



Soltura de macrófagos peritoneais residentes no perfil de ativação M1 e infecção com *Toxoplasma gondii* para avaliação da expressão de iNOS na citometria de fluxo

Marcos Roberto Dias Campos, Pedro Souto Rodrigues, Sérgio Henrique Seabra, Renato Augusto DaMatta

Toxoplasma gondii é parasito intracelular obrigatório de vertebrados e agente etiológico da toxoplasmose. *T. gondii* infecta células nucleadas inclusive macrófagos. Macrófagos são células heterogêneas derivadas de monócitos circulantes ou de células precursoras embrionárias. No peritônio de camundongos saudáveis, há duas subpopulações macrofágicas: macrófagos F4/80^{hi} (origem embrionária) e macrófagos F4/80^{lo} (derivados de monócitos). Na peritonite, ocorre a diapedese de monócitos inflamatórios (Ly6C^{hi}). Macrófagos e monócitos ativados no perfil M1 (IFN- γ e LPS) produzem óxido nítrico (NO). NO é um gás microbicida produzido a partir da enzima *óxido nítrico sintase induzida* (iNOS). *T. gondii* é capaz de modular este sistema microbicida por distintos mecanismos conforme a linhagem de macrófagos. Neste trabalho, avaliaremos se a infecção por *T. gondii* modula a expressão de iNOS e produção de NO de macrófagos peritoneais murinos perfil M1 originários de condições distintas: macrófagos residentes; e de peritônio estimulado com 200 taquizoítos de *T. gondii*. Objetivando analisar por citometria de fluxo a expressão de iNOS, iniciamos experimentos para remoção dos macrófagos cultivados por 24h em perfil M1 em placas de 6 poços. Macrófagos residentes peritoneal de camundongos foram ativados em perfil M1 durante 24h. Macrófagos foram soltos com PBS à 4°C durante 60 min com ou sem raspagem com êmbolo de seringa e foi avaliada a definição da morfologia populacional e viabilidade celular por citometria de fluxo com iodeto de propídio. A remoção de células somente com PBS resultou em 77,3% \pm 12,9 de recuperação dos macrófagos plaqueados. Uso de PBS mais raspagem com êmbolo da seringa recuperou 75,7% \pm 15,6 dos macrófagos. Macrófagos soltos apenas com PBS apresentaram viabilidade de 72,2% \pm 13,7 e macrófagos soltos com PBS mais raspagem com êmbolo da seringa atingiram 70,9% \pm 11,6. A literatura evidencia a problemática de soltar macrófagos e nossos dados estão de acordo. Portanto, PBS à 4°C com ou sem êmbolo da seringa apresentaram boa recuperação e viabilidade dos macrófagos ativados. Essa técnica de soltar macrófagos será usada após infecção das células com *T. gondii*. Macrófagos ou monócitos inflamatórios serão ativados no perfil M1 por 24h e infectados por 2 e 24h. Essas células serão soltas e analisadas por citometria de fluxo para verificar a expressão de F4/80, iNOS e presença de *T. gondii*. Pretende-se analisar se o mecanismo evasivo de *T. gondii* contra o sistema microbicida baseado em NO varia conforme a origem de macrófagos primários de camundongos.

Palavras chaves: Macrófagos, *Toxoplasma gondii*, iNOS

Instituição do Programa de IC: UENF
Fomento da bolsa: CNPq



Release of resident peritoneal macrophages in the M1 activation profile and infection with *Toxoplasma gondii* for evaluation of iNOS expression by flow cytometry

Marcos Roberto Dias Campos, Pedro Souto Rodrigues, Sérgio Henrique Seabra, Renato Augusto DaMatta

Toxoplasma gondii is an intracellular parasite of vertebrates and the etiologic agent of toxoplasmosis. *T. gondii* infects nucleated cells including macrophages. Macrophages are heterogeneous cells derived from circulating monocytes or embryonic precursor cells. In the peritoneum of healthy mice, there are two macrophage subpopulations: macrophages F4/80^{hi} (embryonic origin) and macrophages F4/80^{lo} (derived from monocytes). In peritonitis, occurs diapedesis of inflammatory monocytes (Ly6C^{hi}). Macrophages and monocytes in the M1 activation profile (IFN- γ and LPS) produce nitric oxide (NO). NO is a microbicidal gas produced from inducible nitric oxide synthase (iNOS). *T. gondii* is able to modulate this microbicidal system by different mechanisms according to the lineage of macrophages. In this work, we will evaluate whether *T. gondii* infection modulates iNOS expression and NO production of M1 activation profile peritoneal macrophages originating from different conditions: resident macrophages; and peritoneum stimulated with 200 *T. gondii* tachyzoites. In order to analyze the expression of iNOS by flow cytometry, we started the experiments to remove macrophages cultured for 24h in the M1 activation profile in 6-well plates. Peritoneal resident macrophages of mice were activated in the M1 activation profile for 24h. Macrophages were released with PBS at 4°C for 60 min with or without scraping with a syringe plunger and the populational morphology and cell viability were evaluated by flow cytometry with propidium iodide. Removal of cells with PBS only resulted in 77.3% \pm 12.9 recovery of macrophages. Use of PBS plus scraping with syringe plunger recovered 75.7% \pm 15.6 of the macrophages. Macrophages recovered with PBS alone showed viability of 72.2% \pm 13.7 and detachment of macrophages with PBS plus scraping with syringe plunger reached 70.9% \pm 11.6. The literature highlights the problem of releasing macrophage and our data are in agreement. Therefore, PBS at 4°C with or without a syringe plunger showed good recovery and viability of activated macrophages. This technique of releasing macrophages will be used after infection of the cells with *T. gondii*. Macrophages or inflammatory monocytes will be activated in the M1 profile for 24h and infected for 2 and 24h. These cells will be released and analyzed by flow cytometry to check the expression of F4/80, iNOS and the presence of *T. gondii*. It is intended to analyze whether the evasive mechanism of *T. gondii* against the NO-based microbicidal system varies according to the origin of primary mouse macrophages.

Keywords: macrophages, *Toxoplasma gondii*, iNOS

Instituição do Programa de IC, IT ou PG: UENF
Fomento da bolsa: CNPq