

## ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS GLOMERULARES DE CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *LEISHMANIA (L.) CHAGASI*

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

### INTRODUÇÃO

A leishmaniose Visceral (LV) é causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi* no Brasil. Vários órgãos são afetados, principalmente aqueles ricos em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) como o linfonodo, baço, fígado e a medula óssea, porém os rins são frequentemente sofrem alterações (DUARTE, 2000). As alterações renais se caracterizam por nefrite intersticial e glomerulonefrites, onde são observados vários padrões, havendo predomínio de padrões proliferativos, devido a um aumento do número de células intrínsecas do glomérulo, envolvendo células endoteliais, devido à infiltração glomerular de células inflamatórias extrínsecas (TISHER, 1994). Este trabalho tem como objetivo geral cultivar e caracterizar células endoteliais de camundongos infectados experimentalmente por *Leishmania (L.) chagasi*, para a realização de experimentos “*in vitro*” da expressão de mediadores (moléculas de adesão e citocinas) que participam da patogenia da nefropatia da leishmaniose visceral.

### METODOLOGIA

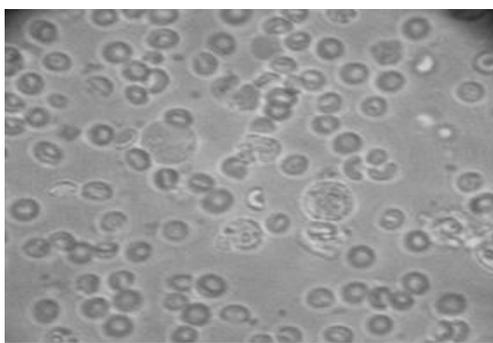
Para a cultura de células em cada experimento foram eutanasiados oito camundongos isogênicos BALB/c machos de aproximadamente 45 dias. Em seguida foi feito deslocamento cervical nos animais por ação mecânica manual, submetidos à tricotomia e nefrectomia bilateral. O cultivo de células mesangiais foi 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 cm<sup>2</sup>, foram mantidas em incubadora com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> 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

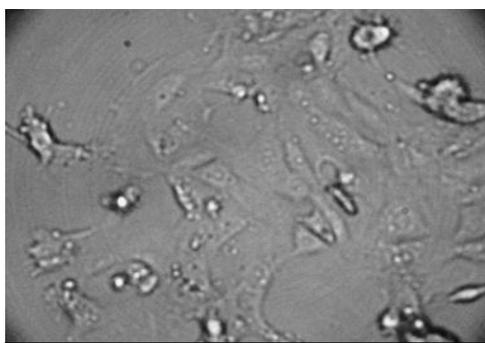
IFN- $\gamma$  e em outro mix com primers para B-actina que serviu como controle endógeno da PCR. A reação foi processada no aparelho StepOne Plus (Applied Biosystems, Estados Unidos).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo de cultivo de células foi realizado para a obtenção de cultura primária de células glomerulares. Nessa etapa ainda não tem como distinguir células endoteliais de demais células glomerulares (Figura 1). Após várias passagens em meios de cultura, as células se tornam homogêneas e é possível observar morfologia típica de células endoteliais. Quarenta e oito horas depois as células renais proliferaram, raras células apresentaram características arredondadas e algumas células com prolongamentos citoplasmáticos que se estendem para células adjacentes, e já apresentavam subconfluência (Figura 2).

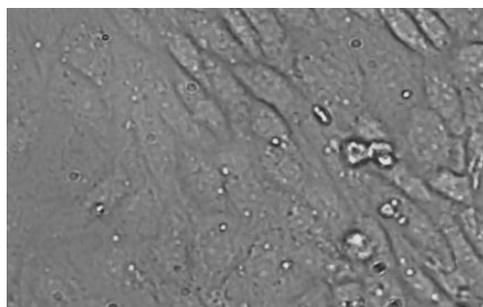


**Figura 1.** Células primárias isoladas de rins de camundongo BALB/c, no momento inicial da cultura. (20X).

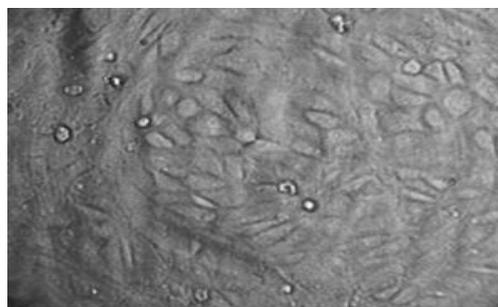


**Figura 2.** Células primárias isoladas de rins de camundongo apresentando prolongamentos citoplasmáticos, e raras células com características arredondadas. Células com 48h da cultura. (20X).

Após 72 e 96 horas as células apresentaram população homogênea e subconfluência maior, predominando características poligonais (Figura 3). Após 8 dias de cultivo as células apresentaram confluência total e predominância de células com características poligonais (Figura 4). Após esse mesmo período a morfologia das células cultivadas tinha características de células endoteliais



**Figura 3.** Células primárias isoladas de rins de camundongo com características poligonais e subconfluentes. Células com 96h da cultura (40X)



**Figura 4.** Células primárias isoladas de rins de camundongo com características poligonais e confluentes. Células com 8 dias de cultivo. (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.

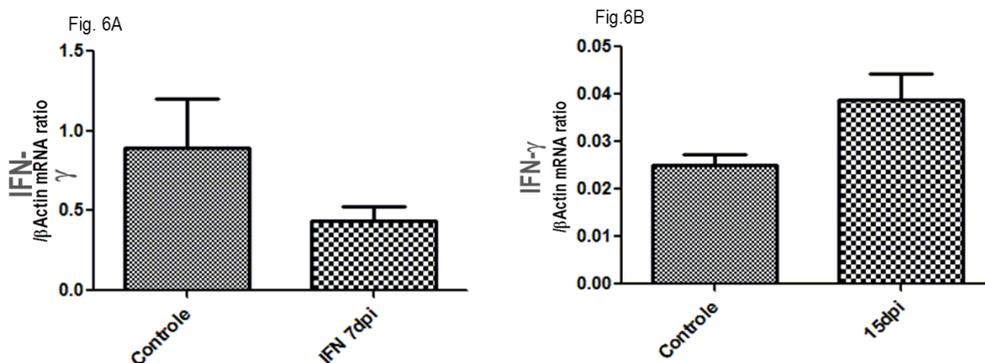


Figura 6 A. e 6 B - Razão da expressão de mRNA entre IFN- $\gamma$  e  $\beta$ -actina em animais controles (Controle), aos 7 dias e 15 dias pós-infecção com *L. (L.) chagasi*.

A expressão de mRNA de IFN- $\gamma$  foi significativamente menor no grupo infectado comparado ao grupo controle aos 7 dias pós-infecção (Fig. 6A), e foi significativamente maior no grupo infectado aos 15 dias pós-infecção comparado aos grupos controle (Fig. 6B).

## CONCLUSÃO

O cultivo de células endoteliais permitirá realização de experimentos para aprofundar o entendimento de mecanismos envolvidos na imunopatogenia das lesões glomerulares na LV. A expressão variável de mRNA de IFN- $\gamma$  nos diferentes períodos de infecção sugere que sua participação seja tempo dependente.

## APOIO

Agradecemos o apoio financeiro do PIBIC/CNPQ pela concessão de Bolsa de Iniciação Científica. FAPEPI /CNPq – Bolsa Desenvolvimento Científico Regional (DCR)

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Atkins, R. Inflammatory cytokines in glomerulonephritis. *NEPHROLOGY* v. 7, S2-S6. 2002;
- 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.
- Costa, F. A. L., M. G. Prianti, *et al.* T cells, adhesion molecules and modulation of apoptosis in the pathogenesis of glomerulonephritis in visceral leishmaniasis. *BMC Infectious Diseases (Online)*. 2010.
- 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 endoteliais. Cultura. Glomerulonefrite.