



## PRODUÇÃO DE ÓXIDO NITRÍCO DE MACRÓFAGOS ATIVADOS EM PERFIL M1 CULTIVADOS SOBRE BIOFILME DE COLÁGENO E SUBSTRATO RÍGIDO INFECTADOS POR *Toxoplasma gondii*CEPA ME-49

Tâmara Carolina Gomes Ribeiro, Sergio Henrique Seabra, Renato Augusto DaMatta

A cultura de células em substrato rígido (2D) é bastante difundida para a experimentação. Mas a utilização de técnicas mais similares ao *in vivo* é crescente. O colágeno (COL) é uma proteína da matriz extracelular que pode ser utilizado como substrato da cultura sobre lamínula (cultura 2,5D). Macrófagos são células fagocíticas do sistema imune com perfis de ativação correspondentes ao estímulo. Podem ser classificados linearmente em M1 (microbicida) ou M2 (homeostase tecidual). Macrófagos M1 são mais microbicidas por produzir óxido nítrico (NO) que se difunde no local da infecção e controla patógenos como *Toxoplasma gondii*, parasito que causa toxoplasmose que acomete 1/3 da população mundial. No entanto, *T. gondii* modula macrófagos inibindo a produção de NO. Essa inibição aumentacom a virulência da cepa do parasito. Diferentes cepas de *T. gondii*, mais e menos virulentas, foram isoladas. A cepa RH é mais virulenta que a cepa ME-49. Objetivamos comparar a capacidade de inibição de NO em macrófagos cultivados em diferentes substratos infectados com cepas de diferentes virulências. O COL foi obtido de cauda de ratos. Macrófagos RAW 264.7 mantidos em garrafa de cultura e ativados com lipopolissacarídeo e interferon- $\gamma$  por 24 h em cultivo 2D e 2,5D. Linhagem celular LLC-MK2 infectada com a cepa ME-49 foi rompida mecanicamente e taquizoítos filtrados. Macrófagos foram infectados e a produção de NO avaliada. Detectamos diferença na produção de NO entre macrófagos em cultivo 2,5D em relação a 2D. Macrófagos ativados em perfil M1 cultivados em 2D produziram mais NO que macrófagos cultivados em 2,5D, o que indica que o substrato de cultivo interfere na resposta do macrófago. Todavia, com a infecção essa diferença reduziu, mas ainda existe. Porém, a taxa de infecção é a mesma. A avaliação qualitativa, por microscopia, e quantitativa, por RT-qPCR será crucial para avaliar a replicação dos taquizoítos nos macrófagos. Com isso, pretendemos determinar se o tipo de cultivo altera a capacidade microbicida de macrófagos M1 em cepas menos virulentas. Comparar as interações parasito/macrófagos em substratos distintos é de suma importância por reproduzir com maior similaridade o ambiente *in vivo*.

Instituição do Programa de IC, IT ou PG: UENF

Fomento da bolsa (quando aplicável): CAPES



## PRODUCTION OF NITRIC OXIDE IN M1 ACTIVATED MACROPHAGES CULTURED ON COLLAGEN BIOFILM AND RIGID SUBSTRATE INFECTED BY *Toxoplasma gondii* STRAIN ME-49

Tâmara Carolina Gomes Ribeiro, Sergio Henrique Seabra, Renato Augusto DaMatta

Cell culture on a rigid substrate (2D) is widespread in experimentation. But the use of techniques more similar to *in vivo* is growing. Collagen (COL) is an extracellular matrix protein that can be used at culture as substrate on a coverslip (2.5D culture). Macrophages are phagocytic cells of the immune system with different profiles of activation. They can be classified linearly into M1 (microbicide) or M2 (tissue homeostasis). M1 macrophages are more microbicidal because produces nitric oxide (NO) that diffuses on the infection site and control pathogens such as *Toxoplasma gondii*, a parasite that causes toxoplasmosis that affects 1/3 of the world population. However, *T. gondii* modulates macrophages inhibiting NO production. This inhibition increases with the virulence of the parasite strain. Different strains of *T. gondii*, more and less virulent, were isolated. The RH strain is more virulent than the ME-49 strain. We aim to compare the ability to inhibit NO in macrophages cultured in different substrates infected with strains of different virulences. COL was obtained from tail of rats. RAW macrophages 264.7 in culture flasks were activated with lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$  for 24 h in 2D and 2.5D culture. LLC-MK2 cell line infected with ME-49 strain was mechanically disrupted and tachyzoites filtered. Macrophages were infected and NO production evaluated. We detected a difference in NO production between macrophages in 2.5D culture compared to 2D culture. Macrophages activated in the M1 profile produced more NO in 2D substrate than macrophages in 2.5D. This indicates that culture substrate interferes with the macrophage response. But with the infection this difference was reduced. However, the infection rate was the same. Qualitative evaluation, by microscopy, and quantitative, by RT-qPCR, will be crucial to assess the replication of tachyzoites in macrophages. Therefore, we will determine if the type of cultivation changes the microbicidal capacity of M1 macrophages against less virulent strains. Comparing interactions of parasite/macrophage on different substrates is important due to similar reproduction of the *in vivo* environment.

Instituição do Programa de IC, IT ou PG: UENF  
Fomento da bolsa (quando aplicável): CAPES