

CULTIVO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS MESANGIAIS GLOMERULARES DE CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *Leishmania (L.) Chagasi*

Aline Maria Dourado Rodrigues (bolsista do PIBIC/CNPQ), Aline Pereira Martins (colaboradora, UFPI), Joice Rayane de Alencar Oliveira (colaboradora, UFPI), Maria das Graças Prianti (Co-orientadora, Pesquisadora DCR/CNPQ - UFPI/CCA/DCCV), Francisco Assis Lima Costa (Orientador, UFPI/CCA/DCCV)

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi* no Brasil; é fatal se não tratada e manifesta-se por febre, hepatoesplenomegalia, anemia, hipergamaglobulinemia e leucopenia. Vários órgãos são afetados, principalmente aqueles ricos em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) como o linfonodo, baço, fígado e a medula óssea (DUARTE, 2000). As alterações renais se caracterizam por nefrite intersticial e glomerulonefrites, onde são observados vários padrões proliferativos de lesão gomerular, devido a um aumento do número de células intrínsecas do glomérulo, envolvendo, especialmente, células mesangiais e endoteliais, ou devido à infiltração glomerular de células inflamatórias extrínsecas (TISHER, 1994). Este trabalho tem como objetivo geral cultivar, isolar e caracterizar células mesangiais de camundongos infectados experimentalmente por *Leishmania (L.) chagasi*, para a realização de experimentos futuros de ensaios “in vitro” da expressão de mediadores (moléculas de adesão, citocinas) que participam da patogenia da nefropatia da leishmaniose visceral.

METODOLOGIA

Para a cultura de células em cada experimento foram eutanasiados oito camundongos isogênicos BALB/c machos de aproximadamente 45 dias. Em seguida foi feito deslocamento cervical nos animais por ação mecânica manual, submetidos à tricotomia e nefrectomia bilateral. O cultivo de células mesangiais foi realizado como descrito previamente (Rops, et al., 2004). A suspensão de células foi cultivada em meio RPMI suplementado com Soro Fetal Bovino (Cultilab, Brasil) a 20% e Penicilina-Estreptomicina a 1%. As células em suspensão em meio RPMI completo foram distribuídas no volume de 5 mL em frascos de poliestireno de 25 cm², foram mantidas em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Ao atingir confluência máxima, as células foram tripsinizadas com 1 mL de solução de Tripsina (Sigma) - Tripsina 0,25%, EDTA 0,2%, preparadas em solução de NaCl 0,9% (Current Protocols in Cell Biology, 1998). A nova suspensão de células foi distribuída em volume de 5 mL/frasco.

Na quantificação relativa da expressão de mRNA de citocinas camundongos isogênicos BALB/c foram infectados com amastigotas purificadas de *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/72/strain 46). Foram sacrificados aos 7 e 15 dias pós-infecção, o rim foi removido para purificação de RNA total e macerado em TRIZOL (Invitrogen, EUA) e depois submetido à transcriptase reversa (RT) para a obtenção do cDNA. Realizamos Real Time-PCR com quatro mixes: um mix foi feito primers para TGF-β, TNF-α e Il-1 e em outro mix com primers para B-actina que serviu como controle endógeno da PCR. A reação foi processada no aparelho StepOne Plus (Applied Biosystems, Estados Unidos).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo de cultivo de células foi realizado objetivando a obtenção de uma cultura primária de células glomerulares. Nesta fase as células mesangiais não podem ser distinguidas das demais células do glomérulo (figura 1). De acordo Brennan et al. (1990) após várias passagens em meios de cultura, as células se tornam homogêneas e parecem ter morfologia típica de células mesangiais.

Após 48 horas as células foram observadas ao microscópio e o meio de cultura foi trocado. As células apresentavam-se aderidas e subconfluentes. Este procedimento foi repetido até o sétimo dia da cultura.

Após sete dias as garrafas foram observadas ao microscópio e as células apresentavam-se totalmente confluentes (figura 2) e com características morfológicas poligonais, o que está de acordo com Pinto (1998) que argumenta que as primeiras células de uma cultura apresentam morfologia poligonal com citoplasma claro e núcleo proeminente, predominando desta forma até o final da primeira semana.

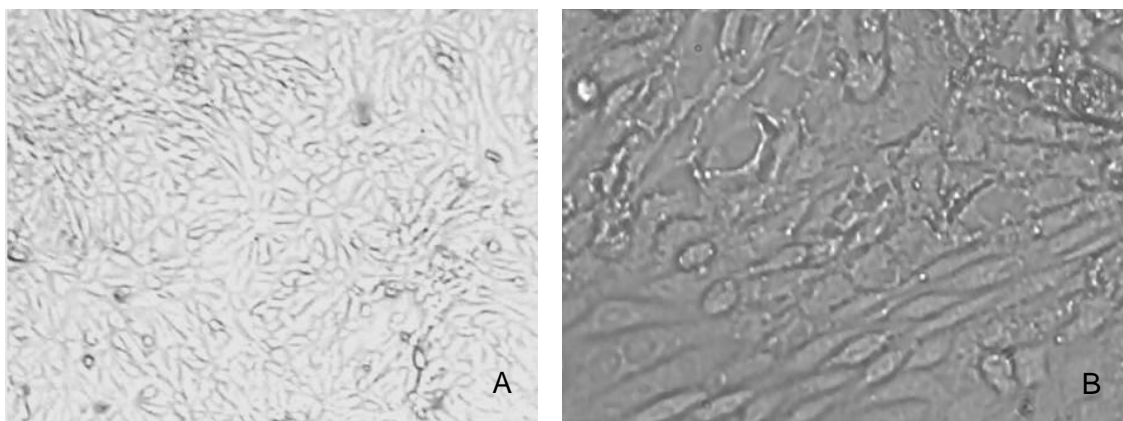
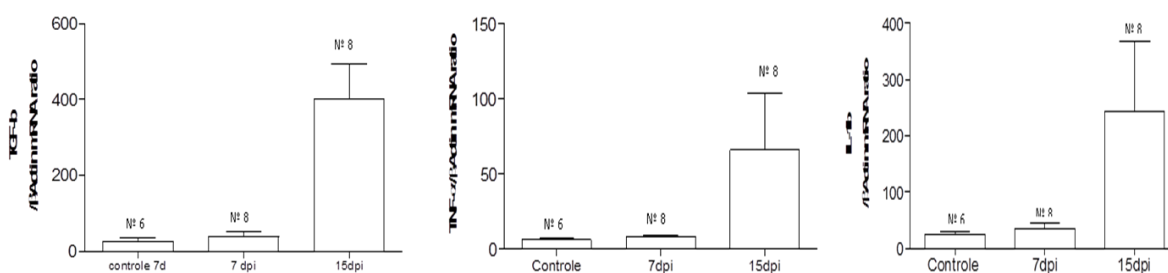


Figura 2: Confluência total com morfologia característica de células mesangiais isoladas de glomérulos de camundongo após sete dias de cultivo (A: 10X, B: 40X).

As células do 1º subcultivo, após sete dias de cultivo, apresentaram um crescimento satisfatório consequentemente foram tripsinizadas e centrifugadas, sendo que a suspensão de células foi expandida em duas outras garrafas, perfazendo o 2º subcultivo.

A expressão de mRNA das citocinas TGF- β , TNF- α e IL-1 β foi significamente maior no grupo de 15 dias pós-infecção comparado aos grupos controle e de 7 dias.



Figuras 1, 2 e 3: Razão da expressão de mRNA entre TGF- β , TNF- α e IL-1 e β -actina em animais controles (Controle), aos 7 dias (7DPI) e 15 dias (15DPI) pós-infecção com *L. (L.) chagasi*.

A maior expressão de TGF- β nos animais com 15 dias pós-infecção sugere que a presença de antígeno de leishmânia estimule a produção de TGF- β , que por sua vez participa do processo de proliferação de células intrínsecas ou da migração de células extrínsecas pelo estímulo da produção de fatores quimiotáticos.

Assim como o TNF- α , a IL-1 também é considerada um potente mediador na patogênese da infecção. O TNF- α é capaz de induzir a síntese e liberação de IL-1 a partir de monócitos e células endoteliais, como demonstrado por Dinarello et al (1986). O que sugere que IL-1, também, seja importante na modulação da glomerulonefrite na leishmaniose visceral experimental em camundongo.

CONCLUSÃO

As células mesangiais podem ser cultivadas e, posteriormente, utilizadas em experimentos que possibilitem o entendimento de mecanismos imunológicos envolvidos nas lesões glomerulares na LV. Todas as citocinas pesquisadas apresentaram considerável aumento na expressão de mRNA nos animais de 15 dias pós infecção, o que demonstra que de acordo com o tempo de infecção as citocinas atuam na patogenia da doença. A expressão do mRNA da citocina TNF- α foi maior nos animais com 15 dias pós infecção, assim como observado para a citocina IL-1, e está de acordo com literatura, uma vez que estas citocinas atuam sinergicamente.

APOIO

Agradecemos o apoio financeiro do PIBIC/CNPQ pela concessão de Bolsa de Iniciação Científica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRENNAN, D. C. et al. Mesangial cell accessory functions: Mediation by intercellular adhesion molecule-1. **Kidney International**, Vol. 38, PP. 1039-1046. 1990.

DINARELLO, C. A. et al. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin-1. **J. Exp. Med.**, v. 163, p.1433-50, 1986.

DUARTE, M. Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. Leishmaniose visceral (Calazar). In: Brasileiro Filho G (Editor) (Ed.). **Bogliolo Patologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000. Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. Leishmaniose visceral (Calazar). , p. 1215-1227.

PINTO, L. M. O. Células mesangiais e matriz mesangial: sua interação mediando o processo de cronificação da lesão glomerular. **J. Bras. Nefrol.** 1998; 20 (2), p. 178-185.

ROPS, et al. Isolation and characterization of conditionally immortalized mouse glomerular endothelial cell lines. **Kidney Int**, v.66, n.6, Dec, p.2193-201. 2004.

TISHER, C. C. B., BRENNER. **Renal Pathology with clinical and funcional correlations**. In: (Ed.): Philadelphia, Lippincott. , 1994.

Palavras-chave: Células Mesangiais. Cultura. Glomerulonefrite.