

MODULAÇÃO DE MACRÓFAGOS ATIVADOS M1 CULTIVADOS SOBRE
SUBSTRATO RÍGIDO E BIOFILME DE COLÁGENO I INFECTADOS COM
Toxoplasma gondii

TÂMARA CAROLINA GOMES RIBEIRO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF
Campos dos Goytacazes - RJ - Brasil
Fevereiro/2022

MODULAÇÃO DE MACRÓFAGOS ATIVADOS M1 CULTIVADOS SOBRE
SUBSTRATO RÍGIDO E BIOFILME DE COLÁGENO I INFECTADOS COM
Toxoplasma gondii

TÂMARA CAROLINA GOMES RIBEIRO

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biotecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia

Orientador: Dr. Renato Augusto DaMatta

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF

Campos dos Goytacazes - RJ - Brasil

Fevereiro/2022

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

R484 Ribeiro, Tâmara Carolina Gomes.

MODULAÇÃO DE MACRÓFAGOS ATIVADOS M1 CULTIVADOS SOBRE SUBSTRATO RÍGIDO E BIOFILME DE COLÁGENO I INFECTADOS COM *Toxoplasma gondii* / Tâmara Carolina Gomes Ribeiro. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

37 f.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2022.

Orientador: Renato Augusto Damatta.

1. Colágeno I. 2. Substrato rígido. 3. Macrofágo. 4. *Toxoplasma gondii*. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

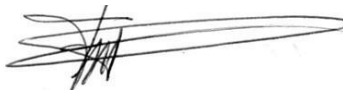
Tâmara Carolina Gomes Ribeiro

MODULAÇÃO DE MACRÓFAGOS ATIVADOS M1 CULTIVADOS SOBRE
SUBSTRATO RÍGIDO E BIOFILME DE COLÁGENO I INFECTADOS COM
Toxoplasma gondii

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Biociências e Biotecnologia

Aprovada em 25 de fevereiro de 2022

Banca examinadora:



Prof. Fábio da Silva de Azevedo Fortes (Dr. Ciências Biológicas) - UEZO



Prof. Jorge Hudson Petretski (Dr. em Biociências e Biotecnologias) - UENF



Prof. Clóvis de Paula Santos (Dr. em Med.Vet.– Parasitol. Veter.) – UENF



Prof. Renato Augusto DaMatta (Dr. em Ciências) - UENF

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo seu amor e graça que me permitiram continuar diante dessa pandemia, sendo minha força e meu refúgio.

Agradeço a minha mãe, Iara Gomes pelo apoio e amor incondicional.

Agradeço aos meus irmãos: Sanderson Yago Gomes de Abreu e Aquires Gomes de Abreu por cada palavra de apoio e por me ouvirem.

Agradeço a meu noivo Miqueias Pereira Macedo pelo suporte emocional e por sempre me motivar na carreira acadêmica. Pelo seu carinho e compreensão.

Agradeço aos demais membros da minha família que sempre acreditaram no meu potencial.

Agradeço ao Prof. Renato DaMatta, por me permitir ser sua orientanda, pela disponibilidade e dedicação profissional constante que me deu forças para permanecer perseverante.

Agradeço ao Prof. Sérgio Henrique Seabra pelo apoio técnico, disponibilidade e pela revisão.

Agradeço ao corpo técnico do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) do CBB, pelo profissionalismo e disponibilidade.

Agradeço a meu grande amigo Pedro Souto Rodrigues, pelo apoio, incentivo, disponibilidade para retirada de dúvidas e carinho.

Agradeço a Felipe Figueirôa Moreira pela disponibilidade constante e pela amizade.

Agradeço a todos meus amigos dos laboratórios da UENF, pelos auxílios no manuseio de equipamentos, retirada de dúvidas, brincadeiras. Em especial a Marcos Roberto Dias Campos.

Agradeço especialmente às instituições de fomento CNPq, FAPERJ, UENF e CAPES, que disponibilizaram a verba necessária para realização dos experimentos e pela bolsa de mestrado CAPES.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	V
LISTA DE FIGURAS	VI
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Cultura celular em diferentes substratos.....	3
1.2. Mecanismo de ação de macrófagos ativados.....	5
1.3. <i>Toxoplasma gondii</i>	7
2. OBJETIVOS	10
2.1. Objetivos	10
2.2. Objetivos específicos.....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1. Colágeno de cauda de rato.....	11
3.2. Preparação do biofilme de colágeno.....	11
3.3. Manutenção de linhagens celulares	11
3.4. Obtenção de taquizoítos de <i>T. gondii</i> cepa ME 49.....	11
3.5. Ativação de macrófagos M1.....	12
3.6. Infecção de macrófagos ativados M1.....	12
3.7. Análise da produção de Óxido nítrico.....	12
3.8. Degradação do colágeno I por collagenase.....	13
3.9. Preparação para microscopia óptica de campo claro.....	13
3.10. Preparo para microscopia confocal.....	13
3.11. Teste estatístico.....	14
4. RESULTADOS	15
4.1. Produção de óxido nítrico é reduzida em macrófagos ativados M1 cultivados em 2,5 D e infectados com <i>T. gondii</i>	15
4.2. Microscopia Óptica.....	15
4.3. Quantificação de taquizoítos por macrófagos e por vacúolo parasitóforo ativados M1 cultivados em SR e COL I.....	16
4.4. Deslocamento de macrófagos não ativados cultivados em biofilme de COL I.....	18
5. DISCUSSÃO	19
6. CONCLUSÕES	22
7. REFERÊNCIAS	23

LISTA DE ABREVIATURAS

COL I: Colágeno I

SR: Substrato rígido

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

IFN- γ : Interferon-gamma

IL: Interleucina

iNOS: Óxido nítrico sintase induzida

LPS: Lipopolissacarídeo

SFB: Soro fetal bovino

TGF- β : Fator de transformação do crescimento

TLRs: Toll-like receptors

TNF: Fator de necrose tumoral

VP: Vacúolo parasitóforo

MMPs: Metaloproteinases

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelos de cultura celular. A) Macrófagos cultivados em substrato rígido (poliestireno ou *in vitro*). B) Macrófagos cultivados em biofilme de colágeno I sobre lamínula. C) Macrófagos cultivados em suspensão pela adição de esferas nanopartículas magnéticas (em amarelo). D) Tabela de legendas.

Figura 2 - Esquema de perfil de ativação de macrófagos. A) Macrófagos ativados no perfil M1. B) Macrófagos ativados no perfil M2.

Figura 3 - Esquema do ciclo da transmissão de *T. gondii*. Liberação de oocistos por felídeos (1) contamina o ambiente, vegetais e água (2). Esses oocistos esporulados contaminam outros animais (3) e seres humanos (4). Mães contaminadas podem transmitir verticalmente (via placenta) o parasito para o feto em desenvolvimento (5). As formas infectantes do ciclo de vida do parasito são: oocisto contendo esporocistos esporulados; taquizoítos de rápida multiplicação; bradizoítos, forma latente contida em cistos teciduais. Traduzido de Florence & Dardé (2012).

Figura 4 - Produção de nitrito (μM) de macrófagos ativados M1 por 24 horas cultivados em substrato rígido (SR – 2D) ou biofilme de colágeno I (COL I - 2,5D) não infectados ou infectados com *T. gondii* cepa ME- 49 após 24 horas. Média e desvio padrão (n = 3 experimentos, cada com 3 replicata). ***P < 0.05 one-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Figura 5 - Microscopia óptica de campo claro de macrófagos ativados M1 por 24 horas e infectados por *T. gondii* cepa ME-49 por 24 horas corados com Giemsa. (A) Macrófagos ativados M1 infectados sob lamínula de vidro, taquizoíto podem ser visualizados (seta). (B) Macrófagos ativados M1 infectados cultivados em biofilme de COL I, taquizoítos podem ser visualizados (setas). Objetiva de 100x com óleo de imersão. Barra=10 μm

Figura 6 - Número médio de taquizoítos por macrófagos ativados M1 cultivados em substrato rígido (SR – 2D) ou biofilme de colágeno I (COL I - 2,5D) infectados com *T.*

gondii cepa ME-49 por 4 e 24 horas. Média e desvio padrão (n = 3 experimentos, cada com 3 replicata). ***P < 0.05 one-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Figura 7 - Número médio de taquizoítos por vacúolo parasitóforo (VP) em macrófagos ativados M1 cultivados em substrato rígido (SR – 2D) e biofilme de colágeno I (2,5D) infectados com *T. gondii* ME 49 por 4 e 24 horas. Média e desvio padrão (n = 3 experimentos, cada com 3 replicata). ***P < 0.05 one-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Figura 8 - Análise de deslocamento de macrófagos não ativados e não infectados semeados sobre COL I por microscopia confocal. A) Esquema representativo do deslocamento de macrófagos no biofilme de COL I (magenta) sobre SR (azul). B) Macrófagos marcados com WGA – TRITC, cada quadro representa um corte óptico de 0,45 µm. C) A seta preta representa uma escala temporal de 10 a 50 minutos do cultivo dos macrófagos; barra cinza indica a distância de deslocamento de macrófagos (valores em vermelho são as diferenças). Barra=40µm

RESUMO

A cultura de células em substrato rígido (SR), denominada cultura 2D, é responsável por muito do que se conhece sobre a biologia celular. O emprego de técnicas mais similares ao *in vivo* sem o uso de modelos animais é uma alternativa cientificamente pertinente. Colágeno I (COL I) é uma proteína abundante na matriz extracelular. Pode ser disposto diretamente no substrato da cultura (cultura 2,5D) ou em biofilmes que permitem cultivar células em suspensão (cultura 3D). Macrófagos são células fagocíticas do sistema imune com funções que correspondem à sua ativação. Podem ser classificados em M1 (microbicida) ou M2 (homeostase tecidual). Macrófagos ativados M1 produzem óxido nítrico (NO) que se difunde no local da infecção e combate patógenos como *Toxoplasma gondii*. Esse parasito causa toxoplasmose acometendo 1/3 da população mundial. *T. gondii* modula macrófagos inibindo a produção de NO. Dados do grupo mostraram que macrófagos cultivados em COL I produzem menos NO e são mais permissíveis ao crescimento de cepa RH de *T. gondii*. Objetivamos estudar a capacidade microbicida de macrófagos cultivados em COL I infectados com cepa ME-49 (menos virulenta) de *T. gondii*. COL I foi obtido de cauda de ratos. Macrófagos RAW 264.7 mantidos em cultura foram ativados com lipopolissacarídeo e interferon- γ por 24 h em cultivo 2D e 2,5D. *T. gondii* cepa ME-49 foi mantido em células LLC-MK2. Macrófagos foram infectados em proporção 1:1 por 4 horas, e reativados por mais 24 horas. Avaliamos produção de NO e desenvolvimento do parasito. Macrófagos cultivados em COL I produzem menos NO que os em SR. A infecção reduziu a produção de NO somente em macrófagos cultivados em SR. Macrófagos cultivados e infectados em COL I apresentaram maior número de parasitos confirmando menor capacidade microbicida. Macrófagos entram no COL I a partir de 10 minutos de interação levando 50 minutos para decantarem sobre a lamínula. Os dados obtidos aqui confirmam resultados do grupo. O cultivo 2,5D em COL I revela diferenças com possíveis implicações biológicas em relação ao cultivo 2D. Comparar as interações parasito/macrófagos em substratos distintos de cultivo é de suma importância, pois reproduzem com maior similaridade o ambiente *in vivo*.

Palavras chaves: Colágeno, Macrófago, Ativação, *Toxoplasma gondii*

ABSTRACT

The culture of cells in rigid substrate (2D) is responsible for much of what is known about cell biology. The use of techniques more similar to in vivo without the use of animal model is an alternative. Collagen I (COL I) is a protein abundant in the extracellular matrix. It can be placed directly on the culture substrate (2.5D culture) or in biofilms that allow cells to be cultivated in suspension (3D culture). Macrophages are phagocytic cells of the immune system with functions that correspond to their activation. They can be classified M1 (microbicide) or M2 (tissue homeostasis). Activated M1 macrophages, among other characteristics, produce nitric oxide (NO) that diffuses at the site of infection and fights pathogens such as *Toxoplasma gondii*. This parasite causes toxoplasmosis affecting 1/3 of the world population. *T. gondii* modulates macrophages by inhibiting NO production. Data from the group showed that macrophages cultured in COL I produce less NO and are more permissible to infection by *T. gondii* strain RH, it is less virulent. COL I was obtained from rat tails. RAW 264.7 macrophages maintained in culture were activated with lipopolysaccharide and interferon- γ for 24 h in 2D and 2.5D cultures. *T. gondii* strain ME-49 was maintained in LLC-MK2 cells. Macrophages were infected in a 1:1 ratio for 4 hours and reactivated for another 24 hours. We evaluated NO production and parasite development. Macrophages grown in COL I produce less NO than those in SR. Infection reduced NO production only in macrophages cultured in SR. Macrophages infected in COL I showed a higher number of parasites, confirming a lower microbicidal capacity. Macrophages enter the COL I after 10 minutes of interaction, taking 50 minutes to settle on the coverslip. The data obtained here confirm data from the group. The 2.5D cultivation in COL I reveals differences with possible biological implications in relation to the 2D cultivation. Comparing the parasite/macrophage interactions in different substrates is of paramount importance because it reproduces the in vivo environment with greater similarity.

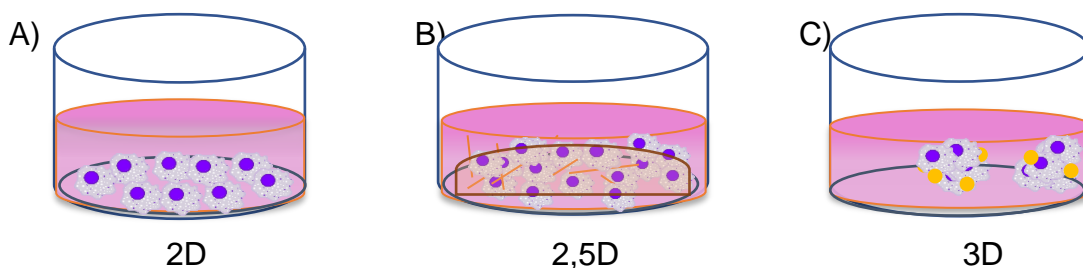
Keywords: Collagen, Macrophage, Activation, *Toxoplasma gondii*

1- INTRODUÇÃO

A cultura celular é convencionalmente realizada em substrato rígido (SR), denominado cultivo “2D”. Assim células, como macrófagos, são cultivadas e estudadas massivamente no cultivo 2D, com contribuição significativa para o que se sabe sobre a biologia de células (Taylor, 2014). A utilização de modelos animais na experimentação é bastante explorada a fim de sanar as lacunas científicas, porém requer atributos éticos específicos, por vezes a eutanásia de animais e o custo é elevado. O ambiente 2D de cultura de células é uma alternativa, consistindo na cultura de células e tecidos em um ambiente estéril que não remete de forma fiel a realidade das células no organismo. (Pampaloni *et al.*, 2007; Jensen & Teng, 2020).

O cultivo de macrófagos em 2D é geralmente realizado em placas de poliestireno tratadas com íons de oxigênio ou sobre superfície de vidro, como lamínulas. Contudo, o surgimento de métodos alternativos de cultura de macrófagos tem ganhado espaço na pesquisa. Os macrófagos podem ser cultivados em biofilmes contendo componentes de matriz extracelular (MEC), como o colágeno I (COL I) formando um biofilme sobre o SR, denominado cultivo “2,5D” (Pebworth *et al.*, 2014; Langhans, 2018).

Outro modelo de cultivo mais próximo ao sistema *in vivo* é conhecido como “3D”. O sistema 3D constituídos de COL I tem uso crescente, permitindo o estudo da estrutura e função dos tecidos de forma mais realística (Dhimolea *et al.*, 2010). Nos modelos 3D não há contato das células com SR. Dentre esses modelos tem-se a utilização de esferas de hidrogel acopladas a partículas magnéticas, gota suspensa (Langhans, 2018; Cavalheiro *et al.*, 2018) matriz de suporte impressas, micropelotas de cultura esferoide de ultrabaixa fixação, e placas micropadronizadas (Langhans, 2018).



D)





	Macrófago
	Biofilme de colágeno I
	Fibras de colágeno I
	Nanopartícula

Figura 1 – Modelos de cultura celular. A) Macrófagos cultivados em substrato rígido (poliestireno ou *in vitro*). B) Macrófagos cultivados em biofilme de colágeno I sobre lamínula. C) Macrófagos cultivados em suspensão pela adição de esferas nanopartículas magnéticas (em amarelo). D) Tabela de legendas.

Macrófagos podem ser cultivado nesses modelos alternativos 2,5 D e 3D (Ravi *et al.*, 2014). São células com grande plasticidade que atuam tanto na manutenção dos tecidos (perfil de ativação M2) como no combate contra patógenos (perfil de ativação M1) caracterizado pela produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como o óxido nítrico (NO) (Mosser & Edwards, 2008). Macrófagos ativados M1 são mais microbicidas, produzindo NO em maior escala (Sica & Mantovani, 2015).

A resposta imune do hospedeiro deve ser equilibrada para evitar produção excessiva de NO, porém, a produção de NO é necessária para controlar parasitos como *Toxoplasma gondii*, causador da Toxoplasmose (Smith *et al.*, 2021) e converter taquizoítos, formas de rápida multiplicação, em bradizoítos, a forma latente do parasito (Bohne *et al.*, 1994; Baneth *et al.*, 2015).

Macrófagos ativados M1 podem ser modulados por *T. gondii* ocasionando a redução da produção de NO que controla o crescimento do parasito (Seabra *et al.*, 2002). Além disso, NO é importante para redução dos cistos cerebrais de *T. gondii* em camundongos (Sa *et al.*, 2018). Após a infecção de macrófagos com *T. gondii* a produção do NO é reduzida em comparação com macrófagos ativados não infectados (DaMatta *et al.*, 2000). A diminuição de NO permite persistência e replicação, garantindo a disseminação do parasito no hospedeiro (Seabra *et al.*, 2002; Damasceno-Sá *et al.*, 2021). Existem diferentes tipos de cepa de *T. gondii*, podendo ser mais ou menos virulentas. A do tipo I, como a cepa RH, é mais virulenta, as do tipo II, como a cepa ME-49, e do tipo III, como VEG, são menos virulentas. Quanto

menos virulenta menos persistem em macrófagos ativados M1 (Damasceno-Sá *et al.*, 2021).

Dessa forma, uma análise da modulação de macrófagos ativados M1 infectados com *T. gondii* a cepa ME-49 em substrato 2,5D (COL I) comparativamente ao 2D é fundamental para compreensão da resposta imunológica de macrófagos ativados. Esse estudo foi iniciado pelo grupo com macrófagos não infectados e em seguida infectados com a cepa RH. Aqui, avançamos com a análise da infecção usando a cepa ME-49, menos virulenta e onde o macrófago se localiza no biofilme de COL I.

1.1. A cultura celular e os diferentes substratos

Há mais de meio século a cultura celular convencional 2D que compreende o cultivo de células individuais em frascos de plástico ou vidro com meio de cultura rico em nutrientes. Um meio de cultura pode ser suplementado com soro, derivado de animal adulto ou de seu feto (Taylor, 2014).

O cultivo de células sobre vidro demanda a limpeza e retirada de todos os resíduos que podem influenciar no metabolismo das células. Na década de 1960, o plástico poliestireno foi massivamente comercializado para cultivo de células devido a sua transparência, facilidade de moldagem e possibilidade de ser esterilizado. O poliestireno é composto por longa cadeia de carbono com anéis de benzeno ligados em cada carbono alternado, conferindo hidrofobicidade, dificultando a adesão celular. Muitos tipos de células de cultura primária têm dificuldade de adesão por isso o poliestireno é tratado com íons de oxigênio para diminuir a hidrofobicidade (Ryan, 2008).

O COL é uma longa proteína de grande valia para aplicações biomédicas e vem sendo utilizado para cultura de células. Possui baixa antigenicidade não promove inflamação e respostas citotóxicas, é a proteína mais abundante em animais, e responsável por grande parte do suporte mecânico para as células nos tecidos. Há mais de 20 tipos de COL. Sua conformação característica é a tripla hélice constituída por três cadeias polipeptídicas enoveladas (Habermehl *et al.*, 2005). As principais fontes de COL para uso biomédico são da pele e do tendão de animais, como tendão de cauda de rato; considerado fonte original de extratos de COL tipo I (Techatanawat *et al.*, 2011).

A MEC é constituída de diferentes proteínas e pode influenciar a forma da célula, o crescimento, proliferação, migração e diferenciação de macrófagos. O COL perfaz 25 a 35% do total de teor proteico de animais e constitui o principal elemento estrutural de órgãos e tecidos de vertebrados e compõe grande parte da MEC (Zhao *et al.*, 2018).

As células cultivadas se adaptam ao ambiente circundante influenciando o seu comportamento. O crescimento de células *in vitro* usando métodos de cultura 2D está distante da complexidade das células nos tecidos. O crescimento em superfícies 2D resulta em achatamento celular e remodelação da célula e seu citoesqueleto (Knight & Przyborski, 2015). Dessa forma, o cultivo de células em substratos alternativos é crescente.

A MEC é capaz de modular as células através da mecanotransdução onde as células percebem mudanças mecânicas do substrato e traduzem esses sinais em informações para o interior celular (Lukeshev & Werb, 1998; Nagelkerke *et al.*, 2015), essa sinalização também pode acontecer através de contato entre células, ativando e concentrando substâncias morfogenias e fatores de crescimento. As células, por sua vez, modificam a MEC através da secreção de proteases como as metaloproteinases (MMPs), que compreendem uma família especializada de proteinases extracelulares dependentes de zinco (Behonick & Werb, 2003). Dependendo do substrato empregado em um ensaio experimental, diferentes MMPs podem ser detectadas especificamente (Kupai *et al.*, 2010).

A utilização de modelos 3D constituídos de componentes da MEC como o COL I é crescente. De modo similar o COL I pode ser depositado sobre SR formando um biofilme determinado de 2,5 D (Langhans, 2018). As culturas de tecidos ou de células 2,5D ou 3D possuem características distintas em termos de heterogeneidade/plasticidade celular/morfologia, transporte de massa e complexo célula-matriz ou interações célula-célula em comparação com 2D (Philippeaux *et al.*, 2009; Haw *et al.*, 2014).

Preconiza-se a utilização de cultivo 2D ao invés de modelos animais. O uso de modelos alternativos como cultivo 3D ou 2,5D fornece modelo fisiologicamente relevante para diversas perguntas que investigam a importância da MEC no comportamento celular pois confere fatores-chave do tecido (Ravi *et al.*, 2014). O cultivo 3D possui custo mais alto do que o 2,5D (Danielson *et al.*, 2018). Dessa forma,

o cultivo 2,5D é uma opção de grande valia por ser um modelo intermediário que permite a cultura de células em um ambiente que propicia interação entre célula-parasito-MEC inexistente no modelo convencional 2D.

Um modelo 3D ideal simularia um tecido específico em fisiologia e microambiente, onde as células poderiam proliferar, agregar e diferenciar de forma similar ao sistema *in vivo*. Todavia esse modelo ainda não foi alcançado. Existem alternativas interessantes que aproximam o cultivo celular *in vitro* da situação *in vivo*.

1.2. Mecanismo de ação de macrófagos ativados

Macrófagos são células presentes em todos os tecidos dos vertebrados que respondem a mudanças internas e externas do organismo, não apenas como fagócitos na defesa contra microrganismos e na eliminação células senescentes, mas também por via trófica, funções regulatórias e de reparo (Giorgio, 2013; Gordon & Plüddemann, 2017). Macrófagos também sintetizam compostos biológicos, como MMPs (Giorgio, 2013). Macrófagos atuam na reparação tecidual ao secretarem componentes da MEC (Mosser & Edwards, 2008). Sua origem tecidual pode ser por autorrenovação de macrófagos residentes originados do estágio embrionário (Siewek & Allen, 2013) e de monócitos circulantes do sangue (Cline, 1978; Gordon & Plüddemann, 2017).

Macrófagos apresentam diversos programas gênicos de ativação, mas são classificados linearmente como M1 (classicamente ativados) ou M2 (alternativamente ativados). Nos tecidos, macrófagos adotam fenótipo M1 ao serem ativados por interferon- γ (IFN- γ) ou fator de necrose tumoral (TNF) e ligantes de *Toll-like receptors* como lipopolissacarídeos (LPS) (Mosser & Zhang, 2008), já o fenótipo M2 ao serem ativados por interleucina (ILs), sendo IL-4, IL-10 e IL-13 (Mosser & Edwards, 2008).

Macrófagos ativados M1 são caracterizados por alta expressão de citocinas pró-inflamatórias e expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) que produz grandes quantidades de NO (Sica & Mantovani, 2015) destruindo patógenos, incluindo o próprio macrófago no processo (Mills & Ley, 2014). A iNOS é uma das isoformas de Óxido nítrico sintase (NOS) e é induzida principalmente por INF- γ (MacMicking *et al.*, 1997).

A ativação microbicida de macrófagos induz a expressão de iNOS e consequente produção de NO, sendo um dos principais mecanismos responsáveis

pela atividade microbicida de macrófagos e atua ativamente contra protozoários intracelulares dentro da imunidade celular autônoma (De Groot & Fang, 1995). NO produzido pela iNOS é uma molécula microbicida crucial durante infecções parasitárias. Citocinas como TNF- α e IL-1 β e presença de LPS, estimulam a expressão da iNOS nos macrófagos infectados, resultando em produção prolongada de altos níveis de NO (Lowenstein & Padalko, 2004).

Em cultivo 2D já foi observado que o NO produzido por macrófagos de camundongos peritoneais ativados controla *T. gondii* após infecção com cepa tipo I (RH) (Adams *et al.*, 1990; Nibbering *et al.*, 1991; Langermans *et al.*, 1992) persistindo com uma ligeira redução nessas células, e as cepas tipo II (ME-49) III (VEG) e recombinantes (P-Br) sendo controlados completamente (Damasceno-Sá *et al.*, 2021).

Macrófagos M2 são caracterizados por promover o remodelamento tecidual, estão presentes em tumores e possuem funções imunorregulatórias (Sica & Mantovani, 2015). Esses macrófagos estimulam células T a produzirem citocinas Th2 como IL-4, IL-10 e TGF- β . Estas citocinas amplificam a atividade M2 dos macrófagos, estimulando fibrose e produção de MEC (Mills & Ley, 2014). Alguns genes são expressos de forma diferenciada nas duas subpopulações de macrófagos ativados, como iNOS, em macrófagos ativados M1, e arginase-1 e receptor de manose (CD206 - MR) em macrófagos M2 (Jablonski *et al.*, 2015).

A iNOS e arginase-1 são proteínas que competem pelo substrato L-arginina (Jenkinson *et al.*, 1996). L-arginina é convertida pela iNOS em NO e citrulina (Stuehr *et al.*, 2001) e pela arginase-1 em ornitina e ureia. Ornitina é precursora da síntese de poliaminas e COL (Mosser & Edwards, 2008), atuando na homeostase de L-arginina e no ciclo da ureia. Arginase-1 inibe produção de NO pela iNOS por competir pelo substrato L-arginina (Chang *et al.* 1998).

A manipulação do substrato de cultivo de macrófagos pode influenciar na ativação induzida, na expressão de marcadores de ativação, na migração, e adesão de macrófagos (Gruber *et al.*, 2018; Vasse 2018; Sridharan 2019; Carey *et al.*, 2016). O microambiente de cultivo influencia diretamente o comportamento das células. O feedback obtido por macrófagos a partir de fibras de COL I da MEC modula a expressão da arginase-1, que é altamente expressa em macrófagos M2 (Mc Whorter *et al.*, 2015).

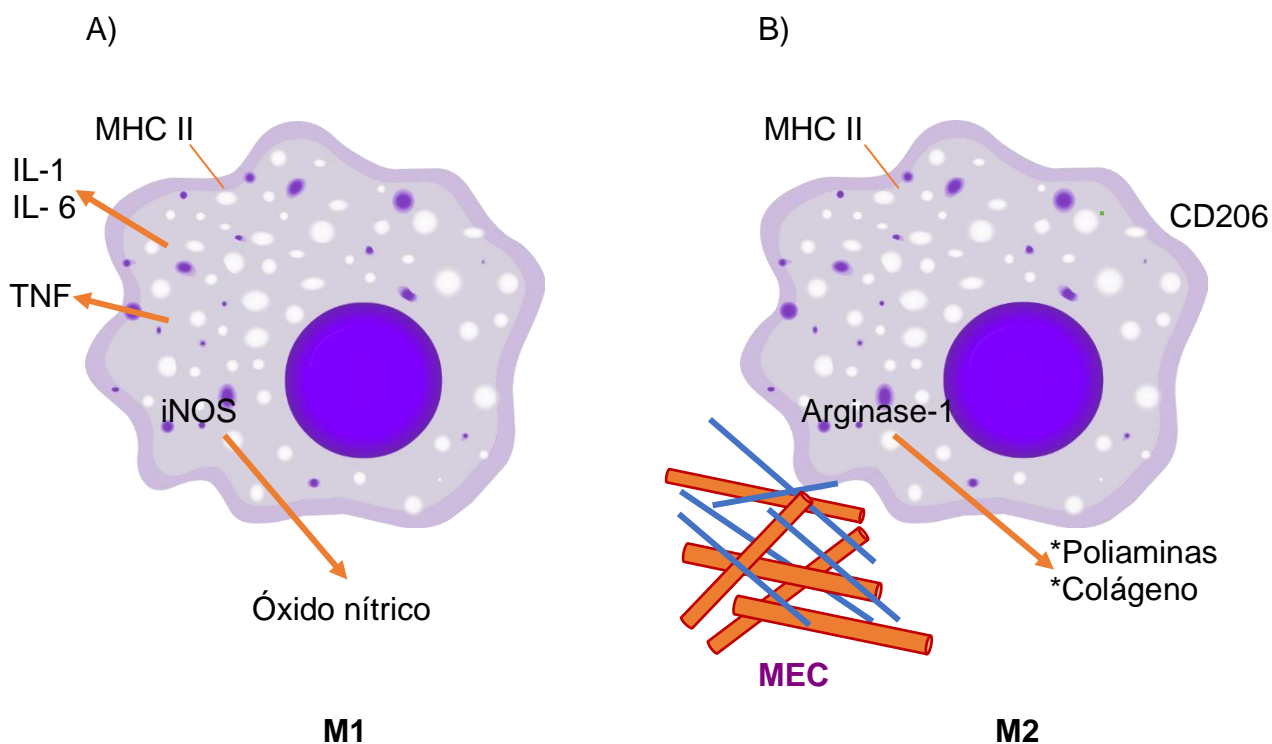


Figura 2 – Esquema de perfil de ativação de macrófagos. A) Macrófagos ativados no perfil M1. B) Macrófagos ativados no perfil M2.

Dados do nosso grupo demonstram diferenças significativas comparando produção de NO de macrófagos em cultura 2,5D (biofilme de COL I) com 2D (cultivo sob SR – poliestireno ou vidro). Foi observado que macrófagos cultivados em 2D ativados para o perfil M1, produziam mais NO do que os macrófagos cultivados em 2,5D, o que sugere modulação da microbicidade de macrófagos de acordo com o substrato de cultivo.

1.3. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii, protozoário do Filo apicomplexa, é o causador da toxoplasmose, doença que atinge grande parte da população mundial e praticamente todos os vertebrados endotérmicos, sendo mais de 30 espécies de aves e 300 espécies de mamíferos (Flegr *et al.*, 2014). A infecção por *T. gondii* é amplamente prevalente em humanos e em animais (Dubey, 1991; Dalimi & Abdoli, 2012). *T. gondii* é um coccídeo com um ciclo de vida complexo. Existem três formas infectivas no ciclo

de vida do parasito: taquizoítos (intracelular), bradizoítos (contidos em cistos teciduais), e esporozoítos (contidos em oocistos esporulados) (Baneth *et al.*, 2015).

Taquizoítos são formas de rápida multiplicação do parasito em células dos hospedeiros, presentes no ciclo lítico na fase aguda da doença. Bradizoítos são formas de lenta multiplicação em cistos teciduais (Dubey *et al.*, 2008). Quando o parasito invade o epitélio intestinal, após a ingestão de cisto tecidual ou oocisto esporulado, se espalha no organismo tornando-se sistêmico no tecido cerebral e muscular (Figura 3).

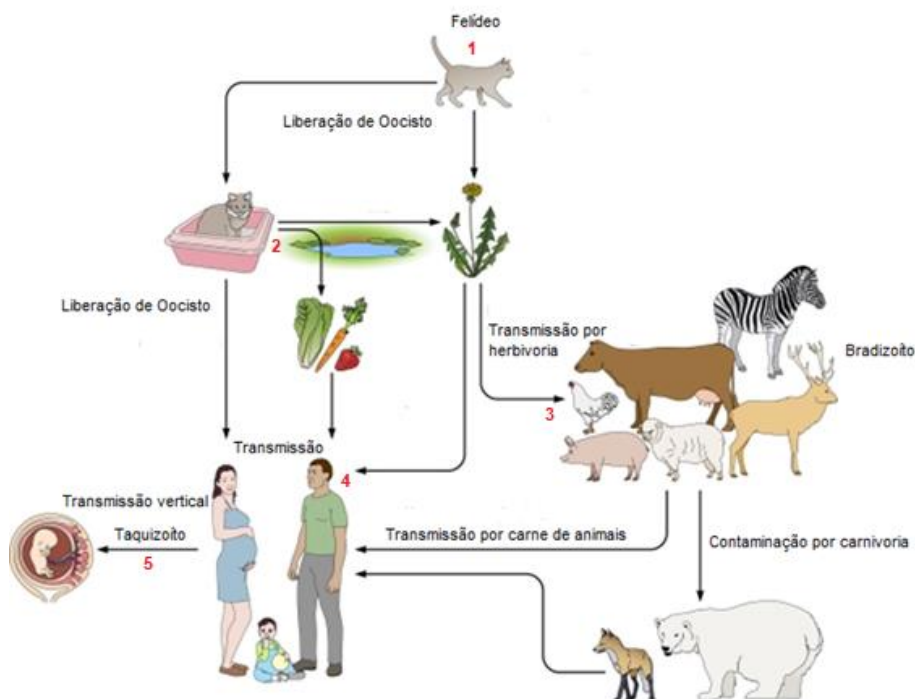


Figura 3 - Esquema do ciclo da transmissão de *T. gondii*. Liberação de oocistos por felídeos (1) contamina o ambiente, vegetais e água (2). Esses oocistos esporulados contaminam outros animais (3) e seres humanos (4). Mães contaminadas podem transmitir verticalmente (via placenta) o parasito para o feto em desenvolvimento (5). As formas infectantes do ciclo de vida do parasito são: oocisto contendo esporocistos esporulados; taquizoítos de rápida multiplicação; bradizoítos, forma latente contida em cistos teciduais. Traduzido de Florence & Dardé (2012).

Na maioria dos casos, a infecção é subclínica, mas manifestações clínicas medianas e severas ocorrem (Baneth *et al.*, 2015). Durante o processo de invasão, ocorre íntima associação da membrana plasmática de *T. gondii* com a da célula hospedeira, formando uma estrutura conhecida como junção móvel. Durante a

invasão da célula hospedeira o vacúolo parasitóforo (VP) contendo o parasito é formado (Sibley, 2003). É no VP que as forma taquizoítos se multiplicam até que a célula rompa.

A maioria dos indivíduos imunocompetentes infectados com *T. gondii* permanecem assintomáticos ao longo da vida, mas o parasito pode causar cegueira e morbidade, além de infecções fatais em pacientes imunocomprometidos e em fetos em desenvolvimento (Furtado *et al.*, 2011). Os felídeos são os hospedeiros definitivos. A fase sexuada do ciclo ocorre no intestino desses animais, resultando na excreção de oocistos resistentes que contaminam o ambiente (Baneth *et al.*, 2015).

Macrófagos ativados M1 agem em resposta a taquizoítos de acordo com a virulência das cepas. Taquizoítos de cepas menos virulentas como ME-49 são combatidos pela resposta imunológica que produz citocinas pró-inflamatórias. A infecção com *T. gondii* estimula a produção de IL-12, que induz a produção de IFN- γ , que é uma das citocinas mais importantes no combate ao parasito (Pifer & Yarovinsky, 2011; Ge *et al.*, 2014). Já macrófagos ativados M1 infectados com taquizoítos de cepa RH, mais virulenta, produzem menos NO (Seabra *et al.*, 2002), de maneira dependente de TGF- β (Seabra *et al.*, 2004). Isso ocorre porque taquizoítos modulam o macrófago permitindo que persistam ou repliquem lentamente dentro da célula, burlando o sistema imune. Dessa forma, a infecção por *T. gondii* modula a produção de NO (Seabra *et al.*, 2002; Seabra *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2011; Damasceno-Sá *et al.*, 2021). Em todo o mundo grande parte da população foi infectada com *T. gondii*. Nos Estados Unidos, a prevalência é de 14% nos indivíduos com 40 anos de idade, com 1 milhão de novas infecções a cada ano, tornando-se a segunda causa mais comum de mortes relacionadas a doenças transmitidas por alimentos (Furtado *et al.*, 2011). As infecções pelo protozoário são amplamente prevalentes em humanos e animais no Brasil (Dubey *et al.*, 2012).

Estudos recentes apontam para uma diferença na resposta de macrófagos a internalização e disposição de *T. gondii* no VP como também na morfologia de macrófagos quando cultivados em diferentes substratos. As células infectadas cultivadas sobre o biofilme de colágeno apresentavam rosáceas com taquizoítos sobrepostos na horizontal e vertical, em maior quantidade nesse substrato (Danielson *et al.*, 2018). A cultura em substratos 2,5D e 3D salienta diferenças de migração, adesão (Carey *et al.*, 2016; Mc Whorter *et al.*, 2015; Sridahran *et al.*, 2019), respostas

imunes (Mc Whorter *et al.*, 2015; Mc Whorter *et al.*, 2016; Sridahran *et al.*, 2019), diferenças na expressão de receptores de membrana considerando o perfil de ativação de macrófagos (Vasse, 2018; Gruber *et al.*, 2017; Madsen *et al.*, 2013).

Nossos resultados anteriores também apontam diferenças significativas na resposta de macrófagos ativados M1 cultivados em substratos 2D versus 2,5D e infectados com *T. gondii* cepa RH. Em cultura 2,5D houve maior replicação de taquizoítos após 24 horas de infecção (Ribeiro, 2019). Dessa forma, faz-se necessário o estudo da interação parasito-hospedeiro em culturas 2,5D ou 3D para um entendimento mais fidedigno da interação em um ambiente mais similar ao *in vivo* do que é obtido com a cultura 2D. A utilização de *T. gondii* da cepa ME-49 é crucial para comparar ao já achado com a cepa RH, pois expande o estudo incluindo diferentes virulências do parasito. Esse estudo é de suma importância para compreensão mais realista da biologia da interação macrófago *T. gondii* podendo gerar conhecimentos importantes para o desenvolvimento de novos tratamentos a doença.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Comparar a ativação de macrófagos M1 infectados com *T. gondii* da cepa ME-49 em cultura 2D (substrato rígido) e cultura 2,5 D (biofilme COL I);

2.2. Objetivos específicos

- Analisar a ativação de macrófagos M1 e a carga parasitária em macrófagos (raw 264.7) ativados infectados com *T. gondii* cepa ME 49 cultivados em 2D e 2,5D;
- Comparar a ativação de macrófagos M1 e a carga parasitária em macrófagos ativados infectados com *T. gondii* cepa ME-49 cultivados em 2D e 2,5D (biofilme COL I);
- Caracterizar a morfologia de macrófagos ativados M1 infectados e não infectados com *T. gondii* cepa ME-49 cultivados em 2D e 2,5D (biofilme COL I).
- Determinar a posição dos macrófagos no biofilme de COL I durante o cultivo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Colágeno de cauda de rato

COL I foi extraído segundo protocolo estabelecido (Rajan *et al.*, 2006) com modificações. Ratos Wistar do descarte do biotério da UENF foram usados para obtenção do COL I. Caudas desses animais foram removidas, limpas com álcool. O tendão e fibras colágenas foram removidos com auxílio de pinças de metal. Os filamentos de COL obtidos foram colocados em ácido acético 0,4 N em um béquer para dissolução do COL e mantido sob refrigeração por 96 horas. As fibras dissolvidas foram transferidas para tubos cônicos armazenadas em geladeira e centrifugadas por 1 hora e 30 min, a 30 000 x g o sobrenadante foi retirado e liofilizado. Em seguida, foi submetido à eletroforese para determinar sua pureza, estocado a -20 °C. Frações para uso foram ressuspensas em ácido acético 0,4 N em concentração final de 5 mg/mL.

3.2. Preparação do biofilme de COL

Para cada 14 poços de placa de 24 poços foram necessários 720 µL de COL (5 mg/mL), diluído em 144 µL de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Sigma Aldrich) 5x concentrado, 1536 µL de DMEM 1x e 400 µL de NaOH 1 N para neutralizar o pH. Essa solução (200 µL) foi disposta em cada poço, com ou sem lamínula, em placas de 24 poços. Em seguida, a placa com poços revestidos com a solução de COL foi disposta em estufa (1 h, 37°C) para polimerização do COL e formação do biofilme.

3.3. Manutenção de linhagens celulares

As linhagens RAW 264.7 (macrófagos murinos) e LLC-MK2 (epitélio de rim de *Macaca mulatta*) foram utilizados nesse trabalho. As células foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm² com DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), e 0,1% de estreptomicina. Taquizoítos de *T. gondii* (cepa ME-49) foram mantidos em cultura em LLC-MK2 em garrafa de cultura de 25 cm² em estufa.

3.4. Obtenção de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* cepa ME 49

Cistos teciduais dessa cepa foram obtidos do cérebro de camundongos previamente infectados por 3 meses. Após eutanásia do camundongo com CO₂, cérebro foi removido e macerado em tubo cônico de 50 mL contendo 1 mL de PBS.

Cistos foram quantificados em 10 μ L da suspensão do cérebro e inoculados na cavidade peritoneal de camundongo. Após 5-7 dias, um lavado peritoneal foi realizado e adicionado sobre monocamadas de LLC-MK2 para infecção e replicação de taquizoítos nessas células hospedeiras. Após 3 dias de infecção, as células contendo taquizoítos foram raspadas, a suspensão filtrada (3 μ m), e centrifugadas a 1000 x g, 10 min, 4°C. Posteriormente, os taquizoítos foram ressuspensos em 1 mL de DMEM, contados em câmara de Neubauer e usados para infectar os macrófagos.

3.5. Ativação de macrófagos M1

Macrófagos foram mecanicamente soltos da garrafa de cultura, centrifugados a 500 x g, 10 min, a aproximadamente 20°C e quantificados em câmara de Neubauer. Macrófagos foram plaqueados (5×10^5 macrófagos por poço) em placa de 24 poços sobre lamínulas ou não contendo ou não o biofilme de COL I. Macrófagos cultivados a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 1 h, lavados com solução de Hank's, e cada poço da placa recebeu 300 μ L de DMEM contendo 2% de SFB. Para ativação M1, os macrófagos receberam lipopolissacarídeo (LPS) (0,2 μ g/mL) e IFN- γ (200 U/ml). Macrófagos foram utilizados após 24 horas de cultivo.

3.6. Infecção dos macrófagos ativados M1

Macrófagos foram infectados na proporção 1:1 taquizoítos/macrófagos em placas de 24 poços contendo células previamente ativadas cultivadas em 2D e 2,5D. Após 2 horas de infecção, as células foram lavadas e cultivadas com DMEM contendo SFB e ativadores. Após 4 e 24 horas a interação foi analisada por diferentes metodologias.

3.7. Análise da produção de óxido nítrico

O NO foi avaliado indiretamente pela quantificação de nitrito, um dos produtos estáveis e não voláteis da quebra do NO. Para cada leitura foi preparada curva-padrão com quantidades definidas de nitrito de sódio em DMEM e adicionado 50 μ L do sobrenadante do cultivo em placas de 96 poços em duplicata. Em seguida foi adicionado 50 μ L de solução de Griess (1 volume de 1% de sulfanilamida em 5 % de ácido ortofosfórico em água deionizada com 1 volume de 0,1% de N-[1-Naftil] etilenodiamina em água deionizada) por poço, sobre as amostras e os pontos da

curva-padrão. Após 10 min, a absorbância dos poços da placa foi lida a 540 nm em leitor de microplacas (Molecular Probes Versa Max). Os resultados foram correlacionados com a curva-padrão e a quantidade de NO calculada (Green *et al.*, 1982; Promega, 2009).

3.8. Degradação do biofilme de colágeno I por collagenase

Macrófagos cultivados em biofilme de COL I são de difícil observação. Portanto, é necessário digerir o biofilme para analisar os macrófagos. A collagenase é uma enzima que foi adicionada para digerir o biofilme de COL liberando os macrófagos que aderirão a lamínula, sobrenadante também será coletado. Para tal, o meio de cultivo das células foi removido e adicionados 300 µL por poço de solução de collagenase (0,15U/µL) contendo CaCl₃ (0,0441g/µL) em DMEM. Entre 1 e 1:30 horas de incubação a 37°C o biofilme se desfez liberando as células que decantam e se aderem a lamínulas.

3.9. Preparação para Microscopia Óptica

Após o cultivo, as células aderidas em lamínulas ou no biofilme de COL I foram fixadas em formaldeído 4% em PBS. As células foram coradas com solução de Giemsa diluída em água destilada (1:10) por 10 min. As lamínulas contendo células foram lavadas com água destilada, desidratadas em bateria acetona xilol (90% acetona e 10% xilol; 50% acetona e 50% xilol; 30% acetona e 70% xilol, 100% xilol), e montadas sobre Entellan em lâminas. Após secagem do Entellan, as células foram observadas no microscópio Zeiss Axioplan, quantificadas e imagens das lamínulas de 4 e 24 horas foram capturadas em câmera digital.

3.10. Preparação para Microscopia Confocal

Macrófagos raw 264.7 foram marcados com a lectina WGA – TRICT que reconhece o carboidrato N-acetilglicosamina presente no glicocálix de células. As células foram incubadas por 10 minutos com 10 µg/ml da lectina. Essa marcação possibilita a visualização das células por microscopia de fluorescência confocal. Esses macrófagos foram semeados sobre o biofilme de colágeno acondicionados em placas de Petri e foram observados em 10, 30 e 50 minutos no confocal Zeiss 710. Dessa

forma, foi possível determinar como os macrófagos se comportavam no biofilme de COL I.

3.11. Análise Estatística

Os dados serão analisados pelos testes estatísticos One way ANOVA e Two way ANOVA com pós-testes Bonferroni e Tukey em Graphpad prism v7.0 para observar a significância dos resultados utilizando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Produção de óxido nítrico foi menor em macrófagos ativados M1 cultivados em 2,5 D e infectados com *Toxoplasma gondii*

Claramente o cultivo em COL I faz com que os macrófagos ativados M1 produzam menos NO do que os cultivados em SR (Figura 4). Ao comparar as células não infectadas e infectadas com *T. gondii* foi detectado que quando cultivadas em SR ocorria inibição da produção de NO (Figura 4). No entanto, quando os macrófagos foram cultivados em COL I a infecção não resultou em redução da produção de NO (Figura 4).

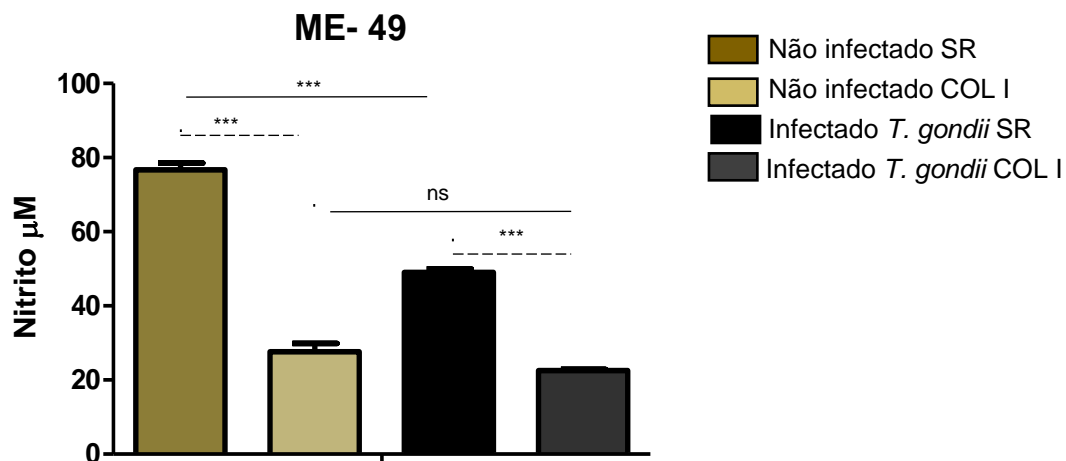


Figura 4 - Produção de nitrito (μM) de macrófagos ativados M1 por 24 horas cultivados em substrato rígido (SR – 2D) ou biofilme de colágeno I (COL I - 2,5D) não infectados ou infectados com *T. gondii* cepa ME- 49 após 24 horas. Média e desvio padrão ($n = 3$ experimentos, cada com 3 replicata). *** $P < 0.05$ one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. ns – não significativo.

4.2. Microscopia óptica de campo claro

As imagens de microscopia óptica de campo claro mostraram que macrófagos cultivados em SR infectados por 24 horas apresentaram taquizoítos sem se multiplicar no seu interior (Figura 5 A). Quando os macrófagos foram cultivados em COL I,

infectados por 24 horas e liberados com a colagenase, foi possível observar um pouco mais de taquizoítos nos macrófagos, geralmente mostrando pelo menos um processo de divisão (Figura 5 B). No entanto, não foi verificado em nenhum dos macrófagos cultivados nas duas situações a presença de taquizoítos formando grandes rosáceas.

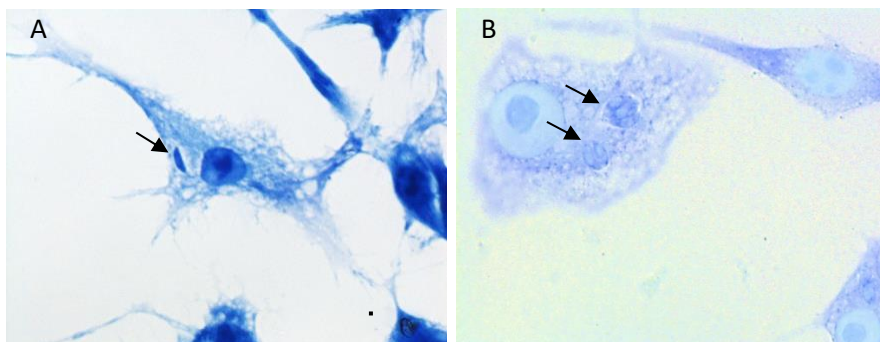


Figura 5 - Microscopia óptica de campo claro de macrófagos ativados M1 por 24 horas e infectados por *T. gondii* cepa ME-49 por 24 horas corados com Giemsa. (A) Macrófagos ativados M1 infectados sob lamínula de vidro, taquizoíto podem ser visualizados (seta). (B) Macrófagos ativados M1 infectados cultivados em biofilme de COL I, taquizoítos podem ser visualizados (setas). Barra=10 μ m

4.3. Quantificação de taquizoítos por macrófagos e por vacúolo parasitóforo ativados M1 cultivados em SR e COL I

Após 4 horas de infecção, macrófagos cultivados em SR ou COL I apresentaram valores similares de taquizoítos por macrófagos (Figura 6). Após 24 horas de cultivo, macrófagos cultivados em SR não apresentaram crescimento de taquizoítos por macrófagos, mas os macrófagos cultivados em COL I apresentaram crescimento de taquizoítos (Figura 6).

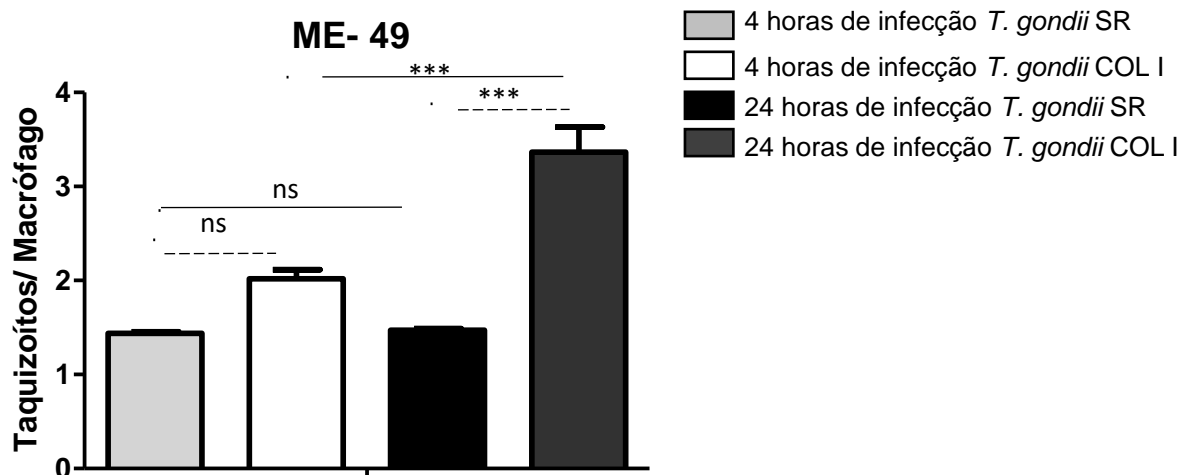


Figura 6 - Número médio de taquizoítos por macrófagos ativados M1 cultivados em substrato rígido (SR – 2D) ou biofilme de colágeno I (COL I - 2,5D) infectados com *T. gondii* cepa ME-49 por 4 e 24 horas. Média e desvio padrão (n = 3 experimentos, cada com 3 replicata). ***P < 0.05 one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. ns - não significativo.

O possível crescimento de taquizoítos nos macrófagos cultivados nos distintos substratos foram confirmados com a contagem de taquizoítos por VP. Foi possível mostrar que o número de taquizoítos por VP ficou constantes após 24 horas de cultivo quando os macrófagos foram cultivados no SR. No entanto, quando os macrófagos foram cultivados em COL I e infectados por 24 horas houve aumento de taquizoítos no VP (Figura 7).

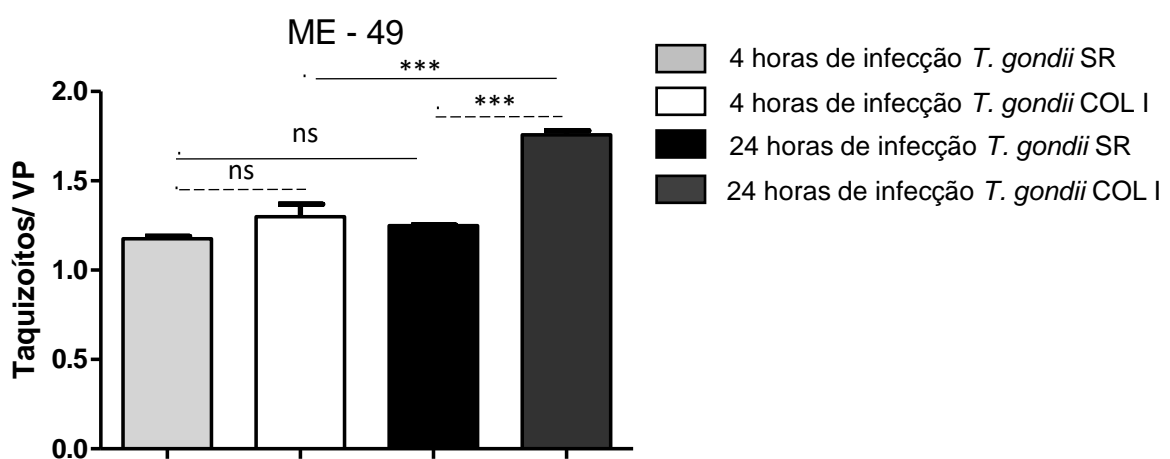


Figura 7 - Número médio de taquizoítos por vacúolo parasitóforo (VP) em macrófagos ativados M1 cultivados em substrato rígido (SR – 2D) e biofilme de colágeno I (2,5D)

infectados com *T. gondii* cepa ME 49 por 4 e 24 horas. Média e desvio padrão (n = 3 experimentos, cada com 3 replicata). ***P < 0.05 one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. ns – não significativo.

4.4. Deslocamento de macrófagos não ativados cultivados em biofilme de COL I

Usamos macrófagos raw 264.7 não ativados e não infectados que foram marcados com a lectina WGA e visualizados por microscopia confocal (Figura 8B). Nos primeiros 10 minutos macrófagos percorrem 25 μm do biofilme de COL I. Entre 10 e 30 minutos os macrófagos se deslocaram 128,0 μm . De 30 a 50 minutos o deslocamento dos macrófagos foi de 51,8 μm e os macrófagos pararam na lamínula (Figura 8C).

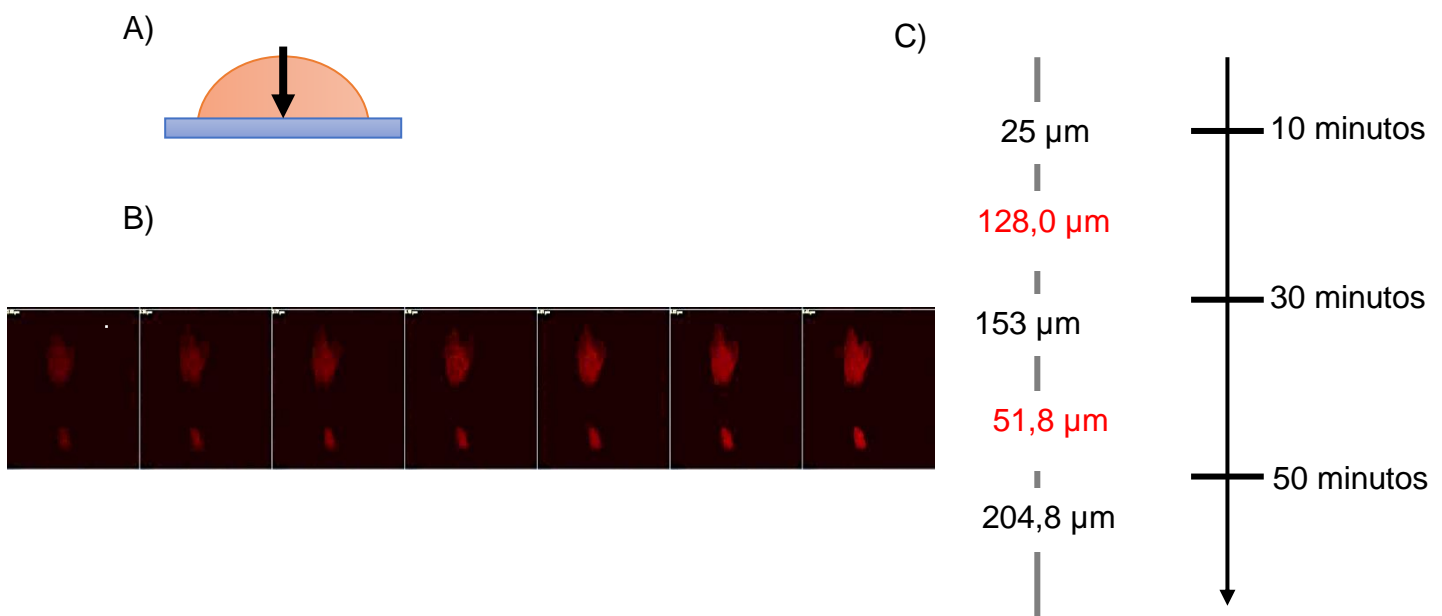


Figura 8 - Análise de deslocamento de macrófagos não ativados e não infectados semeados sobre COL I por microscopia confocal. A) Esquema representativo do deslocamento de macrófagos no biofilme de COL I (magenta) sobre SR (azul). B) Macrófagos marcados com WGA – TRITC, cada quadro representa um corte óptico de 0,45 μm de uma mesma camada no biofilme de COL I. C) A seta preta representa uma escala temporal de 10 a 50 minutos do cultivo dos macrófagos; barra cinza indica a distância de deslocamento de macrófagos (valores em vermelho são as diferenças). Barra – 40 μm .

5. DISCUSSÃO

A utilização de modelos 2,5D para cultura celular é necessária, pois pode refletir, de forma mais fiel os acontecimentos celulares no organismo. Para melhor compreensão da ativação de macrófagos e sua infecção por *T. gondii* utilizamos a cultura 2,5D paralelamente a 2D. Cultivamos uma linhagem de macrófagos Raw 264.7 por 24 horas nos diferentes substratos e induzimos ativação no perfil M1. Essas células foram infectadas com taquizoítos e cultivadas por mais 24 horas. Avaliamos produção de NO, quantificamos os taquizoítos nessas células e a posição dos macrófagos no substrato de COL I. Foi observado que o cultivo de macrófagos em COL I resultou menor produção de NO. A infecção dos macrófagos reduziu a produção de NO quando cultivados em SR, mas não em COL I. Observamos que os taquizoítos cresceram mais em macrófagos cultivados em COL I. Por fim, vimos que os macrófagos cultivados sobre COL I decantavam no decorrer do tempo se alojando sobre a lamínula.

O cultivo em COL I resultou em macrófagos que produziram menos NO. Esse dado corrobora os dados anteriores do grupo utilizando macrófagos peritoneais de camundongo (Campos, 2016) e com a mesma linhagem de macrófagos desse trabalho (Ribeiro, 2019). Portanto, está bem estabelecido no nosso grupo que o cultivo de macrófagos em COL I no sistema 2,5D gera células que produzem menos NO. Curiosamente, Philippeaux *et al.* (2009) demonstram um resultado contrário com macrófagos cultivados em COL I produzindo NO um pouco mais que os cultivados em SR. Porém, os autores utilizaram macrófagos peritoneais de camundongo da linhagem C57/BL6. Contudo ao se comparar a produção de NO dos macrófagos ativados com IFN- γ ou LPS, de forma separada, percebe-se que está abaixo de 1 nMol o que é demasiado baixo para ser detectado pelo reagente de Griess Ademais, a figura 11 A e B desse trabalho não deixa claro uma comparação estatística entre a produção de NO de macrófagos cultivados nos distintos substratos e indica média de 3nMol de produção de NO nos macrófagos cultivados com COL I e de 2,5 Mol de produção de NO nos macrófagos cultivados em SR. Portanto, nossa interpretação é que a produção de NO nesse trabalho (Philippeaux *et al.* 2009) é similar entre os macrófagos cultivados nos diferentes substratos. Nossa interpretação é que no nosso sistema, o cultivo de macrófagos em COL I diminui a produção de NO sugerindo que

a ativação M1 usada aqui é reduzida, o que poderia gerar macrófagos menos microbicidas. Isso pode ser reflexo da modulação do substrato de cultivo no macrófago que ao entrar em contato com fibras colágenas pode estar sendo induzido a um perfil mais M2, como pode ser visto por McWhorter *et al.* (2015).

A infecção por cepa ME-49 reduziu a produção de NO dos macrófagos quando cultivados em SR., No entanto, a infecção não alterou a produção de NO de macrófagos cultivados em COL I. Dados do grupo mostram que independente da cepa de *T. gondii* ocorre a inibição da produção de NO nas primeiras 2 a 24 horas de infecção em macrófagos ativados cultivados em SR (Damasceno-Sá *et al.*, 2021). Portanto, esse resultado descrito nesse trabalho está em concordância com o publicado na literatura. Resultados anteriores obtidos pelo grupo com macrófagos cultivados em COL I e infectados com *T. gondii*, mas da cepa RH, apontam para uma redução da produção de NO. No entanto, essa redução de NO não foi verificada quando a infecção foi realizada com *T. gondii* da cepa ME-49. Essa discrepância pode ser explicada pela menor virulência da cepa ME-49 quando comparada com a cepa RH (Damasceno-Sá *et al.*, 2021). Novos estudos devem ser realizados para melhor entender por que macrófagos cultivados em COL I não apresentam menores níveis de produção NO quando infectados com *T. gondii* da cepa ME-49.

Observamos que os taquizoítos cresceram mais em macrófagos cultivados em COL I. Isso é um indicativo da expressão de um perfil menos microbicidas. Essa menor capacidade microbicida também foi observada por Ribeiro (2019), mas utilizando infecção de *T. gondii* com a cepa RH. Nesse caso, devido sua virulência maior, a formação rosácea de parasito no interior dos macrófagos foi observada após 24 horas de infecção quando cultivados em COL I. Já quando o cultivo é realizado em SR não havia formação dessas rosáceas. É bem possível que com a ME-49 não houve formação de rosáceas em nenhum dos substratos testados devido a menor virulência da cepa. Portanto, o uso de uma cepa menos virulenta corrobora a menor capacidade microbicida de macrófagos ativados M1 quando cultivados em COL I.

Macrófagos cultivados sobre COL I no decorrer do tempo penetraram no biofilme e se alojaram sobre a lamínula. Isso é um indicativo de que a concentração de COL I utilizada ainda não possui densidade suficiente para manter os macrófagos atrelados a esse substrato. Vasse *et al.* (2018) salienta que o COL I (fibrilar) induz um perfil menos anti-inflamatório que um colágeno globular. Contudo, isso não modifica sua

ação menos inflamatória que em SR. O contato dos macrófagos com a lamínula pode tornar os macrófagos mais ativados, mas não suficientemente para se comportar como nos cultivados em SR. Ao utilizar uma concentração maior de COL pode ser que esses macrófagos fiquem menos microbicidas ainda em relação ao sistema que usamos. Novos experimentos, mais caracterização e uso de COL I mais concentrado são necessários.

6. CONCLUSÕES

Macrófagos ativados M1 cultivados em COL I apresentam menor produção de NO que quando cultivados em SR. O mesmo ocorreu em macrófagos infectados com cepa ME-49. Ao serem observados e quantificados o número de taquizoítos por macrófago e por VP foi percebido um maior número em macrófagos cultivados em COL I, o que correlaciona com a menor produção de NO, sendo indicativo de menor microbicidade que de macrófagos cultivados em SR.]

Ao serem adicionados em COL I, macrófagos conseguem penetrar no substrato e percorre-lo. Porém, com o passar do tempo ocorre a diminuição do espaço alcançado por esses macrófagos, indicando menor velocidade de sedimentação. Isso sugere que pode ocorrer interação mecânica ou por sinalização do macrófago com o substrato alterando sua decantação no COL I.

O estudo da interação macrófago/parasito em substrato 2,5D confirma dados do grupo e ao mesmo tempo demonstra novas variáveis até então não testadas. Assim, é necessária a continuidade de análise dessa interação e caracterização mais minuciosa desse contato da célula não infectada e infectada com o COL I através de diferentes microscopias e análises metabólicas.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, L. B., *et al.* (1990). Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J. Immunol.* 144(7), 2725-2729.
- Adnet, L., *et al.* (2013). A Simple and Efficient Method to Observe Internal Structures of Helminths by Scanning Electron Microscopy. *Microscopy and Microanalysis*. Pages 5.
- Baneth, G., *et al.* (2015). Major Parasitic Zoonoses Associated with Dogs and Cats in Europe. *ScienceDirect* 155: S54-S74.
- Behonick, D.J & Werb, Z. (2003) A bit of give and take: the relationship between the extracellular matrix and the developing chondrocyte. *Mech Dev* 120:1327-1336.
- Bohne, W., *et al.* (1994). Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect. Immun.* 62, 1761-1767.
- Campos, V, S., (2016). Comportamento de macrófagos em construtos de colágeno I sob diferentes configurações: determinação de marcador inflamatório. Orientador: Fernando Costa e Silva Filho. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Bacharelado, defesa em 28 de janeiro.
- Carey, S, P., *et al.* (2017) Three-dimensional collagen matriz induces a mechanosensitive invasive epithelial phenotype. *Sci. Reports*.
- Cline, M.J. (1978) Monocytes, macrophages, and their disease in men. *J Invest Dermatol* 41:56-58.
- Craig, V. J., *et al.* (2015) Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* Vol 53, Iss 5, pp 585–600.
- Damasceno-Sá, J. C., *et al.* (2021). Inhibition of nitric oxide production of activated mice peritoneal macrophages is independent of the *Toxoplasma gondii* strain. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 116, e200417. doi: 10.1590/0074-02760200417
- DaMatta, R. A., *et al.* (2000). Nitric oxide is not involved in the killing of *Trypanosoma cruzi* by chicken macrophages. *Parasitol. Res.* 86(3), 239-243. doi: 10.1007/s004360050037.

- Danielson, J.J., *et al.* (2018). Modelling *Toxoplasma gondii* infection in a 3D cell culture system In Vitro: Comparison with infection in 2D cell monolayers. PLoS ONE 13: e0208558.
- Dhimolea., & Maffini., (2010). The role of collagen reorganization on mammary epithelial morphogenesis in a 3D culture model. Biomaterials journal. (13):3622-30.
- Dubey JP., Jones JL., (2008). *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. Int J Parasitol. 38:1257-1278.
- Dubey, JP., (1991). Toxoplasmosis - an overview. Southeast Asian J Trop Med Public Health. Suppl:88-92.
- Dubey, J, P., *et al.* (2012). Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. Parasitology (2012), 139, 1375–1424.
- Flegr J., *et al.* (2014) Toxoplasmosis – A Global Threat. Correlation of Latent Toxoplasmosis with Specific Disease Burden in a Set of 88 Countries. PLoS ONE 9(3): e 90203.
- Furtado, J, M., *et al.* (2011). Toxoplasmosis: A Global Threat. J Glob Infect Dis. 3(3): 281–284.
- Giorgio, S., (2013). Macrophages: plastic solutions to environmental heterogeneity. Inflamm Res 62:835-843.
- Guillermo & DaMatta (2004) Nitric Oxide Inhibition After *Toxoplasma gondii* Infection of Chicken Macrophage Cell Lines. Poultry Science 83:776–782.
- Ge, Y., *et al.* (2014). Natural killer cell intrinsic toll-like receptor MyD88 signaling contributes to IL-12-dependent IFN- γ production by mice during infection with *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 44:475-484.
- Gordon & Plüddemann (2017). Tissues macrophages: heterogeneity and functions. BMC. Biology. (2017) 15:53.
- Gruber, E., *et al.* (2018). Toll-like receptor signaling in macrophages is regulated by extracellular substrate stiffness and Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK1/2). Inter. Immunol. Vol 30. No. 6, pp. 267-278.
- Habermehl, J., *et al.* (2005). Preparation of ready-to-use, stockable and reconstituted collagen. Macromol Biosci 5:821-828.

- Haw, R, T, Y., *et al.* (2014). A three-dimensional collagen construct to model lipopolysaccharide-induced activation of BV2 microglia. *J Neuroinflammation* 11:134-144.
- Jablonski, K, A., *et al.* (2015). Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages. *PLoS ONE* 10:e0145342.
- Kupai, K. *et al.* Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *Journal of Pharmacological and toxicological methods*, v.61, n.2, p.205-209, 2010.
- Langhans, S, A., (2018). Three-Dimensional in vitro cell culture models in drug Discovery and drug repositioning. *Frontiers in Pharm.* 2018 00006.
- Lukeshev, M.E & Werb, Z. (1998). ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehavior. *Trends Cell Biol* 8:437-441.
- MacMicking, J., *et al.* (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 323-350. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.323.
- Madsen, D, H., *et al.* (2013). M2-like macrophages are responsible for collagen degradation through a mannose receptor-mediated pathway. *J. Cell. Biomol.* 951-966.
- McWhorter, F, Y., *et al.* (2015). Physical and mechanical regulation of macrophage phenotype and function. *Cell. Mol. Life. Sci.* 72:1303 – 1316.
- McWhorter, F, Y., *et al.* (2016). Macrophage secretion heterogeneity in engineered microenvironments revealed using a microwell platform. *Inte. Biol.*
- Miranda, F, J, B., *et al.* (2016). Development of ostrich thrombocytes and monocyte-derived macrophages in culture and the control of *Toxoplasma gondii* reproduction after macrophage activation. *Poultry Science.* 95(1), 12–18.
- Mills, C.D & Ley, K. (2014) M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity. *J Innate Immun* 6:716-726.
- Mosser, D.M & Edwards, J.P. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8:958-969.
- Mosser, D.M & Zhang, X. (2008) Activation of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol* 14:1-9.
- Nagelkerke, A., (2015). The mechanical microenvironment in cancer: how physics affects tumours. *Semin Cancer Biol* 35:62-70.

- Padrão, J., *et al.* (2014). Toxoplasma gondii infection of activated J774-A1 macrophages causes inducible nitric oxide synthase degradation by the proteasome pathway. *Parasitology International* 63 (2014) 659–663.
- Pebworth, M, P., *et al.* (2014). A novel 2.5D culture platform to investigate the role of stiffness gradients on adhesion-independent cell migration. *PLOS one*. 9 (10): e110453.
- Pifer & Yarovinsky (2011). Innate responses to Toxoplasma gondii in mice and humans. *Trends Parasitol* 27:388-393.
- Pittayapruek, P., *et al.* (2016) Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci* 17, 868.
- Philippeaux, M., *et al.* (2009). Culture and functional studies of mouse macrophages on native-like fibrillar type I collagen. *Eur J Cell Biol* 88:243-256.
- Rajan, N., *et al.* (2006) Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. *Nat Protoc* (6):2753-2758.
- Ravi, M., *et al.* (2014). 3D cell culture systems: advantages and applications. *J. Cell. Physiol.* 230, 16–26.
- Ryan, J.A. (2008). Evolution of cell culture surfaces. *BioFiles* 3.
- Santos, T,A., (2011). Phosphatidylserine exposure by Toxoplasma gondii is fundamental to balance the immune response granting survival of the parasite and of the host *Plos one* 6:e27867 .
- Seabra, S,H., *et al.* (2002). Toxoplasma gondii partially inhibits nitric oxide production of activated murine macrophages. *Exp Parasitol* 100: 62-70.
- Seabra, S,H., *et al.* (2004). Toxoplasma gondii exposes phosphatidylserine inducing a TGF- β 1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 744-752.
- Sibley, L, D., (2003). Toxoplasma gondii: perfecting an intracellular life style. *Traffic* 4(9): 581-586.
- Siewek, M.H & Allen, J.E. (2013) Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science* 342:1242974.
- Smith, C, N., *et al.* (2020). Control of humans Toxoplasmosis. *Int. Jour. of Parasitology.* 0020-7519.

- Sridharan, R., *et al.* (2019). Material stiffness influences the polarization state, function and migration mode of macrophages. *Acta Biomater.* 89 (2019) 47-59.
- Ribeiro, T, C, G., (2019). Macrófagos cultivados em poliestireno e biofilme de colágeno: Modulação da ativação clássica e crescimento de *Toxoplasma gondii*. Defesa 26 de Novembro.
- Taylor, M, W., (2014). A history of cell culture. In: *Viruses and man: a history of interactions*. Springer International Publishing. pp.41-44.
- Techatanawat, S., *et al.* (2011). Type I collagen extracted from rat-tail and bovine Achilles tendon for dental application: a comparative study. *Asian Biomedicine* Vol. 5. 787-798.
- Vasse, G, F., *et al.* (2018). Collagen morphology influences macrophage shape and marker expression in vitro. *Jour. of Immunol. Reg. Med.* 2468-4988.
- Vasse, G, F., *et al.* (2018). Collagen morphology influences macrophage shape and marker expression in vitro. *Journal of Immunology and Regenerative Medicine.* 2468-4988.
- Zhao, Y, L., *et al.* (2018). "Phorbol ester (PMA)-treated U937 cells cultured on type I collagen-coated dish express a lower production of pro-inflammatory cytokines through lowered ROS levels in parallel with cell aggregate formation." *International Immunopharmacology* 55: 158-16.

