

AULA PRÁTICA 3 - 02/06/2015

Roteiro de aula prática

Infecção de macrófagos por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Macrófagos previamente plaqueados e infectados com formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Análise de 3 possíveis comparações:

- A: Macrófagos estimulados ou não com a proteína CD100 recombinante;
- B: Macrófagos infectados com duas cepas diferentes de *L. (L.) amazonensis*: PH8 e LV79;
- C: Macrófagos infectados por 24 e 48 horas.

Procedimento experimental

1. Contagem dos macrófagos em câmara de Neubauer para o plaqueamento

Camundongos são sacrificados em câmara de CO₂ para a retirada dos macrófagos peritoneais residentes ou obtenção do fêmur para retirada das células da medula óssea e posterior diferenciação em macrófagos.

Em seguida os macrófagos obtidos são contados em câmara de Neubauer (Figura 1).

A Câmara de Neubauer tem 30 x 70 mm e 4 mm de espessura e duas áreas independentes para contagem (Figura 1).



Figura 1. Câmara de Neubauer

A grade para contagem tem 3 mm x 3 mm e 9 subdivisões (quadrados) de 1 mm. Para a contagem de macrófagos usamos os quadrados das extremidades, numerados com “1” na figura 2.

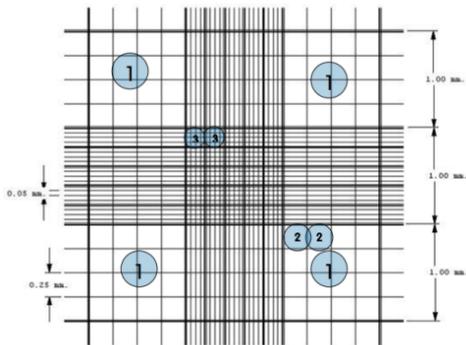


Figura 2. Grade de contagem da câmara de Neubauer

A lamínula usada tem 22 mm de largura, e é colocada sobre o centro da câmara, cobrindo a área central. 10 µL da suspensão da célula é aplicada na borda da câmara de Neubauer, em contato com a lamínula, de forma que a entrada se dê por capilaridade, sem formação de bolhas (Figura 3).

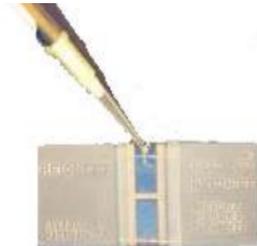


Figura 3. Aplicação das células na câmara de Neubauer

No microscópio, é localizada a área de contagem e nela os quadrados das extremidades (“1” na figura 2), contendo 16 quadrados cada. A contagem é iniciada usando um método zig-zag, como mostrado na figura 4.

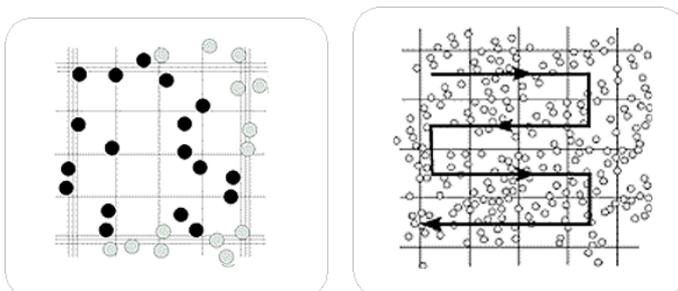


Figura 4. Método de contagem em zig-zag

Densidade de células = número contado \times 10.000 \times diluição

10.000 é a correção do volume do quadrado contado para 1mL

Para o experimento de infecção de macrófagos com *L. (L.) amazonensis* são utilizados 4 ou 8×10^5 macrófagos por poço em placas de 24 poços contendo em seu interior lamínulas circulares de vidro (figura 5) em um volume final de 0,5 mL. As células são incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37° C para aderirem até o dia seguinte.

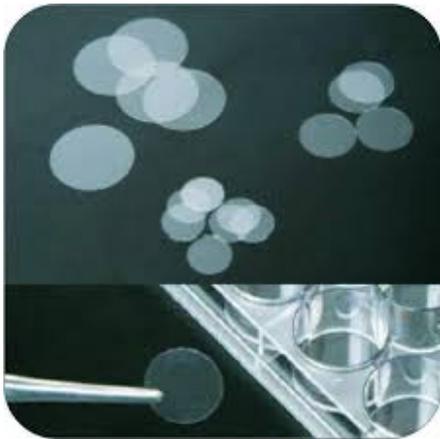


Figura 5. Posicionamento das lamínulas circulares de vidro em placa de cultivo celular de 24 poços.

2. Infecção

No dia seguinte ao plaqueamento dos macrófagos as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* são contadas também em Câmara de Neubauer. Neste segundo momento, os parasitas são contados usando os quadrados centrais, numerados com “3” na figura 2. Para este ensaio são utilizadas 5 promastigotas para cada macrófago plaqueado (proporção 5:1). O volume correspondente a quantidade de *Leishmania* desejada é coletado e centrifugado por 10 minutos a 250 xg. O sobrenadante é desprezado e os parasitas ressuspensos em meio e transferidos para os poços com macrófagos. A placa é incubada em estufa com 5% de CO₂ a 34°C por 4 horas para que ocorra a infecção dos macrófagos. Após este período o meio de cultivo é trocado para a remoção dos parasitas que não infectaram as células e estas mantidas sob as mesmas condições até o período que se pretende analisar a infecção.

3. Coloração

Após o período de incubação que se pretende analisar a infecção, o meio de cultivo das células infectadas é retirado e é adicionado metanol por 3 minutos para a fixação das mesmas. As células são então coradas com panótico, corante utilizado em análises

laboratoriais, realizado em duas etapas: primeiro é adicionado o corante rosa, que cora o citoplasma das células; ele é retirado e adicionado o segundo corante, o roxo, que cora o núcleo celular, o corante é retirado, as lamínulas são lavadas duas vezes com água destilada e deixadas a temperatura ambiente para que sequem completamente. Após esse procedimento as lamínulas são coladas em lâmina com meio de montagem Entellan[®]. Após a secagem completa as lâminas podem ser analisadas em microscópio óptico com objetiva de imersão (100x)

4. Contagem e determinação do índice de infecção

Para a análise das lâminas e determinação da porcentagem de macrófagos infectados (MI), número de amastigotas por macrófago infectado (AMA) e índice de infecção serão necessários 3 contadores de célula: um para contar o número de macrófagos não infectados outro para contar o número de macrófagos infectados e o terceiro para contar o número de amastigotas presente nos macrófagos. Serão contados 100 macrófagos por lamínula e determinada a proporção de macrófagos infectados e a quantidade de amastigotas em 100 macrófagos. O índice de infecção corresponde ao produto da proporção de macrófagos infectados pela média do número de amastigotas por macrófago infectado: $II = MI \times AMA$.

AULA PRÁTICA 3 - 02/06/2015

Grupo:

1.

2.

3.

4.

5.

6.

Comparação:

[]: macrófagos estimulados ou não com a proteína CD100

[]: macrófagos infectados com cepas PH8 e LV79

[]: macrófagos infectados por 24 e 48h

Determinar para cada condição média e desvio de:

- % de macrófagos infectados
- amastigotas/macrófago infectado
- índice de infecção

Plotar em histograma, analisar a significância estatística (por teste t) e discutir o resultado obtido.