dos GBMs (23–25), 67 genes foram escolhidos para captura e sequenciamento em larga escala de todo o fragmento codificante de cada gene. Usando a ferramenta de desenho SureSelect DNA Design (Agilent Technologies), sondas de captura foram construídas para incluir a região codificadora dos éxons e 50 bp das regiões intrônicas 3' e 5' franqueadoras, de forma a incluir potenciais mutações em sítios de *splicing*. Um total de 973 regiões dos 67 genes foram escolhidas para um tamanho final de captura de 2,79 Mb. O preparo da biblioteca para o sequenciamento foi efetuado utilizando o kit Agilent SureSelect Target Enrichment (Agilent Technologies). Duzentos nanogramas de DNA tumoral foram fragmentados usando o ultrasonicador Covaris (Covaris, EUA). Bibliotecas ligadas por adaptadores foram construídas usando os kits Paired-End Genomic DNA (Illumina, EUA). As amostras multiplexadas foram sequenciadas na plataforma NextSeq (Illumina).

3.9. Sequenciamento de RNA (RNA-seq)

As reações de sequenciamento em larga escala foram executadas no núcleo multiusuário da FMUSP, SELA (Sequenciamento em Larga Escala). Para as amostras de micróglia provenientes de autópsia, a biblioteca de cDNA foi preparada começando com uma concentração de 60ng de RNA total, utilizando o kit TruSeq Stranded Total RNA kit (Illumina, EUA). O RNA ribossomal foi depletado com o kit de *beads* magnéticas Ribo-zero Gold (Illumina) e o RNA restante foi fragmentado por cátions bivalentes. Para as amostras de micróglia de tumor, a biblioteca de cDNA foi preparada partindo de uma concentração de 50pg de RNA total, utilizando o kit Clontech SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA (Takara, Japão). Os transcritos da primeira fita de cDNA foram preparados com reação de transcriptase reversa e *random primers*. A segunda fita foi sintetizada pela DNA polimerase. Adaptadores e índices de sequências únicas foram adicionados aos fragmentos de cDNA. O enriquecimento da biblioteca foi

feito por reação de PCR e a quantificação foi medida por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR, Kappa Library Quantification Kit, Illumina, Kappa Biosystems), e o tamanho médio das bibliotecas foi determinado pelo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). O sequenciamento foi executado no HiSeq 2500 (Illumina).

3.10. Análise do RNA-seq de amostras de micróglia de autópsia

As amostras de RNA geradas tanto no Brasil quanto na Holanda foram sequenciadas simultaneamente, no centro multiusuário SELA. O sequenciamento foi *paired-ended*, com 100 pares de bases (bp) de comprimento de leitura (*read length*). Checagens de qualidade FAST-QC foram feitas para determinar uma alta qualidade de pares de base, e FASTX foi utilizado para retirar (*trimming*) *reads* de baixa qualidade. Os dados foram alinhados usando o software *Tophat2*, versão 2.0.14 (Kim *et al.* 2013) para o conjunto de *templates* de referência *iGenomes*, e quantificados utilizando *HT-seq count* (98). Checagens de qualidade dos dados alinhados foram feitas utilizando RNA-SEQC (99) e mostraram um alinhamento de dados de alta qualidade. Por amostra, uma média de 17,6 milhões de *reads* unicamente mapeados foram gerados, com uma variância de 6,1 a 61,1 milhões.

Os dados foram então colocados no programa R, anotados utilizando BioMart (100) e analisados usando o pacote EdgeR (Bioconductor) (101). Três análises diferentes foram feitas usando o EdgeR: 1) micróglia *versus* córtex; 2) análise da micróglia em relação a idade, gênero e tempo *post-mortem* (PMD) e 3) micróglia *versus* monócitos e macrófagos. Os *Q-values* de significância referem-se aos valores de *p* corrigidos para taxa de falsa descoberta (*False Discovery Rate*, FDR).

Para a primeira comparação, dois critérios de significância foram aplicados para determinar o que foi chamado de “assinatura estendida da micróglia” ($q < 0,001$ e $\log FC > 3$) e o “núcleo” da assinatura da micróglia ($q < 1.E-25$, $\log FC > 5$, e valores de RPKM 50% mais altos do que a distribuição gênica da micróglia). Os dados gerados no presente estudo foram comparadas à assinatura de 107 genes da micróglia de camundongos de estudos previamente

publicados pelos grupos de Zhang *et al* (102) Butovsky *et al* (103), consistindo 107 genes; e 98 genes específicos do estudo de Hickman *et al* (104). Todos esses perfis gênicos foram plotados como barras ao lado dos gráficos de *heat map* de expressão, detalhados na seção de Resultados.

A segunda comparação foi feita utilizando um modelo linear generalizado, com país de origem da amostra e gênero como variáveis binárias, enquanto que idade e PMD foram usados como variáveis quantitativas. País de origem também foi usado como fator de efeito batch para prevenir interferências com a predição de outras variáveis. Em cada análise e comparação, pequenas diferenças de critérios foram usadas para determinar a significância. Para as variáveis quantitativas, apenas um critério de $q < 0,05$ foi utilizado, uma vez que os valores de logFC foram utilizados para estimar o aumento da expressão de um dado gene conforma a idade (variável “idade”) ou por hora (variável “PMD”).

Para a terceira comparação, análise de expressão gênica diferencial foi completa para micróglia versus monócitos, micróglia versus macrófagos e monócitos versus macrófagos. Subsequentemente, essas listas foram comparadas às listas de genes diferencialmente expressos em micróglia, monócitos, macrófagos e monócitos/macrófagos geradas, respectivamente. Para esse critério, a expressão diferencial foi considerada quando $q < 0,05$ e $|\log FC| > 1$.

Gráficos de barra mostrando a expressão de famílias de genes de característica imune foram gerados no programa R. Esses genes foram obtidos usando o critério de busca no BioMart que contivesse o nome completo dos genes em listas, como “*Toll*”, “*Complement*”, “*MHC*”. Valores negativos de RPKM (*Reads Per Kilobase Million*) foram ajustados para 0. Apenas genes estatisticamente diferentes entre micróglia e córtex ($q < 0.01$ e $\text{abs}(\log FC) > 1$), ou micróglia versus monócitos, micróglia versus macrófagos ($q < 0.01$ e $\text{abs}(\log FC) > 1$) foram mostrados.

Anotações funcionais dos perfis encontrados foram feitas com o *software* de análise Qiagen’s Ingenuity. Os valores de p corrigidos de categorias de genes estatisticamente enriquecidos foram apresentados em forma de gráficos de barra. Uma rede de interação proteína-proteína dos genes da assinatura de expressão gênica da micróglia foi gerada com IPA. Foram mostradas apenas

interações experimentalmente comprovadas ou com predição de alta confiança. Genes sem tal conexão foram removidos. Essa rede de interações foi ordenada de acordo com a localização sub-celular de cada proteína.

Os gráficos de *heat map* foram feitos utilizando o pacote do BioConductor Heatmap.3. Os dados foram disponibilizados no GEO (Gene Expression Omnibus). Dados de RNA-seq publicados por Saad *et al* (105), utilizados na comparação da micróglia com outras células mielóides, também foram obtidos no GEO.

3.11. Análise do RNA-seq de amostras de micróglia tumoral

A análise dos dados de sequenciamento de RNA de seis amostras de micróglia tumoral foi realizada através de um *pipeline* próprio desenvolvido pelo SELA, que consiste nos seguintes procedimentos

- Procedimentos pré-analíticos:
 - Métrica dos arquivos FASTQ: Foi realizada através do programa FastQC. Todas as amostras apresentaram qualidade satisfatória, com > 95% dos *reads* apresentando qualidade acima de Q30.
 - Pré-processamento: Apesar da qualidade satisfatória dos arquivos .FASTQ, optamos pela remoção de eventuais traços de sequências adaptadoras, bem como bases com baixa qualidade junto às extremidades, e reads excessivamente curtos. Estes procedimentos foram executados pelo *software* bbduk (BBMap - Bushnell B. – www.ourcelforge.net/projects/bbmap/).
- Alinhamento:
 - Os arquivos .FASTQ pós-processamento foram alinhados à versão hg38 do genoma humano, obtida do website www.ensembl.org. Os reads foram alinhados ao genoma-referência através do software STAR aligner (106).
 - Os arquivos .BAM resultantes (*reads* alinhados às coordenadas genômicas), foram submetidos à análise métrica e através dos softwares RNA-SEQC (99).

- Quantificação da expressão gênica: Todas as etapas descritas a seguir, com exceção da geração da planilha de *counts* brutos, foram realizados em ambiente R.
 - Contagem de *reads*: Os arquivos .BAM alinhados às coordenadas genômicas foram quantificados pelo software RSEM (107). A quantificação foi realizada considerando a extensão do gene total. Este procedimento gera uma matriz cujas colunas são representadas pelas amostras e as linhas pelos genes, contendo valores referentes ao número de *reads* (*counts*), não normalizados que se sobrepõem a cada *feature* (gene), para cada amostra.
 - Filtragem dos genes não expressos: Os genes considerados não expressos em pelo menos 20% amostras foram removidos da matriz. Após esta etapa de filtragem, 22070 genes foram considerados expressos.
 - Transformação logarítmica e normalização: A normalização dos dados, transformação logarítmica e quantificação da expressão gênica foram feitas através do *pipeline limma-voom*, obtido através do portal R-Bioconductor (108). As anotações referentes a cada gene (conversão dos identificadores *ENSEMBL* em outros identificadores - ENTREZ_ID, *Symbol*, entre outros) foram realizadas pelo *software* biomaRt (R-Bioconductor).
- Análise supervisionada (*class comparison*): A identificação de genes diferencialmente expressos entre as diferentes classes de amostras foi feita a partir dos dados de expressão gênica normalizados pela função *voom*, através do *software limma*. Este *software* emprega testes *t* moderados para o cálculo dos valores *p* em comparações pareadas. Foi feita a seguintes comparação: micróglia tumoral *versus* micróglia de autópsia . Foi utilizado o procedimento de Benjamini-Hochberg para controle de falsos-positivos. Considerando um valor de expressão de X e um valor de *p* corrigido $<0,05$, foram identificados 10462 genes diferencialmente expressos nas comparações descritas anteriormente ($p<0,05$).

3.12. Imunohistoquímica

Para a detecção imunoistoquímica, secções de tecido foram inicialmente processadas e submetidas à recuperação antigênica. As lâminas foram imersas em tampão citrato 10mM, pH 6,0, e incubadas a 122°C por 3 minutos utilizando Pascal elétrica (BioCare Medical, EUA). As amostras foram então bloqueadas para a peroxidase endógena e posteriormente incubadas com os anticorpos primários, na diluição final de acordo com otimização, conforme a Tabela 2 em temperatura 16-20°C por 16 horas. A reação foi revelada utilizando kit comercial (Novolink, Novocastra, Reino Unido) em temperatura ambiente, utilizando diaminobenzidina e hematoxilina de Harris para a coloração nuclear. Para todas as reações, foram utilizados controles positivos. As amostras de gliomas aqui analisadas fazem parte do repositório de blocos de parafina da FMUSP, Departamento de Patologia. Os diagnósticos anátomo-patológicos de todos os casos aqui incluídos foram estabelecidos pelo neuropatologista da instituição.

Tabela 2. Anticorpos primários utilizados para imunohistoquímica e especificações

Proteína	Especificidade	Clone	Procedência	Controle Positivo	Diluição final
IBA-1	Monoclonal de camundongo	1022-5	Abcam	córtex normal	1:700
CD68	Monoclonal de camundongo	KP1	DBS	pulmão	1:1600
CD163	Monoclonal de camundongo	10D6	Abcam	tonsila	pré-diluído
IL1- β	Monoclonal de camundongo	11E5	Abcam	pulmão	1:800
CD36	Monoclonal de camundongo	5-271	Biolegend	Pulmão	1:100
CD143	Monoclonal de camundongo	5-369	Biolegend	pulmão	1:100

3.13. Análise por microscopia óptica

Foi realizada análise semiquantitativa (percentagem de estruturas marcadas) e qualitativa (intensidade da reação) da expressão da proteína obtida por reação imunohistoquímica. A análise foi feita por dois observadores independentes (SKNM e TFAG), obedecendo aos seguintes critérios:

Análise semiquantitativa:

- negativo
- + até 25% das estruturas marcadas
- ++ 26 a 50% das estruturas marcadas
- +++ 51 a 75% das estruturas marcadas
- ++++ mais de 75% das estruturas marcadas.

Análise qualitativa da intensidade da marcação:

- + fraco
- ++ moderado
- +++ intenso

3.14. Imunofluorescência

As amostras de tecido congelado foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20 min. O tecido foi transferido para sucrose 25% por 2 dias e subsequentemente embebido em Tissue Tek (OCT, Sakura) e congelados. Cortes transversais seriados de 16 µm foram feitos com criostato (Jung CM3000, Leica Biosystems). As secções foram lavadas com PBS contendo 10% de soro normal de cabra e 0.1% Triton X-100 (45 min) e incubadas *overnight* com os seguintes anticorpos específicos para humanos: policlonal de coelho anti-Iba1 (Wako, 1:1000), monoclonal de camundongo anti-CD36 (clone 5-271, 1:50, Biolegend, EUA), monoclonal de camundongo anti-CD32 (clone FUN-2, 1:50, Biolegend), e monoclonal de camundongo anti-CD16 (clone RUO, 1:50, Biolegend). No dia seguinte, as amostras foram incubadas por duas horas com anticorpos secundários (Cy3 – vermelho – ou Alexa 488 – verde –, Invitrogen,

ambos 1:600). Secções foram montadas com Mowiol. A aquisição das imagens foi feita utilizando microscópio confocal Leica SP2 AOBS.

3.15. Análises estatísticas para dados de expressão provenientes de qRT-PCR

O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificação da distribuição dos dados. A análise estatística da distribuição da expressão relativa dos genes estudados por qRT-PCR na casuística (NN e gliomas), foi realizada pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido da comparação de Dunn. Os parâmetros de expressão foram considerados: hipoexpressão, abaixo da mediana; hiperexpressão, acima da mediana. A significância estatística foi estabelecida quando $p < 0,05$.

A co-expressão entre os genes estudados foi realizada através da Correlação de Pearson para amostras com distribuição paramétrica e Spearman-rho, para amostras com distribuição não-paramétrica. O coeficiente de correlação $r \geq 0,7$ foi interpretado como forte correlação, um coeficiente $0,3 \leq r < 0,7$ como correlação moderada e $r < 0,3$ como correlação fraca. Valores positivos de r referem-se a grandezas proporcionais, enquanto valores negativos foram interpretados como grandezas inversamente proporcionais.

A sobrevida foi calculada da data da cirurgia até a data do óbito. A curva de Kaplan Meier de sobrevida foi analisada utilizando-se o teste *log rank*. Todos os cálculos estatísticos para essas análises foram realizados com auxílio do programa SPSS versão 23.0 (IBM, EUA) e os gráficos de dispersão foram feitos com auxílio do programa GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software Inc., EUA).

4.RESULTADOS

4.1. Expressão de marcadores de ativação de micróglia em gliomas

A análise da expressão de *CD11b*, *IL1B* e *CD163* em gliomas foi efetuada em 202 amostras de glioma, conforme mostra a Figura 8. Pode-se observar que os níveis de *CD11b* são maiores em astrocitomas, se comparadas tanto ao tecido não-neoplásico quanto aos oligodendrogliomas. A diferença estatística foi significativa entre o tecido não-neoplásico de córtex (NNc) e AGI ($p<0,0005$), AGIII ($p<0,0005$) e GBM ($p<0,005$), e não houve diferença estatística entre o tecido não-neoplásico de substância branca (NNSb) e as amostras de oligodendrogliomas. Houve uma grande dispersão nos valores de expressão em todas as amostras tumorais, enquanto que os resultados para o tecido NN, tanto em córtex quanto em substância branca, foram mais homogêneos. Resultados similares foram obtidos na análise do mRNA de *CD163*, com maiores valores e maior dispersão nos casos de astrocitomas, enquanto que os níveis em oligodendrogliomas permaneceram basais. Houve diferença estatística significativa entre NNc e AGI ($p<0,005$), AGIII ($p<0,0005$) e GBM ($p<0,0005$). Já os níveis de mRNA de *IL1B* foram menores nas amostras de astrocitoma do que em NNc, com diferença estatística entre AGII ($p<0,005$), AGIII ($p<0,05$) e GBM ($p<0,005$); casos apresentando uma maior expressão também estavam presentes em todos os graus. Nos casos de oligodendroglioma, os oligoastrocitomas grau II mostraram uma maior expressão de *IL1B* se comparados aos outros graus deste tipo de tumor. É importante notar, também, que o córtex NN apresentou níveis maiores de *CD11b*, *CD163* e *IL1B* do que a substância branca NN. Todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o teste de Kruskal-Wallis, seguidos da comparação de Dunn.

Figura 8: Gráficos de dispersão representando a expressão dos genes *CD11b* (A), *CD163* (B) e *IL1B* (C) em amostras de gliomas. As linhas pretas horizontais representam a mediana de cada grupo. NNC/sb, não-neoplásico córtex ou substância branca.

4.2. Estratificação molecular de glioblastomas

Foram analisados 109 casos de GBM para a análise da estratificação molecular. Foi realizado uma pesquisa de mutações utilizando um painel customizado desenvolvido na plataforma Agilent (SureSelect), contendo 67 genes. Os critérios adotados para estipular o subtipo molecular dos GBMs baseiam-se em dados disponíveis na literatura (21,23,25). Para classificação em Proneural, foram consideradas mutações em *IDH1*, *PDGFRa* e *TP53*, bem como amplificações em *PDGFRa*. Para o subtipo Clássico, foram consideradas alterações em *EGFR* (amplificação, mutação ou presença da variante *EGFRVIII*) e *PTEN* (mutação ou deleção). Finalmente, foram considerados do subtipo Mesenquimal aqueles que apresentaram mutações em *NF1* ou alterações em *RB1* (deleção ou mutação).

Seguindo esses critérios, foi possível classificar 82 das 109 amostras (75.22%) analisadas. As amostras não classificadas não apresentaram alterações condizentes com o que já foi descrito como característico de cada um dos subtipos e foram agrupados no subtipo “outros”.

Corroborando os dados de estudos prévios, alterações que caracterizam o subtipo Clássico foram as mais prevalentes, correspondendo a 57% dos casos. Os casos com alterações próprias do subtipo Mesenquimal corresponderam a 22% dos casos; 21% das amostras apresentaram alterações correspondentes ao subtipo Proneural (Figura 9). Os dados referentes às alterações encontradas nas amostras aqui classificadas encontram-se na tabela intitulada Tabela Suplementar 1, que pode ser acessada através do link: <http://tinyurl.com/tabelas-suplementares>

Após a classificação molecular dos subtipos de GBM, foi analisada a sobrevida desses pacientes de acordo com essa classificação. Como mostra o Kaplan-Meier da Figura 9, os pacientes classificados com o subtipo Mesenquimal de GBM apresentaram uma menor sobrevida (mediana de 8 meses). Já os classificados com o subtipo Clássico apresentaram uma sobrevida de 9 meses (mediana). Finalmente, os casos classificados como Proneural apresentaram uma sobrevida de 13 meses. Todos os dados foram obtidos com o teste de *log-rank*.

Figura 9: Distribuição da classificação molecular dos GBM. Gráfico de Kaplan-Meier indicando o tempo de sobrevida desses pacientes de acordo com sua subclassificação molecular. m, meses.

4.3. Expressão de marcadores de ativação de micróglia na subclassificação dos glioblastomas

Quando verificamos a distribuição desses dos marcadores de microglia analisados no presente estudo em amostras de GBM subdivididos de acordo com a classificação molecular (Proneural, Clássico e Mesenquimal), observou-se que os casos do subtipo Mesenquimal apresentavam níveis maiores de mRNA de *CD11b*, *CD163* e *IL1B* em relação aos outros dois subtipos, como mostra a Figura 10. Há uma diferença estatisticamente significativa quando comparamos os níveis de *CD11b* e *CD163* em casos de subtipos Mesenquimal e Proneural ($p=0,011$ para *CD11b* e $p=0,014$ para *CD163*, de acordo com teste de Kruskal-Wallis, seguido da comparação de Dunn). O subtipo Clássico também apresentou aumento da expressão de *CD11b* e de *CD163*. Não houve diferença nos níveis de expressão de *IL1B*.

Figura 10: Gráficos de dispersão representando a expressão dos genes *CD11b*, *CD163* e *IL1B* em GBM de acordo com a estratificação molecular dessas amostras. * $p < 0,05$ de acordo com o teste de Kruskal-Wallis, seguido da comparação de Dunn.

O próximo passo foi analisar o nível de correlação da expressão desses marcadores inflamatórios nas amostras sub-classificadas de GBM. Como mostra a Tabela 3, observa-se correlação positiva e estatisticamente significativa entre *CD11b* tanto com *IL1B* como com *CD163* nos casos Clássicos e Mesenquimais. No entanto, nos casos Proneurais, isso foi verdade apenas para *CD11b* e *IL1B*. Esses resultados nos levaram a concluir que o subtipo Proneural apresenta um fenótipo pró-inflamatório mais acentuado do que os subtipos Clássico e Mesenquimal, que apresentam um fenótipo misto.

Tabela 3. Correlação dos genes de perfil inflamatório em amostras de GBM

GBM do subtipo Proneural			CD11B	IL1B	CD163
Teste de correlação Spearman's rho	CD11B	Coeficiente de correlação (r)	1.000	0.776	0.512
		p		0.001	0.061
	IL1B	Coeficiente de correlação (r)		1.000	0.112
		p			0.703
GBM do subtipo Clássico			CD11B	IL1B	CD163
Teste de correlação Spearman's rho	CD11B	Coeficiente de correlação (r)	1.000	0.484	0.523
		p		0.002	0.001
	IL1B	Coeficiente de correlação (r)		1.000	-0.107
		p			0.524
GBM do subtipo Mesenquimal			CD11B	IL1B	CD163
Teste de correlação Spearman's rho	CD11B	Coeficiente de correlação (r)	1.000	0.896	0.934
		p		0.000	0.000
	IL1B	Coeficiente de correlação (r)		1.000	0.885
		p			0.000

Em seguida, avaliamos se o aumento da expressão desses marcadores de características inflamatórias impactava de alguma forma na sobrevida dos pacientes com GBM e suas subdivisões. O número de casos classificados como Proneural e Mesenquimal com dados clínicos disponíveis foi muito baixo (N=14 em ambos os casos), impossibilitando qualquer análise subsequente. No caso do subtipo Clássico, no entanto, essa análise foi possível. Constatou-se que, quando analisamos conjuntamente a hiper-expressão de *CD11b* e de *CD163*, a sobrevida dos pacientes foi menor (4 meses) em comparação àqueles que apresentavam níveis mais baixos (9 meses). Essa diferença foi estatisticamente significativa ($p=0.037$, *log rank test*), como mostra o gráfico de Kaplan Meier na Figura 11.

Figura 11: Gráfico de Kaplan Meier ilustrando a diferença no tempo de sobrevida dos pacientes com GBM do subtipo Clássico comparando a hiperexpressão conjunta de *CD11b* e *CD163* com sua hipoexpressão. $p=0,37$ de acordo com o teste de *log rank*. m, meses.

Podemos concluir dessas análises que a expressão de marcadores característicos de células inflamatórias (*CD11b*) e de processos anti-inflamatórios (*CD163*) conferem um pior prognóstico aos pacientes com GBM. Ainda que a quantidade de amostras tenha impossibilitado análises de sobrevida

nos casos dos subtipos Proneural e Mesenquimal, podemos especular que a menor expressão de *CD11b* e *CD163* em casos Proneurais esteja relacionada com o melhor prognóstico característico deste subtipo. Já o contrário pode ser dito para os casos do subtipo Mesenquimal, onde a hiperexpressão desses dois fatores pode estar relacionada a uma menor sobrevida dos pacientes.

4.4. Distribuição de marcadores de ativação em GBMs estratificado

Foi realizada a detecção imunohistoquímica de IBA1 (marcador microglial), CD68 (marcador para macrófagos e micróglia), CD163 (fenótipo de ativação M2) e IL1B (fenótipo de ativação M1) em amostras de GBM com status mutacional positivo para os genes *NF1*, *EGFR* e *IDH1*, respectivamente correspondentes nos subtipos Mesenquimal, Clássico e Proneural de GBM. A Figura 12 ilustra a marcação obtida.

Maiores níveis de marcação positiva para IBA1, CD68 e CD163 foram encontrados no subtipo Mesenquimal, comparado ao subtipo Clássico e Proneural. A marcação de IL1B apresentou maior positividade no caso de GBM do subtipo Proneural, enquanto pouquíssima marcação foi observada no subtipo Clássico. O subtipo Mesenquimal mostrou fraca positividade para este marcador. Quanto à localização das células marcadas, enquanto nos subtipos Clássico e Proneural apresentaram maior concentração de células positivas dos marcadores analisados ao redor dos vasos, o subtipo Mesenquimal a marcação positiva foi mais homogênea no corte, com células positivas ao redor do vaso e no centro do tumor.

Figura 12: Secções de corte da imunohistoquímica dos casos de GBM para IBA1(A-C), CD68 (D-G), CD163 (H-J) e IL1B (K-M). mut, mutado

Ainda que IBA1 seja considerado um marcador microglial e vastamente utilizado para o reconhecimento dessas células, em humanos, macrófagos infiltrados podem expressar níveis semelhantes de IBA1, dificultando ainda mais a diferenciação dessas células mielóides. Como forma de tentar solucionar esse obstáculo, nós prosseguimos o estudo com a análise da micróglia normal de amostras de autópsia, com o objetivo de caracterizar essa população em situação o mais próximo possível da fisiológica.

4.5. Estratégia de *sorting* de micróglia humana

A primeira etapa da seleção da micróglia humana consistiu em separar as células dos detritos celulares e *doublets* (eventos que não correspondem a células únicas) resultantes do procedimento de separação. Para isso, foram usados os padrões de FSC (*Forward Scatter*, relativo ao tamanho das células) e SSC (*Side Scatter*, relativo a granulosidade celular). Em seguida, foram selecionadas as células vivas, baseando-se na expressão negativa de DAPI.

Células humanas produzem muita auto-fluorescência, um fenômeno caracterizado pela produção natural de fluorescência pelas células e que resulta na perda da resolução e sensibilidade do sinal. Os compostos que podem originar auto-fluorescência incluem NAD(P)H, colágeno, e aminoácidos como tirosina, triptofano e fenilalanina, comuns à maioria das células humanas. Para que não houvesse interferência na nossa seleção de micróglia, utilizamos o canal do fluoróforo PE/Cy7, que não correspondia à nenhuma de nossas marcações, e selecionamos as células negativas (não auto-fluorescentes).

Em seguida, usamos os marcadores específicos de micróglia, CD11b e CD45 (64,109), conjugados aos fluoróforos PE e FITC, respectivamente. A micróglia apresenta alta expressão de CD11b e expressão intermediária de CD45. As amostras tumorais podem apresentar grande quantidade de infiltrado mielóide, além da micróglia. Esse infiltrado é caracterizado por uma maior expressão de CD11b e, principalmente, de CD45. Este infiltrado esteve presente em apenas uma amostra tumoral (MTU-1, um GBM), e foi coletado separadamente.

4.6. Isolamento agudo de micróglia pura de amostras de tecido *post-mortem*

Amostras puras de micróglia foram coletadas durante o procedimento de autópsia de corpo inteiro por dissecação do córtex parietal do giro superior direito, seguida do processamento do tecido e isolamento de células viáveis por *FACS sorting*. Os isolamentos foram realizados dentro de um intervalo de 24h post-mortem (PMD), utilizando-se amostras de doadores não-portadores de doenças

cerebrais degenerativas. Ao total, foram efetuados 74 isolamentos, (41 no Brasil e 33 na Holanda), dos quais 25 amostras foram escolhidas para o subsequente sequenciamento. Essas amostras foram escolhidas com tendo como parâmetro alta concentração e qualidade adequada de RNA (RIN>7). Informações sobre as amostras utilizadas, como origem, gênero, idade, PMD e causa da morte encontram-se no Anexo XX.

Sequenciamento de profundidade (RNA-seq) foi realizado em 25 amostras de micróglia e 16 amostras de córtex correspondentes. Os dados foram pré-processados, quantificados e genes diferencialmente expressos foram determinados, como descrito na Metodologia e como ilustra a Figura 13.

Figura 13: Ilustração do procedimento de obtenção, isolamento e sequenciamento da micróglia humana.

A análise inicial focou na expressão de marcadores célula-específicos tanto de micróglia como de outras células do SNC, a fim de determinar a pureza das amostras escolhidas (Figura 14). A micróglia humana apresentou alta expressão de genes previamente caracterizados como específicos de micróglia, como *P2RY12*, *TYROBP*, *CX3CR1*, *AIF1* e *ITGAM*. Genes associados aos outros tipos celulares (neurônios, astrócitos, oligodendrócitos) foram detectados

nas amostras de córtex, mas apresentaram baixa expressão nas amostras de micróglia humana. O marcador de monócitos, *CCR2*, também apresentou baixa expressão na micróglia humana. Esses achados indicam que uma população altamente pura de micróglia foi isolada para esse estudo.

Figura 14: Sequenciamento do mRNA da micróglia isolada e do córtex correspondente. Genes previamente identificados como específicos da micróglia encontram-se altamente expressos na população purificada (roxo). Genes característicos de neurônios, astrócitos e oligodendrócitos apresentaram alta expressão nas amostras de córtex (preto). O marcador de células imunes da periferia, *CCR2*, apresentou baixa expressão em micróglia.

4.7. Identificação da assinatura de expressão gênica da micróglia humana

Correlações do tipo *pairwise* dos dados de expressão do RNA-seq de micróglia pura e de córtex foram calculados e hierarquicamente clusterizados, com as variáveis tipo de tecido (micróglia ou córtex), idade, gênero, PMD e origem das amostras (Brasil ou Holanda), como mostra a Figura 15. A micróglia humana e o córtex clusterizaram de forma claramente distinta, com altos níveis de correlação entre as amostras de cada grupo.

Análises de expressão gênica diferencial mostraram grande diversidade entre a micróglia e o córtex total (Figura 15). Baseando-se em critérios altamente

rigorosos, dois perfis de expressão de micróglia foram definidos: uma assinatura estendida da micróglia, contendo 1765 genes contidos nos critérios de $\log FC > 3$ e $q < 1E-4$; e assinatura restrita de expressão gênica da micróglia, contendo 328 genes com $\log FC > 5$ e $q < 1E-25$, sendo que apenas os transcritos com mais de 50% de abundância foram incluídos.

Figura 15: *Análise de clustering da correlação dos valores de RNA-seq entre amostras.* Pode-se observar que as amostras isoladas de micróglia são muito parecidas entre si, e muito diferentes do tecido cerebral total (córtex). Variáveis como idade, gênero e intervalo *post-mortem* (PMD) não mostraram um clustering claro, enquanto que o país de origem das amostras dividiu as amostras (Brasil e Holanda).

Detalhamentos sobre os dados de expressão gênica, como símbolo do gene e descrição, $\log FC$ e valores de FDR encontram-se na tabela intitulada Tabela

Suplementar 2, que pode ser acessada através do link: <http://tinyurl.com/tabelas-suplementares>

Genes da assinatura restrita de expressão da micróglia foram classificados como “vermelhos” no *heat map* da Figura 16, genes da assinatura estendida da micróglia como “azuis”, genes menos expressos em micróglia e cuja diferença entre micróglia e córtex foi menos significativa foram classificados como “azul escuro”; quando não houve diferença tanto na abundância de expressão ou na comparação entre os dois grupos, o grupo de genes foi classificado como “preto”.

Figura 16: *Heat map de expressão de genes microgliais, do córtex e da micróglia murina.* Análise do transcriptoma da micróglia e sua comparação com o córtex mostrou diferenças marcantes. A assinatura restrita da micróglia (vermelho), compreende aqueles genes com maior expressão nessa comparação. Genes altamente expressos também se encontram na assinatura estendida da micróglia (azul). Em preto, os genes que não apresentaram diferença nessa comparação. Abaixo, os genes correspondentes da micróglia de camundongos (dos trabalhos de Butovsky (2013), Zhang (2014) e Hickman (2013) são indicados por barras pretas.

Para determinar a sobreposição de expressão gênica da micróglia entre aqueles genes expressos em humanos e em camundongos, o transcriptoma da micróglia foi comparado a dados de expressão de micróglia murina (102–104). Os genes expressos pela micróglia de camundongo foram pareados com os dados da expressão diferencial da micróglia humana no *heat map* da Figura 16, indicados por barras pretas.

Muitos dos genes previamente identificados por esses estudos murinos encaixaram-se no nosso grupo da assinatura estendida da micróglia, indicando que existe sim uma sobreposição entre os genes de micróglia expressos tanto por humanos quanto por camundongos. É interessante notar que diversos dos genes previamente identificados como específicos da micróglia murina apresentaram baixa ou não significativa expressão quando comparamos aos expressos em micróglia humana e no córtex, sugerindo diferenças espécie-específicas na expressão gênica da micróglia.

Os 328 genes da assinatura restrita de expressão gênica da micróglia humana encontram-se ilustrados no *heat map* da Figura 17. Estão incluídos nessa assinatura diversos genes previamente identificados, como *CX3CR1*, *TYROBP*, *TREM2*, *P2RY12*, *CSF1R*, e *CD33*. Os dados da micróglia murina também encontram-se ilustrados nesse *heat map* e pode-se observar grande sobreposição entre os dois conjuntos de dados. No entanto, a assinatura de expressão gênica da micróglia humana também continha genes não identificados nos estudos murinos. Estão incluídos nessa categoria: genes da família *Toll Like Receptors*, *TLR5* e *TLR10*; o fator de transcrição *IRF7*; as imunoglobulinas do tipo lectina *SIGLEC7*, *SIGLEC8*, *SIGLEC9*, *SIGLEC10*; as metaloproteinases *MMP14*, *ADAM28*; os receptores do tipo Fcγ *FCGR1A/1B*, *FCGR2A* (*CD32*), *FCGR2C*, *FCGR3A* (*CD16*); e os reguladores de apresentação de antígeno *CIITA*, *NLRC5*.

Figura 17: Heat map de expressão comparando os genes da assinatura restrita da micróglia humana com a assinatura murina. Os 328 genes da assinatura da micróglia humana foram ordenados em ordem alfabética e, ao lado, estão os genes encontrados pelos estudos murinos de Zhang (verde), Butovsky (azul) e Hickman (rosa). O preto indica a falta de correspondência entre amostras humanas e de camundongos.

As vias associadas aos 2093 genes da assinatura estendida da micróglia, juntamente com a assinatura restrita, foram determinadas usando a análise de enriquecimento IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*). Esse perfil da micróglia mostrou enriquecimento para vias de sinalização imune incluindo “sinalização da via TREM1”; “formação de fagossomo”; “vias de apresentação de antígeno”; “sinalização da via IL10”; “sinalização da via IL4”; “sinalização da via TLR”; “reconhecimento de padrões”; e “produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos” (Figura 18). Esses dados demonstram que as células microgлияis são imunocompetentes e fagócitos especializados, que expressam uma gama diversa de receptores e ligantes imunes, equipadas para responder a uma grande variedade de patógenos e padrões moleculares associados a danos. O perfil de expressão diferencial entre genes expressos em micróglia e córtex de algumas famílias com função imune encontra-se na Figura 19.

Figura 18: Análise de vias associadas aos genes da assinatura da expressão gênica da micróglia humana. Gráfico gerado com a ferramenta de análise Ingenuity Pathway Analysis, Qiagen.

Figura 19: Genes de diversas famílias imunes na comparação de expressão entre a micróglia humana e o córtex.

Um mapa de interação de proteínas de alta confiabilidade, ordenado de acordo com a localização intracelular dessas proteínas (espaço extracelular, membrana plasmática, citoplasma e núcleo) foi gerado utilizando os genes da assinatura restrita de expressão da micróglia (Figura 20). A grande maioria das proteínas encontra-se associada à membrana plasmática, realçando o papel de reconhecimento de padrões (*pattern recognition*) da micróglia. Já no núcleo, encontram-se fatores de transcrição previamente identificados, essenciais para a ontogenia da micróglia, como *SPI-1* e *IRF8*; mas também fatores ainda não descritos como parte do funcionamento dessas células, como *IRF5*, *IRF7*, *CIITA*,

4.8. Efeito do tempo *post-mortem* (PMD), gênero e idade na expressão gênica da micróglia humana

Um modelo linear generalizado foi criado com PMD, gênero e idade como variáveis preditivas para identificar genes significativamente associados a cada valor, depois que a análise foi corrigida para o efeito do país de origem (Figura 21). A tabela com todos os dados de símbolo do gene, descrição, valores de FDR e logFC referentes a essas análises encontram-se na tabela intitulada Tabela Suplementar 3, que pode ser acessada através do link: <http://tinyurl.com/tabelas-suplementares>

Variáveis	Hiper	Hipo
Idade	110	140
PMD	1	0
Gênero	24	14

Figura 21: Número de genes diferencialmente expressos em relação às variáveis idade, PMD e gênero. Usando um modelo linear de análise em que o efeito do país de origem foi compensado, o número de genes diferencialmente expressos (hiper e hipo) considerando idade, intervalo post-mortem (PMD) e gênero foi estimado.

Diversos estudos do transcriptoma do cérebro reportaram que o tempo *post-mortem* afeta a expressão gênica (110,111). PMD foi usada como uma variável quantitativa para estimar o efeito do tempo até a obtenção da amostra no perfil de expressão gênica da micróglia. Apenas um gene mostrou estar significativamente aumentado com o aumento progressivo do tempo *post-mortem*, sendo ele o gene não codificante *PSORS1C3* (*psoriasis susceptibility 1 candidate 3*), como mostra a Figura 21. Não houve nenhum outro gene associado a PMD, o que sugere que a micróglia foi pouco afetada até pelo menos 24h de tempo *post-mortem*.

Diferenças de gênero relacionadas a inflamação e à função da micróglia foram previamente identificadas(112,113). Nossos dados constatarem apenas 36 genes com diferenças significativas entre homens e mulheres. Em sua maioria, esses genes estão associados aos cromossomos X e Y, como *XIST*, *TTY14* e *TTY15* (Figura 22). Esses 36 genes não codificam receptores imunes

ou proteínas associadas à função da micróglia, sugerindo que a variável “gênero” não possui nenhum efeito nítido relacionado a essas células. No entanto, para que os efeitos de gênero na micróglia sejam realmente aferidos, um maior número de amostras femininas se faz necessário (n=5 nesse estudo).

Figura 22: Heat map de expressão dos genes da micróglia associados a diferenças entre os gêneros. Podemos observar que a grande maioria dos genes alterados encontram-se nos cromossomos X ou Y, indicando pouca diferença entre os homens e mulheres.

Mudanças na expressão gênica da micróglia associadas à idade foram demonstradas em estudos prévios (104,114). A idade dos indivíduos em nossa casuística variou de 37 a 102 anos. Usando “idade” como uma variável quantitativa, 110 genes encontraram-se aumentados e 137 genes com expressão diminuída ($q < 0,05$). A Figura 23 (A) mostra um *heat map* com os

genes significativamente afetados pela idade ($q < 0,01$). *Clustering* hierárquico desses 247 genes resultou em dois diferentes *clusters*, contendo amostras de indivíduos relativamente mais jovens (adultos) ou mais idosos, respectivamente. Alguns dos genes cuja expressão aumentou conforme o aumento da idade foram: *CXCR4*, *IRF4*, *CLEC2B*, *CLEC5A*, *SIGLEC5*, *P2RX1*, *ADAMTS15*, *MAP1B*, *VEGFA* e *KIF5C*; enquanto genes cuja expressão diminuiu conforme a idade incluem *CLEC17A*, *C2*, *OLFM3*, *HOXB2*, *CKB* e *P2RY12*. Análise de enriquecimento IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*) dos genes de expressão aumentada e diminuída combinados resultou em enriquecimento de diversas categorias de vias relacionadas ao desenvolvimento do Sistema Nervoso Central, como “morfologia anormal de axônios/neurônios” e “morfologia de células cerebrais”, como mostra a Figura 23 (B).

Figura 23: Diferenças na expressão gênica da micróglia ao longo do envelhecimento. A) Clustering hierárquico mostra diferença clara entre o perfil da micróglia de adultos e de idosos. B) Análise de vias associadas a essas alterações indicam (*Ingenuity Pathway Analysis*, Qiagen) que a micróglia perde sua capacidade de neuroproteção ao longo dos anos. C) A sobreposição dos genes da assinatura da micróglia entre humanos e camundongos é muito reduzida, limitando-se a apenas quatro genes.

Em seguida, nós comparamos o perfil de expressão gênica de envelhecimento da micróglia humana com o perfil de outros estudos de envelhecimento e *priming* – ativação exacerbada da micróglia, característico em modelos murinos – em micróglia murina (104,115,116). Foram encontrados apenas quatro genes em comum entre os estudos murinos e nosso estudo: *CXCR4* e *GBP2* estavam aumentados e *P2RY12* e *CKB* diminuíram sua expressão conforme a idade tanto em humanos como em camundongos (Figura 23 (C)). Além da falta de sobreposição entre as espécies e estudos em genes associados ao envelhecimento, a anotação funcional do nosso estudo com humanos mostrou-se muito diferente dos resultados referentes à camundongos previamente publicados. Esses dados indicam que o efeito do envelhecimento na expressão gênica da micróglia em humanos e camundongos é extremamente diferente.

4.9. O perfil de expressão gênica da micróglia humana difere de macrófagos e monócitos

Em determinadas condições neuropatológicas, como gliomas (32) e esclerose múltipla (117), células imunes (macrófagos e células dendríticas) infiltram o SNC e contribuem para a progressão da doença. Os marcadores usualmente utilizados para identificar a micróglia são *AIF1*, *P2RY12* e *CX3CR1*, enquanto que sua diferenciação das células mielóides infiltradas é feita com base na expressão de *CCR2* (118). A expressão de alguns, senão todos, desses marcadores sofre alteração em consequência da ativação da micróglia, *priming* ou envelhecimento. Por essa razão, a identificação de marcadores melhores e mais estáveis e que diferenciasssem a micróglia residente das células infiltradas seria de grande benefício. Potencias novos marcadores foram identificados através de comparação do transcriptoma da micróglia humana com o transcriptoma de macrófagos e monócitos humanos previamente publicados (105).

Clustering hierárquico da correlação inter-amostras mostrou que a cultura de monócitos, macrófagos e PBMCs (*peripheral blood mononuclear cell*, células mononucleares do sangue periférico) primeiramente formam um cluster entre si,

e em seguida com a micróglia. Como era esperado, os dados da expressão gênica de córtex mostraram-se muito diferentes daqueles referentes a macrófagos, monócitos, PBMCs e micróglia (Figura 24).

Figura 24: *Análise de clustering de correlação entre amostras de micróglia e outras células mielóides. A análise demonstrou que as células mielóides formam clusters primeiramente com elas mesmas e, depois, entre si. Isso indica que, apesar de semelhantes, existem características intrínsecas de cada tipo celular. MP, macrófagos; MO, monócitos, PB, PBMC.*

Análise de expressão gênica diferencial revelou que o número de genes que diferem entre micróglia e macrófagos ou micróglia e monócitos é similar ($q < 0,01$, $\log_{2}FC > 1$) (Figura 25). Macrófagos e monócitos compartilham 1683 genes que não foram expressos ou apresentaram baixa expressão em micróglia. A assinatura restrita da expressão gênica da micróglia aparece no *heat map* da Figura 24. Dos 305 genes desse grupo, 109 encontram-se também

significativamente mais altos em micróglia em comparação a monócitos e macrófagos. Os genes candidatos a marcadores específicos de micróglia foram: *CX3CR1*, *P2RY12*, *OFLML3*, *TMEM119*, *C3*, *SIGLEC10*, *FCGR2A*, *FCGR3A*, *SLC2A5*, *CIITA* e *NFATC2*. Genes específicos de macrófagos – *ACE*, *CLEC10A* e *ITGA3* – e de monócitos – *CD300E*, *CLEC1B* e *TGFBFR3* – também foram identificados. Diversos genes candidatos encontravam-se altamente expressos tanto em monócitos quanto em macrófagos, como *CD1b*, *CD36* e *MPEG1*. Detalhes desses dados de expressão e suas análises são mostrados: símbolo do gene e descrição, valores de logFC e FDR entre micróglia (MI), monócitos (MO), macrófagos (MA) e monócitos/macrófagos (MO/MA) encontram-se na tabela intitulada Tabela Suplementar 4, que pode ser acessada através do link: <http://tinyurl.com/tabelas-suplementares>. Genes da assinatura restrita de expressão da micróglia são classificados como “vermelhor” (*red*), genes da categoria MO como “verde claro” (*light green*), genes da categoria MA como “azuis” (*blue*) e genes da categoria MO/MA como “verde escuro” (*dark green*).

Figura 25: Análise de clustering de correlação entre amostras de micróglia e outras células mielóides. A análise demonstrou que as células mielóides formas clusters primeiramente com elas mesmas e, depois, entre si. Isso indica que, apesar de semelhantes, existem características intrínsecas de cada tipo celular. MP, macrófagos; MO, monócitos, PB, PBMC.

Os genes específicos de micróglia apresentaram enriquecimento para vias de “formação de fagossomo”, “fagocitose mediada por receptores FCγ”, e “sinalização da orientação axonal” (análise de enriquecimento IPA, Figura 25). Essa análise sugere que a micróglia é uma célula fagocítica especializada e que expressa genes especificamente necessários para seu funcionamento no SNC.

Os genes expressos tanto em macrófagos como monócitos mostraram enriquecimento para vias de “fosforilação oxidativa” e “sinalização da disfunção mitocondrial” (Figura 26). Na Figura 27, a expressão de genes de famílias imunes, como quimiocinas e seus receptores, em micróglia, macrófagos e monócitos é mostrada, confirmando a função imune dessas células.

Figura 26: Análise de vias associadas aos genes da assinatura específica da expressão gênica da micróglia humana e de monócitos/macrófagos. Gráfico gerado com a ferramenta de análise *Ingenuity Pathway Analysis*, Qiagen.

Figura 27: Genes de diversas famílias imunes na comparação de expressão entre a micróglia humana, monócitos e macrófagos. Valores em log(RPKM).

4.10. Os marcadores de micróglia humana encontrados são estáveis em condições patológicas

No tecido cerebral de indivíduos com esclerose múltipla, o local onde se encontram as lesões demielinizantes está repleto de micróglia e macrófagos (119). Reações de imunofluorescência foram feitas em tecido de pacientes com esclerose múltipla contendo essas lesões para validar os marcadores específicos de micróglia e MO/MA. Utilizamos um anticorpo específico para IBA1 para identificar micróglia e houve sobreposição parcial com os marcadores CD16 e CD32 (Figura 28). O infiltrado mielóide foi identificado com anticorpo específico para CD36 (C) e não houve co-marcação com células marcadas com IBA1.

Figura 28: Marcadores específicos da micróglia humana e macrófagos infiltrados. Criocortes de tecido de esclerose múltipla. Setas indicam a micróglia que expressa IBA1 e CD32 (A) ou CD16 (B), e triângulos indicam macrófagos que expressam CD36 (C), mas não IBA1. Barra de escala de 25µm, 40x.

Em amostras seriais de GBM, a presença de infiltrado mielóide foi verificada por imunohistoquímica. Foi escolhida uma região rica em necroses e formação vascular, como mostra a coloração com hematoxilina e eosina na Figura 29 (A). Utilizamos um anticorpo para CD68 (Figura 29 (B)), normalmente usado para identificar macrófagos, como controle. Tanto CD36 quanto CD143 (ACE) tiveram uma marcação parecida à marcação de CD68, ainda que não em todas as células, reforçando a ideia de marcadores diferenciais.

Figura 29: Cortes seriais de uma amostra representativa de GBM. Foi escolhida uma região com formação angiogênica e necrose (A). B) Células positivas para CD68, usado como marcador de macrófagos. Ambos os novos marcadores encontrados nesse estudo, CD36 (C) e CD143 (D) mostraram uma marcação similar, porém não igual, à de CD68. Barra de escala de 10 µm. Imagens em aumento de 40x e detalhes em aumento de 20x.

Foi efetuado o RNA-seq de 6 amostras de micróglia proveniente de gliomas (n=2 AGII, n=1 AGIII e n=3 GBM). Os dados resultantes dessa análise foram compilados e analisados comparativamente à micróglia de autópsia. Os resultados dessa análise são por demais extensos e complexos, e requerem

ainda uma série de validações experimentais. No entanto, pudemos observar que os marcadores escolhidos como específicos da micróglia (*CD16* e *CD32*) mantiveram expressão constante nas amostras tumorais, independente do grau do tumor, e sem diferença estatística quando comparada a micróglia NN, como mostra a Figura 29.

Foi possível obter amostra de infiltrado inflamatório mielóide de apenas uma amostra tumoral (MTU-1, um GBM). Por essa razão, não foi possível realizar análises estatísticas na comparação com a micróglia normal ou tumoral. Porém, a fim de complementar as análises feitas anteriormente sobre os marcadores específicos do infiltrado, plotamos os dados em um gráfico para comparação (Figura 30). Ainda que a micróglia tumoral apresente uma pequena elevação na expressão tanto de *CD36* quando de *CD143 (ACE)*, esse aumento não é significativo estatisticamente. Fica claro, no entanto, que os macrófagos apresentam uma expressão muito mais elevada do que a micróglia. Uma casuística maior de macrófagos/monócitos provenientes de gliomas ou de outro tecido contendo infiltrado inflamatório mielóide se faz necessária para a confirmação desses dados. Entretanto, podemos inferir que os marcadores escolhidos são eficientes na diferenciação da micróglia de outros leucócitos infiltrados.

Figura 30: Análise preliminar da comparação do transcriptoma da micróglia humana de glioma e de autópsia. Os marcadores identificados como específicos da micróglia normal (*CD32* e *CD16*) foram verificados na micróglia tumoral e foi observado que estes mantêm-se estáveis. Já os marcadores específicos de macrófagos infiltrados (*CD36* e *CD143 – ACE*) encontram-se muito elevados na amostra de macrófagos de glioma que obtivemos, enquanto que na micróglia tumoral eles se mantiveram baixos. Tu ugliia, micróglia tumoral.

Em suma, essas análises reforçam a ideia de que a micróglia é unicamente adaptada ao SNC, e novos marcadores que diferenciam a micróglia do infiltrado mielóide são apresentados.

5.DISSCUSSÃO

Nosso estudo apresenta o perfil de ativação da micróglia em gliomas humanos de diferentes graus e em GBMs de diferentes subtipos, ao mesmo tempo que explora os marcadores específicos da micróglia humana, ainda inédito na literatura atual e crucial para o estudo do microambiente de tumores cerebrais.

O estudo da micróglia em gliomas esbarra em dois pontos cruciais. O primeiro, a falta de uma população controle adequada como forma de comparação, levando em consideração possíveis diferenças de idade e gênero dos indivíduos, além do fato de que a maioria dos estudos utiliza amostras provenientes de cirurgia de epilepsia, com alterações inflamatórias inerentes à doença (90,91). O segundo ponto seria a falta de marcadores específicos que diferenciem a micróglia humana residente e as células mielóides infiltradas. Este estudo apresentou uma extensa coleção de amostras para identificar o perfil do transcriptoma da micróglia humana, tanto em indivíduos cognitivamente normais como em tumores. Ao mesmo tempo, foi feita a comparação dessa micróglia normal com dados previamente publicados da micróglia de camundongo. Camundongos são frequentemente usados para estudar micróglia, inclusive em gliomas; no entanto, existe grande debate sobre a validade desse modelo animal e de sua correspondência com a condição humana.

Os pontos abordados nesse estudo foram: 1) qual o perfil de ativação da micróglia em gliomas humanos? 2) qual o perfil de ativação da micróglia em glioblastomas de acordo com sua subclasse molecular? 3) qual o perfil de expressão da micróglia normal e como ele se compara ao perfil da micróglia murina? 4) quais alterações ocorrem na micróglia ao longo do envelhecimento? 5) existe diferença na micróglia de homens e mulheres? 6) é possível identificar marcadores que diferenciem a micróglia humana residente de células mielóides infiltradas?

5.1. O perfil de ativação da micróglia/macrófagos em astrocitomas tende ao perfil anti-inflamatório

Após avaliação de casuística extensa utilizando marcadores para os fenótipos clássico e alternativo, pudemos verificar que as amostras de astrocitomas apresentaram maior expressão de *CD163*, um marcador característico da ativação do tipo M2 (120). As amostras utilizadas para essa avaliação provêm de tecido misto de tumor, contendo tanto células tumorais como outras células do microambiente tumoral. Isso explicaria os baixos níveis de expressão dos genes característicos de células inflamatórias utilizados para essa análise. No entanto, podemos inferir desta avaliação que os astrocitomas apresentam uma característica anti-inflamatória mais acentuada do que os oligodendrogliomas, dada a maior expressão de *CD163*. Isso também é verdade quando é feita a comparação com o tecido NN. Devemos considerar que essas amostras advêm de cirurgias de epilepsia e provavelmente apresentam altos níveis de inflamação (90,91). Melhores comparações poderão ser feitas com amostras de micróglia não neoplásica que melhor se assemelhe a condições fisiológicas, como discutiremos a seguir. Ainda assim, essas observações vão de encontro com a característica de pior prognóstico dos astrocitomas, diretamente relacionada a um fenótipo de ativação alternativo das células inflamatórias (79,121).

5.2. O subtipo Proneural de GBM apresenta um fenótipo misto de ativação da micróglia, enquanto que os subtipos Clássico e Mesenquimal apresentam um fenótipo anti-inflamatório

Efetuamos a pesquisa de mutações somáticas em nossas amostras de GBM utilizando um painel customizado que incluiu todas as regiões codificadoras dos genes-alvo, bem como sítios de *splicing*. A análise desses resultados deixou claro que a identificação dos subtipos de GBM não é possível com análises de mutações pontuais. Existe um espectro muito grande de alterações nas regiões genômicas afetadas em cada subtipo e análises de larga escala tornar-se-ão cada vez mais comuns. Os resultados obtidos relacionados

à porcentagem de casos de GBM pertencentes a cada um dos subtipos, Proneural, Clássico e Mesenquimal, foi condizente com o reportado na literatura (23–26).

A expressão de marcadores característicos de células inflamatórias (*CD11b*) e de processos anti-inflamatórios (*CD163*) conferem um pior prognóstico aos pacientes com GBM (122). Ainda que a quantidade de amostras tenha impossibilitado análises de sobrevida nos casos dos subtipos Proneural e Mesenquimal, podemos especular que a menor expressão de *CD11b* e *CD163* em casos Proneurais esteja relacionada com o melhor prognóstico característico deste subtipo, uma vez que houve impacto na sobrevida de pacientes do subtipo Clássico com alta expressão de *CD163* e *CD11b*. Já o contrário pode ser dito para os casos do subtipo Mesenquimal, onde a hiperexpressão desses dois fatores pode estar relacionada a uma menor sobrevida dos pacientes.

Ainda que a classificação da ativação da micróglia e MAGs em M1 e M2 tenha sido contestada recentemente e não seja absoluta (123,124), ela ainda constitui uma definição relativa que auxilia na projeção do prognóstico da doença.

Em seguida, passamos a explorar o perfil do transcriptoma da micróglia humana, que nos auxiliará na identificação dessas células no microambiente tumoral.

5.3. O perfil da expressão gênica da micróglia humana apresenta grande diferença do perfil murino e é caracterizado por genes de neuroproteção e manutenção da homeostase

De forma a obter resultados que mais se aproximassem das condições fisiológicas *in vivo* para a análise da expressão gênica da micróglia, indivíduos com patologias do SNC evidentes foram excluídos, além de extensa análise neuropatológica ter sido feita para garantir amostras “normais”. Além disso, apenas as células viáveis foram selecionadas por FACS *sorting* (negativas para marcação com DAPI) e apenas amostras com alta qualidade de RNA foram sequenciadas. Ainda assim, por tratar-se de amostras de autópsia, todos os doadores sofriam de doenças que por fim o levaram ao óbito, potencialmente

afetando a expressão gênica da micróglia. No entanto, consideramos esta amostragem de autópsia, com critérios restritos de inclusão como os mencionados, o mais próximo da normalidade plausível de se obter. Nós analisamos o efeito de diversos parâmetros no transcriptoma da micróglia, como gênero, idade e tempo post-mortem. Surpreendentemente, nossos dados indicaram que um tempo post-mortem variando de 4h-24h teve pouca influência na expressão gênica dessas células.

Nosso estudo revelou grande sobreposição nos genes expressos na micróglia de humanos e de camundongos, ainda que diferenças consideráveis também estivessem presentes. Muitos fatores podem ter contribuído para causar essas diferenças, como diferenças intrínsecas entre as espécies, diferenças no ambiente, condição médica e as regiões cerebrais analisadas. Para citar um exemplo, camundongos laboratoriais são mantidos em condições ambientais padronizadas, que diferem daquelas as quais estariam expostos na natureza e que impedem quaisquer contatos com eventuais patógenos. É uma diferença notável dos humanos, expostos a diversos fatores patogênicos ao longo da vida. Além disso, a micróglia dos camundongos foi extraída de animais saudáveis e sem tempo *post-mortem* de espera, enquanto que a micróglia humana foi obtida durante o procedimento de autópsia de corpo inteiro e de doadores que sofriam de uma gama diversa de patologias. Fora isso, os estudos murinos utilizados para comparação (102–104) incluíram micróglia do cérebro total, enquanto que nosso estudo utilizou apenas a micróglia isolada do lóbulo superior parietal; estudo recente em camundongos revelou diversidade na expressão gênica da micróglia isolada de diferentes regiões do cérebro (125). Uma alternativa para verificar quais os fatores, intrínsecos e extrínsecos, determinantes para as dissimilaridades encontradas na expressão gênica da micróglia de humanos e camundongos seria a análise de micróglia de primatas não-humanos, com um tempo post-mortem similar ao dos estudos com camundongos.

Um número abundante dos genes classificados como específicos da micróglia humana estão envolvidos em vias de sinalização imunes, podendo refletir características funcionais dessas células. Exemplos interessantes são os receptores do tipo Toll, *TLR3*, *TLR5* e *TLR10*; o fator regulatório de intérferon *IRF7*, as imunoglobulinas do tipo *SIGLEC*, *SIGLEC8*, *SIGLEC9* e *SIGLEC10*; e

os fatores de transcrição reguladores das moléculas apresentadoras de antígenos *CIITA* e *NLRC5*.

Diversos genes expressos pela micróglia humana são receptores de superfície celular, ativados por padrões associados a patógenos ou dano. A ativação desses receptores leva à translocação de fatores de transcrição como os do tipo reguladores de interferon (IRF). IRFs representam uma família de fatores de transcrição ligados a diversas cascatas de sinalização imunes. A ativação de IRFs resulta na transcrição de interferons do tipo I, citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que coordenam a ativação de células imunes. Por exemplo, *TLR3* sinaliza via *IRF7* (126), e *IRF7* é responsável pela troca do fenótipo pró- para anti-inflamatório em culturas primárias de micróglia e macrófagos de camundongos (127). A expressão de *TLR3* e *IRF7* poderia possivelmente estar envolvida na função de neuroproteção e manutenção da homeostase da micróglia humana.

SIGLECs exercem um papel importante na imunossupressão e na neuroproteção. Elas regulam os efeitos da ativação imune, fagocitose e formação de inflamossomo através de seu imunorreceptor ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) (128). CD33 (SIGLEC3), um conhecido marcador de micróglia, está associado com o acúmulo de placas de beta amiloide em modelos animais (camundongos) de Doença de Alzheimer; isso se dá devido à capacidade de fagocitose diminuída das células microgliais desses camundongos, que apresentam altos níveis de CD133 (129). SIGLEC5, que encontra-se hiperexpresso em nossa casuística de micróglia humana durante o processo de envelhecimento, também foi associado à uma menor capacidade de fagocitose (130) e, como consequência, dificuldade na liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Nossos achados de que a micróglia humana expressa, além das moléculas SIGLEC previamente associadas a esse tipo células, SIGLECs 8, 9 e 10, destacam a importância e a especialização da micróglia para a manutenção homeostática do microambiente cerebral.

NLRC5 e *CIITA* são os maiores fatores de transcrição responsáveis pela regulação da expressão gênica dos fatores MHC I e II, respectivamente (131). Enquanto que a expressão de *CIITA* é restrita a células do tipo apresentadoras de antígenos (APCs), *NLRC5* é constitutivamente expresso em diversos tecidos,

principalmente nos da linhagem hematopoiética (células T CD4⁺, células T CD8⁺, células B CD19⁺, células natural killer (NK) e células T natural killer). A expressão de *NLRC5* em monócitos CD14⁺ e células mielóides CD11b⁺ de baço, no entanto, mostrou ser intermediária (132). Sendo assim, é interessante notar que a micróglia apresenta altos níveis dos reguladores da transcrição de ambas as classes de MHC. Esses dados sugerem que a micróglia é uma célula apresentadora de antígenos mais potente do que a micróglia murina e pode interagir as populações de células T-helper CD4 e CD8.

5.4. Mudanças na expressão gênica da micróglia humana ao longo do envelhecimento estão relacionadas a sua função de neuroproteção

Continuando a comparação entre a micróglia humana e a murina, comparamos os perfis de expressão gênica dessas células ao longo do envelhecimento. Surpreendentemente, houve muito pouca sobreposição da assinatura da micróglia entre as espécies dentro desse parâmetro, com apenas quatro genes presentes nos três estudos murinos usados para comparação. Os genes *CXCR4* e *GBP2* encontram-se aumentados e os genes *P2RY12* e *CKB* encontram-se diminuídos ao longo do envelhecimento na micróglia.

Análise de enriquecimento de vias revelou que as alterações de expressão que ocorrem em decorrência do envelhecimento estão relacionadas ao desenvolvimento e função do SNC, sugerindo que a micróglia perde sua capacidade de neuroproteção ao longo dos anos. O aumento da expressão de *VEGFA*, por exemplo, poderia indicar um papel na perda da função cognitiva para as células microgliais, uma vez que o aumento da expressão de *VEGFA* foi observado em pacientes com Doença de Alzheimer (133). Alterações de expressão em genes da família de Dectinas (CLECs)/SIGLECs ao longo do envelhecimento também poderia estar associado à perda da função de neuroproteção da micróglia. *CXCR4* é importante no processo de migração dessas células durante o desenvolvimento cerebral, processo esse mediado por *CXCL12* (134). No geral, as alterações relacionadas ao envelhecimento na micróglia foram muito mais contundentes em camundongos do que em

humanos. É possível que a micróglia humana seja mais resiliente e, por consequência, menos afetada pelo envelhecimento. Por outro lado, ainda que a micróglia seja considerada uma célula de longa sobrevivência e ou, a verdadeira duração da vida útil dessas células é desconhecida em humanos. O processo de reposição – e a taxa na qual esse processo ocorre – pode ser diferente entre humanos e murinos, influenciando as mudanças que ocorrem ao longo do envelhecimento nessas duas espécies (135).

5.5. Diferenças entre gêneros na expressão gênica da micróglia humana estão restritas a genes dos cromossomos X e Y

Existem poucos dados referentes a diferenças entre os gêneros relacionadas à micróglia, no entanto, alguns estudos identificaram a participação da micróglia nesse aspecto, tanto no desenvolvimento do cérebro quanto ao longo de seu processo de envelhecimento. Durante o desenvolvimento do cérebro de ratos, a quantidade de células microgliais e sua morfologia é diferente entre machos e fêmeas em regiões específicas do cérebro (112,136). Nossos dados mostraram que as diferenças na expressão gênica da micróglia humana entre homens e mulheres encontra-se restrita a genes dos cromossomos X e Y, sugerindo que há pouquíssima diferença funcional na micróglia do lóbulo parietal em indivíduos de gêneros diferentes. Interessantemente, estudo de Cribbs et al (137) mostrou que, para mulheres, as mudanças relacionadas ao envelhecimento tinham um aspecto mais inflamatório do que para homens. Nossa casuística consistiu em um n=5 de mulheres e um n=20 de homens. Sendo assim, um maior número de amostras femininas ajudaria a melhor elucidar características específicas dos gêneros na micróglia.

5.6. Identificação de marcadores específicos e estáveis da micróglia humana

Um dos obstáculos no estudo da micróglia humana em condições patológicas onde há a presença de infiltrados inflamatórios, como o glioma (32) e a esclerose múltipla (117), é a falta de um marcador específico que a diferencie

de outras células mieloides infiltradas, como macrófagos e monócitos. Até o presente momento, os marcadores específicos identificados na micróglia quiescente não permanecem estáveis ao longo do envelhecimento ou condições neuropatológicas. O marcador *P2RY12*, por exemplo, diminui conforme a idade.

Ao comparar nossos dados de expressão gênica da micróglia humana com dados prévios de monócitos e macrófagos, identificamos alguns possíveis candidatos a serem utilizados na diferenciação dessas células mielóides. Células que expressam CD32 e CD16 expressam, também, IBA1, porém, nem todas as células que expressam IBA1 expressam níveis detectáveis de CD32 ou CD16, indicando que esses marcadores, ainda que específicos para micróglia, não marcam todas as células microgliais. CD36 encontra-se expresso em células negativas para IBA1, confirmando que seu potencial para diferenciar células mielóides infiltradas da micróglia residente.

Nossos dados de análise preliminar da micróglia tumoral e sua comparação com a micróglia de autópsia são promissores. Os marcadores identificados para a micróglia permanecem estáveis, e os marcadores indicados para diferenças macrófagos infiltrados encontram-se hipoexpressos. Esses dados serão cruciais para análises futuras, mais aprofundadas, juntamente com o aumento na amostragem e especificidade das amostras de micróglia tumoral. Poderemos, então, entender melhor as características dessas células num contexto tão complexo como o microambiente tumoral do glioma.

Em suma, nosso estudo apresentou o status de ativação da micróglia em gliomas de diferentes graus e seu perfil de expressão gênica em amostras humanas cognitivamente intactas. Diferenças contundentes entre o perfil de expressão das células humanas e das células murinas foram encontradas, principalmente no que diz respeito ao processo de envelhecimento. Esses dados realçam a importância de mais estudos focados em células humanas. Nosso estudo poderá servir como ponto de partida para estudos futuros salientando as funções de genes específicos da micróglia humana, tanto em condições fisiológicas como patológicas, e principalmente no que diz respeito à identificação da micróglia num contexto patológico, como demonstramos em glioma.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise da expressão gênica de marcadores associados aos fenótipos de ativação da micróglia (*CD163* e *IL1B*) em gliomas humanos revelou maiores níveis de *CD163*, um marcador característico do fenótipo anti-inflamatório da micróglia, em amostras de astrocitoma. O mesmo foi verdade para os subtipos Clássico e Mesenquimal de GBM. Podemos concluir que esse aumento está associado a um pior prognóstico, como foi demonstrado para o subtipo Clássico. No entanto, essas análises demonstraram grande heterogeneidade na expressão desses marcadores, característica intrínseca dos gliomas, e salientaram a necessidade de estudos focados em populações puras.

Ao caracterizar a expressão gênica da micróglia humana proveniente de amostras de autópsia, pudemos verificar que esta apresenta genes que a classificam como uma célula altamente especializada às suas funções de célula apresentadora de antígenos, de fagócito, mas principalmente de neuroproteção e manutenção da homeostase cerebral. Essas últimas características são as mais afetadas ao longo do envelhecimento. A comparação dos nossos dados da micróglia humana com dados sobre a micróglia de camundongos disponíveis na literatura evidenciou grandes diferenças entre as espécies, principalmente relacionado às mudanças que ocorrem durante o envelhecimento. Pudemos concluir, também, que há pouca diferença entre homens e mulheres no que diz respeito à expressão gênica da micróglia, ainda que estudos adicionais com um maior número de amostras femininas se faça necessário.

Nossos dados preliminares de análise da expressão gênica de micróglia isolada de amostras de glioma confirmou que os marcadores específicos de micróglia identificados em nosso estudo permanecem estáveis em condições patológicas. Os marcadores encontrados para macrófagos encontram-se pouco expressos nessa micróglia tumoral, indicando o potencial desses marcadores para análises futuras.

7.REFERÊNCIAS

1. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-Oncol.* outubro de 2015;17 Suppl 4:iv1-iv62.
2. Collins VP. Brain tumours: classification and genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* junho de 2004;75 Suppl 2:ii2-11.
3. Chen R, Cohen AL, Colman H. Targeted Therapeutics in Patients With High-Grade Gliomas: Past, Present, and Future. *Curr Treat Options Oncol.* agosto de 2016;17(8):42.
4. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol (Berl).* agosto de 2007;114(2):97–109.
5. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol (Berl).* junho de 2016;131(6):803–20.
6. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 26 de setembro de 2008;321(5897):1807–12.
7. Ichimura K, Ohgaki H, Kleihues P, Collins VP. Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. *J Neurooncol.* novembro de 2004;70(2):137–60.
8. Reifenberger G, Collins VP. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med Berl Ger.* outubro de 2004;82(10):656–70.
9. Reis GF, Tihan T. Therapeutic targets in pilocytic astrocytoma based on genetic analysis. *Semin Pediatr Neurol.* março de 2015;22(1):23–7.
10. Frequent gains at chromosome 7q34 involving BRAF in pilocytic astrocytoma. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 4 de agosto de 2016]. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Frequent+gains+at+chromosome+7+q34+involving+BRAF+in+pilocytic+astrocytoma>

11. Deshmukh H, Yeh TH, Yu J, Sharma MK, Perry A, Leonard JR, et al. High-resolution, dual-platform aCGH analysis reveals frequent HIPK2 amplification and increased expression in pilocytic astrocytomas. *Oncogene*. 7 de agosto de 2008;27(34):4745–51.
12. Pfister S, Janzarik WG, Remke M, Ernst A, Werft W, Becker N, et al. BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas. *J Clin Invest*. maio de 2008;118(5):1739–49.
13. Kamoun A, Idbaih A, Dehais C, Elarouci N, Carpentier C, Letouzé E, et al. Integrated multi-omics analysis of oligodendroglial tumours identifies three subgroups of 1p/19q co-deleted gliomas. *Nat Commun*. 19 de abril de 2016;7:11263.
14. Foote MB, Papadopoulos N, Diaz LA. Genetic Classification of Gliomas: Refining Histopathology. *Cancer Cell*. 13 de julho de 2015;28(1):9–11.
15. Ichimura K, Narita Y, Hawkins CE. Diffusely infiltrating astrocytomas: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol (Berl)*. junho de 2015;129(6):789–808.
16. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev*. 1 de novembro de 2007;21(21):2683–710.
17. Binder DC, Davis AA, Wainwright DA. Immunotherapy for cancer in the central nervous system: Current and future directions. *Oncoimmunology*. fevereiro de 2016;5(2):e1082027.
18. Cancer Genome Atlas Research Network, Brat DJ, Verhaak RGW, Aldape KD, Yung WKA, Salama SR, et al. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med*. 25 de junho de 2015;372(26):2481–98.
19. Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, et al. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell*. 28 de janeiro de 2016;164(3):550–63.

20. Wesseling P, van den Bent M, Perry A. Oligodendroglioma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol (Berl)*. junho de 2015;129(6):809–27.
21. Cloughesy TF, Cavenee WK, Mischel PS. Glioblastoma: from molecular pathology to targeted treatment. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:1–25.
22. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 de fevereiro de 2013;19(4):764–72.
23. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 19 de janeiro de 2010;17(1):98–110.
24. Stieber D, Golebiewska A, Evers L, Lenkiewicz E, Brons NHC, Nicot N, et al. Glioblastomas are composed of genetically divergent clones with distinct tumorigenic potential and variable stem cell-associated phenotypes. *Acta Neuropathol (Berl)*. fevereiro de 2014;127(2):203–19.
25. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*. março de 2006;9(3):157–73.
26. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*. 10 de outubro de 2013;155(2):462–77.
27. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 19 de fevereiro de 2009;360(8):765–73.
28. Rogozin IB, Pavlov YI. Theoretical analysis of mutation hotspots and their DNA sequence context specificity. *Mutat Res*. setembro de 2003;544(1):65–85.
29. Filbin MG, Suvà ML. Gliomas Genomics and Epigenomics: Arriving at the Start and Knowing It for the First Time. *Annu Rev Pathol*. 23 de maio de 2016;11:497–521.

30. Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H. The brain tumor microenvironment. *Glia*. agosto de 2011;59(8):1169–80.
31. Hambardzumyan D, Bergers G. Glioblastoma: Defining Tumor Niches. *Trends Cancer*. dezembro de 2015;1(4):252–65.
32. Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci*. 29 de dezembro de 2015;19(1):20–7.
33. Ransohoff RM, El Khoury J. Microglia in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. janeiro de 2016;8(1):a020560.
34. Tremblay M-È, Lecours C, Samson L, Sánchez-Zafra V, Sierra A. From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. *Front Neuroanat*. 2015;9:45.
35. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*. junho de 2005;8(6):752–8.
36. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 27 de maio de 2005;308(5726):1314–8.
37. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 5 de novembro de 2010;330(6005):841–5.
38. Hoeffel G, Chen J, Lavin Y, Low D, Almeida FF, See P, et al. C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity*. 21 de abril de 2015;42(4):665–78.
39. Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*. 6 de abril de 2012;336(6077):86–90.
40. Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, et al. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci*. 20 de janeiro de 2013;16(3):273–80.
41. Ginhoux F, Prinz M. Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. agosto de 2015;7(8):a020537.

42. Ginhoux F, Guilliams M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*. 15 de março de 2016;44(3):439–49.
43. Ransohoff RM. Microglia and monocytes: 'tis plain the twain meet in the brain. *Nat Neurosci*. setembro de 2011;14(9):1098–100.
44. Perdiguerro EG, Geissmann F. The development and maintenance of resident macrophages. *Nat Immunol*. janeiro de 2016;17(1):2–8.
45. Elmore MRP, Najafi AR, Koike MA, Dagher NN, Spangenberg EE, Rice RA, et al. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron*. 16 de abril de 2014;82(2):380–97.
46. Bruttger J, Karram K, Wörtge S, Regen T, Marini F, Hoppmann N, et al. Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity*. 21 de julho de 2015;43(1):92–106.
47. Shemer A, Erny D, Jung S, Prinz M. Microglia Plasticity During Health and Disease: An Immunological Perspective. *Trends Immunol*. outubro de 2015;36(10):614–24.
48. Tremblay M-È, Lowery RL, Majewska AK. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol*. 2010;8(11):e1000527.
49. Colton CA, Chernyshev ON, Gilbert DL, Vitek MP. Microglial contribution to oxidative stress in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;899:292–307.
50. Karperien A, Ahammer H, Jelinek HF. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front Cell Neurosci*. 2013;7:3.
51. Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. abril de 2011;91(2):461–553.
52. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*. 9 de setembro de 2011;333(6048):1456–8.
53. Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*. 24 de maio de 2012;74(4):691–705.

54. Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, Lafaille JJ, et al. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*. 19 de dezembro de 2013;155(7):1596–609.
55. Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Kikuta J, Ishii M, et al. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat Neurosci*. maio de 2013;16(5):543–51.
56. Wu Y, Dissing-Olesen L, MacVicar BA, Stevens B. Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends Immunol*. outubro de 2015;36(10):605–13.
57. Brown GC, Neher JJ. Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat Rev Neurosci*. abril de 2014;15(4):209–16.
58. Sokolowski JD, Chabanon-Hicks CN, Han CZ, Heffron DS, Mandell JW. Fractalkine is a “find-me” signal released by neurons undergoing ethanol-induced apoptosis. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:360.
59. Hanisch U-K, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*. novembro de 2007;10(11):1387–94.
60. Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*. junho de 2015;16(6):358–72.
61. Sanchez-Guajardo V, Tentillier N, Romero-Ramos M. The relation between α -synuclein and microglia in Parkinson’s disease: Recent developments. *Neuroscience*. 27 de agosto de 2015;302:47–58.
62. Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. fevereiro de 2015;14(2):183–93.
63. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FMV. Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci*. setembro de 2011;14(9):1142–9.
64. Vainchtein ID, Vinet J, Brouwer N, Brendecke S, Biagini G, Biber K, et al. In acute experimental autoimmune encephalomyelitis, infiltrating macrophages are immune activated, whereas microglia remain immune suppressed. *Glia*. outubro de 2014;62(10):1724–35.

65. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. novembro de 2011;11(11):762–74.
66. Hickey WF, Kimura H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science*. 15 de janeiro de 1988;239(4837):290–2.
67. Flügel A, Bradl M, Kreutzberg GW, Graeber MB. Transformation of donor-derived bone marrow precursors into host microglia during autoimmune CNS inflammation and during the retrograde response to axotomy. *J Neurosci Res*. 1 de outubro de 2001;66(1):74–82.
68. Massengale M, Wagers AJ, Vogel H, Weissman IL. Hematopoietic cells maintain hematopoietic fates upon entering the brain. *J Exp Med*. 16 de maio de 2005;201(10):1579–89.
69. Hao N-B, Lü M-H, Fan Y-H, Cao Y-L, Zhang Z-R, Yang S-M. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:948098.
70. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. novembro de 2002;23(11):549–55.
71. Galdiero MR, Garlanda C, Jaillon S, Marone G, Mantovani A. Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression. *J Cell Physiol*. julho de 2013;228(7):1404–12.
72. Ellert-Miklaszewska A, Dabrowski M, Lipko M, Sliwa M, Maleszewska M, Kaminska B. Molecular definition of the pro-tumorigenic phenotype of glioma-activated microglia. *Glia*. 1 de julho de 2013;61(7):1178–90.
73. Gabrusiewicz K, Hossain MB, Cortes-Santiago N, Fan X, Kaminska B, Marini FC, et al. Macrophage Ablation Reduces M2-Like Populations and Jeopardizes Tumor Growth in a MAFIA-Based Glioma Model. *Neoplasia N Y N*. abril de 2015;17(4):374–84.
74. Ghoochani A, Schwarz MA, Yakubov E, Engelhorn T, Doerfler A, Buchfelder M, et al. MIF-CD74 signaling impedes microglial M1 polarization and facilitates brain tumorigenesis. *Oncogene*. 9 de maio de 2016;

75. Nakagawa Y, Chiba K. Role of microglial m1/m2 polarization in relapse and remission of psychiatric disorders and diseases. *Pharm Basel Switz*. 2014;7(12):1028–48.
76. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol*. novembro de 2009;86(5):1065–73.
77. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 24 de julho de 2008;454(7203):436–44.
78. Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol*. abril de 2009;9(4):259–70.
79. Glass R, Synowitz M. CNS macrophages and peripheral myeloid cells in brain tumours. *Acta Neuropathol (Berl)*. setembro de 2014;128(3):347–62.
80. Muramatsu M, Yamamoto S, Osawa T, Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling promotes mobilization of macrophage lineage cells from bone marrow and stimulates solid tumor growth. *Cancer Res*. 15 de outubro de 2010;70(20):8211–21.
81. Brandenburg S, Müller A, Turkowski K, Radev YT, Rot S, Schmidt C, et al. Resident microglia rather than peripheral macrophages promote vascularization in brain tumors and are source of alternative pro-angiogenic factors. *Acta Neuropathol (Berl)*. março de 2016;131(3):365–78.
82. Bettinger I, Thanos S, Paulus W. Microglia promote glioma migration. *Acta Neuropathol (Berl)*. abril de 2002;103(4):351–5.
83. Ye X, Xu S, Xin Y, Yu S, Ping Y, Chen L, et al. Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF- β 1 signaling pathway. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 de julho de 2012;189(1):444–53.
84. Sarkar S, Döring A, Zemp FJ, Silva C, Lun X, Wang X, et al. Therapeutic activation of macrophages and microglia to suppress brain tumor-initiating cells. *Nat Neurosci*. janeiro de 2014;17(1):46–55.
85. Zhou W, Ke SQ, Huang Z, Flavahan W, Fang X, Paul J, et al. Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated

macrophages and promotes malignant growth. *Nat Cell Biol.* 12 de janeiro de 2015;

86. Szatmári T, Lumniczky K, Désaknai S, Trajcevski S, Hídvégi EJ, Hamada H, et al. Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Sci.* junho de 2006;97(6):546–53.

87. Steed TC, Treiber JM, Patel K, Ramakrishnan V, Merk A, Smith AR, et al. Differential localization of glioblastoma subtype: implications on glioblastoma pathogenesis. *Oncotarget.* 1 de abril de 2016;

88. Li R, Li H, Yan W, Yang P, Bao Z, Zhang C, et al. Genetic and clinical characteristics of primary and secondary glioblastoma is associated with differential molecular subtype distribution. *Oncotarget.* 30 de março de 2015;6(9):7318–24.

89. Natesh K, Bhosale D, Desai A, Chandrika G, Pujari R, Jagtap J, et al. Oncostatin-M differentially regulates mesenchymal and Proneural signature genes in gliomas via STAT3 signaling. *Neoplasia N Y N.* fevereiro de 2015;17(2):225–37.

90. Devinsky O, Vezzani A, Najjar S, Lanerolle NCD, Rogawski MA. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci.* 1 de março de 2013;36(3):174–84.

91. Eyo UB, Murugan M, Wu L-J. Microglia-Neuron Communication in Epilepsy. *Glia.* 18 de maio de 2016;

92. Grinberg LT, Ferretti RE de L, Farfel JM, Leite R, Pasqualucci CA, Rosemberg S, et al. Brain bank of the Brazilian aging brain study group - a milestone reached and more than 1,600 collected brains. *Cell Tissue Bank.* 2007;8(2):151–62.

93. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology.* julho de 1984;34(7):939–44.

94. Kent WJ. BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res.* abril de 2002;12(4):656–64.

95. Valente V, Teixeira SA, Neder L, Okamoto OK, Oba-Shinjo SM, Marie SKN, et al. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol.* 2009;10:17.
96. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif.* dezembro de 2001;25(4):402–8.
97. Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* 25 de abril de 2013;14(4):R36.
98. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq - A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinforma Oxf Engl.* 25 de setembro de 2014;31(2):166–9.
99. DeLuca DS, Levin JZ, Sivachenko A, Fennell T, Nazaire M-D, Williams C, et al. RNA-SeQC: RNA-seq metrics for quality control and process optimization. *Bioinforma Oxf Engl.* 1 de junho de 2012;28(11):1530–2.
100. Durinck S, Spellman PT, Birney E, Huber W. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat Protoc.* janeiro de 2009;4(8):1184–91.
101. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinforma Oxf Engl.* 1 de janeiro de 2010;26(1):139–40.
102. Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, et al. An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 3 de setembro de 2014;34(36):11929–47.
103. Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, et al. Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci.* janeiro de 2014;17(1):131–43.
104. Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi TK, Borowsky ML, Wang L, Means TK, et al. The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat Neurosci.* dezembro de 2013;16(12):1896–905.
105. Saeed S, Quintin J, Kerstens HHD, Rao NA, Aghajani-refah A, Matarese F, et al. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage

differentiation and trained innate immunity. *Science*. 25 de setembro de 2014;345(6204):1251086–1251086.

106. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinforma Oxf Engl*. 1 de janeiro de 2013;29(1):15–21.

107. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*. janeiro de 2011;12:323.

108. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. 2015;43(7).

109. Olah M, Amor S, Brouwer N, Vinet J, Eggen B, Biber K, et al. Identification of a microglia phenotype supportive of remyelination. *Glia*. fevereiro de 2012;60(2):306–21.

110. Mistry M, Gillis J, Pavlidis P. Meta-analysis of gene coexpression networks in the post-mortem prefrontal cortex of patients with schizophrenia and unaffected controls. *BMC Neurosci*. janeiro de 2013;14:105.

111. Zhang B, Gaiteri C, Bodea L-G, Wang Z, McElwee J, Podtelezhnikov AA, et al. Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. *Cell*. 25 de abril de 2013;153(3):707–20.

112. Chen Y, Won SJ, Xu Y, Swanson RA. Targeting microglial activation in stroke therapy: pharmacological tools and gender effects. *Curr Med Chem*. janeiro de 2014;21(19):2146–55.

113. Lenz KM, McCarthy MM. A starring role for microglia in brain sex differences. *Neurosci Rev J Bringing Neurobiol Neurol Psychiatry*. junho de 2015;21(3):306–21.

114. Ma W, Cojocaru R, Gotoh N, Gieser L, Villasmil R, Cogliati T, et al. Gene expression changes in aging retinal microglia: relationship to microglial support functions and regulation of activation. *Neurobiol Aging*. outubro de 2013;34(10):2310–21.

115. Raj DDA, Jaarsma D, Holtman IR, Olah M, Ferreira FM, Schaafsma W, et al. Priming of microglia in a DNA-repair deficient model of accelerated aging. *Neurobiol Aging*. 9 de setembro de 2014;35(9):2147–60.
116. Holtman IR, Raj DD, Miller JA, Schaafsma W, Yin Z, Brouwer N, et al. Induction of a common microglia gene expression signature by aging and neurodegenerative conditions: a co-expression meta-analysis. *Acta Neuropathol Commun*. janeiro de 2015;3:31.
117. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 7 de agosto de 2015;15(9):545–58.
118. Mizutani M, Pino PA, Saederup N, Charo IF, Ransohoff RM, Cardona AE. The fractalkine receptor but not CCR2 is present on microglia from embryonic development throughout adulthood. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 de janeiro de 2012;188(1):29–36.
119. van der Valk P, De Groot CJ. Staging of multiple sclerosis (MS) lesions: pathology of the time frame of MS. *Neuropathol Appl Neurobiol*. fevereiro de 2000;26(1):2–10.
120. Komohara Y, Niino D, Saito Y, Ohnishi K, Horlad H, Ohshima K, et al. Clinical significance of CD163⁺ tumor-associated macrophages in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Sci*. julho de 2013;104(7):945–51.
121. Hagerling C, Casbon A-J, Werb Z. Balancing the innate immune system in tumor development. *Trends Cell Biol*. abril de 2015;25(4):214–20.
122. Prosniak M, Harshyne LA, Andrews DW, Kenyon LC, Bedelbaeva K, Apanasovich TV, et al. Glioma grade is associated with the accumulation and activity of cells bearing M2 monocyte markers. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 de julho de 2013;19(14):3776–86.
123. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Rep*. 2014;6:13.
124. Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci*. 26 de julho de 2016;19(8):987–91.
125. Grabert K, Michoel T, Karavolos MH, Clohisy S, Baillie JK, Stevens MP, et al. Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat Neurosci*. março de 2016;19(3):504–16.

126. Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol*. 27 de janeiro de 2008;26:535–84.
127. Cohen M, Matcovitch O, David E, Barnett-Itzhaki Z, Keren-Shaul H, Blecher-Gonen R, et al. Chronic exposure to TGF β 1 regulates myeloid cell inflammatory response in an IRF7-dependent manner. *EMBO J*. 17 de dezembro de 2014;33(24):2906–21.
128. Macauley MS, Crocker PR, Paulson JC. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat Rev Immunol*. outubro de 2014;14(10):653–66.
129. Griciuc A, Serrano-Pozo A, Parrado AR, Lesinski AN, Asselin CN, Mullin K, et al. Alzheimer's Disease Risk Gene CD33 Inhibits Microglial Uptake of Amyloid Beta. *Neuron*. 22 de maio de 2013;78(4):631–43.
130. Carlin AF, Chang Y-C, Areschoug T, Lindahl G, Hurtado-Ziola N, King CC, et al. Group B Streptococcus suppression of phagocyte functions by protein-mediated engagement of human Siglec-5. *J Exp Med*. 8 de março de 2009;206(8):1691–9.
131. Meissner TB, Li A, Biswas A, Lee K-H, Liu Y-J, Bayir E, et al. NLR family member NLRC5 is a transcriptional regulator of MHC class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 3 de agosto de 2010;107(31):13794–9.
132. Kobayashi KS, van den Elsen PJ. NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nat Rev Immunol*. dezembro de 2012;12(12):813–20.
133. Tang H, Mao X, Xie L, Greenberg DA, Jin K. Expression level of vascular endothelial growth factor in hippocampus is associated with cognitive impairment in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. maio de 2013;34(5):1412–5.
134. Arnò B, Grassivaro F, Rossi C, Bergamaschi A, Castiglioni V, Furlan R, et al. Neural progenitor cells orchestrate microglia migration and positioning into the developing cortex. *Nat Commun*. 26 de novembro de 2014;5:5611.

135. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM V. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci.* dezembro de 2007;10(12):1538–43.

136. Lenz KM, Nugent BM, Haliyur R, McCarthy MM. Microglia are essential to masculinization of brain and behavior. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 13 de fevereiro de 2013;33(7):2761–72.

137. Cribbs DH, Berchtold NC, Perreau V, Coleman PD, Rogers J, Tenner AJ, et al. Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: a microarray study. *J Neuroinflammation.* 2012;9:179.

8. ANEXOS

Anexo 1: Informações e dados clínicos dos pacientes com gliomas e epilepsia incluídos nesse trabalho.

Anexo 2: Informações e dados clínicos dos indivíduos submetidos a autópsia incluídos nesse trabalho.

Anexo 3: Aprovação do estudo pela CAPPesq.

Anexo 4: Exemplo do Termo de Consentimento Pós-Informado dos entregue aos pacientes incluídos nesse trabalho.

Anexo 5: Carta de aceite da revista *Methods in Molecular Biology* do artigo referente ao presente estudo, *intitulado Isolation of microglia and immune infiltrates from mouse and primate central nervous system*. Carta de submissão à *Nature Neuroscience* do artigo intitulado *Identification of the human microglia transcriptome*

Anexo 5: Artigo referente ao presente estudo submetido e aceito pela revista *Methods in Molecular Biology*.

Anexo 6: Artigo referente ao presente estudo submetido à revista *Nature Neuroscience*.

8.1. ANEXO 1												
Diagnóstico	Caso	Número	AS3	Sexo	Idade*	Registro HC	No. do Anátomo Patológico	Data de Nascimento	Data de Cirurgia	Data de Óbito	Tempo de Seguimento*	Sobrevida*
NN	1	108	N	M	31a	7044114J	48-6846-3	08/05/70	28/06/01		7a 8m	
NN	2	132	N	M	51a	2775661A	49-5770-9	10/11/49	16/08/01		7a 4m	
NN	3	167	N	M	39a	3288025F	50-4808-7	31/03/62	17/10/01		7a 4m	
NN	4	173	N	F	44a	3055143A	50-5645-4	04/10/57	24/10/01		7a 4m	
NN	5	179	N	F	39a	7041451D		21/03/62	31/10/01		7a 4m	
NN	6	189	N	F	35a	3013021C		15/06/66	21/11/01		7a 3m	
NN	7	196	N	F	44a	3170702G		15/08/57	05/12/01		7a 2m	
NN	8	226	N	M	38a	2995897G	51-7832-0	25/06/63	31/01/2002		7a 1m	
NN	9	232	N	M	28a	2920291E		08/10/73	14/02/2002		7a 0m	
NN	10	237	N	F	47a	7028040A	52-0316-3	08/09/54	20/02/02		7a 0m	
NN	11	245	N	M	25a	2859949E	52-1343-6	25/06/76	28/02/02		7a 0m	
NN	12	263	N	M	27a	2835024G		10/12/74	04/04/02		6a 10m	
NN	13	312	N	F	41a	3189719A	53-6502-3	18/05/61	13/06/02		6a 8m	
NN	14	330	N	M	32a	2374932H	54-1685-0	14/02/70	23/07/02		6a 7m	
NN	15	332	N	F	32a	3359015D	54-2198-5	07/03/79	25/07/02		6a 7m	
NN	16	349	N	M	40a	55301488G	54-5969-9	26/12/61	21/08/02		6a 6m	
NN	17	714	N	F	56a	13622992A	62-2613-2	04/06/47	18/03/04		5a 10m	
NN	18	714	N	F	56a	13602383F	62-2100-9	04/06/47	18/03/04		4a 11m	
NN	19	755	N	F	39a	7048016-C	63-0783-3	14/07/64	19/05/04		4a 9m	
NN	20	805	N	F	37a	7047635-A	64-1342-0	14/10/66	04/08/04		4a 6m	
NN	21	861	N	M	35a	13561850G	65-3324-8	01/04/69	03/11/04		4a 3m	
NN	22	969	N	F	34a	7047021-J		28/02/71	05/05/05		3a 9m	
AGI	23	185	N	M	24a	13522266H	50-8257-9	11/10/77	12/11/01		7a 3m	
AGI	24	335	N	F	34a	2568552A	54-2626-0	15/11/67	30/07/02		6a 7m	
AGI	25	352	N	M	35a	13578917K	54-6383-1	28/09/66	23/08/02		6a 6m	
AGI	26	363	N	M	13a	6063214G	54-9952-6	20/04/89	18/09/02		6a 5m	
AGI	27	421	N	F	16a	13473553G	56-4821-1	09/03/86	15/01/03		6a 1m	
AGI	28	436	N	M	18a	13570687I	56-8949-0	09/01/85	10/02/03		6a 0m	
AGI	29	463	N	F	16a	13449456G	57-3638-2	07/07/86	21/03/03		5a 11m	
AGI	30	495	N	F	8a	13492358C	58-1515-0	16/10/94	21/05/03		5a 9m	
AGI	31	501	N	M	32a	13491797C	58-2590-3	18/03/71	28/05/03		5a 9m	
AGI	32	570	N	F	8a	13594605C	59-5895-4	05/04/95	01/09/03		6a 1m	

AGI	33	594	N	M	18a	3367062G	59-9510-8	13/06/85	24/09/03		5a 5m	
AGI	34	601	N	M	21a	1359908G	60-0984-0	26/07/82	06/10/03		5a 4m	
AGI	35	828	N	M	16a	77071554A	64-8111-6	21/06/88	23/09/04		4a 5m	
AGI	36	878	N	F	18a	13658238-D	65-6608-1	02/11/86	29/11/04		4a 3m	
AGI	37	889	N	F	43a	13661866-B	65-9211-2	27/05/61	17/12/04		4a 2m	
AGI	38	892	N	M	14a	13665259-F	65-9601-0	01/01/90	22/12/04		4a 2m	
AGI	39	932	N	M	17a	13672526-D	66-7407-0	13/04/87	07/03/05		3a 11m	
AGI	40	946	N	M	9a	3206638-A	66-9467-5	06/11/95	23/03/05		3a 11m	
AGI	41	995	N	M	22a	13685104-G	68-3495-7	14/01/83	02/07/05		3a 8m	
AGI	42	1000	N	M	4a	13694475-E	68-4796-0	10/09/00	13/07/05		3a 7m	
AGI	43	1044	N	M	8a	13610605-I	69-6825-2	28/10/96	05/10/05		3a 4m	
AGI	44	1049	N	F	14a	13708589-J	69-8645-5	18/09/91	19/10/05		3a 4m	
AGI	45	1058	N	M	22a	77077345-C	70-0849-0	07/02/83	04/11/05		3a 3m	
AGII	46	55	89	F	36a	2623330D	46-6343-8	21/03/64	02/01/01		8a 2m	114m
AGII	47	76	14	M	27a	3361902H	47-3260-0	04/12/73	23/3/01	04/12/05		56m
AGII	48	101	10	F	23a	7047105H	48-3300-7	25/10/77	04/06/01		7a 8m	82m
AGII	49	118	2	F	45a	13546582F	49-1687-5	02/08/55	23/07/01	30/07/03		24m
AGII	50	239	40	M	56a	13548901E	52-0559-0	25/07/45	22/02/02		7a 0m	91m
AGII	51	250	39	F	30a	13562412F	52-2827-1	25/08/71	11/03/02		6a 11m	7m
AGII	52	254	38	F	24a	13572670I	52-3726-2	18/06/77	15/03/02		6a 11m	27m
AGII	53	267	1	M	43a	13574538G	52-7365-0	13/09/58	01/04/02		6a 10m	96m
AGII	54	328	15	M	39a	77063187A	54-0842-3	18/04/63	17/07/02		6a 7m	91m
AGII	55	341	14	M	28a	3361902H	54-4295-8	04/12/73	09/08/02	04/12/05		
AGII	56	346	16	M	23a	77062139H	54-5126-4	03/06/79	15/08/02		6a 6m	51m
AGII	57	392	22	F	38a	3233880E	55-7686-5	09/05/64	11/11/02		6a 3m	80m
AGII	58	412	1	M	44a	13574538G	56-2912-8	13/09/58	20/12/02		6a 2m	
AGII	59	452	62	M	41a	77062882E	57-1922-4	15/11/61	10/03/03	06/08/08	5a 11m	84m
AGII	60	453	60	M	28a	3144835K	57-1958-5	23/12/74	11/03/03		5a 11m	44m
AGII	61	467	63	F	41a	13484936E	57-4432-6	25/10/61	27/03/03	06/09/06		41m
AGII	62	490	52	M	35a	13491090E	58-0272-5	20/06/67	13/05/03	01/08/06		38m
AGII	63	577	78	F	35a	13592815B	59-6637-0	08/10/67	05/09/03		5a 5m	50m
AGII	64	715	88	F	27a	13622992A	62-2613-2	26/10/76	22/03/04	10/01/05		9m
AGII	65	806	93	M	39a	13643283-C	64-1370-6	08/02/65	05/08/04		4a 6m	44m
AGII	66	999	115	M	25a	13683439-B	68-4581-1	19/08/79	12/07/05		3a 7m	60m
AGII	67	1016	119	M	35a	77068029-G	68-7346-4	12/08/69	21/10/03		1a 11m	23m

AGII	68	1095	127	M	32a	13722519-E	71-3078-3	08/12/73	10/02/06		3a 0m	110m
AGII	69	1099	129	F	32a	13723677-B	71-4215-3	06/03/73	17/02/06		4a 4m	52m
AGII	70	1113	62	M	44a	77062882E	71-9661-0	15/11/61	27/03/06	06/08/08		
AGII	71	1155	140	F	25a	13743082-E	2006-1830	13/07/81	14/07/06			43m
AGIII	72	28	6	M	54a	3003852-K	45-5543-0	06/09/82	20/11/00		8a 3m	99m
AGIII	73	34	53	M	18a	3324020-E	45-7850-3	06/09/82	20/11/00		8a 3m	115m
AGIII	74	73	51	F	25a	7042702A	47-2162-4	08/04/76	16/3/01	19/03/07		77m
AGIII	75	233	41	F	58a	13567029I	51-9554-3	12/07/43	15/02/2002	16/03/03		13m
AGIII	76	249	3	M	32a	3259481K	52-2586-8	27/12/69	08/03/02	21/10/02		7m
AGIII	77	338	11	F	37a	13580020H	54-3528-5	21/01/65	05/08/02	14/10/03		14m
AGIII	78	347	17	M	15a	13579476I	54-5552-9	20/04/87	19/08/02		6a 6m	82m
AGIII	79	360	18	F	32a	77063981H	54-9361-7	04/07/70	13/09/02		6a 5m	90m
AGIII	80	366	8	M	37a	13452901C	55-0872-0	25/08/65	23/09/02		6a 5m	93m
AGIII	81	410	67	M	30a	13472055H	56-2773-7	04/08/73	19/12/02		6a 2m	77m
AGIII	82	428	92	M	58a	13454723D	56-6174-9	04/10/80	24/01/03		6a 1m	74m
AGIII	83	478	64	M	39a	77066277G	57-6718-0	12/11/66	11/04/03	12/01/05		21m
AGIII	84	514	73	M	37a	13498164D	58-5446-6	10/11/65	16/06/03		5a 8m	24m
AGIII	85	734	100	M	31a	3246130E	62-7221-5	14/07/72	27/04/04		4a 10m	1m
AGIII	86	905	38	F	27a	13572670-I	66-1379-9	18/06/77	14/01/05		4a 1m	1m
AGIII	87	981	N	M	21a	6045626-J	67-8719-3	08/02/84	01/06/05		3a 9m	
AGIII	88	1033	121	F	29a	77060584-C	69-3015-8	02/06/76	08/09/05		3a 5m	2m
AGIII	89	1036	120	F	46a	13702355-F	69-3029-8	19/07/59	10/09/05	12/12/05		3m
GBM	90	35	12	M	53a	3324020-E	45-7850-3	25/11/47	24/11/00	15/09/04		45m
GBM	91	74	50	M	74a	7045824G	47-2426-7	25/10/26	19/3/01	29/08/02		17m
GBM	92	175	49	F	56a	3316801G	50-6045-1	07/04/45	26/10/01	31/03/02		5m
GBM	93	194	48	M	71a	77060472A	51-0694-0	29/05/30	30/11/01	01/10/03		22m
GBM	94	204	47	F	70a	2837573G	51-3734-9	01/01/30	21/12/01	06/08/02		7m
GBM	95	208	45	M	62a	2869282K	51-4351-9	09/08/39	04/01/02	24/07/02		6m
GBM	96	256	7	M	41a	13572856A	52-4509-5	25/11/60	21/03/02	14/06/02		2m
GBM	97	269	43	F	65a	13574725E	52-7569-5	28/02/37	12/04/02	18/04/02		0
GBM	98	274	42	F	47a	77062152I	52-8714-6	20/12/54	19/04/02	27/09/03		17m
GBM	99	297	4	F	78a	13445637B	53-3674-0	14/06/23	23/05/02	02/05/03		11m
GBM	100	317	32	F	71a	2357547B	53-7898-2	22/12/30	24/06/02	15/09/02		2m
GBM	101	356	30	M	74a	5163770G	54-7434-5	17/06/28	30/08/02	23/08/03		11m
GBM	102	370	29	M	45a	13581612B	55-1404-5	12/07/57	27/09/02	04/11/03		13m

GBM	103	384	13	M	45a	1356103K	55-5488-8	27/04/57	25/10/02	14/03/03		14m
GBM	104	391	9	F	54a	13581546D	55-7112-0	16/03/48	07/11/02	06/12/03		12m
GBM	105	397	20	F	58a	2995994F	55-8650-0	08/12/43	20/11/02	30/04//2003		5m
GBM	106	405	30	M	74a	13581612B	16-1466-0	12/07/57	10/12/02	04/11/03		
GBM	107	427	25	F	51a	3200846K	56-5920-5	11/11/51	23/01/03	13/07/03		5m
GBM	108	442	27	M	68a	13473990D	56-9206-7	12/05/34	17/02/03	18/06/03		4m
GBM	109	450	54	F	61a	13481051K	57-1498-2	26/08/41	06/03/03	13/05/04		14m
GBM	110	458	55	M	62a	13482791J	57-2532-1	23/04/42	16/03/03	15/07/03		3
GBM	111	485	57	M	67a	13489242I	57-8817-0	18/02/36	01/05/03	30/11/03		6m
GBM	112	496	58	F	57a	3009732B	58-1738-2	30/10/45	22/05/03	25/01/04		8m
GBM	113	498	61	F	17a	3346247F	58-1946-6	06/02/86	23/05/03	15/10/03		4m
GBM	114	503	72	M	63a	13470665B	58-3233-0	17/07/39	02/06/03	25/08/03		2m
GBM	115	510	71	M	56a	3335161J	58-4389-8	11/10/46	10/06/03	28/05/05		23m
GBM	116	522	69	M	48a	13498664F	58-6616-2	20/05/55	27/06/03	20/07/05		24m
GBM	117	524	56	F	59a	13499574B	58-6807-6	05/11/43	30/06/03	11/03/04		8m
GBM	118	547	75	M	71a	13590219J	59-1211-3	15/08/31	31/07/03	15/09/04		13m
GBM	119	555	24A	M	57a	13592731D	59-3422-2	20/07/46	14/08/03	16/02/05		18m
GBM	120	573	70	M	50a	3337216F	59-6190-4	14/11/52	03/09/03	04/06/04		9m
GBM	121	592	74	F	40a	13599910A	59-9328-8	01/10/62	24/09/03		5a 5m	
GBM	122	629	79	M	64a	13605568F	60-6149-4	25/06/38	11/11/03	15/01/05		14m
GBM	123	632	77	F	41a	13607484I	60-6580-5	15/08/62	13/11/03	23/03/06		28m
GBM	124	638	13	M	55a	13607484I	60-6580-5	15/08/62	13/11/03	28/01/04		2m
GBM	125	640	85	F	58a	44104649F	60-7753-6	12/12/44	21/11/03	13/05/04		5m
GBM	126	642	59	M	42a	13608382J	60-7749-8	14/04/62	21/11/03	04/05/05		17m
GBM	127	663	82	M	66a	3011915I	61-2537-9	11/12/37	05/12/03	06/08/04		7m
GBM	128	684	81	F	56a	13616873G	61-7187-7	15/12/47	12/02/04	18/05/04		1m
GBM	129	687	84	M	45a	13619180I	61-7615-1	07/03/58	16/02/04	28/12/04		9m
GBM	130	698	83	M	58a	13621334B	61-9020-0	25/09/45	27/02/04	15/12/04		7m
GBM	131	724	68	F	62a	13625792E	62-4884-5	01/02/42	08/04/04		4a 10m	
GBM	132	743	80	M	52a	2173677-K	62-8701-8	09/06/52	06/05/04	16/07/04		2m
GBM	133	750	86	M	51a	13613008-D	62-9711-0	23/09/52	13/05/04	25/11/04		6m
GBM	134	792	N	M	35a	44106871-I	63-8599-0	21/12/69	16/07/04	14/01/05		5m
GBM	135	795	N	M	28a	13640608-J	63-9408-6	15/06/76	22/08/04	18/07/05		11m
GBM	136	852	97	M	60a	13654470A	65-2002-2	19/08/44	22/10/04	05/12/05		13m
GBM	137	854	90	M	46a	13655653B	65-2828-7	17/06/58	27/10/04		4a 4m	

GBM	138	875	94	M	35a	44106871-I	65-5776-7	21/12/69	23/11/04	14/01/05		
GBM	139	879	103	M	61a	3024155-H	65-7270-7	27/07/43	02/12/04	18/03/05		3m
GBM	140	881	95	M	49a	13661416-K	65-7715-6	25/01/55	07/12/04	22/04/05		4m
GBM	141	884	97	F	52a	13663130-B	65-8286-9	15/01/52	10/12/04	08/04/07		27m
GBM	142	885	N	F	86a	2105118-C	65-8283-4	24/04/18	10/12/04	23/02/05		2m
GBM	143	891	98	M	57a	13664358-H	65-9493-0	25/10/47	21/12/04	28/01/06		7m
GBM	144	901	102	M	16a	13665181-J	66-0382-3	07/11/88	05/01/05	12/03/05		2m
GBM	145	903	117	M	55a	13666243-J	66-0989-9	08/02/45	11/01/05	29/11/06		22m
GBM	146	925	105	M	40a	13672566-C	66-5405-5	08/09/64	25/02/05	22/03/06		12m
GBM	147	930	104	M	26a	13572505-G	66-6758-9	01/10/78	03/03/05	10/10/07		31m
GBM	148	1002	108	M	40a	13693256-A	68-5149-5	29/01/65	15/07/05	04/10/05		2m
GBM	149	1003	109	F	68a	13694933-J	68-5148-7	25/03/37	17/07/05	30/11/05		4m
GBM	150	1007	117	F	28a	13572670-I	68-6084-2	18/06/77	22/07/05	18/11/05		3m
GBM	151	1009	112	F	38a	13680596-I	68-6226-8	25/10/66	25/07/05	12/03/06		21m
GBM	152	1070	N	M	72a	77077431-F	70-3955-7	09/03/33	29/11/05	05/08/06		8m
GBM	153	1074	118	M	32a	13714223-E	70-4471-2	25/07/73	03/12/05		3a 11m	
GBM	154	1077	111	F	41a	13607484-I	70-6006-8	15/08/62	14/12/05	23/03/06		
GBM	155	1084	122	M	54a	13718609-B	70-9092-7	18/04/51	13/01/06	07/07/06		5m
GBM	156	1091	124	M	55a	13625572-H	71-1551-2	05/09/49	03/02/06	09/01/07		21m
GBM	157	1103	137	M	54a	13718609-B	71-5874-2	18/04/1951	03/03/2006	07/07/06		
GBM	158	1118	130	F	61a	13731814-H	72-2757-4	10/07/59	18/04/06	21/06/06		2m
GBM	159	1122	123	M	68a	55441508-G	72-4276-0	26/07/37	01/05/06	01/10/06		5m
GBM	160	1123	131	M	53a	13732747-F	72-4527-0	29/10/53	02/05/06	21/04/07		11m
GBM	161	1124	134	M	63a	13732923-H	72-5103-3	19/03/43	05/05/06	20/09/06		4m
GBM	162	1133	135	M	52a	55302090-A	72-8168-4	28/12/53	26/05/06	26/02/07		9m
GBM	163	1144	133	M	76a	13740714-K	73-1961-4	15/08/29	25/06/06	07/09/06		2m
GBM	164	1161	136	M	39a	13743659-F	2006-3702	13/01/67	26/07/06	08/11/07		13m
GBM	165	1162	138	F	68a	13743549-A	2006-4376	20/05/38	31/07/06	26/12/07		15m
GBM	166	1169	139	F	56a	13746356-E	2006-5805	13/03/50	09/08/06	05/01/08		2m
GBM	167	1190	141	F	58a	13756119-E	2006-17398	16/09/48	24/10/06	24/12/07		9m
GBM	168	1194	144	M	26a	13572505-G	2006-18928	01/10/78	03/11/06	10/10/07		
GBM	169	1199	142	M	30a	13716278-H	2006-21506	06/11/75	24/11/06	14/02/07		11m
GBM	170	1205	143	M	69a	13749545-H	2006-23080	13/12/36	05/12/06		2a 9m	
GBM	171	1212	107	M	31a	13716278-H	2007-0539	06/11/75	05/01/07	14/02/07		
GBM	172	1232	N	M	58a	13770362-G	2007-6934	07/04/48	16/02/07	29/02/08		12m

GBM	173	1237	145	M	59a	890319629-I	2007-7960	18/05/47	27/02/07	13/10/07		7m
GBM	174	1243	N	M	47a	13773467-E	2007-10145	22/09/59	13/03/07	15/01/08		10m
GBM	175	1250	146	M	63a	13774296-K	2007-13001	11/01/44	30/03/07	06/11/07		7m
GBM	176	1272	N	M	70	13781741-I	2007-20364	05/05/1937	18/05/07			6m
GBM	177	1274	N		58	13782798-D	2007-21414	29/05/1948	25/05/07			13m
GBM	178	1282	N	M	56	13788581-C	2007-27711	29/01/1951	06/07/07			9m
GBM	179	1295	N	F	60		2007-31638		03/08/07			7m
GBM	180	1299	N	M	77	13793837-H	2007-33833	29/10/1930	17/08/07			4m
GBM	181	1303	N	M	49	13794631-F	2007-37019	31/08/1957	07/09/07			5m
GBM	182	1310	N	M	48	13800157-D	2007-41204	14/11/1958	05/10/07			16m
GBM	183	1315	N	M	68	77088953-K	2007-43161	31/07/1939	19/10/07			11m
GBM	184	1318	N	M	58	13802880-H	2007-44105	12/11/1949	26/10/07			21m
GBM	185	1319	N	F	76	13802845-D	2007-44102	25/03/1931	27/10/07			3m
GBM	186	1331	N	M	66	13824293-D	2008-16625	29/08/1941	21/05/08			0
GBM	187	1380	N	M	58	13862981-K	2009-15426	18/12/1950	29/04/09			29m
GBM	188	1386	N	F	66	4054985-G	2009-17921	20/01/1943	20/05/09			2m
GBM	189	1398	N	M	78	77099995-H	2009-21308	06/07/1930	17/06/09			7m
GBM	190	1416	N	M	32	3882644-I	2009-27938	08/11/77	06/08/09			7m
GBM	191	1417	N	M	36	13881714-H	2009-28105	29/10/71	07/08/09			4m
GBM	192	1503	N	F	49	N	N	16/12/66	18/02/14			
GBM	193	1507	N	M	45	N	N	02/11/70	23/04/14			
GBM	194	1508	N	M	30	N	N	31/08/83	26/05/14			
GBM	195	1509	N	M	71	N	N	28/10/42	09/06/14			
GBM	196	1511	N			N	N					
GBM	197	1518	N	M	55	N	N	30/01/1959	22/10/14			
GBM	198	1520	N	F	79	N	N	29/10/1935	02/12/14			
GBM	199	1522	N	F	53	N	N	03/05/61	05/12/14			
OAI	200	512	7	F	36	13497507-H	58-4764-8	22/08/1967	12/06/2003	11/05/2006	2a 10m	
OAI	201	1040	27	M	52	13805339-H	69-5568-1	19/04/1956	19/11/2007	10/02/2008		0a 2m
OAI	202	1067	28	M	34	13804795E	69-5983-0	04/04/1974	11/01/2008		1a 0m	1a 2m
OAI	203	1258	40	M	26	13765467-A	2007-6978	06/09/1981	16/04/2007		1a 11m	1a 11m
OAI	204	257	46	M	46	2940354-I	17130	22/11/1960	26/04/2007		2a 6m	1a 11m
OAI	205	1011	55	M	30	13812053-G	3214	15/08/1977	08/02/2008		2a 0m	1a 1m
OAI	206	1143	28	M	48	13572750-K	3988	03/05/1956	25/03/2002		6a 11m	7a 0m
OAI	207	1216	80	F	25	13756860-D	28812	08/11/1981	27/10/2006		2a 5m	2a 5m
OAI	208	1369	85	F	34	13689041D	44488	22/02/1974	11/10/2007		2a 1m	1a 5m
ODI	209	298	12	M	29	13443793-E	53-4195-7	17/02/1973	24/05/2002		7a 8m	6a 10m

ODII	210	313	39	M	45	3261223-C	376957-7/377131-8	02/06/1954	12/03/1999		10a 11m	10a 0m
ODII	211	371	13	F	41	3188657-K	33-11210/55-23419	26/12/1956	10/03/1998		11a 8m	0
ODII	212	457	5	M	27	13483257-I	57-2528-3	11/09/1976	14/03/2003		6a 7m	6a 0m
ODII	213	459	6	M	48	13469927-E	57-2775-8	16/08/1955	17/03/2003		6a 8m	6a 0m
ODII	214	531	4	F	37	13499662-C	58-6577-8	26/05/1966	26/03/2003		6a 9m	6a 0m
ODII	215	560	64	M	50	77067260A	59-4455-4	15/02/1954	21/08/2003		6a 3m	5a 7m
ODII	216	572	65	M	47	2814019K	59-6087-8	25/08/1956	25/08/2003	19/02/2005	1a 5m	
ODII	217	685	23	F	37	44105950-F	62-5893-0	07/06/1967	15/04/2004		5a 6m	4a 11m
ODII	218	733	25	M	40	13627488-D	62-7152-9	25/07/1964	26/04/2004	18/11/2006	2a 6m	
ODII	219	751	22	M	52	13616426-B	62-9955-5	19/09/1952	14/05/2004		5a 1m	4a 10m
ODII	220	931	25	M	41	13627488-D	66-6799-6	25/07/1964	04/03/2005	18/11/2006	1a 8m	
ODII	221	978	24	M	33	44109572-E	66-9710-0	16/04/1972	24/03/2005		4a 1m	4a 0m
ODII	222	992	41	M	50	13637704-C	2007-1242	30/11/1956	12/03/2007		2a 10m	2a 0m
ODII	223	1012	47	M	51	3021910-H	07- 13973	21/04/1956	05/04/2007	13/03/2009	1a 11m	
ODII	224	1039	54	M	25	13808560-G	2008- 409	11/06/1983	04/01/2008		2a 0m	1a 2m
ODII	225	1041	53	M	47	77076226-I	46850	20/05/1958	24/10/2005		4a 0m	3a 5m
ODII	226	1092	56	M	36	2148953-B	2008- 1091	19/07/1972	14/08/2008		1a 4m	0a 7m
ODII	227	1104	60	M	33	13724570-H	30303	24/04/1973	03/03/2006		3a 4m	3a 0m
ODII	228	1108	30	M	50	13835734-A	71-5858-0	09/09/1958	01/08/2008		1a 7m	0a 8m
ODII	229	1111	61	M	50	77097036-E	26684	14/10/1958	29/12/2008		0a 11m	0a 3m
ODII	230	1176	11	M	39	13578182-E	52-5048-0	27/08/1967	01/09/2006		3a 4m	2a 7m
ODII	231	1184	44	F	26	13746421-D	2006-9742	31/05/1980	09/10/2006		2a 11m	2a 5m
ODII	232	1233	36	M	61	13760188-I	2006-15236	15/03/1946	16/02/2007		2a 11m	2a 1m
ODII	233	1242	34	M	36	13637704-C	06- 17968	30/11/1956	12/03/1993		16a 10m	0
ODII	234	1337	77	F	67	13830327-I	07- 15522	08/02/1941	24/06/2008		0a 11m	0a 9m
ODII	235	1352	49	M	46	138492285-A	2007-16349	22/03/1963	25/11/2008		0a 7m	0a 4m
ODIII	236	125	33	M	43	13684952-K	67-6389-8	24/11/1961	15/05/2005	03/12/2006	1a 6m	
ODIII	237	193	75	F	54	13798349I	2007-41038	01/02/1954	04/10/2007		1a 5m	1a 5m
ODIII	238	492	81	M	40	13868606A	N	11/11/1967	01/09/2007		1a 9m	1a 7m
ODIII	239	980	43	M	23	13686203-J	68-2309-2	22/02/1982	26/06/2005	27/08/2008	3a 2m	
ODIII	240	993		F	46	3188657-K	N	26/12/1956	02/10/2002		7a 1m	6a 6m
ODIII	241	1127	62	M	51	77076226-I	46850	20/05/1958	30/09/2009		0a 0m	0
ODIII	242	1177	35	F	58	13837713I	2006-5099	23/06/1950	18/08/2008	14/11/2009	1a 2m	
ODIII	243	1262	41	M	60	13598354-C	07- 10118	29/09/1947	20/04/2007	09/08/2008		1a 3m

8.2. ANEXO 2						
Donor	tissue	origin	gender	age	PMD(hrs)	Cause of death
SPM9	Parietal cortex	Brazil	M	78	6	Pulmonary edema / Chronic ischemic heart disease
SPM8	Parietal cortex	Brazil	M	78	13	Pulmonary edema / Hypertensive heart disease
SPM6	Parietal cortex	Brazil	M	56	12	Ischemic stroke / Complicated generalized atherosclerosis
SPM5	Parietal cortex	Brazil	M	62	12	Ischemic heart disease
SPM36	Parietal cortex	Brazil	M	40	11	Acute myocardial infarction
SPM35	Parietal cortex	Brazil	M	37	16	Pulmonary edema / chronic ischemic cardiomyopathy
SPM33	Parietal cortex	Brazil	M	67	6	Hemopericardium / Break dissecting aortic aneurysm
SPM30	Parietal cortex	Brazil	M	64	12	Bronchopneumonia
SPM28	Parietal cortex	Brazil	F	98	19	Pulmonary thromboembolism
SPM26	Parietal cortex	Brazil	M	66	12	Pulmonary edema / Acute myocardial infarction
SPM25	Parietal cortex	Brazil	M	43	14	Pulmonary edema / Healed myocardial infarction / Chronic ischemic heart disease
SPM2	Parietal cortex	Brazil	M	50	10	brocopneumonia
SPM15	Parietal cortex	Brazil	M	44	11	Bilateral pneumonia
SPM14	Parietal cortex	Brazil	F	57	15	Bronchoaspiration / acute peritonitis / Advanced and perforated colorectal carcinoma
SPM13	Parietal cortex	Brazil	M	84	23	Upper gastrointestinal bleeding / Acute chronic pancreatitis
SPM11	Parietal cortex	Brazil	M	74	15	Chronic obstructive pulmonary disease
SPM9	Microglia	Brazil	M	78	6	Pulmonary edema / Chronic ischemic heart disease
SPM8	Microglia	Brazil	M	78	13	Pulmonary edema / Hypertensive heart disease
SPM7	Microglia	Brazil	M	54	16	Acute myocardial infarction / coronary atherosclerosis
SPM6	Microglia	Brazil	M	56	12	Ischemic stroke / Complicated generalized atherosclerosis
SPM5	Microglia	Brazil	M	62	12	Ischemic heart disease
SPM4	Microglia	Brazil	F	77	14	Pulmonary edema / Healed myocardial infarction
SPM36	Microglia	Brazil	M	40	11	Acute myocardial infarction
SPM35	Microglia	Brazil	M	37	16	Pulmonary edema / chronic ischemic cardiomyopathy
SPM33	Microglia	Brazil	M	67	6	Hemopericardium / Break dissecting aortic aneurysm

SPM30	Microglia	Brazil	M	64	12	Bronchopneumonia
SPM28	Microglia	Brazil	F	98	19	Pulmonary thromboembolism
SPM26	Microglia	Brazil	M	66	12	Pulmonary edema / Acute myocardial infarction
SPM25	Microglia	Brazil	M	43	14	Pulmonary edema / Healed myocardial infarction / Chronic ischemic heart disease
SPM2	Microglia	Brazil	M	50	10	Bronchopneumonia
SPM15	Microglia	Brazil	M	44	11	Bilateral pneumonia
SPM14	Microglia	Brazil	F	57	15	Bronchoaspiration / acute peritonitis / Advanced and perforated colorectal carcinoma
SPM13	Microglia	Brazil	M	84	23	Upper gastrointestinal bleeding / Acute chronic pancreatitis
SPM11	Microglia	Brazil	M	74	15	Chronic obstructive pulmonary disease
S15018	Microglia	Netherlands	F	84		NA
S14005	Microglia	Netherlands	M	67	9	Polyneuropathy, Aortic Aneurysm, asystole
S13067	Microglia	Netherlands	M	57	6	Multi-system atrophy/Euthanasia
S12112	Microglia	Netherlands	M	85	7	Ischemia, pneumonia
S1210100	Microglia	Netherlands	F	56	NA	NA
S12067	Microglia	Netherlands	M	102	5	Ileus
S12048	Microglia	Netherlands	M	81	7	Bipolar/Euthanasia

8.3. Anexo 3

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Ao

Departamento de Neurologia

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU** na sessão de 07.08.13 a execução do subprojeto intitulado "**Papel da ativação da micróglia em astrocitomas humanos**", que será tese de Doutorado da aluna **Thais Galatro**, tendo como orientadora o Profa. Dra. **Suely Kazue Nagahashi Marie**.

O referido projeto faz parte do **Protocolo de Pesquisa nº 0599/10**, intitulado "**Expressão diferencial dos genes da família ID em astrocitoma de baixo grau em relação ao oligodendroglioma**", aprovado por esta CAPPesq em 13.10.2010.

CAPPesq, 07 de Agosto de 2013.

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0599/10

Título: EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS GENES DA FAMÍLIA ID EM ASTROCITOMA DE BAIXO GRAU EM RELAÇÃO AO OLIGODENDROGLIOMA.

Pesquisador Responsável: Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie

Pesquisador Executante: Thais Fernanda de Almeida Galatro

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Departamento: NEUROLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 07/08/2013, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

•Carta datada de 22/07/2013 - Relatório parcial do estudo - Subprojeto que será tese de doutorado da aluna Thais Galatro com o título - Papel da ativação da micróglia em astrocitomas humanos - tendo como orientadora a Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie

CAPPesq, 07 de Agosto de 2013

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

8.4. Anexo 4

Termo de Consentimento Pós-Informado

Você está sendo admitido(a) neste hospital para tratamento de doença do sistema nervoso central. Como parte de seu tratamento, você será submetido a um exame de sangue e cirurgia na qual se retirará um fragmento de seu cérebro onde está o tumor. Este sangue e o material obtido do cérebro são utilizados em exames clínicos laboratoriais, necessários para um diagnóstico definitivo. Nestes exames sempre há sobra de material que se toma sem utilidade.

Para obter um maior conhecimento clínico e científico das doenças do sistema nervoso central, o corpo clínico deste hospital (médicos e pesquisadores) desenvolve pesquisa clínica científica. Através desta pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos da doença e, portanto, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Ainda mais, este trabalho envolve a busca de novos genes ou de lesões genéticas em genes já existentes.

Este material restante, que não seria utilizado para o diagnóstico será congelado e posteriormente utilizado para pesquisa científica. O uso deste material não implicará riscos adicionais para você, nem exigirá que se submeta a qualquer procedimento adicional. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, de acordo com o processo nº 830/D1, e todo estudo que vier a utilizar este material será previamente apresentado à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital.

Todo material colhido e usado nesta pesquisa será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade será preservada. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do paciente.

Concordando com o uso deste material, do modo descrito, é necessário esclarecer que você não terá benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você concordar em permitir o uso deste material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, o seu tratamento.

Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado em seu prontuário.

Caso você tenha questões a fazer sobre este acordo ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida pelo seu médico, por gentileza, entre em contato com a Comissão de Ética.

Assinatura do(a) paciente ou Responsável Legal: _____

Nome do(a) paciente: _____

RG do Prontuário Médico: _____

Médico Responsável: _____

LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÕES EM NEUROLOGIA

Fones: 3061-4036 / 3061-7471 / 3062-0620 - Célia

8.5. Anexo 5

Dear mrs. Galatro, dear Thais,

For purposes of completing your PhD thesis for defence in Brasil, please be informed that your manuscript is in principle accepted for publication in 'Inflammation', to be published in the lab protocol series 'Methods in Molecular Biology', published by Springer. Full details of all the Methods series can be found at Springer's web site <<<http://www.springer.com/series/7651>>>.

Isolation of microglia and immune infiltrates from mouse and primate central nervous system

Thais F. Galatro*, Ilia D. Vainchtein*, Nieske Brouwer, Erik W.G.M. Boddeke and Bart J.L. Eggen

Department of Neuroscience, section Medical Physiology, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, 9713 AV, The Netherlands.

Also on behalf of my co-editor, Prof. Bjorn Clausen (Mainz, Germany),

Jon Laman

Prof. Dr. Jon D. Laman
Professor of Immune Physiology
Head Department of Neuroscience
University Medical Center Groningen
PO Box 196, 9700 AD Groningen, The Netherlands

Visiting address

Antonius Deusinglaan 1
Building 3215, room 849
9713 AV Groningen
The Netherlands

Phone [+31-50-361-6422](tel:+31-50-361-6422) [PLEASE NOTE new number as of March 30th]

Mobile [+31-6-2740-2046](tel:+31-6-2740-2046)

e-mail j.d.laman@umcg.nl

website <http://neuroscience.umcg.nl>

Dear Thais Galatro,

Please note that a Nature Neuroscience manuscript tracking system account has been created for you. This is because you are listed as a co-author on the manuscript "Identification of the human microglia transcriptome" (reference number: NN-A56490), which was recently submitted to Nature Neuroscience.

Your account details are provided below. You will be required to set a password using the 'Forgot my login details' option.

Login: tgalatro

[Access your account](#)

The corresponding author is solely responsible for communicating with the journal and managing communication between co-authors. Please contact the corresponding author directly with any queries you may have related to this manuscript.

You can now use a single sign-on for all your accounts, view the status of all your manuscript submissions and reviews, access usage statistics for your published articles and download a record of your refereeing activity for the Nature journals. Please check your account regularly and ensure that we have your current contact information.

In addition, NPG encourages all authors and reviewers to associate an Open Researcher and Contributor Identifier (ORCID) to their account. ORCID is a community-based initiative that provides an open, non-proprietary and transparent registry of unique identifiers to help disambiguate research contributions.

Many thanks,

Adam Lipkin
Senior Editorial Assistant
Nature Neuroscience
[212.726.9319](tel:212.726.9319)

8.6. Anexo 6

Isolation of microglia and immune infiltrates from mouse and primate central nervous system

Thais F. Galatro*, Ilia D. Vainchtein*, Nieske Brouwer, Erik W.G.M. Boddeke and Bart J.L. Eggen

Department of Neuroscience, section Medical Physiology, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, 9713 AV, The Netherlands.

*shared first authorship, listed in alphabetical order

ABSTRACT

Microglia are the innate immune cells of the central nervous system (CNS) and play an important role in the maintenance of tissue homeostasis, providing neural support and neuroprotection. Microglia constantly survey their environment and quickly respond to homeostatic perturbations. Microglia are increasingly implicated in neuropathological and neurodegenerative conditions, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and glioma progression. Here, we describe a detailed isolation protocol for microglia and immune infiltrates, optimized for large amounts of *post mortem* tissue from human and rhesus macaque, as well as smaller tissue amounts from mouse brain and spinal cord, that yield a highly purified microglia population (up to 98% purity). This acute isolation protocol is based on mechanical dissociation and a two-step density gradient purification, followed by fluorescence-activated cell sorting (FACS) to obtain pure microglia and immune infiltrate populations.

Key words: microglia, ex vivo, acute isolation, FACS, neuroinflammation, CNS, multiple sclerosis, glioma

1. INTRODUCTION

Microglia are the macrophages of the central nervous system (CNS), originating from erythro-myeloid progenitors in the yolk sac (1). Microglia are highly specialized and adapted to their CNS environment, involved in CNS development and homeostasis (2–4). Although microglia and other tissue macrophages, like liver Kupffer cells and skin Langerhans cells, arise from erythro-myeloid progenitors, they differ in their developmental programs and their respective tissue environment plays a major role in determining their unique gene expression profiles and functions (1, 5, 6).

Under healthy conditions, microglia are the only immune cells present in the CNS parenchyma. However, under neuropathological and neurodegenerative conditions, various other immune and antigen-presenting (AP) cells, such as macrophages and dendritic cells, infiltrate the CNS tissues (7–9), where they modulate further immune cell infiltration and phenotypes. To elucidate the role of such immune cells in both normal conditions and disease, it is crucial to obtain sizable cell numbers and purity. Here, we present a fluorescence-activated cell sorting (FACS)-based protocol yielding highly pure immune cell populations from the CNS of mammals. The flexibility of this procedure allows diversity in sample origin (mouse, human and non-human primates) and tissue type (brain or spinal cord).

Contrary to enzymatic dissociation protocols, mechanical dissociation does not require a 37°C incubation, hence maintaining the cell surface markers integrity and allowing for phenotype investigation (10). The isolation procedure described here consists of 3 main steps: 1) mechanical dissociation of the tissue to obtain a single-cell suspension; 2) separation of cells from debris and myelin using Percoll gradient centrifugation; and 3) purification of immune cell types based on cell surface marker expression using FACS sorting (Fig. 1).

SAMPLES

The origin and condition of the tissue sample is crucial for the end result of the isolation protocol. We have applied this optimized protocol to the following:

Mouse

Preferably, mice are perfused with 0.9% physiological saline solution prior to removal of CNS tissue to avoid contamination of CNS-immune cells with blood immune cells. Microglia have been successfully isolated from brain and spinal cord of several experimental conditions and molecular backgrounds, such as aged mice (11) and aging models (mTerc^{-/-}; Ercc1 Δ ^{-/-}) (12, 13), EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) (14), GL261 glioma injected brains and Alzheimer's disease models (APP23, 5xFAD).

Human and non-human primate samples

Human and non-human primate (Rhesus macaque; *Macaca mulatta*) brain samples have been collected under the course of full body autopsies. Donor age (increased cell-death and auto fluorescence with age), neuropathological condition (Alzheimer, Parkinson, and multiple sclerosis), CSF pH (pH $\leq$ 6.5 results in poor RNA quality) and post mortem interval (up to 24 h) varied between these samples, which affected cell yields. Microglia have also been successfully isolated from surgical biopsies collected after tumor resection (glioma) or temporal lobectomy of epilepsy surgeries.

MATERIALS AND SOLUTIONS

Materials

1. 50 and 15 mL tubes
2. 5, 10, and 25 mL pipettes
3. 1 mL, 200 μ L, 20 μ L and 10 μ L pipettes and tips
4. 800 mL beaker glass with 106 and 300 μ m sieve on top
5. 70 μ m cell-strainer
6. round bottom 96-wells microplate

7. 5 mL polystyrene round-bottom tube with cell-strainer cap 12 x 75 mm style, referred to as "FACS tube"
8. 1.7 mL siliconized Eppendorf tubes
9. 5 cm³ or 15 cm³ glass homogenizers
10. centrifuge with controllable acceleration and brake

Solutions:

1. **Isolation medium with phenol red (iMed+)** (this medium is not suitable for FACS, due to phenol red interference): 500 mL of HBSS (1x) with phenol red; 7.5 mL HEPES 1 M (f.c. 15 mM); 6.5 mL glucose 45% (f.c. 0.6%).
2. **Isolation medium without phenol red (iMed-)**: 50 ml of HBSS (1x) without phenol red; 750 µL HEPES 1 M (f.c. 15 mM); 650 µL glucose 45% (f.c. 0.6%); 100 µL 0.5 M EDTA pH=8.0 (f.c. 1 mM).
3. **Myelin gradient buffer**: prepare 1.5 L of NaH₂PO₄·H₂O (0.78 g/L; f.c. 5.6 mM), solution 1. Prepare 1.5 L of Na₂HPO₄ 2H₂O (3.56 g/L; f.c. 20 mM), solution 2. Adjust solution 1 to pH 7.4 with solution 2. Measure the final volume and add: 8 g/L NaCl (f.c. 140 mM); 0.4 g/L KCl (f.c. 5.4 mM); 2 g/L glucose (f.c. 11 mM). Autoclave and keep sterile at 4 °C.
4. **22% Percoll gradient solution**: 110 mL Percoll; 12 mL NaCl 1,5 M; 378 mL myelin gradient buffer.
5. **30%/60% Percoll solution**: prepare 100% Percoll solution by mixing 27 ml Percoll with 3 ml 10x HBSS. For 60% Percoll solution take 18 ml and add 12 ml PBS, or for 30% Percoll solution take 9 ml and add 21 ml PBS.
6. Virkon®S
7. DAPI (200 µg/ml)
8. RNAlater
9. RLT plus

3. METHODS

The whole procedure is conducted on ice and all centrifugation steps are performed at 4 °C. When dealing with primate samples, steps 1-5

are carried out in a laminar flow due to potential biohazard risk. Waste is collected in 1% Virkon®S solution, stored for 24 h and autoclaved.

3.1 Preparation of a single-cell brain tissue homogenate

1. Weigh tissue, place it in a petri dish with iMed+ and cut it into 2 mm³ pieces with a scalpel.
2. Transfer the minced tissue to a glass tissue homogenizer with iMed+ and homogenize until a uniform solution is obtained. When using a 5 cm³ glass tissue homogenizer, transfer up to 1 gram of tissue each time, if a 15 cm³ glass tissue homogenizer is used, portions of 4 grams can be transferred. Repeat the procedure until all tissue is homogenized (see Note 1).
3. For small amounts of tissue, use a pre-wetted (with 1 mL of iMed+) 70 µm cell-strainer on top of a 50 mL tube and filter the tissue homogenate. For larger amounts of tissue, put 106 µm and 300 µm sieves on top of an 800 mL beaker glass and filter the solution.
4. For large (primate) samples, divide the tissue homogenate over several 50 mL tubes, no more than 1.5 g starting material per 50 mL tube (for example: 7.5 g of tissue results in 5 tubes).
5. Rinse glass homogenizer and beaker glass with extra iMed+ and add to the tissue homogenate after passing it through the sieve.
6. Centrifuge at 220 g, 10 min (brake and acceleration: 9).
7. Carefully remove supernatant by pipetting.
8. Resuspend the cell pellet in 1 mL of 22% Percoll solution. Add 19 mL 22% Percoll solution to the 50 mL tube and mix well (or add 10 mL when using 15 mL tubes).
9. Carefully (without mixing) place 3 mL of PBS on top of the 22% Percoll solution.
10. Separate cells and myelin by centrifugation: 20 min, 950 g (acceleration 4; brake 0).
11. Carefully remove the myelin layer by pouring it off (or pipetting). Leave the cell pellet undisturbed. For functional assays with vital mouse cells

(i.e. chemotaxis and phagocytosis), continue with step 12, otherwise continue with step 20.

12. Resuspend the cell pellet in 1 mL 60% Percoll using 1 mL pipette tip.

13. Add 14 mL of 60% Percoll solution (per 50 mL tube) to the suspension and homogenize.

14. Carefully place 14 mL of 30% Percoll on top of the 60% Percoll layer.

15. Carefully layer 3 mL PBS on top of the 30% Percoll. Centrifuge for 25 min, 800 g (acceleration 4; brake 0)

16. Collect the 60%-30% interphase with a pre-wetted (with 1 mL iMed+) glass pipette and transfer to a 50 mL tube containing iMed+.

17. Add two volumes of iMed+ equivalent to the collected cell-rich interphase.

18. Pellet cells by centrifugation: 600 g, 10 min (brake and acceleration: 9).

19. Remove as much medium as possible (optional: place tube upside down).

20. Resuspend cell pellet in 100 μ L iMed- (the cells can be used for functional assays).

21. To prevent aspecific binding of antibodies perform a blocking step. Incubate samples for 15 min on ice with the following blocking solution (Table 1):

Table 1: Blocking reagents

Sample origin	Blocking reagent	Supplier	Amount
human / macaque	FcR-blocking	eBioscience	10 μ L / 100 μ L cell suspension
mouse	anti-mouse CD16/CD32	eBioscience	1 μ L / 100 μ L cell suspension

3.2 Settings of FACS sorting machine:

In order to facilitate fluorochrome compensation and settings of the FACS machine, unstained and single stained reference samples should be made. A small volume of the sample(s) can be used for such purpose (further referred to as FACS setting solution), but keep in mind some of the markers are only lowly expressed in the brain. Preferably, beads can be used, or in case of mouse samples, splenocytes can be used for the settings (see Note 2). If a FACS setting solution is used, continue with step 22.

22. Transfer 5 μ L of the sample to a separate tube for the settings. In case of multiple samples, take 5 μ L of each sample and pool.

23. For primate samples fill the tube up to 300 μ L with iMed-, mouse samples up to 600 μ L with iMed-.

24. In a 96-well microplate, pipet 3x100 μ L of FACS setting solution in 3 wells (unstained, CD11b PE single stain, CD45 FITC single stain) in case of primate samples; or 6x100 μ L of FACS setting solution in 6 wells (unstained, CD11b PE single stain, CD45 FITC single stain; Ly-6C APC single stain, Ly-6G APC/Cy7 single stain, CD3 PE/Cy7 single stain) for mouse samples.

3.3 Antibody incubation procedure:

25. Add antibodies to the single stains in the 96-well microplate as indicated in Table 2 below, keep on ice for 20-30 min, in the dark.

26. Prepare and add antibody mix to the samples (human: 1,2; macaque: 1,3; mouse: 4-8) in the falcon tubes as indicated in Table 2 below, keep on ice for 20-30 min, in the dark.

Table 2: Antibody dilution

Sample origin	Antibody	Clone	Isotype	Supplier	Dilution
1.Human/ Macaque	CD11b PE	ICRF44	Mouse IgG1, κ	Biolegend	1:25
2. Human	CD45 FITC	HI30	Mouse IgG1	Biolegend	1:25

3. Macaque	CD45 FITC	MB4-6D6	Mouse IgG1	Miltenyi Biotec	1:25
4. Mouse	CD11b PE	M1/70	Rat IgG2b, κ	eBioscience	1:170
5. Mouse	CD45 FITC	30-F11	Rat IgG2b, κ	eBioscience	1:250
6. Mouse	Ly-6C APC	HK1.4	Rat IgG2c, κ	Biolegend	1:130
7. Mouse	Ly-6G APC-Cy7	1A8	Rat IgG2a, κ	Biolegend	1:100
8. Mouse	CD3 PE/Cy7	17A2	Rat IgG2b, κ	Biolegend	1:100

27. After incubation, divide the sample solution over several wells (100 µL in each well of a 96 well microplate). Wash the tube with an extra 100 µL of iMed- and pipet in a separate well. Add 100 µL of iMed- to all wells (single stains and samples).

28. Spin the cells down for 3 min at 300 g.

29. Remove supernatant and add 100 µL of iMed- to each well.

30. Transfer each single stain to an individual FACS tube by filtering it through the pre-wetted (50-100 µL of iMed-) filter.

31. Combine each divided sample into an individual pre-wetted (50-100 µL of iMed-) FACS tube.

32. Collect the remaining cells with iMed- (100 – 150 µL) from the 96 well microplate and add it to the corresponding FACS tubes.

3.4 FACS isolation myeloid cells

33. 1-2 min before starting the FACS procedure add 0.5 µL of DAPI.

34. First, gate on all the events/cells (SSC^{height} vs FSC^{height} ; to gate out cell debris), second gate on singlets (first gate in SSC^{width} vs FSC^{height} followed by FSC^{width} vs FSC^{height}) (single cells 1 and 2; Fig. 2).

35. Select the live, single cells by gating against DAPI (DAPI vs FSC^{height}).

36. For primate samples, plot for SSC^{height} vs a fluorochrome that is not in the panel (for example PE/Cy7 for primate samples) and gate for non-autofluorescent cells.

37. Then plot for CD11b vs CD45, the $CD11b^{pos} CD45^{int}$ cells are the microglia. In case mouse samples are used, the microglia gate 1 can be plotted for SSC^{height} vs Ly-6C, as microglia are $Ly-6C^{neg}$. A pure microglia population can be sorted ($CD11b^{pos} CD45^{int} Ly-6C^{neg}$; Fig. 2).

38. In the CD11b vs CD45 plot, the $CD11b^{high} CD45^{int-high}$ cells (myeloid gate) are the infiltrates, consisting of macrophages and neutrophils that can be separated in mouse samples by gating for Ly-6G and Ly-6C (macrophages are $Ly-6C^{pos} Ly-6G^{neg}$ and neutrophils are $Ly-6C^{int} Ly-6G^{pos}$).

39. In mouse samples, the $CD45^{high} CD11b^{neg}$ fraction (lymphoid gate) in the CD11b vs CD45 plot can be plotted for SSC^{height} vs CD3 and a T-lymphocyte population can be sorted.

40. During sorting, cells should be collected in siliconized tubes filled with the following, depending on desired downstream application:

- 350 μ L RNeasy, in case of RNA/DNA isolation for gene expression profiling.
- 350 μ L iMed-, for other applications such as protein isolation and chromatin immunoprecipitation.

41. Collection of cells by centrifugation will depend on downstream application. I.e., for RNA/DNA isolation purposes, centrifuge 10 min, 5000 RCF; carefully remove RNeasy and lyse (invisible) cell pellet in 350 μ L RLTplus and store at -80°C .

42. If cells are collected in iMed-, centrifuge for 10 min at 500 RCF, remove supernatant and resuspend pellet in the appropriate buffer.

4. Notes

1. It is advised to use a 5 cm^3 glass tissue homogenizer for low myelin content samples (i.e. mouse brain, spinal cord, glioma tissue) and a 15

cm³ glass tissue homogenizer for higher amounts of starting material or samples with high myelin content (primates).

2. Mouse splenocyte isolation: conduct steps 1-7 as described above. Resuspend the pellet in 1 mL of lysis buffer (ammonium chloride 155 mmol/L, potassium bicarbonate 10 mmol/L, sodium edetate 0.1 mmol/L) to remove red blood cells and incubate on ice for 5 min. Fill to 15 mL with iMed+ and perform step 7 again. Carefully pour off (or pipet) supernatant and resuspend pellet in 1 mL of iMed-. Use this cell suspension for the calibration and settings of FACS sorting machine and continue with step 24.

5. REFERENCES

1. G. Hoeffel, J. Chen, Y. Lavin, et al. (2015) C-Myb(+) erythromyeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages, *Immunity*. 42, 665–678.
2. F. Aloisi (2001) Immune function of microglia, *Glia*. 36, 165–179.
3. R.M. Ransohoff and V.H. Perry (2009) Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses, *Annual review of immunology*. 27, 119–145.
4. M. Prinz, T.L. Tay, Y. Wolf, et al. (2014) Microglia: unique and common features with other tissue macrophages, *Acta Neuropathologica*. 128, 319–331.
5. D. Gosselin, V.M. Link, C.E. Romanoski, et al. (2014) Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities, *Cell*. 159, 1327–1340.
6. Y. Lavin, D. Winter, R. Blecher-Gonen, et al. (2014) Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment, *Cell*. 159, 1312–1326.
7. P.G. McMenamin, R.J. Wealthall, M. Deverall, et al. (2003) Macrophages and dendritic cells in the rat meninges and choroid plexus: three-dimensional localisation by environmental scanning electron microscopy and confocal microscopy, *Cell and Tissue Research*. 313, 259–269.

8. H.R. Chinnery, M.J. Ruitenberg, and P.G. McMenamin (2010) Novel characterization of monocyte-derived cell populations in the meninges and choroid plexus and their rates of replenishment in bone marrow chimeric mice, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 69, 896–909.
9. S.M. Brendecke and M. Prinz (2015) Do not judge a cell by its cover-diversity of CNS resident, adjoining and infiltrating myeloid cells in inflammation, *Seminars in Immunopathology*. 37, 591-605
10. M. Olah, D. Raj, N. Brouwer, et al. (2012) An optimized protocol for the acute isolation of human microglia from autopsy brain samples, *Glia*. 60, 96–111.
11. I.R. Holtman, D.D. Raj, J.A. Miller, et al. (2015) Induction of a common microglia gene expression signature by aging and neurodegenerative conditions: a co-expression meta-analysis, *Acta Neuropathologica Communications*. 3, 31.
12. D.D.A. Raj, J. Moser, S.M.A. van der Pol, et al. (2015) Enhanced microglial pro-inflammatory response to lipopolysaccharide correlates with brain infiltration and blood-brain barrier dysregulation in a mouse model of telomere shortening, *Aging Cell*. 14, 1003-13
13. D.D.A. Raj, D. Jaarsma, I.R. Holtman, et al. (2014) Priming of microglia in a DNA-repair deficient model of accelerated aging, *Neurobiology of Aging*. 35, 2147–2160.
14. I.D. Vainchtein, J. Vinet, N. Brouwer, et al. (2014) In acute experimental autoimmune encephalomyelitis, infiltrating macrophages are immune activated, whereas microglia remain immune suppressed, *Glia*. 62, 1724–1735.

Fig. 1: Isolation protocol for microglia and immune infiltrates of the CNS. Step 1: mince brain tissue and dissociate with a glass tissue homogenizer until a homogeneous suspension is obtained. Step 2: myelin and cell debris are removed by Percoll gradient centrifugation. For small amounts of starting tissue, a single Percoll gradient is used (22%) and the resulting pellet is used for the next step. For larger amounts and myelin-rich starting tissue, a second Percoll gradient separation is applied (60-30%). In that case,

the interphase between the two Percoll layers is used. Step 3: resulting cell suspension is blocked to reduce non-specific antibody binding, then stained for the desired membrane markers. The cell suspension is then filtered in a FACS tube and FACS sorted (Beckman Coulter MoFlo Astrios/XDP). * Optional: for functional assays perform the 60-30% Percoll gradient separation and continue from there.

Fig. 2: FACS sorting strategy. To isolate pure populations of microglia and different immune infiltrates (macrophages, neutrophils and T-lymphocytes), cells are first separated from cell debris and the remaining myelin by a gate in the SSC^{height} vs FSC^{height} . Single cells are selected in the SSC^{width} vs FSC^{height} followed by FSC^{width} vs FSC^{height} gates (single cells 1 and 2 gate). To obtain high quality RNA/DNA samples, live cells can be gated as $DAPI^{neg}$ ($DAPI$ vs FSC^{height}). Depending on the experimental condition in mice, three well identifiable cell populations can be distinguished using $CD11b$ vs $CD45$ plotting. From the microglia gate 1, microglia can be identified as $Ly-6C^{neg}$ when plotting for SSC^{height} vs $Ly-6C$. The myeloid gate contains two main populations when plotting for $Ly-6G$ vs $Ly-6C$; macrophages are $Ly-6C^{pos}$ $Ly-6G^{neg}$ and neutrophils $Ly-6C^{int}$ $Ly-6G^{pos}$. T-lymphocytes ($CD3^{+}$) can be sorted when gating for SSC^{height} vs $CD3$ in the lymphoid gate. For the primate samples, after the live cells gate, the autofluorescent cells should be removed by gating on the non-autofluorescent (AFS) cells (SSC^{height} vs a fluorochrome that is not used, preferably APC or PE/Cy7). This has to be performed for human samples, but is not obligatory for macaque due to less autofluorescence. In the $CD11b$ vs $CD45$ plot, microglia can be identified as $CD11b^{pos}$ $CD45^{int}$.

Figure 1

Figure 2

8.7. Anexo 7

Identification of the human microglia transcriptome

Thais F. Galatro^{1,2*}, Inge R. Holtman^{1*}, Ilia D. Vainchtein¹, Nieske Brouwer¹, Paula Sola², Mariana Veras³, Tulio Pereira^{4,5}, Renata Leite³, Thomas Möller⁶, Paul D. Wes⁶, Mari C. Sogayar⁴, Jon D. Laman¹, Wilfred den Dunnen⁷, Carlos A. Pasqualucci³, Sueli M. Oba-Shinjo², Erik W.G.M. Boddeke¹, Suely K. N. Marie^{2,4**}, Bart J.L. Eggen^{1**}

* shared first authors

** shared last authors

¹Department of Neuroscience, Section Medical Physiology, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands

²Department of Neurology, Laboratory of Molecular and Cellular Biology, LIM15, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³Brazilian Aging Brain Study Group, LIM22, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁴Center for Studies of Cellular and Molecular Therapy (NAP-NETCEM-NUCEL), University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁵Chemistry Institute, Department of Biochemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁶Neuroinflammation Disease Biology Unit, Lundbeck Research USA, Paramus, New Jersey 07652, USA

⁷Department of Pathology, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands

Abstract

Microglia are essential for central nervous system (CNS) homeostasis and innate neuroimmune function, and play important roles in neurodegeneration and brain aging. Their CNS-tailored functions and ontogeny distinguish microglia from other tissue-resident macrophages in mice. Here, we present the gene expression profile of pure cortical human microglia and corresponding unsorted tissue samples. Microglia were isolated from the parietal cortex of 25 autopsy samples of cognitively intact humans and RNA sequenced. Overall, genes expressed by human microglia are similar to mouse microglia, containing established microglia-specific genes such as CX3CR1, P2YR12, and ITGAM. Interestingly, a number of immune genes, not identified as mouse microglia signature genes, were abundantly expressed in human microglia. These included TLR, Fc γ and SIGLEC receptors and NLRC5 and CIITA, regulators of MHC-class I and II genes. Age-induced changes in human microglia gene expression were enriched for CNS-related biological functions, suggesting that the neurosupportive role of human microglia changes during aging. The overlap in age-associated gene expression between mice and humans is very limited, indicating that human and mouse microglia age very differently. With respect to gender, no major differences in gene expression were observed, other than for X and Y chromosome-associated genes. Comparison of microglia to monocyte and macrophage expression data underscored the CNS-specific functions of microglia and new markers were identified that distinguish human microglia from other myeloid cells. This data is the first comprehensive pure human microglia gene expression profile; human microglia clearly differ from mouse microglia, especially with respect to age-induced changes in gene expression.

1 Introduction

Microglia are highly specialized cells with a unique ontogeny and are crucially shaped by their local central nervous system (CNS) environment(1). Fate mapping studies showed that microglia have a different ontogeny than other tissue macrophages(2). Microglia originate from erythro-myeloid progenitors in the yolk sac via CSF1R, PU.1- and IRF8-dependent pathways(2–4). Genome-wide transcriptome and epigenome studies of mouse microglia showed that microglia are very different from other tissue macrophages and other glial cell types(5–10). These studies identified CX3CR1, TREM2, TYROBP, CD33, and P2RY12 as genes specifically expressed in mouse microglia. This microglia gene expression profile is regulated by factors in the CNS microenvironment, like TGF β , and is likely also to be partially determined by their ontogeny (5,9).

Microglia are plastic cells that adopt different phenotypes under varying circumstances in the CNS, such as aging and neurodegeneration (11). An increased inflammatory signature characterizes the aging and neurodegenerative brain in which microglia obtain a sensitized, primed phenotype (12–14). Several studies report isolation of microglia from mouse models for these diseases and described age- and neurodegeneration-associated microglia expression profiles (7,15–17). In a recent meta-analysis, we identified a core expression profile of primed microglia that was preserved in different mouse models with neurodegenerative and aging conditions. This consensus profile was enriched for general immune gene ontology categories and more specific phagosome and lysosome KEGG pathways. In aging mice, microglia gene expression was also enriched for an Interferon Type-I and a ribosome signature (18).

There is considerable debate about the similarity of microglia in different species (19). So far, pure microglia gene expression profiles were exclusively generated using murine microglia. It is unclear to what degree these findings can be extrapolated to human microglia and several arguments have been raised that suggest divergence between species. First, cross-species differences in the CNS microenvironment have been identified with respect to CNS gene expression (20–22), the lipidome(23) and the proteome(24).

Second, it has been proposed that the immune system is an evolutionary hotspot with considerable cross-species divergence in microglia function¹⁹. Third, the validity of mouse models for neurodegenerative diseases has recently been re-examined (25). Mouse neurodegeneration models rarely mimic the expression profiles of corresponding human neurodegenerative condition. Therefore, identification of the (dis)similarities between human and mouse microglia expression profiles in physiological, aging and neurodegenerative conditions is required to evaluate the potential strengths and weaknesses of mouse microglia studies.

To address these issues, human microglia samples from the right parietal cortex were collected and RNA-sequenced. We report 1) a human microglia core expression profile, that contains many previously identified mouse microglia regulators and markers, as well as genes that were not identified in any of the previously identified mouse signatures; 2) an age-specific human microglia expression profile that has little overlap with previously generated aging mouse aging profiles; 3) a gender-specific human microglia expression profile that mainly contains X and Y chromosomal genes, and 4) new markers that distinguish between microglia and infiltrating monocytes/macrophages.

2 Materials and Methods

Human Brain Tissue

Human brain tissue was collected from the right parietal cortex during the course of full body autopsy. Samples were acquired from both the Human Brain Bank of the Department of Pathology, School of Medicine of São Paulo University and The Netherlands Brain Bank. Written informed consent for research purposes was obtained and the procedure was approved by ethical committees from the University of São Paulo, Brazil, the Netherlands Brain Bank and the University Medical Center Groningen, The Netherlands. Detailed data of the autopsy samples, such as age, gender, post mortem interval, cause

of death, the number of sorted viable cells and RNA quality are listed in suppl. table 1.

Microglia isolation

The procedure was carried out as described (Galatro et al., in press) with a few modifications. Samples from the right parietal cortex were collected in ice-cold HBBS (Lonza, Switzerland) supplemented with 15 mM HEPES (Lonza) and 0.6% glucose (Sigma-Aldrich, USA). The brain tissue was dissociated in a glass tissue homogenizer and filtered using a 300 μ m sieve, followed by a 106 μ m sieve to obtain a single cell suspension. Cells were pelleted by centrifugation at 220 rcf for 10 min. (acc: 9, brake: 9, 4°C). The pellet was resuspended in 22% Percoll (GE Healthcare, UK), 40 mM NaCl and 77% myelin gradient buffer (5.6 mM NaH₂PO₄·H₂O, 20 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 11 mM Glucose, pH 7.4). A layer of PBS was added on top, and this gradient was centrifuged at 950 rcf for 20 min. (acc: 4, brake: 0, 4°C). The myelin layer and the remaining supernatant were carefully removed and the pellet resuspended in a solution of 60% Percoll, which was overlaid with 30% Percoll and PBS respectively, and centrifuged at 800 rcf for 25 min (acc: 4, brake: 0, 4°C). The cell layer at the 60-30% Percoll interface was collected with a pre-wetted Pasteur pipette, washed and centrifuged at 600 rcf for 10 min (acc:9, brake: 9, 4°C). The final pellet was resuspended in HBBS without phenol red (Lonza) supplemented with 15 mM HEPES (Lonza) and 0.6% glucose (Sigma-Aldrich). Fc receptors were blocked with human Fc receptor binding inhibitor (eBioscience, Affymetrix, USA) for 10 min on ice. For sorting, cells were incubated for 20 min on ice with anti-human CD11b-PE (Biolegend, USA) and anti-human CD45-FITC (Biolegend) and subsequently washed with HBBS without phenol red. The cells were passed through a 35- μ m nylon mesh and collected in round bottom tubes (Corning, USA) and sorted using either a BD Biosciences FACS Aria II cell sorter (Brazilian samples) or a Beckman Coulter MoFloAstrio cell sorter (Dutch samples). Cells were sorted based on CD11b^{high}/CD45^{int} expression and negative staining for DAPI, and

collected in RNAlater (Qiagen). Sorted cells were centrifuged 5,000 rcf for 10 min and pellets were lysed in RLT-Plus buffer (Qiagen) for RNA extraction.

RNA extraction and RNA-sequencing

Total RNA was extracted from flow cytometry–sorted cells using an RNeasy Micro Kit (Qiagen, Germany) and from whole brain tissue using RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. RNA quality was checked with a Experion RNA HighSens Analysis Kit (Bio-Rad). RNA-Seq analysis was performed at the next generation sequencing facility core (SELA – Sequenciamento em Larga Escala) at the University of São Paulo. The cDNA library was prepared starting from 60ng of total RNA using TruSeq Stranded Total RNA kit (Illumina, USA). In brief, ribosomal RNA was depleted with Ribo-zero Gold magnetic beads (Illumina) and the remaining RNA was fragmented by divalent cations. The transcript for the first strand cDNA was prepared with reverse transcriptase and random primers. The second strand cDNA was synthesized by DNA polymerase. Adaptors and index of unique sequence were added to cDNA fragments. Enrichment of the libraries was performed by PCR and the quantification was measured by qPCR (Kappa Library Quantification Kit, Illumina, Kappa Biosystems), and the median size of the libraries determined by Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA) sequencing was performed on HiSeq 2500 (Illumina).

RNA-sequencing and data analysis

RNA samples generated in The Netherlands and Brazil were sequenced simultaneously. Paired-end, 100 bp read length Illumina RNA sequencing was performed at the University of Sao Paulo. FAST-QC quality checks were done to determine high quality base pairs, and FASTX was applied to trim low quality reads. Data was aligned using Tophat2 aligner Version 2.0.14 (Kim et al. 2013) to the ensemble iGenomes reference template and quantified with HT-seq count (Anders, Pyl and Huber 2014). Quality check of aligned data was done with RNA-SEQC (DeLuca et al. 2012) and showed

high quality alignment and data. Per sample, on average 17.6 million uniquely mapped reads were generated ranging between 6 and 61.1 million.

Data was loaded in R, annotated using BioMart²⁹ and analyzed using EdgeR package from Bioconductor³⁰. Three different analyses were done using EdgeR: 1) microglia vs. cortex; 2) microglia: aging, gender and PMD analysis; and 3) microglia vs. monocytes and macrophages. Q-values for significance refers to p-values corrected for false discovery rate. For the first comparison two significance criteria were applied to determine extended microglia signature ($q < 0.001$ and $\log FC > 3$) and core microglia signature ($q < 1.E-25$, $\log FC > 5$, and RPKM value higher than 50 % of microglia gene distribution). In addition to our own data, mouse microglia signatures were obtained from previously published papers from Zhang et al.⁸ consisting of the top 500 microglia genes, Butovsky et al.⁵, consisting of the microglia top 107 genes and Hickman et al.⁽⁶⁾ consisting of the top 98 genes. These profiles were plotted as side bars next to the expression heat maps.

The second comparison was performed with a generalized linear model with country of isolation and gender as a binary variables, while age and post mortem delay were used as quantitative variables. Country of isolation was also used as a batch effect to prevent interference with the prediction of the other variables. In the different analyses and comparisons slightly different criteria were used to determine significance. For the quantitative variables only a q-value criteria was applied ($q < 0.05$), since the $\log FC$ values corresponded to estimate increase of the gene per year (for age) or per hr (for PMD).

For the third comparison, differential gene expression analysis was completed for microglia vs macrophages, microglia vs monocytes, and monocytes vs macrophages. Subsequently these lists were compared to generate lists of genes differentially expressed in microglia, macrophages, monocytes, and macrophages/monocytes vs microglia, respectively. The criteria for differential expression was set to $q < 0.05$ and $|\log FC| > 1$

Barplots that show the expression of immune gene families were generated in R. Genes were obtained using search criteria through the BioMart full gene name lists such as "Toll", "Complement", "Antigen, MHC". Negative

log RPKM values (or RPKM <1) were set to 0. Only genes that were significantly different in microglia vs cortex ($q < 0.01$ and $\text{abs}(\log\text{FC}) > 1$) were depicted, or microglia vs macrophages and microglia vs monocytes ($q < 0.01$ and $\text{abs}(\log\text{FC}) > 1$).

Functional annotation of the profiles was done with Qiagen's Ingenuity core analysis. Benjamini corrected-p values of significantly enriched categories were depicted as barplots. A protein-protein interaction network of the microglia core profile was generated with IPA. Only high confidence predicted or experimentally proven protein-protein interactions are shown. Genes without such connections were removed. The protein-protein interaction network was ordered according to subcellular location.

Heatmaps were made with BioConductor package Heatmap.3. Data is uploaded to GEO, RNA-seq datasets published in (29) were obtained from GEO.

Immunohistochemistry

For immunohistochemical detection, tissue sections were routinely processed and subjected to antigen retrieval. Briefly, slides were immersed in 10 mM citrate buffer, pH 6.0 and incubated at 122°C for 3 min using an electric pressure cooker (BioCare Medical, Walnut Creek, USA). Specimens were then blocked and further incubated with the following antibodies raised against human CD36 (Biolegend, 1:50), CD143 (Biolegend, 1:50), CXCR4 (Abcam, Cambridge, UK, 1:200), VEGF (Abcam, 1:800) at 16-20°C for 16 hr. Development of the reaction was performed with a commercial kit (Novolink; Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, UK) at room temperature, using diaminobenzidine and Harris hematoxylin for nuclear staining.

For immunofluorescent staining, snap-frozen spinal cord or brain was cut on a cryostat and 20 μm thick sections were fixed for 10 minutes in 4% PFA, rinsed with PBS and pre-incubated with 5% normal serum in PBS with 0.15% Triton X-100 (PBS+). Sections were incubated for 48 hr at 4°C with

primary antibodies diluted in PBS+ with 1% normal serum, washed with PBS and incubated for 4 hr with horse anti-mouse-biotin (1:400; Vector BA-2001). After washing, sections were incubated for 1 hr in a mixture of donkey anti rabbit-AF488 (1:300; Molecular Probes A21202) and streptavidin-AF594 (1:400; JacksonImmunoResearch 016-580-084). A Hoechst staining (Fluka 14530) was performed followed by a 15 min incubation in 0.3% Sudan Black B (Sigma S-0393) in 70% ethanol to reduce autofluorescence. Finally, sections were washed with demi-water, embedded in Mowiol. Imaging was performed on a Zeiss LSM 780 confocal laser scanning microscope using an 20x Plan_Apochromat NA=0,8 air objective or an 40x Plan-Neofluar NA 1.3 oil-immersion objective using 405 nm, 488nm and 594 nm lasers and appropriate filters (Carl Zeiss B.V., Sliedrecht, The Netherlands).

3 Results

Acute isolation of pure microglia from human post-mortem tissue samples

Human microglia samples were collected during the course of full body autopsy, by dissection of parietal cortex brain tissue, tissue processing and acute isolation of viable microglia by FACS sorting. Microglia isolations were performed within a 24 hr post-mortem delay (PMD) from donors without diagnosed brain diseases. 74 rapid microglia isolations were performed (33 in the Netherlands and 41 in Brazil). Ultimately, 25 samples from donors with a history of normal cognitive function and no apparent neuropathological abnormalities with sufficient levels of high quality RNA were selected for RNA-sequencing. For donor information: sample ID, tissue type, sample origin, gender, age, PMD and cause of death see suppl. table 1.

Paired-end Illumina high quality deep sequencing was performed on 25 microglia and 16 corresponding superior parietal cortex tissue samples (further referred to as cortex). RNA-seq data was pre-processed, quantified and differentially expressed genes were determined. The initial analysis focused on the expression of cell type-specific markers from microglia and other CNS

cells to determine the purity of the samples (Figure 1A). Human microglia highly expressed known microglia genes such as P2RY12, TYROBP, CX3CR1, AIF1 and ITGAM. Neuron-, astrocyte-, and oligodendrocyte-associated genes were detected in cortex samples but were low or not expressed in microglia. The monocyte marker CCR2 was lowly expressed in microglia. These findings indicate that a highly pure population of microglia was collected.

Identification of core human microglia gene signature

Pairwise correlations of RNA-seq expression data of pure microglia and cortex samples were calculated and hierarchically clustered, with variables tissue, age, gender, post-mortem delay (PMD) and origin of the samples (Netherlands or Brazil; Figure 1B). Microglia and cortex samples clustered separately and highly correlated within each tissue group. Sub-clusters were observed for the Dutch and Brazilian microglia samples. No obvious clustering was observed for variables PMD, gender or age.

Differential gene expression analysis showed extensive differences between microglia and brain tissue (Figure 2A) and based on increasingly stringent criteria, two microglia expression profiles were defined: an extended microglia signature containing 1765 genes with criteria $\log_{2}FC > 3$ and $q < 1E-4$. A core microglia signature of only 328 genes was generated with $\log_{2}FC > 5$ and $q < 1E-25$ as criteria, and only genes in the top 50% most abundant transcripts were included (Figure 2A). In Suppl. Table 2, detailed gene expression data are provided: gene symbol and description, $\log_{2}FC$ and FDR of genes between microglia and cortex samples. Genes of the microglia core signature are classified as 'red'; genes of the microglia extended signature as 'blue'; genes less abundantly expressed in microglia and less significantly different are classified as 'darkblue'; genes not different or more abundantly expressed in cortex are classified as 'black'.

To determine the overlap in gene expression between human and mouse microglia, the human transcriptome was compared to published mouse microglia gene expression data(5,6,8). Genes expressed in mouse microglia

were plotted next to the differential expression heat map of the human dataset and are indicated by black lines (Figure 2A). Many genes of these previously identified mouse microglia profiles were detected in the extended and core human microglia signatures indicating an extensive overlap in genes expressed in human and mouse microglia. Notably, several mouse microglia-specific genes were decreased or not significantly different in human microglia compared to cortex tissue, suggesting species-specific differences in microglia gene expression. In Suppl. Table 2, if genes in the human microglia and cortex dataset were present in published mouse microglia signatures(5,6,8) they were classified as 'black' and as 'white' if absent.

The 328 genes in the human core-microglia signature are depicted as a heat map (Figure 2B). This core profile contained many previously identified microglia signature genes such as CX3CR1, TYROBP, TREM2, P2RY12, CSF1R, and CD33. Next to the heat map of human microglia and cortex tissue samples, the presence of each human microglia core gene in the mouse microglia signatures was indicated. A large overlap between the human core signature and the mouse profiles was observed. However, the human microglia core signature also contained genes that were not previously identified in mouse microglia. These included genes from the Toll-like receptor (TLR) family: TLR5, TLR10; the transcription factor IRF7; Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins: SIGLEC7, SIGLEC8, SIGLEC9, SIGLEC10; Matrix metalloproteinases: MMP14, ADAM28; Fcγ-receptors: FCGR1A/1B, FCGR2A, FCGR2C, FCGR3A; and Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptors LILRA1, LILRA2, LILRA4; and antigen presentation regulators CIITA, NLRC5.

The pathways associated with the 2093 genes of the extended microglia signature were determined with an IPA enrichment analysis. The profile was enriched for immune signaling pathways including 'TREM1 signaling', 'pattern recognition', 'phagosome formation', 'antigen presentation pathways', 'IL-10', 'IL-4' and 'Toll-like receptor', 'production of reactive oxygen species in macrophages' – signaling pathways (Figure 2C). This data identified human microglia as immunocompetent and phagocytic cells that express a wide range

of immune receptors and ligands, equipped to respond to a wide variety of pathogen- and damage-associated molecules. The expression profile of genes differentially expressed between microglia and cortex samples of specific immune function-related families such as TLR, Nod-Like Receptors, Chemokines, Fc- γ Receptors, and Complement components is depicted in Suppl. Figure 1.

A high confidence protein-protein interaction (PPI) network, ordered according to subcellular localization: extracellular space, plasma membrane, cytoplasm, and nucleus, was generated with the genes of human microglia core profile (Suppl. Figure 2). The vast majority of these proteins were associated with the plasma membrane, underscoring the sensing and pattern recognition functions of microglia. The human microglia core signature contained two transcription factors essential for microglia ontogeny: SPI-1 (or PU.1) but also IRF8 and transcription factors not yet implicated in microglia function, IRF5, IRF7, CIITA, NFKB2, and NFATC2. Taken together, these findings show that the human microglia signature contains many new microglia-specific genes that can be used as new microglia markers and point to interspecies differences.

The effect of post-mortem delay, gender, and age on microglia gene expression.

A generalized linear model was generated with post-mortem delay PMD, gender, and age as predictive variables to identify genes significantly associated with each factor, after correction for the effect of country of isolation (Figure 3A). Gene symbol and description, logFC and FDR data with gender, age, and PMD as respective variables are provided in Suppl. Table 3).

Several whole brain transcriptome studies reported that the PMD affects gene expression (30,31). PMD was used as a quantitative variable to estimate the effect of time to tissue sampling on microglia gene expression and is significantly associated with only 1 gene (Figure 3A). The non-coding psoriasis susceptibility 1 candidate 3 (PSORS1C3) gene increased in expression with

progressive PMD. This suggests that the isolated microglia samples were largely unaffected by PMD.

Gender differences in inflammation and microglia function have been reported (32,33). In our data, expression of only 36 genes was significantly different between males and females, and primarily concerned genes localized on the X and Y chromosomes, such as XIST, TTTY14, and TTTY15 (Figure 3B). These 36 genes did not encode immune receptors or proteins associated with microglia function. This suggested that gender had no pronounced effect on microglia function, however subtler gender effects require a higher number of females samples (n=5 in this study).

Age-associated changes in gene expression occur in mouse microglia (6,34). The age of the microglia samples ranged between 37 and 102 years. Using age as a quantitative variable, 110 genes increased and 137 genes decreased in expression ($q < 0.05$). In Figure 3C, a relative expression heat map was generated with the genes significantly affected by age ($q < 0.01$). Hierarchical clustering of these 247 genes resulted two separate clusters, containing relatively younger and older samples, respectively. Noteworthy genes with increased expression over age are CXCR4, IRF4, CLEC2B, CLEC5A, SIGLEC5, P2RX1, ADAMTS15, MAP1B, VEGFA, and KIF5C and decreased expression was observed for CLEC17A, C2, OLFM3, HOXB2, CKB and P2RY12. Ingenuity Pathway Analysis Enrichment on the combined up and down-regulated differential gene expression list showed that several categories belonging to nervous system development were enriched, such as 'abnormal morphology of axons/neurons', and 'morphology of brain cells' (Figure 3D).

Next we compared the human microglia aging profile with previously published mouse microglia aging and priming profiles (6,18,35). Only four genes overlapped between the mouse and human aging signatures, CXCR4 and GBP2 were increased and P2RY12 and CKB were decreased in expression in human and all mouse datasets (Figure 3E). In addition to this lack in overlap between age-associated genes, the observed functional annotations of human age-associated categories clearly differed from

previously published mouse annotations. This data indicated that the effect of age on microglia gene expression in mouse and human is strikingly divergent.

The microglia expression profile is distinct from macrophages and monocytes

Under certain neuropathological conditions, i.e. glioma progression (36) and multiple sclerosis (37), immune cells, such as macrophages and dendritic cells, infiltrate the CNS and contribute to disease progression. Microglia are often identified using AIF1, P2RY12 and CX3CR1 as markers and differentiated from infiltrating immune cells based on CCR2 expression on these cells. The expression levels of (some of) these markers are altered by microglia activation, priming and aging. Therefore, the identification of better, more stable, markers to distinguish between these cell types would be of great benefit. New potential markers to distinguish microglia from bone-marrow-derived myeloid cells were identified by comparing the human microglia transcriptome to previously published monocyte and macrophage RNA-seq datasets (29).

Hierarchical clustering of the inter sample correlations showed that cultured monocytes, macrophages and PBMCs primarily cluster together and secondary cluster with microglia. As expected, gene expression data of cortical brain tissue were very different from monocytes, macrophages, PBMCs and microglia. (Figure 4A). Differential gene expression analyses (Figure 4B) showed that the number of genes that differ between microglia and monocytes or macrophages is fairly similar ($q < 0.01$, $\log FC > 1$). Human microglia expressed 3116 genes more abundantly than macrophages and monocytes; conversely monocytes and macrophages uniquely expressed 159 and 82 genes, respectively (Figure 4C). Monocytes and macrophages share 1683 genes that were not or low expressed in microglia. The microglia core profile was plotted as a heat map with on the side genes that distinguish microglia from other CNS cells as well as from macrophages/monocytes. Of the 305 core microglia genes, 109 genes were also significantly higher expressed in microglia than in monocytes or macrophages. Top microglia-specific

candidates genes were CX3CR1, P2RY12, OFLML3, TMEM119, C3, SIGLEC10, FCGR2A, FCGR3A, SLC2A5, CIITA, and NFATC2. Macrophage- and monocyte-specific genes were also identified with ACE, CLEC10A, and ITGA3 as macrophage-specific and CD300E, CLEC1B, and TGFBR3 as monocyte-specific genes. Several candidates highly expressed in both macrophage and monocyte were also identified: CD1b, CD36, and MPEG1. In Suppl. Table 4, detailed gene expression data are provided: gene symbol and description, logFC and FDR of genes between microglia (MI), monocytes (MO), macrophages (MA) or between MI and monocytes and macrophages (MO/MA). Genes of the microglia core signature are classified as 'red'; genes of the MO category as 'light green'; genes of the MA category as 'blue', genes of the MA+MO category as 'dark green'.

The microglia-specific genes were enriched for 'phagosome formation', 'Fc-γ mediated phagocytosis' and 'axonal guidance signaling' (IPA enrichment analysis; Figure 4D). This suggests that microglia are phagocytic and express genes required for their CNS function. The common macrophage- and monocyte-specific genes were enriched for 'oxidative phosphorylation', and 'mitochondrial dysfunction signaling' pathways (Figure 4E). In Suppl. Fig. 3, the expression of immune family, chemokine and receptor genes in microglia, monocytes and macrophages is depicted, confirming the immune function of these myeloid cells. In microglia, the expression

In demyelinating lesions in multiple sclerosis, macrophages and microglia are abundantly present. Immune staining of lesion-containing multiple sclerosis tissue validated potential novel microglia- and myeloid-specific markers. Microglia were visualized with an IBA1 antibody and these cells partially overlapped with identified microglia markers CD32 and CD16 (Figure 5AB). Myeloid infiltrates were identified with antibodies against CD36 and CD1B, and no co-localization of these markers with IBA1-labelled cells was observed. Taken together, this analysis supported the notion that microglia are uniquely adapted to the CNS and new markers that distinguish between microglia and myeloid infiltrates were identified.

4 Discussion

In this analysis we present an extensive collection of human microglia transcriptome profiles and systematically compare them to previously published mouse profiles. Mice are frequently used to study microglia, but there is extensive debate about the validity of these mouse models to study microglia in aging and neurodegenerative conditions (19). We addressed four main questions: 1) What is the expression profile of human microglia and how does it relate to mouse microglia profiles? 2) What age-related changes occur in aging human microglia and to what degree do they overlap with mouse microglia aging and priming signatures? 3) What is the human microglia gender profile? 4) Can we identify markers that are able to distinguish between human microglia and infiltrating immune cells such as macrophages and monocytes?

To approximate the physiological human *in vivo* microglia expression profile, donors with overt CNS pathologies were excluded, viable microglia were FACS-sorted (DAPI-negative), and only high quality RNA samples were sequenced. Nonetheless, all donors suffered from a range of pathologies ultimately leading to their decrease, potentially affecting the microglia gene expression profile. The effect of various parameters on gene expression, such as PMD, age, and gender was estimated. Remarkably, our data indicate that a post-mortem delay between 4 and 24 hr had little influence on the microglia gene expression profile.

The first aim of this study was to determine the similarity and differences between human and mouse microglia expression profiles. Considerable overlap between human and mouse microglia gene expression was observed but pronounced dissimilarities were also present. These dissimilarities could be caused by a range of factors such as intrinsic differences between species, differences in environment, medical condition, the brain regions analyzed, and differences in study design. For example, laboratory mice are, to a certain degree, kept under standardized conditions and typically not exposed to a wide range of pathogens, this is in striking contrast to humans who are exposed to

a range of pathogens during the course of their lives. In addition, mouse microglia were isolated from healthy animals with no PMD, whereas the human microglia samples were obtained during the course of autopsies of donors that suffered from various pathologies. Moreover, the mouse studies used for comparison (5,6,8) included microglia from the whole brain, while human microglia were isolated from the superior parietal lobule and recent studies in mice revealed gene expression diversity in microglia isolated from different brain regions (Grabert et al., 2016). Expression profiling of microglia obtained from healthy non-human primates with a very short PMD would be a means to delineate which intrinsic or extrinsic factors contribute to the observed dissimilarities in gene expression between humans and mice.

A substantial number of the human microglia-specific genes are implicated in immune pathways, and could reflect functional characteristics of human microglia. Interesting examples are Toll-like receptors TLR3, TLR5, TLR10; Interferon regulatory factor IRF7; Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins SIGLEC8, SIGLEC9, SIGLEC10; and antigen presentation regulators CIITA and NLRC5. Many genes expressed by human microglia are cell surface receptors that are activated by pathogen- and danger-associated molecular patterns. Activation of these receptors induces translocation of transcription factors such as Interferon regulatory factors (IRF). IRFs represent a family of transcription factors linked to several immune signaling cascades. IRF activation results in the transcription of type I IFNs, pro-inflammatory cytokines, and chemokines that coordinate immune cell activation. For example, TLR3 signals via IRF7 (38), and IRF7 is responsible for a pro- to anti-inflammatory switch in primary cultures of murine microglia and macrophages (39). TLR3 and IRF7 expression could possibly be involved in the maintenance of a neuroprotective and tissue-supportive state by human microglia.

SIGLECs have an important role in immunosuppression and neuroprotection. SIGLECs regulate the effects of activation, phagocytosis and inflammasome formation via their immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) (40). CD33 (SIGLEC3), a known microglia marker, is associated with the accumulation of amyloid beta plaques in mouse AD models due to

diminished phagocytic capacity of microglial cells up-regulating this gene (41). SIGLEC5, up-regulated in human microglia during aging in our cohort, has also been associated with the impairment of phagocytosis (42) and, as a consequence, hampering reactive oxygen species (ROS) release. Our finding that human microglia express, besides these previously known microglia SIGLEC molecules, SIGLECs 8, 9 and 10 highlights the importance and the specialization of microglia for the maintenance of a homeostatic microenvironment.

NLRC5 and CIITA are the respective master regulators of MHC class I and II gene expression (43). While CIITA expression is restricted to antigen presenting cells (APCs), NLRC5 is constitutively expressed in various tissues, most highly in cells from the hematopoietic lineage (CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, CD19⁺ B cells, natural killer (NK) cells and natural killer T cells). NLRC5 expression in monocytic CD14⁺ cells and CD11b⁺ splenic myeloid cells, however, was shown to be intermediate (44). It is, therefore, interesting that human microglia seem to express higher levels of the regulators of both classes of MHC gene expression. This data suggests that human microglia are more potent APC than mouse microglia and able to interact with CD4 and CD8 T-helper subsets.

The second aim of the current study was to compare the human and mouse aging microglia expression profiles. Strikingly, very little overlap between the human and mouse aging signatures was detected, and only four genes were shared by three different mouse aging and priming signatures, and the human aging profile. The genes CXCR4 and GBP2 were increased and P2RY12 and CKB were decreased in expression during human aging.

Age-induced changes are enriched for gene sets related to CNS development and function, suggesting that human microglia change their neuro-supportive role during aging. Up-regulation of VEGFA expression, for instance, could imply a role for microglia in the loss of cognitive function in the aged brain, as VEGFA up-regulation has been observed in Alzheimer's patients (45). Alterations in the expression of members of the Dectin (CLECs)/SIGLEC families during aging could also be associated with a loss of

neuroprotective function by microglia. CXCR4 is important for CXCL12-mediated microglia migration in the developing brain (46). Overall, age-related changes were much more pronounced in mouse than in human microglia. It is possible that human microglia are less affected by aging and more resilient than mouse microglia. Alternatively, although microglia are considered to be long-lived cells, the actual lifespan of human microglia is unknown. Microglia replacement and the rate thereof could be different between mice and human and influence age-induced changes in gene expression (47).

The third aim of the current study was to determine whether microglia expression profiles differ between genders. Little is known about microglia gender differences, but a few studies have identified a gender-specific role for microglia in the developing and aging brain. In the developing rat brain, microglia numbers and morphology differ between genders in particular brain regions, and play a role in sex differentiation of the brain (32,48). Sex differences in microglia function in the developing brain have been associated with neurodevelopmental, psychiatric conditions (33). We found that gender differences in humans were largely restricted to X and Y-chromosome genes, suggesting that there are very little functional differences between adult males and females in superior parietal lobule microglia. Interestingly, Cribbs and coworkers (2012) showed that the CNS age-related inflammatory profile is more pronounced for females than males. Our donor population contained 5 females versus 20 males, more female donors would be required in order to identify possible gender-specific traits.

In our study, an interaction between gender and age could not be determined. If this gender difference in age-related CNS inflammation is microglia-mediated remains to be determined and requires a much larger number of (female) donors.

The fourth aim of this study was to identify new markers that distinguish between microglia and infiltrating macrophages and monocytes. Glioma (36) and multiple sclerosis tissue (37), are characterized by infiltrating immune cells, such as macrophages and monocytes. At present, no microglia markers are known that remain stable during aging or neurodegenerative conditions.

For instance, the expression of microglia marker P2RY12 decreases with age. Comparing our microglia expression data to previously generated monocyte and macrophage datasets identified tentative candidates that distinguish between microglia and infiltrating myeloid cells. Cells expressing CD32 and CD16 co-expressed IBA1, but not all IBA1-positive cells also expressed detectable levels CD32 and CD16 indicating that these markers, although microglia-specific, do not label all microglia. CD36 and CD1B expressing cells did not overlap with IBA1 expressing cells, conforming that CD36 and CD1B are markers that distinguish microglia from myeloid infiltrates

In summary, here we present the first human microglia gene expression profile. Critical differences with mouse microglia, especially in the context of aging, were observed which highlight the necessity to independently study human microglia. These data and analyses serve as a starting point to address human-specific microglia genes and functions under physiological and neuropathological conditions.

5 Acknowledgements

The authors want to thank dr. I. Huitinga, the director of the Netherlands Brain Bank, for the Dutch brain samples. The authors thank São Paulo Research Foundation (FAPESP), grants 2013/07704-3, 2013/06315-3, 2013/02162-8 and 2014-50137-5, CAPES-NUFFIC (062/15), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq 305730/2015-0) and Fundação Faculdade de Medicina (FFM) for financial support. The authors thank Geert Mesander, Henk Moes and Roelof Jan van der Lei for their technical assistance with FACS sorting and dr. Hilmar van Weering for artwork.

Figure Legends

Figure 1: Comparison of human microglia and parietal cortex expression profiles.

A) RNA-sequencing from ex vivo isolated microglia and corresponding parietal cortex tissue samples revealed high and consistent expression of known genes in microglia, with negligible expression of genes for neurons, astrocytes, oligodendrocytes and potential immune infiltrates. As expected, expression of neural genes was detected in total parietal cortex tissue samples. This indicated that a highly pure microglia population was sorted from our cohort of human post-mortem brain samples.

B) Clustering analysis of RNA-seq intersample correlation values showed that microglia were highly similar and very different from the unsorted superior parietal lobule (cortex) samples. Microglia and cortex samples did not cluster according to age, gender or post mortem delay (PMD), clustering of the microglia samples was influenced by sampling site (Brazil and The Netherlands).

Figure 2: Comparison of the human microglia expression profile to cortex and mouse microglia signatures

A) Log fold-change expression heat map of the microglia versus cortex comparison showed striking differences between microglia and cortex samples in their overall expression profiles. Four classes of genes were identified with the corresponding color codes: genes not significantly affected (black side bar), genes minorly but significantly altered (dark blue side bar), genes highly and differentially expressed (blue side bar) and genes very abundantly expressed in microglia when compared to cortex (red side bar, the human microglia core signature). Genes of the blue or red profiles with increased level expression in human microglia were referred to as an extended microglia signature. Next to this differential gene expression profile, the mouse microglia signatures reported by Butovsky⁵, Zhang⁸ and Hickman⁶ are depicted. Corresponding genes in the mouse microglia datasets are indicated with black stripes.

B) Log fold-change expression heatmap of the core human (red) microglia genes, alphabetically ordered, the corresponding mouse genes

identified in the Zhang⁸, Butovsky⁵ and Hickman⁶ studies are indicated by green, blue and white boxes, respectively.

C) Ingenuity pathway analysis of the extended microglia signature.

Figure 3: Human microglia gene expression in relation to PMD, gender and age

A) Using a linear model approach R Bioconductor package EdgeR in which the country of isolation was used as a batch effect for which was compensated, the effect on differential gene expression for age, gender and post-mortem delay (PMD) was estimated. The number of differentially expressed genes in relation to these variables is depicted.

B) Z-score expression heatmap of the effect of gender showed that most genes affected by gender in human microglia were Y or X chromosome-related, indicating that human superior parietal lobule microglia were very similar between both sexes.

C) Hierarchically clustered Z-score expression heatmap of the effect of age showed genes significantly associated with age and a clear clustering, separating older and younger samples, was observed.

D) Ingenuity enrichment analysis showed clear enrichment for CNS development and function biological categories of aging-associated genes.

E) The overlap in age-induced changes in human and mouse microglia gene expression is very limited. Only CXCR4 and GBP2 were increased and CKB and P2RY12 were decreased in all three mouse microglia aging data sets.

Figure 4: Comparison of the human microglia expression profile to macrophage and monocyte expression data.

A) Clustering analysis of inter-sample correlations of microglia, cortex, macrophages, monocytes and PBMC showed that the PBMC (peripheral blood mononuclear cell), macrophages and monocytes first cluster with each other and then with microglia.

B) Table showing the number of differentially expression genes when comparing microglia, macrophages and monocytes.

C) Differential expression was used to determine four categories of genes: microglia uniquely increased level expression genes (purple), monocytes increased level expression genes(green), macrophages increased level genes (blue) and monocytes and macrophage common increased level genes (brown). Moreover, the before identified microglia core red profile was plotted on the side bar.

D) Ingenuity Enrichment Analysis – Canonical Pathways of the red (microglia) profiles.

E) Ingenuity Enrichment Analysis – Canonical Pathways of the green (monocyte and macrophage combined) profiles.

Figure 5: Specific markers for microglia and macrophages.

Cryosections of MS tissue were double stained for the indicated proteins; Iba1 as microglia marker, and CD32 (A) and CD16 (B) as microglia markers and CD36 (C) and CD1B (D) as macrophage markers. Arrows indicate microglia expressing Iba1 and CD32 or CD16 (see merge), arrowheads indicate macrophages expressing CD36 or CD1B but not Iba1. scalebars are 25 μ m.

Suppl. Table 1: Donor information.

Sample ID, country of sampling, donor age, gender, post-mortem delay, cause of death are described.

Suppl. Table 2: Gene expression in human microglia and cortex vs. mouse microglia.

Gene symbols and descriptions, ENSEMBL gene IDs, logFC and FDR of human microglia versus cortex samples are listed. Classifications of microglia expression levels (red=core, blue=extended) and overlap with mouse microglia genes (white=absent, black=present) are listed.

Suppl. Table 3: gene expression vs. PMD, gender and age

Gene symbols and descriptions, ENSEMBL gene IDs, logFC and FDR of genes differentially expressed in human microglia with gender, age, and PMD as respective variables.

Suppl. Table 4: Gene expression in microglia, monocytes and macrophages

Gene symbols and descriptions, ENSEMBL gene IDs, logFC and FDR of comparisons between human microglia monocyte and macrophage samples are listed. Genes of the core microglia signature are classified as red. Genes specific for monocytes are classified as blue, for macrophages as light green and for monocytes and macrophages as dark green. Genes in neither category are classified as black.

Suppl. Figure 1: Expression of immune genes in different myeloid cells

The average log(RPKM) values with standard deviations obtained in the RNA seq data of microglia and cortex samples are depicted for different immune gene families.

Suppl. Figure 2: Protein-protein interaction network from the human microglia core signature

A predicted protein-protein interaction network based on the core microglia gene signature is depicted. Based on known subcellular location, four domains are defined, extracellular space, plasma membrane, cytoplasm and nucleus respectively.

Suppl. Figure 3: Expression of immune genes in myeloid cells: microglia vs monocytes and macrophages

The average log(RPKM) values with standard deviations obtained in the RNA seq data of microglia and monocyte and macrophage samples are depicted for different immune gene families.

References

1. Salter MW, Beggs S. Sublime Microglia: Expanding Roles for the Guardians of the CNS. *Cell*. 7 de julho de 2014;158(1):15–24.
2. Hoeffel G, Chen J, Lavin Y, Low D, Almeida FF, See P, et al. C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity*. 21 de abril de 2015;42(4):665–78.
3. Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*. 6 de abril de 2012;336(6077):86–90.
4. Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, et al. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci*. 20 de janeiro de 2013;16(3):273–80.
5. Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, et al. Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci*. janeiro de 2014;17(1):131–43.
6. Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi TK, Borowsky ML, Wang L, Means TK, et al. The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat Neurosci*. dezembro de 2013;16(12):1896–905.
7. Chiu IM, Morimoto ETA, Goodarzi H, Liao JT, O’Keeffe S, Phatnani HP, et al. A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Cell Rep*. 25 de julho de 2013;4(2):385–401.
8. Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O’Keeffe S, et al. An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 3 de setembro de 2014;34(36):11929–47.

9. Gosselin D, Link VM, Romanoski CE, Fonseca GJ, Eichenfield DZ, Spann NJ, et al. Environment Drives Selection and Function of Enhancers Controlling Tissue-Specific Macrophage Identities. *Cell*. dezembro de 2014;159(6):1327–40.
10. Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonen R, David E, Keren-Shaul H, Merad M, et al. Tissue-Resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment. *Cell*. dezembro de 2014;159(6):1312–26.
11. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*. novembro de 2007;10(11):1387–94.
12. Loerch PM, Lu T, Dakin KA, Vann JM, Isaacs A, Geula C, et al. Evolution of the aging brain transcriptome and synaptic regulation. Orban L, organizador. *PloS One*. janeiro de 2008;3(10):e3329.
13. Perry VH, Holmes C. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. abril de 2014;10(4):217–24.
14. Cribbs DH, Berchtold NC, Perreau V, Coleman PD, Rogers J, Tenner AJ, et al. Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: a microarray study. *J Neuroinflammation*. janeiro de 2012;9(1):179.
15. Hickman SE, Allison EK, El Khoury J. Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 13 de agosto de 2008;28(33):8354–60.
16. Orre M, Kamphuis W, Osborn LM, Jansen AHP, Kooijman L, Bossers K, et al. Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiol Aging*. 14 de junho de 2014;
17. Orre M, Kamphuis W, Osborn LM, Melief J, Kooijman L, Huitinga I, et al. Acute isolation and transcriptome characterization of cortical astrocytes and microglia from young and aged mice. *Neurobiol Aging*. janeiro de 2014;35(1):1–14.
18. Holtman IR, Raj DD, Miller JA, Schaafsma W, Yin Z, Brouwer N, et al. Induction of a common microglia gene expression signature by aging and

neurodegenerative conditions: a co-expression meta-analysis. *Acta Neuropathol Commun.* janeiro de 2015;3:31.

19. Smith AM, Dragunow M. The human side of microglia. *Trends Neurosci.* março de 2014;37(3):125–35.

20. Miller JA, Horvath S, Geschwind DH. Divergence of human and mouse brain transcriptome highlights Alzheimer disease pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13 de julho de 2010;107(28):12698–703.

21. Konopka G, Friedrich T, Davis-Turak J, Winden K, Oldham MC, Gao F, et al. Human-specific transcriptional networks in the brain. *Neuron.* 23 de agosto de 2012;75(4):601–17.

22. Hawrylycz M, Miller JA, Menon V, Feng D, Dolbeare T, Guillozet-Bongaarts AL, et al. Canonical genetic signatures of the adult human brain. *Nat Neurosci.* 16 de novembro de 2015;18(12):1832–44.

23. Bozek K, Wei Y, Yan Z, Liu X, Xiong J, Sugimoto M, et al. Organization and Evolution of Brain Lipidome Revealed by Large-Scale Analysis of Human, Chimpanzee, Macaque, and Mouse Tissues. *Neuron.* 18 de fevereiro de 2015;85(4):695–702.

24. Bayés A, Collins MO, Croning MDR, van de Lagemaat LN, Choudhary JS, Grant SGN. Comparative study of human and mouse postsynaptic proteomes finds high compositional conservation and abundance differences for key synaptic proteins. *PloS One.* janeiro de 2012;7(10):e46683.

25. Burns TC, Li MD, Mehta S, Awad AJ, Morgan AA. Mouse models rarely mimic the transcriptome of human neurodegenerative diseases: A systematic bioinformatics-based critique of preclinical models. *Eur J Pharmacol.* 15 de julho de 2015;759:101–17.

26. Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* 25 de abril de 2013;14(4):R36.

27. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq - A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinforma Oxf Engl.* 25 de setembro de 2014;31(2):166–9.

28. DeLuca DS, Levin JZ, Sivachenko A, Fennell T, Nazaire M-D, Williams C, et al. RNA-SeQC: RNA-seq metrics for quality control and process optimization. *Bioinforma Oxf Engl*. 1 de junho de 2012;28(11):1530–2.
29. Saeed S, Quintin J, Kerstens HHD, Rao NA, Aghajani-refah A, Matarese F, et al. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science*. 25 de setembro de 2014;345(6204):1251086–1251086.
30. Mistry M, Gillis J, Pavlidis P. Meta-analysis of gene coexpression networks in the post-mortem prefrontal cortex of patients with schizophrenia and unaffected controls. *BMC Neurosci*. janeiro de 2013;14:105.
31. Zhang B, Gaiteri C, Bodea L-G, Wang Z, McElwee J, Podtelezhnikov AA, et al. Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. *Cell*. 25 de abril de 2013;153(3):707–20.
32. Chen Y, Won SJ, Xu Y, Swanson RA. Targeting microglial activation in stroke therapy: pharmacological tools and gender effects. *Curr Med Chem*. janeiro de 2014;21(19):2146–55.
33. Lenz KM, McCarthy MM. A starring role for microglia in brain sex differences. *Neurosci Rev J Bringing Neurobiol Neurol Psychiatry*. junho de 2015;21(3):306–21.
34. Ma W, Cojocaru R, Gotoh N, Gieser L, Villasmil R, Cogliati T, et al. Gene expression changes in aging retinal microglia: relationship to microglial support functions and regulation of activation. *Neurobiol Aging*. outubro de 2013;34(10):2310–21.
35. Raj DDA, Jaarsma D, Holtman IR, Olah M, Ferreira FM, Schaafsma W, et al. Priming of microglia in a DNA-repair deficient model of accelerated aging. *Neurobiol Aging*. 9 de setembro de 2014;35(9):2147–60.
36. Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci*. 29 de dezembro de 2015;19(1):20–7.
37. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 7 de agosto de 2015;15(9):545–58.

38. Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol.* 27 de janeiro de 2008;26:535–84.
39. Cohen M, Matcovitch O, David E, Barnett-Itzhaki Z, Keren-Shaul H, Blecher-Gonen R, et al. Chronic exposure to TGF β 1 regulates myeloid cell inflammatory response in an IRF7-dependent manner. *EMBO J.* 17 de dezembro de 2014;33(24):2906–21.
40. Macauley MS, Crocker PR, Paulson JC. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat Rev Immunol.* outubro de 2014;14(10):653–66.
41. Griciuc A, Serrano-Pozo A, Parrado AR, Lesinski AN, Asselin CN, Mullin K, et al. Alzheimer's Disease Risk Gene CD33 Inhibits Microglial Uptake of Amyloid Beta. *Neuron.* 22 de maio de 2013;78(4):631–43.
42. Carlin AF, Chang Y-C, Areschoug T, Lindahl G, Hurtado-Ziola N, King CC, et al. Group B Streptococcus suppression of phagocyte functions by protein-mediated engagement of human Siglec-5. *J Exp Med.* 8 de março de 2009;206(8):1691–9.
43. Meissner TB, Li A, Biswas A, Lee K-H, Liu Y-J, Bayir E, et al. NLR family member NLRC5 is a transcriptional regulator of MHC class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3 de agosto de 2010;107(31):13794–9.
44. Kobayashi KS, van den Elsen PJ. NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nat Rev Immunol.* dezembro de 2012;12(12):813–20.
45. Tang H, Mao X, Xie L, Greenberg DA, Jin K. Expression level of vascular endothelial growth factor in hippocampus is associated with cognitive impairment in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* maio de 2013;34(5):1412–5.
46. Arnò B, Grassivaro F, Rossi C, Bergamaschi A, Castiglioni V, Furlan R, et al. Neural progenitor cells orchestrate microglia migration and positioning into the developing cortex. *Nat Commun.* 26 de novembro de 2014;5:5611.

47. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM V. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci.* dezembro de 2007;10(12):1538–43.

48. Lenz KM, Nugent BM, Haliyur R, McCarthy MM. Microglia are essential to masculinization of brain and behavior. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 13 de fevereiro de 2013;33(7):2761–72.

Figure 1

A

B

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 4

Figure 5