



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Coordenadoria Geral de Pesquisa
Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica PIBIC
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bloco 06 – Bairro Ininga
Cep: 64049-550 – Teresina-PI – Brasil – Fone (86)3235-5564 – Fone/Fax (86)3235-5560

DETECÇÃO DE CITOCINA POR PCR EM TEMPO REAL NO TECIDO RENAL DE CAMUNDONGO INFECTADO COM *LEISHMANIA (L) CHAGASI*

Elaine Gonçalves de Oliveira (Bolsista ICV/UFPI), Francisco Assis Lima Costa (Colaborador, CCV-UFPI), Aline Pereira Martins (Colaborador, UFPI), Maria da Graças Prianti (Orientador, CCV/UFPI)

Introdução

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica grave que atinge homens e animais. No Brasil o agente etiológico é a *L. chagasi* (LAINSON R, SHAW JJ, 1987). A LV é transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Lutzomia longipalpes* (flebotomíneo). É um parasito intracelular obrigatório que atinge órgãos do sistema fagocítico mononuclear (SFM) como linfonodos, baço, fígado e medula óssea (DUARTE, 2000). Nos rins, apesar de ser rara a presença de parasito, as alterações se caracterizam por nefrite intersticial e glomerulonefrites (GN), observando-se padrões proliferativos, ocasionada por aumento de células intrínsecas do glomérulo, envolvendo, principalmente, as células mesangiais e endoteliais, ou por infiltrado glomerular de células inflamatórias extrínsecas (TISHER & BRENNER, 1994).

Existem evidências de que citocinas como IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-10 etc., podem estar envolvidas na patogenia da GN (MAIN et al., 1992). Em trabalhos anteriores do nosso grupo foi constatada a presença de hiper celularidade e de citocinas em glomérulos com LV (COSTA et al, 2010), o que nos incentivou a estudar mais profundamente esse achado para que, assim, possamos contribuir para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da glomerulonefrite na LV.

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar participação de citocinas (IL-1 β , IL-4 e INF- γ) nas lesões renais em camundongos BALB/c infectados com amastigotas de *L. chagasi*.

Metodologia

Camundongos isogênicos machos da linhagem BALB/c e hamsteres foram inoculados intraperitonealmente com 2×10^7 amastigotas de *L. (L.) chagasi* purificadas, em 100 μ L e 1000 μ L respectivamente, meio RPMI 1640. Os animais do grupo controle foram inoculados com meio RPMI 1640 concomitantemente. A cepa *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/BR/72/cepa 46) foi

mantida em hamsteres.

Após 7, 15 e 30 dias de infecção, os grupos de camundongos foram anestesiados com Cloridrato de ketamina na dosagem de 40mg/Kg de peso vivo e xilazina na dosagem de 10mg/Kg de peso vivo, por via intraperitoneal, em seguida foi feito deslocamento cervical por ação mecânica manual, para coleta do rim. O rim direito foi removido assepticamente e preservados para realização de técnica de biologia molecular e o rim esquerdo para análise por Imunoistoquímica.

A quantificação da expressão de mRNA em tecido renal de IL-4 e INF- γ foi realizada por meio da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. Por sua vez a expressão de IL- β foi verificada pela reação de imunoistoquímica utilizando-se a técnica de imunoperoxidase. Para a análise estatística foram realizados testes paramétricos ou não paramétricos de acordo com a natureza dos dados, utilizando programas estatísticos do GraphPad Prisma V.3 statistical software (Califórnia, Estados Unidos). Foram consideradas diferenças significantes quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Os experimentos demonstraram que a expressão de mRNA da citocina IL-4 foi maior significativamente em relação à β -actina no grupo de camundongos com 7 dias pós infecção em relação aos animais do grupo controle e com 15 dias pós infecção (Fig.1). Esses resultados demonstram que na fase inicial da doença, há predomínio de inibição da resposta imune, levando ao aumento do número de células glomerulares, provavelmente por infiltração de células inflamatórias, como visto anteriormente pelo nosso grupo (PRIANTI, 2005).

Os resultados do PCR em Tempo Real para INF- γ revelam que não houve diferença da expressão de mRNA entre os grupos controle não infectado e 7 dias pós-infecção, todavia há tendência a menor expressão no grupo infectado em relação ao grupo controle (Fig.2). A inibição da expressão diminuída nos animais infectados, confirma a participação de INF- γ na resposta inflamatória aguda da GN na LV, pois há hiper celularidade dos 7 aos 30 dias pós-infecção. Talvez essa hiper celularidade seja devido a infiltração de células inflamatórias no glomérulo (PRIANTI, 2005), isso nos leva a crer que a expressão dessa citocina é importante na modulação da resposta imunológica na fase inicial da GN na LV. Em relação aos grupos de 15 dias devido a problemas com aparelho de PCR real time será concluído posteriormente.

Figura 1 – Análise da expressão de mRNA de IL-4 em rim de camundongos BALB/c controles, e aos 7 e 15 dias pós-infecção com *L. (L) chagasi*. A expressão dos genes foi quantificada usando RT-PCR em Tempo Real. Dados apresentados como razão de expressão de mRNA de IL-4 em relação à β -actina.

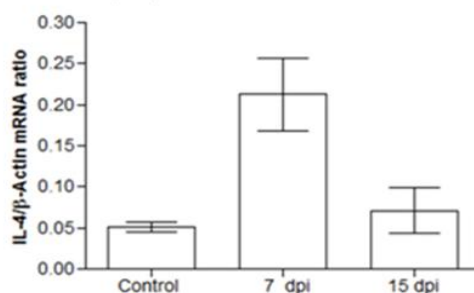
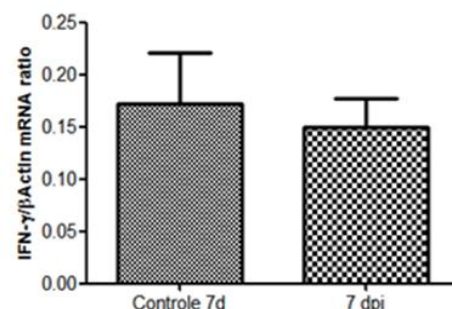


Figura 2 – Análise da expressão de mRNA de INF- γ em rim de camundongos BALB/c controles, e aos 7 e 15 dias pós-infecção com *L. (L) chagasi*. A expressão dos genes foi quantificada usando RT-PCR em Tempo Real. Dados apresentados como razão de expressão de mRNA de INF- γ em relação a β -actina.



A análise semiquantitativa dos dados da expressão de IL-1 β revela que há diferença significativa entre os animais 30 dias pós infecção e grupo de 7 dpi e grupo controle não infectados (Figs.3 e 4). Como IL-1 β é considerada um mediador na patogênese da infecção, esse resultado sugere que esta interleucina, também, tem participação importante na fase tardia da GN na LV experimental em camundongo. Esse resultado está de acordo com resultados obtidos anteriormente pelo nosso grupo. (PRIANTI, 2002). Considerando também que esta citocina participa da ativação de moléculas de adesão e também pode relacionada com proliferação celular.

Figura 3 - Análise semiquantitativa de expressão de IL-1 β em camundongos do grupo controle, 7, 15 e 30 dias pós infecção.

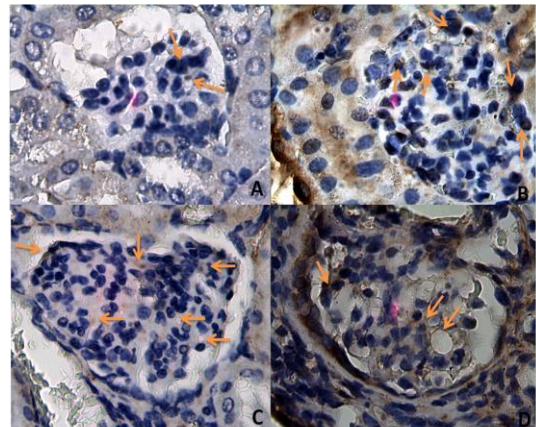
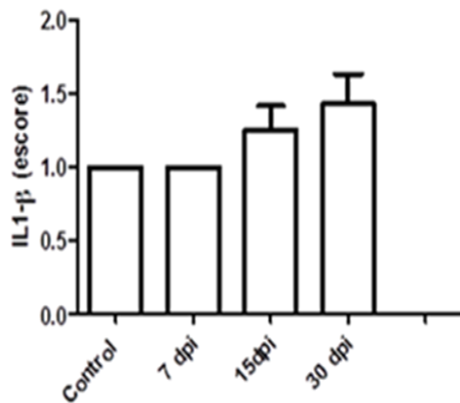


Fig. 4 - Rim de camundongo BALB/c não infectado e infectado com *Leishmania (L) chagasi*. Coloração imunoperoxidase. (A) Controle não infectado (x100). (B) Animal 7 dias pós-infecção (x100). (C) Animal 15 dias pós-infecção (x100). (D) Animal 30 dias pós-infecção (x100).

Apoio: ICV/UFPI, FAPEPI

Referências

- 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.
- DUARTE, M. *Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. Leishmaniose visceral (Calazar)*. In: Brasileiro Filho G (Editor), Bogliolo Patologia. 6th ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2000. p 1215-1227.
- LAINSON R, SHAW JJ. *Evolution, classification and geographical distribution*. In: Peters W, KillickKendrick R. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Vol. 1. London: Academic Press; 1987. p. 1-120.
- MAIN, I. W.; NIKOLIC-PATERSON, D. J.; ATKINS, R. C. *T cells and macrophages and their role in renal injury*. Seminars in Nephrology, v. 12, n. 5, p. 395-407, 1992.
- PRIANTI M.G. *Desenvolvimento e patogenia da glomerulonefrite na leishmaniose visceral em camundongo*. (Tese.). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo., Universidade de São Paulo., São Paulo, Brasil,, 2005.
- TISHER, C. C.; B, BRENNER. *Renal Pathology with clinical and funcional correlations*. Philadelphia, Lippincott. 1994.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, glomerulonefrites e citocinas.