



UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE OSTEOPONTINA NA
INFECCÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* POR *Leishmania sp.*

TAÍS FONTOURA DE ALMEIDA

Salvador - Bahia - Brasil

2005

4:616.993.161



001662

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE OSTEOPONTINA
NA INFECÇÃO *IN VITRO* POR *Leishmania sp.***

TAÍS FONTOURA DE ALMEIDA

Orientadora: PATRÍCIA SAMPAIO TAVARES VERAS

Dissertação apresentada para a
obtenção do grau de Mestre em
Patologia Experimental

Salvador – Bahia - Brasil

2005

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Almeida, Taís Fontoura de
A447a Avaliação da expressão de osteopontina na infecção *in vitro e in vivo* por
Leishmania sp. [manuscrito] / Taís Fontoura de Almeida. - 2005.
65 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisas
Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2005.

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras, Laboratório de
Patologia e Biointervenção.

1. Camundongos CBA/J. 2. *Leishmania amazonensis*. 3. *Leishmania major*.
4. Título.

CDU 599.323.4:616.993.161

PHL
10.11.11
05.11.11

599.323.4:616.993.161

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE OSTEOPONTINA NA INFECÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO*
POR *Leishmania sp.*

TAÍS FONTOURA DE ALMEIDA

FOLHA DE APROVAÇÃO

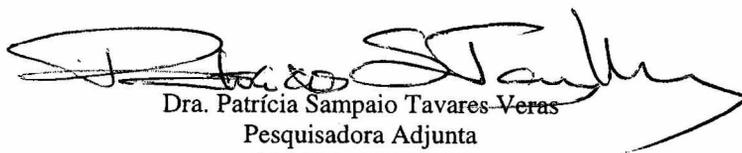
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Nicolaus Albert Borges Schriefer
Pesquisador
HUPES - UFBA



Dra. Claudia Ida Brodskyn
Pesquisadora Associada
CPqGM - FIOCRUZ



Dra. Patricia Sampaio Tavares-Veras
Pesquisadora Adjunta
CPqGM - FIOCRUZ

Fontes de Financiamento:

FAPEX – projeto 022058
CAPES – Bolsa de Mestrado

**A meus pais, minha irmã e meus avós
por toda confiança, incentivo, carinho e amor
sempre presentes em todos os momentos de minha vida.**

AGRADECIMENTOS

Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras, meu agradecimento pela orientação, pela oportunidade de crescimento na Biologia Celular, pela dedicação, preocupação e incentivo constantes.

Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas por sua orientação, pela grande contribuição na minha formação acadêmica e pelas sugestões sempre enriquecedoras durante o desenvolvimento do trabalho.

Dra. Tânia Correia pela amizade e participação indispensável na análise imunohistoquímica.

Dr. Washington Luis Conrado dos Santos pelas sugestões enriquecedoras ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Jaqueline França Costa, estudante dedicada ao projeto, pela participação indispensável para a sua realização. Guilherme de Oliveira Campos e José Geraldo Bomfim Lima pelo auxílio na execução dos experimentos.

Juliana Perrone Bezerra de Menezes pela amizade e por compartilhar as angústias e alegrias envolvidas nesta conquista.

Marcus Welby Borges de Oliveira, Ivana Nunes Gomes de Araújo, Tânia Regina Marques da Silva, Valderes Lemos de Souza, Cleusa Alves Theodoro Rodrigues e Lara Ferrero Gomez pela amizade, apoio e pela grande importância na minha formação acadêmica.

Amigos do LPBI, Luís Fábio Batista, Théo Santos, Júlia Di Tullio, Sírio Melo, Marta Santos, Lenita dos Santos e Luciano dos Santos pelo agradável convívio e apoio no dia a dia do laboratório.

Rosália Meire Oliveira da Silva e Iumara Evangelista pela atenção e apoio em todos os momentos do curso.

Ana Fiscina Sampaio e todo o pessoal da biblioteca do CPqGM pela presteza no atendimento.

A turma do Mestrado em Patologia Experimental de 2003 pelo companheirismo e amizade.

Todos os funcionários do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz.

SUMARIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.1.1	<i>O modelo murino de leishmaniose tegumentar</i>	2
1.1.1.1	<i>O modelo de infecção do camundongo CBA/J</i>	5
1.1.2	<i>Papel do macrófago na infecção por Leishmania</i>	6
1.2	OSTEOPONTINA.....	9
2	JUSTIFICATIVA	14
3	OBJETIVOS	16
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1	ANIMAIS.....	17
4.2	PARASITOS.....	17
4.3	OBTENÇÃO E CULTURA DE CÉLULAS	17
4.4	INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR LEISHMANIA.....	18
4.5	EXTRAÇÃO E DETECÇÃO DE RNAM POR RT-PCR.....	18
4.6	INFECÇÃO <i>IN VIVO</i> DE CAMUNDONGOS POR LEISHMANIA.....	20
4.7	DETECÇÃO DE OPN POR IMUNOHISTOQUÍMICA.....	20
4.8	ANÁLISE DAS CÉLULAS POSITIVAS EM LINFONODOS DE DRENAGEM E NOS INFILTRADOS INFLAMATÓRIOS DAS LESÕES.....	21
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
5	RESULTADOS	23
5.1	EXPRESSÃO DE RNAM PARA OPN E HPRT NA INFECÇÃO <i>IN VITRO</i> DE MACRÓFAGOS POR <i>L. AMAZONENSIS</i> OU <i>L. MAJOR</i>	25
5.2	IDENTIFICAÇÃO DE OPN EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE INFILTRADO INFLAMATÓRIO DE CAMUNDONGOS CBA/J INFECTADOS POR <i>L. AMAZONENSIS</i> OU <i>L. MAJOR</i>	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.3	IDENTIFICAÇÃO DE OPN EM LINFONODOS POPLÍTEOS DE CAMUNDONGOS CBA/J INFECTADOS POR <i>L. AMAZONENSIS</i> OU <i>L. MAJOR</i>	33
6	DISCUSSÃO	38
7	CONCLUSÃO	44
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

RESUMO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE OSTEOPONTINA NA INFECÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* POR *Leishmania* sp. TAÍS FONTOURA DE ALMEIDA. Camundongos da linhagem CBA/J são resistentes à infecção por *L. major* e susceptíveis à infecção por *L. amazonensis*, apresentando distintos padrões morfológicos de resposta tecidual e da resposta imune. O infiltrado inflamatório nestes animais é composto principalmente por macrófagos. Macrófagos desempenham importante papel na infecção por *Leishmania* por serem as principais células hospedeiras do parasito, por apresentarem antígenos a linfócitos T específicos e por secretarem citocinas e quimiocinas. Pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos no recrutamento de macrófagos para o sítio da infecção, embora este seja um importante fenômeno para a manutenção e disseminação da infecção por *Leishmania*. Osteopontina (OPN) é uma proteína envolvida em migração e adesão celular e que tem sido relacionada à atração de macrófagos para sítios inflamatórios em resposta a diferentes estímulos patológicos, sendo os macrófagos o tipo celular que predominantemente responde a OPN. Este trabalho teve como objetivo avaliar a participação de osteopontina durante a infecção *in vitro* de macrófagos por *Leishmania* sp. e durante a infecção *in vivo* de camundongos CBA/J por este mesmo patógeno. Macrófagos peritoneais inflamatórios e camundongos CBA/J foram infectados por *L. major* ou *L. amazonensis* e a expressão de OPN foi avaliada, *in vitro*, através da expressão de RNAm e, *in vivo*, através de imunohistoquímica para OPN em células de infiltrados inflamatórios e de linfonodos de drenagem das lesões destes animais. Foi observado que há uma maior expressão de RNAm para OPN em tempos tardios após a infecção de macrófagos e em linfonodos de animais infectados por *L. amazonensis*. Por regressão linear, foi observada que essa maior expressão e maior número de células expressando OPN no linfonodo de drenagem são dependentes do tempo de infecção por *L. amazonensis*. Estes dados sugerem que OPN está envolvida na resposta de susceptibilidade de camundongos CBA/J à infecção por *L. amazonensis* e aponta para a necessidade de ampliar o conhecimento sobre o papel desta proteína no contexto da infecção por *Leishmania*.

1. Camundongo CBA/J. 2. *Leishmania major*. 3. *Leishmania amazonensis*.

ABSTRACT

EVALUATION OF OSTEOPONTIN EXPRESSION DURING *IN VITRO* AND *IN VIVO* INFECTION BY *Leishmania* sp. **TAÍS FONTOURA DE ALMEIDA**. CBA mice are resistant to *L. major* infection and susceptible to *L. amazonensis*, presenting distinct patterns of tissular and immune responses. There is evidence that the early events post-infection are crucial to the course of the disease. Macrophages play a central role in *Leishmania* infection, since they are the cells that harbor parasites, present antigens to specific T lymphocytes and also have capacity to secrete cytokines and chemokines. Little is known about the mechanisms involved in macrophage recruitment to the site of infection despite it is important for the maintenance and dissemination of *Leishmania* infection. Osteopontin (OPN) is a protein involved in cellular migration and adhesion that has been related to attraction of macrophages to inflammatory sites in response to different pathological stimuli. Since macrophages are the main cell which responds to OPN stimulus, the goal of this work was to evaluate OPN participation during both *in vitro* and *in vivo* *Leishmania* infection. Peritoneal inflammatory macrophages and CBA/J mice were infected by *L. amazonensis* or *L. major*. *In vitro*, OPN expression was evaluated by RT-PCR analysis. In *in vivo* studies, the expression of OPN protein was detected in cells of the inflammatory infiltrates and draining lymph nodes of infected animals. During infection of peritoneal inflammatory macrophages it was observed a higher expression of OPN mRNA in later times of *L. amazonensis* infection. According to this result, the number of OPN expressing cells was higher in draining lymph nodes of *L. amazonensis* infected animals. By linear regression analysis it was observed that the increase in both *in vitro* OPN mRNA and *in vivo* lymph node OPN expression depends on the time of *L. amazonensis* infection. These data suggest that OPN is involved in the susceptibility of CBA/J mice to *L. amazonensis* infection and points out to the need to broad the knowledge about the role of this protein in the context of infection by *Leishmania*.

1. CBA/J mice.
2. *Leishmania major*.
3. *Leishmania amazonensis*.

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	células apresentadoras de antígeno (antigen-present cells)
BCG	bacilo de Calmette Guérin
Camp	adenosina monofosfato cíclico
CR1	receptor do complemento 1
CR3	receptor do complemento 3
DMEM	meio de cultivo de células (Dulbecco's modified Eagle's medium)
ELISA	ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (enzyme-linked immunosorbent assay)
ETA-1	fator de ativação inicial de linfócitos T (Early T Lymphocyte Activation-1)
FMLP	formil-metionil-leucil-fenilalanina
gp63	glicoproteína 63
HSV-1	vírus herpes simples-1
Hepes	N-2hidroxetilpiperazina:N'-2-etano ácido sulfônico
IFN- γ	interferon-gama
IL	interleucina
INOS	óxido nítrico sintetase induzível
LPG	lipofosfoglicano
LPS	lipopolissacarídeo
MAC-1	receptor do complemento 3
MCP	proteína quimiotática de monócitos
MIP	proteína inflamatória de macrófagos
NADPH	dinucleotídeo nicotinamida-adenina fosfato reduzido
NK	células matadoras naturais (natural killer cells)
NO	óxido nítrico

OPN osteopontina

PBS salina fosfatada a 150mM, pH 7,4 (phosphate buffered saline)

RANTES quimiocina regulada pela ativação de linfócitos T normais (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted)

RGD seqüência de aminoácidos Arg-Gly-Asp

RNAm RNA mensageiro

SCID imunodeficiência severa combinada (severe combined immunodeficiency)

TGF- β fator de crescimento tumoral-beta

Th linfócito T auxiliador

TNF- α fator de necrose tumoral-alfa

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A leishmaniose é uma doença endêmica causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Está presente em 88 países de cinco continentes – África, Ásia, Europa e Américas do Norte e do Sul – atingindo 12 milhões de pessoas. Estima-se que, anualmente, ocorram 1.5-2 milhões de novos casos de leishmaniose, porém somente 600.000 são oficialmente declarados. No período de 1985 a 2001, o Ministério da Saúde e a Fundação Nacional de Saúde registraram um aumento na incidência de leishmaniose tegumentar de 10,45 para 21,23 casos/100.000 habitantes, sendo a região Nordeste a que vem contribuindo com o maior número de casos (Guia de doenças, 2002).

A doença pode envolver pele e mucosas, na forma tegumentar, ou órgãos internos, na forma visceral (Bittencourt *et al.*, 1995). Apresenta-se sob quatro formas clínicas diferentes: a leishmaniose cutânea localizada, a leishmaniose cutânea difusa, a leishmaniose cutâneo-mucosa e a leishmaniose visceral. A gravidade da doença, sua distribuição mundial e alta incidência levaram a Organização Mundial de Saúde a incluí-la entre as seis mais importantes endemias do mundo.

O gênero *Leishmania* (Ross, 1903) compreende espécies de parasitos digenéticos pertencentes à Família Trypanosomatidae (Doflein, 1901; Woodcock, 1906). No Velho Mundo *L. tropica*, *L. aethiopica* e *L. major* são os agentes causadores da leishmaniose cutânea localizada. Atualmente, as espécies do Novo Mundo são classificadas em complexos fenotípicos, agrupados em dois subgêneros: subgênero *Viannia*, que inclui os complexos *braziliensis* e *guyanensis* e subgênero *Leishmania*, que inclui os complexos *mexicana*, *infantum* e *amazonensis*. No Novo Mundo os parasitos dos complexos *braziliensis* e *mexicana* são associados aos casos de

leishmaniose cutânea localizada e difusa, como por exemplo *L. mexicana* e *L. amazonensis* (Bittencourt *et al.*, 1995). No Brasil, a ocorrência de lesões tegumentares está relacionada à infecção por *L. amazonensis* e também à infecção por *L. braziliensis* (Barral *et al.*, 1991). Independente do agente infeccioso, a leishmaniose cutânea localizada e a leishmaniose cutânea mucosa são caracterizadas por uma resposta inflamatória intensa e poucos parasitos presentes na lesão (Coutinho *et al.*, 1987), enquanto na leishmaniose cutânea difusa ocorre uma infiltração predominantemente monomórfica de macrófagos muito parasitados, sem a ocorrência de ulcerações.

1.1.1 O modelo murino de leishmaniose tegumentar

Na leishmaniose tegumentar murina, são estudados camundongos isogênicos que apresentam padrões distintos de resposta à infecção por uma ou mais espécies de *Leishmania*, uma vez que estes padrões reproduzem muitas características importantes das manifestações clínicas observadas em humanos.

Um considerável espectro de manifestações da doença pode ser produzido a depender da espécie do parasito e da linhagem de camundongo utilizada. Linhagens como C3H/He, C57BL/6, C57BL/10, ATL e CBA/J são resistentes à infecção por *L. major* e são susceptíveis à infecção por parasitos do complexo *mexicana*, como *L. mexicana* e *L. amazonensis* (Behin *et al.*, 1979; Mitchell *et al.*, 1981). *L. amazonensis* induz uma variação maior no espectro da doença a depender da linhagem de camundongo e da cepa utilizada. A maioria das linhagens investigadas são susceptíveis, desenvolvendo doenças crônicas, como os camundongos das linhagens C57BL/6, C57BL/10 e C3H/HeN (Afonso *et al.*, 1993; Barral *et al.*, 1983; Grimaldi *et al.*, 1980);

ou doenças graves que levam à morte dos animais, como os camundongos da linhagem BALB/c (Andrade *et al.*, 1984).

O estudo desses modelos tem fornecido muitos dados sobre a resposta imune contra *Leishmania*. Há evidências recentes de que a resposta à infecção por *Leishmania* é influenciada por eventos da resposta imune inata. Esses eventos ocorrem nos primeiros dias de infecção, antes da diferenciação de células T CD4⁺ em Th1 ou Th2 (Chatelain *et al.*, 1992; Sypek *et al.*, 1993). Sabe-se que *L. major* é capaz de infectar células dendríticas e promover o aumento da expressão de moléculas de MHC classe I e II e de moléculas co-estimulatórias como CD40, CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2), sugerindo que, na fase inicial da infecção, *L. major* capacita estas células a atuarem como células apresentadoras de antígenos (APC)s (von Stebut *et al.*, 1998), influenciando indiretamente na resposta de resistência ou susceptibilidade ao parasito.

A resistência de linhagens de camundongos infectados por *L. major* se correlaciona com a indução de sub-populações de células T “helper” 1 (Th1) - produtoras de interferon- γ (IFN- γ), enquanto que a susceptibilidade de outras linhagens de camundongos infectados por *L. major*, correlaciona-se com a indução de sub-populações T “helper” 2 (Th2) - produtoras das interleucinas-4, 5, 10 e 13 (Mosmann *et al.*, 1986; Reiner *et al.*, 1994).

O IFN- γ é a principal citocina liberada durante a resposta Th1. Ele atua de maneira sinérgica com o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) para ampliar a resposta de resistência (Liew *et al.*, 1990). O mecanismo de ação do IFN- γ e do TNF- α é a ativação de macrófagos, capacitando-os a destruir formas amastigotas intracelulares (Titus *et al.*, 1989). Os mecanismos efetores clássicos dessa destruição são a liberação de superóxidos (O₂⁻) via o complexo NADPH oxidase, e a síntese de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina, catalisada pela enzima NO sintetase induzível (iNOS) presente

nestas células (Bogdan *et al.*, 1998). Entretanto, foi demonstrado em nosso laboratório, que *L. amazonensis* não é eficientemente destruída por tais mecanismos (Gomes *et al.*, 2003).

Na resposta imune mediada por células Th2, ocorre a produção de citocinas que promovem a progressão da doença. A IL-4, IL-10 e o “transforming growth factor- β ” (TGF- β) funcionam como citocinas que inibem a ativação de macrófago e desempenham um papel importante na progressão da lesão (Bogdan *et al.*, 1991; Ding *et al.*, 1990; Liew *et al.*, 1989). IL-4 modula respostas Th1 e constitui o principal fator indutor de respostas do tipo Th2. Essa citocina age possivelmente por um efeito direto sobre o macrófago ou estimulando a síntese de IL-10, que atuaria inibindo a produção de IFN- γ , regulando a ativação dos macrófagos (Fiorentino *et al.*, 1991; Tanaka *et al.*, 1993). O TGF- β promove inativação de macrófago na fase inicial da infecção e inibe a expressão de iNOS em macrófagos ativados nas lesões cutâneas de camundongos susceptíveis infectados com *L. major* (Barral-Netto *et al.*, 1992; Stenger *et al.*, 1994).

Algumas citocinas estão envolvidas na determinação do fenótipo das células T CD4⁺ e são descritas como importantes no processo de determinação do tipo de resposta de células T. A IL-12 é uma citocina produzida por macrófagos e células dendríticas, sendo determinante para a estimulação de células NK e células Th1 a produzir IFN- γ (Scharton-Kersten *et al.*, 1995). Estudos *in vivo* mostraram que, em camundongos susceptíveis, o tratamento com IL-12 recombinante é capaz de curar a infecção por *L. major*, desde que seja realizado na primeira semana de infecção (Heinzel *et al.*, 1993). Entretanto, a produção *in vivo* de IL-12 por macrófagos é inibida por promastigotas metacíclicas de *Leishmania* (Belkaid *et al.*, 1998; Reiner *et al.*, 1994). Estes dados indicam a importância das APCs na liberação de fatores moduladores durante o início e

desenvolvimento da resposta à infecção por *Leishmania*, sugerindo que a polarização da resposta de células T CD4⁺ é regulada pelo contato inicial com o patógeno.

1.1.1.1 O modelo de infecção do camundongo CBA/J

Os camundongos da linhagem CBA/J infectados por *L. major* apresentam um padrão de resistência: desenvolvem lesões cutâneas localizadas que curam espontaneamente e se tornam imunes à re-infecção. Os poucos trabalhos referentes à infecção por *L. amazonensis* demonstram que as lesões apresentam crescimento progressivo em camundongos CBA/J, sendo considerados susceptíveis (Childs *et al.*, 1984). Em nosso laboratório, foi demonstrado que camundongos CBA/J infectados por *L. major* ou *L. amazonensis* apresentam distintos perfis histológicos no linfonodo de drenagem e no sítio de inoculação dos parasitos na pele (Lemos de Souza *et al.*, 2000). Na infecção por *L. major* observa-se um infiltrado mononuclear misto, com aumento progressivo do número de linfócitos na lesão e formação de granulomas, que culmina na eliminação dos parasitas e cura espontânea das lesões. Na infecção por *L. amazonensis* observa-se um infiltrado macrofágico difuso, monomórfico, com intenso parasitismo, seguido de disseminação dos parasitos, que resulta na morte desses animais. Os mecanismos responsáveis pelas diferenças na composição de células do infiltrado inflamatório destes camundongos foram pouco explorados.

O padrão da resposta imune de camundongos CBA/J infectados por *L. major* ou *L. amazonensis* correlaciona-se com o perfil morfológico de resposta tecidual. Nos tempos iniciais da infecção por *L. major* observa-se um padrão de resposta misto em culturas de células de linfonodos re-estimuladas *in vitro*, com a presença de citocinas características de perfis Th1 e Th2. Com a progressão da infecção, esses camundongos mantêm níveis elevados de IFN- γ , evidenciando uma resposta do tipo Th1. Na infecção

por *L. amazonensis* observa-se produção precoce de IL-4 que se mantém, caracterizando uma resposta do tipo Th2 (Lemos de Souza *et al.*, 2000). Além disso, IL-10 é produzida por células de linfonodo de drenagem re-estimuladas *in vitro* por *L. major* ou *L. amazonensis*, sugerindo que esta citocina tem um duplo papel na resposta imune contra Leishmania: no contexto da susceptibilidade, favorece uma resposta Th2; na resposta de resistência, modula a resposta Th1 (Lemos de Souza *et al.*, 2000).

Assim, os camundongos CBA/J, por responderem de forma distinta às infecções por Leishmania, constituem um bom modelo para estudos comparativos entre infecções por diferentes espécies, enfatizando os efeitos relacionados ao parasito e minimizando as dificuldades dos estudos que utilizam hospedeiros de “background” genéticos diferentes.

1.1.2 Papel do macrófago na infecção por *Leishmania*

Leishmania spp. (Ross, 1903) são protozoários que sobrevivem no interior dos macrófagos. Estas células são importantes na resposta imune inata e adaptativa, pois realizam funções como pinocitose, fagocitose, destruição de microorganismos internalizados, digestão e apresentação de antígenos aos linfócitos T e B, secreção de moléculas, como componentes do complemento, citocinas e moléculas quimiotáticas.

A infecção de macrófagos por *Leishmania* sp. ocorre pela ligação de moléculas de superfície do parasito a receptores de membrana celular. O lipofosfoglicano (LPG) e o gp63 são as principais moléculas de superfície de promastigotas de *Leishmania* e funcionam como importantes fatores de virulência do parasito e participam no reconhecimento e internalização de *Leishmania* pelos macrófagos (Brittingham *et al.*, 1995; Turco *et al.*, 1992). Foi demonstrado que na dependência do comprimento da

molécula do LPG, há um bloqueio efetivo da lise pelo sistema complemento, por evitar a ligação dos componentes líticos com a membrana do parasito (Sacks *et al.*, 1990). O gp63 constitui uma glicoproteína com atividade proteolítica capaz de se ligar ao receptor de complemento expresso na superfície de macrófagos, impedindo a fixação do complemento e favorecendo o estabelecimento da infecção nessas células (Brittingham *et al.*, 1995). As moléculas do sistema complemento são capazes de promover a opsonização do parasito, promovendo a sua adesão aos receptores do complemento CR1 e CR3 na superfície dos macrófagos. Além disso, *Leishmania* também pode ser internalizada pela ligação com outros receptores, como os receptores Fc e os receptores de manose. No interior dos macrófagos, as formas promastigotas sofrem transformações moleculares e estruturais dando origem às formas amastigotas, obrigatoriamente intracelulares e imóveis, mas capazes de se multiplicar no ambiente ácido do vacúolo parasitóforo.

A disseminação da infecção depende da ruptura de células altamente parasitadas, do recrutamento de novos macrófagos ao sítio inflamatório que alberguem os parasitos liberados e da capacidade de macrófagos e células dendríticas de carrear o parasito a órgãos linfóides secundários (Rittig *et al.*, 2000). Estudos *in vivo* demonstram que macrófagos, as principais células hospedeiras de *Leishmania* sp., compõe o infiltrado inflamatório de lesões de camundongos infectados por *Leishmania* (Andrade *et al.*, 1984; Lemos de Souza *et al.*, 2000) e que, juntamente com a célula dendrítica, participam do início e regulação da resposta contra o parasito (Alexander *et al.*, 1999). O recrutamento de células inflamatórias vem sendo descrito como resultado da produção de diversas moléculas no sítio inflamatório, como quimiocinas e citocinas. Badolato e colaboradores (Badolato *et al.*, 1996) observaram que a infecção de macrófagos humanos com promastigotas de *L. major* estimula a produção de IL-

8/CXCL8 e MCP-1/CCL2, nas primeiras horas da infecção, discutindo a possibilidade dessas quimiocinas estarem envolvidas no recrutamento de células-alvo que favorecem a replicação intracelular do parasito. No modelo murino, camundongos SCID infectados por *L. amazonensis* não apresentam diminuição do recrutamento de macrófagos no sítio da lesão, indicando que a infiltração destas células ocorre, principalmente, por mecanismos dependentes dos próprios macrófagos e independentes de células T (Terabe *et al.*, 2000).

A atração de células imaturas para o sítio da infecção representa uma forma de disseminação (Fortier *et al.*, 1982). Apesar da grande quantidade de macrófagos nas lesões cutâneas de camundongos susceptíveis BALB/c, elas contêm, comparativamente, um número muito maior de macrófagos imaturos (positivos para marcação MRP14 e negativos para F4/80) do que os infiltrados de pele de camundongos resistentes C57BL/6 (Sunderkotter *et al.*, 1993). Assim, macrófagos imaturos não são capazes de conter a infecção pelo parasito, indicando que o recrutamento destas células para o sítio inflamatório não é suficiente para o controle da infecção. Além disso, foi demonstrado que a infecção por *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. braziliensis* pode induzir um estado de baixa aderência de macrófagos ao tecido conjuntivo, sugerindo que a infecção dessas células facilita a disseminação da infecção (Carvalho *et al.*, 2004).

Dados do nosso laboratório demonstram que, *in vitro*, a partir de 24 horas após a infecção, o percentual de macrófagos de camundongo CBA/J infectados por promastigotas de *L. amazonensis* foi duas vezes maior quando comparado à infecção destas células por *L. major* (Gomes *et al.*, 2003), evidenciando que macrófagos de camundongos CBA/J respondem de forma diferente à infecção por *L. major* e *L. amazonensis* e indicando a importância de aprofundar o conhecimento sobre a

participação destas células no estabelecimento e disseminação da infecção por *Leishmania*.

No modelo *in vivo* do camundongo CBA/J, o infiltrado inflamatório destes animais demonstra predominância de células MAC-1⁺ tanto em infecções causadas por *L. major* quanto em infecções causadas por *L. amazonensis* (Almeida, 2002). Apesar da ativação dos macrófagos que constituíam o infiltrado inflamatório não ter sido avaliada, outros estudos em nosso laboratório demonstraram o aumento da expressão de RNAm para MCP-5/CCL12 em lesões de pata apenas de camundongos infectados por *L. major*, no primeiro dia após a infecção (Welby-Borges, 2000). MCP-5/CCL12 é uma quimiocina produzida principalmente por macrófagos e que atrai monócitos, linfócitos e eosinófilos para os sítios inflamatórios (Luster, 1998; Rollins, 1997; Strieter *et al.*, 1996). É possível que MCP-5/CCL12 produzida por macrófagos, presentes nas lesões desses animais, possa contribuir para o recrutamento e ativação de novos monócitos e macrófagos que, assim, poderiam se tornar capazes de destruir os parasitos intracelulares. Até o momento não existem trabalhos na literatura que expliquem os mecanismos de recrutamento de macrófagos para o sítio da lesão de animais infectados, principalmente na infecção por *L. amazonensis*, onde há recrutamento de grande número destas células.

1.2 OSTEOPONTINA

A osteopontina (OPN) é uma fosfoproteína secretada de 60KDa, também conhecida como “Early T-Lymphocyte Activation-1 (ETA-1)” e fosfoproteína secretada-1 (*spp1*), que é codificada por um gene multialélico presente no cromossomo 4 humano (Patarca *et al.*, 1993). No genoma murino, o gene *spp1* está localizado no

cromossomo 5, em um locus descrito como relacionado à resistência contra a infecção letal por *Rickettsia tsutsugamushi* (Patarca *et al.*, 1989; Patarca *et al.*, 1993).

A OPN apresenta muitas regiões conservadas, tais como: seqüências de poliaspartato; sítios para fosforilação por cinases; sítios de N-glicosilação; muitos sítios de O-glicosilação; dois domínios de ligação à heparina, além do domínio RGD e de um sítio de clivagem por trombina (Ashkar *et al.*, 1993). O domínio RGD corresponde a uma seqüência arginina-glicina-aspartato (Arg-Gly-Asp) e é um sítio estrutural para reconhecimento por receptores de superfície da família das integrinas, sendo compartilhado por outros componentes da matriz extracelular, como por exemplo: fibronectina, vitronectina, trombospondina e alguns tipos de colágenos. O reconhecimento de seqüências RGD em uma proteína promove migração e adesão celular, tanto entre células quanto entre estas e componentes da matriz extracelular (Ruoslahti, 1996). Além da sua capacidade de ligação a sub-famílias de receptores integrina, principalmente a integrina $\alpha V\beta 3$, OPN também pode se ligar a isoformas do receptor CD44. (ligação independente do domínio RGD) e a ligação a cada receptor contribui para diferentes efeitos funcionais da molécula.

OPN pode ser expressa em diversas formas funcionais geradas a partir de “splicing” alternativo e por modificações pós-traducionais (fosforilações e glicosilações) durante seu trajeto até a superfície celular. Sua forma não-fosforilada é capaz de formar complexos com fibronectina que, ao se ligar a receptores específicos nos macrófagos, aumenta a fagocitose via complemento e receptor Fc (McKee *et al.*, 1996). A fosforilação tecido-específica de OPN pode ser essencial para modular sua função biológica. Osteoblastos secretam uma grande quantidade de formas fosforiladas de OPN, enquanto células renais de rato secretam formas fosforiladas e não-fosforiladas dessa proteína (Singh *et al.*, 1990). A fosforilação de OPN é dependente de proteínas

cinases (Singh *et al.*, 1990). Tanto caseína cinase II quanto proteínas cinases dependentes de cAMP são capazes de fosforilar OPN *in vitro*. A presença de sítios diferentes de fosforilação dependentes de proteínas cinases sugere que há geração de distintas formas fosforiladas desta proteína (Ashkar *et al.*, 1993). Foi demonstrado que fosforilações específicas modulam a capacidade de OPN se associar à superfície celular (por ligação a integrinas) e não se associar com a matriz extracelular. A fosforilação em resíduos serina na ETA-1 recombinante não é requerida para que a molécula interaja com o CD44 e promove migração quimiotática de macrófagos (Weber *et al.*, 2002).

A OPN pode ser produzida, de forma constitutiva, por muitos tipos celulares, inclusive células endoteliais, osteoblastos, fibroblastos e células epiteliais e pode ter a expressão regulada em células mononucleares inflamatórias, como macrófagos ativados, células dendríticas, células T (Patarca *et al.*, 1989; Singh *et al.*, 1990; Weber *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 2001) e células NK (Pollack *et al.*, 1994).

Inicialmente, foi descrita uma relação entre a infecção letal por *R. tsutsugamushi* e a expressão de um alelo específico de OPN (Patarca *et al.*, 1989). Camundongos que expressam o alelo *Eta-1^a* (BALB/cJ, C57BL/6J e CBA/CaJ, por exemplo) são descritos como resistentes à infecção por *R. tsutsugamushi*, apresentando uma alta expressão de RNAm para OPN, a partir de 24 horas e até 6 dias após infecção. Camundongos CBA/J possuem o alelo *Eta-1^b* e não expressam níveis significantes de RNAm para OPN, nos três primeiros dias após a infecção por *R. tsutsugamushi*, sendo descritos como susceptíveis à infecção por este patógeno (Patarca *et al.*, 1989). Os autores sugeriram que, em infecções bacterianas, a expressão do gene para ETA-1 precede uma resposta rápida dependente de célula T (Patarca *et al.*, 1989). Em estudos posteriores, os mesmos autores sugeriram que, uma vez que a produção de OPN por macrófagos esplênicos e do

figado pode ser induzida por LPS, OPN seria capaz de mediar destruição de bactérias Gram-negativas pelos macrófagos (Patarca *et al.*, 1993)

Estudos em modelos de doenças inflamatórias demonstraram que OPN é encontrada em sítios inflamatórios decorrentes de lesão tecidual ou agentes infecciosos. OPN apresenta um importante papel na infiltração de macrófagos em resposta a estímulos patológicos (Giachelli *et al.*, 1998). Os níveis protéicos de OPN estão aumentados em células de linhagem monocítica/macrofágica, em células T ativadas ou na matriz extracelular próxima a estas células em muitas doenças inflamatórias crônicas. Foi demonstrado que células T residentes de granulomas não-imunes possuem alta expressão de OPN (Jansson *et al.*, 2002) e que a molécula está elevada em respostas granulomatosas e em certas infecções por microorganismos intracelulares, como no caso de vírus herpes simples (HSV-1), BCG, *M. bovis* e *L. monocytogenes* (Ashkar *et al.*, 2000; Nau *et al.*, 1997).

Foi sugerido que OPN está relacionada à inflamação, em particular como um fator migratório e adesivo para macrófagos humanos e murinos *in vitro*. Após 24 horas de injeção intradérmica de 300ng de ETA-1 em camundongos BALB/c, foi observado um infiltrado inflamatório, localizado principalmente em tecido conjuntivo frouxo ao redor de vasos sanguíneos, e composto basicamente por neutrófilos e macrófagos, sendo o número de macrófagos 25X maior na injeção de ETA-1 do que nos controles (PBS), enquanto o aumento do número de neutrófilos foi menos expressivo, apenas 5X (Singh *et al.*, 1990). Estes autores também demonstraram que OPN promove adesão de macrófagos e que o domínio RGD é essencial para esta ligação (Singh *et al.*, 1990), fornecendo evidências de que OPN pode ser uma molécula de citoadesão para monócitos/macrófagos.

A injeção intradérmica de OPN purificada induz o acúmulo local de macrófagos em ratos e facilita a adesão e migração de células “macrophage-like” *in vitro* (Giachelli *et al.*, 1998). Além disso, a injeção intradérmica de N-formyl-met-leu-phe (fMLP) induz a migração de um infiltrado macrofágico, onde a maioria das células expressa altos níveis de OPN (Giachelli *et al.*, 1998). Em outro modelo, a injeção intraperitoneal de OPN se mostrou capaz de induzir um infiltrado celular composto principalmente por macrófagos (65%), mas também por linfócitos T e B (Weber *et al.*, 2002). Em adição, foi demonstrado que OPN participa na quimioatração e migração de células dendríticas para o sítio inflamatório (Weiss *et al.*, 2001) e no estímulo de outras funções do macrófago, tais como fagocitose (Carlson *et al.*, 1997) e produção de citocinas e enzimas proteolíticas, que estão envolvidas em cura por cicatrização (Weber *et al.*, 2002).

A participação de macrófago na inflamação envolve a migração destas células do sangue periférico para os tecidos infectados, onde elas produzem citocinas que regulam diversos processos, inclusive atividade anti-microbica, crescimento e diferenciação celular e cura de lesões. A migração do macrófago depende de um engajamento coordenado de diferentes classes de receptores de superfície celular por moléculas, tipicamente citocinas e quimiocinas, e pela matriz extracelular que determinam a migração e adesão em diversos compartimentos anatômicos (Ashkar *et al.*, 2002). Assim, uma vez que macrófagos são células importantes durante a infecção por *Leishmania* e são as principais células que predominantemente respondem a OPN, a proposta deste estudo foi avaliar a participação desta proteína na infecção, *in vitro*, de macrófagos peritoneais inflamatórios e, *in vivo*, de camundongos CBA/J por *L. major* ou *L. amazonensis*.

2. JUSTIFICATIVA

O conhecimento mais aprofundado sobre a resposta imune na leishmaniose vem sendo adquirido através de estudos que utilizam o modelo murino de infecção experimental que têm demonstrado a importância tanto da resposta imune do hospedeiro quanto da espécie de *Leishmania* em regular a infecção e progressão da doença. Muitos estudos demonstram que o resultado da infecção murina depende do balanço Th1/Th2 da resposta imune. Entretanto, o comprometimento do sistema imune com um destes dois tipos de resposta é determinado por eventos que ocorrem em momentos iniciais do contato entre o parasito e o sistema imune do hospedeiro, uma vez que a ativação da resposta imune inata é pré-requisito para estimular a resposta imune adquirida (Janeway *et al.*, 2002).

Camundongos CBA/J infectados por *L. major* ou *L. amazonensis* apresentam distintos perfis histológicos no linfonodo de drenagem e no sítio de inoculação dos parasitos na pele. Esses perfis são relacionados, respectivamente, à resistência e susceptibilidade, inclusive pela produção de citocinas de perfil Th1 e Th2 (Lemos de Souza *et al.*, 2000). Independente do tipo de resposta, os macrófagos desempenham papel importante na infecção por *Leishmania* sp. tanto por serem as principais células hospedeiras do parasito e efetoras na sua destruição, quanto por atuarem como APCs a linfócitos T específicos (Solbach *et al.*, 1995). Um recente trabalho do nosso laboratório demonstrou, *in vitro*, que macrófagos de camundongos CBA/J são eficientes na destruição de *L. major*, enquanto *L. amazonensis* é resistente aos mecanismos leishmanicidas destas células (Gomes *et al.*, 2003). Isso sugere que o primeiro contato do parasita com o macrófago pode levar a célula hospedeira a produzir, de forma diferenciada, fatores que teriam papel no desenvolvimento da resposta imune específica.

A OPN é uma molécula imuno-moduladora produzida por macrófagos e outros tipos celulares e que tem papel no recrutamento e ativação de macrófagos e linfócitos durante resposta não-específica a infecções microbianas e durante o processo de cura por cicatrização (Patarca *et al.*, 1989). OPN age como uma citocina sinalizadora em macrófagos murinos, exercendo funções tanto pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias (Denhardt *et al.*, 2001), dependendo das características de diferenciação do macrófago. Além disso, OPN pode ser encontrada em sítios inflamatórios decorrentes de lesão tecidual ou de infecção por patógenos (Ashkar *et al.*, 2000; Jansson *et al.*, 2002; Nau *et al.*, 1997). Recentemente, foi demonstrado que os níveis protéicos de OPN estão aumentados em células de linhagem monocítica/macrofágica e em células T ativadas ou na matriz extracelular próxima destas células em doenças inflamatórias crônicas. Muitos estudos têm demonstrado que a expressão de OPN precede o acúmulo de monócitos/macrófagos (Eddy *et al.*, 1995; Giachelli *et al.*, 1994; Murry *et al.*, 1994; Pichler *et al.*, 1994; Wiener *et al.*, 1996) e que OPN está envolvida no recrutamento e retenção de macrófagos e células T aos sítios inflamatórios (Mazzali *et al.*, 2002).

Apesar do conhecido papel de OPN no recrutamento de macrófagos em doenças inflamatórias, até o momento, não há dados sobre a participação de OPN em infecções causadas por *Leishmania*. É possível que OPN contribua para as diferenças entre a resposta imuno-inflamatória à *L. amazonensis* e *L. major*, participando na atração de macrófagos para o sítio inflamatório da lesão e na migração de células aos linfonodos de drenagem no modelo do camundongo CBA/J. Este trabalho teve como objetivo avaliar a participação de OPN durante a infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais por *Leishmania*, e durante a infecção *in vivo* de camundongos CBA/J por este mesmo patógeno. A hipótese do presente trabalho foi que ocorreria expressão diferencial de OPN na infecção por *L. amazonensis* ou *L. major*.

3. OBJETIVOS

Investigar a participação de OPN na infecção *in vitro* e durante a resposta *in vivo* de camundongos CBA/J infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar os perfis de expressão de RNAm para OPN em macrófagos de camundongos CBA/J infectados *in vitro* por *L. major* ou *L. amazonensis*.

2. Determinar se há diferenças na expressão de OPN por células mononucleares presentes nos infiltrados inflamatórios de camundongos CBA/J infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*.

3. Determinar se há diferenças na detecção de OPN em células de linfonodos de drenagem de camundongos CBA/J infectados por *L. major* ou *L. amazonensis*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem CBA/J, fêmeas ou machos, com 6 a 10 semanas de idade, obtidos e mantidos no Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ-BA). Os animais foram alimentados com ração comercial balanceada e água acidificada e permaneceram sob condições controladas de temperatura, luminosidade e umidade.

4.2 PARASITOS

Promastigotas de *L. major* (cepa MHOM/IR/-173) e *L. amazonensis* (cepa MHOM/Br88/Ba-125) foram mantidas por, no máximo, sete passagens em meio Schneider suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (GIBCO) e gentamicina (SIGMA) numa concentração de 50µg/ml.

4.3 OBTENÇÃO E CULTURA DE CÉLULAS

Após quatro dias de injeção intraperitoneal de 3mL de tioglicolato a 3% (SIGMA), os macrófagos peritoneais inflamatórios foram obtidos pela lavagem da cavidade peritoneal com solução salina gelada heparinizada (20UI/mL) e, após lavagem, foram re-suspensos em meio DMEM suplementado com 25mM HEPES pH 7,4, 2mM glutamina, 2,0g/L bicarbonato de sódio e 10% de soro bovino fetal (GIBCO) e 0,02mg/mL de ciprofloxacina (DMEM completo). Para avaliação da cinética de infecção, 2×10^5 macrófagos foram cultivados em triplicatas em placas de 24 poços. A

extração de RNAm foi realizada de culturas de 10^6 céls/poço em duplicatas em placas de 24 poços. Após 24 horas de incubação à 37°C e 5% de CO₂, as culturas foram lavadas com meio RPMI tamponado com 25mM HEPES (RPMI HEPES) para a retirada das células não aderidas.

4.4 INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR LEISHMANIA

Os macrófagos foram incubados com promastigotas de *L. major* ou *L. amazonensis* em fase estacionária, na proporção de 10 parasitos/macrófago. Após 6 horas de pulso, as culturas foram lavadas com meio RPMI HEPES para a remoção de parasitos não internalizados e re-incubadas por mais 12, 24, 48 ou 72 horas em DMEM completo.

Em cada intervalo de tempo após a infecção analisado, as células plaqueadas sobre lamínulas foram fixadas com metanol por 10 minutos. As lamínulas foram coradas por Hematoxilina-Eosina e por microscopia ótica foi determinado o índice de infecção pela contagem de macrófagos infectados e do número de amastigotas de *Leishmania* por macrófago.

4.5 EXTRAÇÃO E DETECÇÃO DE RNAm POR RT-PCR

Para a extração do RNA das células infectadas ou não infectadas nos tempos de 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas, utilizou-se 0,4ml/poço de Trizol[®] (GIBCO). Após extração segundo as instruções do fabricante, o RNA foi quantificado por leitura de densidade óptica e testado quanto à sua integridade em gel de agarose. O DNA complementar (cDNA) foi preparado através da transcrição reversa (RT) em tubos contendo cloreto de

magnésio a 5mM ($MgCl_2$ - GIBCO), tampão de PCR 1× (GIBCO), desoxinucleotídeos trifosfatados a 1mM cada (dNTPs - GIBCO), 0,5 μ g de oligonucleotídeos (oligo d(T) - GIBCO), 1UI de inibidor de Rnase (Rnase Out - GIBCO), 2,5UI de transcriptase reversa (MuLVRT- GIBCO) e 1 μ g de RNAm, diluídos em água bidestilada livre de RNase. As reações, com volume final de 20 μ l, foram submetidas a um único ciclo de incubação a 42°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos e 4°C por, pelo menos, 5 minutos. Após a RT, 80 μ l de água bidestilada foi adicionada às amostras e o cDNA foi, posteriormente, congelado à -70°C.

A amplificação de cDNA foi realizada através da reação de polimerase em cadeia (PCR) numa solução contendo 6 μ l de cDNA, tampão de PCR 1× (GIBCO), $MgCl_2$ a 2,5mM (GIBCO), dNTPs a 1mM cada (GIBCO), água bidestilada, 0,625U de Taq polimerase (GIBCO) e 50pmoles dos “primers” 5'→3' e 3'→5' (GIBCO) para as moléculas analisadas no trabalho (tabela 1). As reações, que possuíam volume final de 25 μ l, foram levadas à máquina de PCR, sendo submetidas a um único ciclo de incubação a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 63,4°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e um ciclo de 72°C por 10 minutos, seguido de 4°C por, pelo menos, 5 minutos. Após amplificação do cDNA, as amostras foram misturadas ao tampão de corrida e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,8%. Após a corrida, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio para a visualização das bandas sob luz ultravioleta e fotografia. Os dados densitométricos das bandas são semi-quantitativos e referem-se à área ocupada por elas no gel, tal qual detectados pelo programa Scion Image. A expressão do gene para OPN foi ajustada pela densitometria do fragmento do gene para HPRT (hipoxantina-phosphoribosil-transferase), que apresenta expressão constitutiva. Os resultados foram apresentados como percentual de expressão de RNAm para OPN em células infectadas em relação a expressão em células controles. A tabela 1

mostra a seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificar os genes das moléculas correspondentes e o tamanho do fragmento amplificado.

Gene	Seqüências	Comp (pb)
HPRT	5'-AGCTTGCTGGTGAAAAGGAC-3' 5'-TTATAGTCAAGGGCATATCC-3'	104
OPN	5'-GTGATAGCT TGGCTTATGGACTGA-3' 5'-AACTGTGTT TTTGCCTCTTCTTTA-3'	472

Tabela 1

4.6 INFECÇÃO *in vivo* DE CAMUNDONGOS POR LEISHMANIA

Camundongos da linhagem CBA/J foram infectados pela inoculação subcutânea na pata traseira direita de 5×10^6 parasitos (*L. major* ou *L. amazonensis*) em fase estacionária de crescimento ou inoculados com 20µl de solução salina estéril. Após 6, 24, 72 horas e 7 dias de infecção, 3 animais de cada grupo foram sacrificados e foi retirado o coxim plantar da pata infectada e o linfonodo de drenagem da lesão.

4.7 DETECÇÃO DE OPN POR IMUNOHISTOQUÍMICA

A detecção de OPN foi realizada no coxim plantar da pata infectada e no linfonodo de drenagem da lesão. As lâminas foram desparafinizadas por banhos em xilol, e hidratadas progressivamente em concentrações decrescentes de álcool e incubadas para o bloqueio da peroxidase endógena com uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,5% em PBS, por 20 minutos. Em seguida, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas, utilizando leite desnatado 10% em PBS por 10

minutos e foi adicionado o anticorpo primário na concentração de 1:50 (LF175 – um policlonal produzido em coelho anti-OPN recombinante de camundongo, gentilmente cedido por Dr. Larry Fisher – NIH/NIDCR) diluído em soro de camundongo normal 10% em PBS por, no mínimo, 18 horas à 4°C. Após a incubação, foram feitas lavagens com PBS/Tween 0,1% (2X de 5 minutos) e as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado (anti-IgG de coelho produzido em cabra/DAKO) diluído em soro de cabra normal a 10% em PBS por 30 minutos a 37°C. As lâminas foram novamente lavadas com PBS/Tween 0,1% (2X de 5 minutos) e incubadas por 30 minutos a 37°C com streptoavidina peroxidase (PEARCE) diluída 1:500 em PBS. Em seguida, as lâminas foram lavadas novamente com PBS (2X de 5 minutos) e submetidas a revelação, utilizando a solução reveladora do kit DAKO Envision. A revelação foi acompanhada em microscópio ótico durante, no máximo, 1 minuto; sendo interrompida com banho em água destilada. Após a revelação, as lâminas foram lavadas em água corrente e em água destilada, contracoradas com hematoxilina de Harris e montadas em bálsamo do Canadá.

4.8 ANÁLISE DAS CÉLULAS POSITIVAS EM LINFONODOS DE DRENAGEM E NOS INFILTRADOS INFLAMATÓRIOS DAS LESÕES

Após as reações de imunohistoquímica, as lâminas foram analisadas em estudo cego por Taís Fontoura de Almeida e por uma patologista experiente, Dra. Tânia Correia Silva, e classificadas de maneira quantitativa. Para avaliar a quantidade de células positivas no infiltrado inflamatório das lesões, foi contabilizado o número de células OPN positivas dentre um mínimo de 200 e máximo de 400 células mononucleares contadas no infiltrado inflamatório, a depender do tamanho de cada infiltrado. Em linfonodos de drenagem das lesões foram contabilizadas todas as células

positivas presentes no órgão. As lâminas com reações positivas de cada animal (3 réplicas) foram avaliadas em conjunto. Em todos os tempos após a infecção, a quantidade de células positivas foi expressa em relação à quantidade de células positivas no grupo controle.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparação entre os grupos foi utilizado One-way ANOVA e os pós-testes de Newman-Keuls e Bonferroni e a análise da relação entre a expressão de RNAm para OPN com o tempo ou o percentual de infecção foi feita através de regressão linear simples (programa GraphPad Prism, versão 4.00 - GraphPad Software Incorporate). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Para validar o modelo, anteriormente descrito (Gomes *et al.*, 2003), de infecção de macrófagos por *L. amazonensis* ou *L. major in vitro* foi avaliada a cinética de infecção. As células foram incubadas em presença de promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. major* em fase estacionária por períodos de 3 e 6 horas. Após 6 horas de infecção, as células foram lavadas e re-incubadas por adicionais 12, 24, 48 e 72 horas. Em cada período de tempo, foram determinados o percentual de células infectadas e o número de amastigotas por macrófago. Foi observado que no tempo de 3 horas após a infecção, o percentual de infecção e a carga parasitária foi similar em macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* (fig. 1A e B). No tempo de 6 horas após a infecção, o percentual de macrófagos infectados por *L. amazonensis* foi 4 vezes maior em relação ao percentual de células infectadas por *L. major* e essa diferença se manteve durante todo o curso da infecção (fig. 1A). A avaliação da carga parasitária mostrou que o número de amastigotas de *L. amazonensis* por macrófago foi 2 a 3 vezes maior do que o de amastigotas de *L. major* (fig. 1B), evidenciando que as diferenças na carga parasitária acompanham o observado para o percentual de macrófagos infectados (fig. 1A e B).

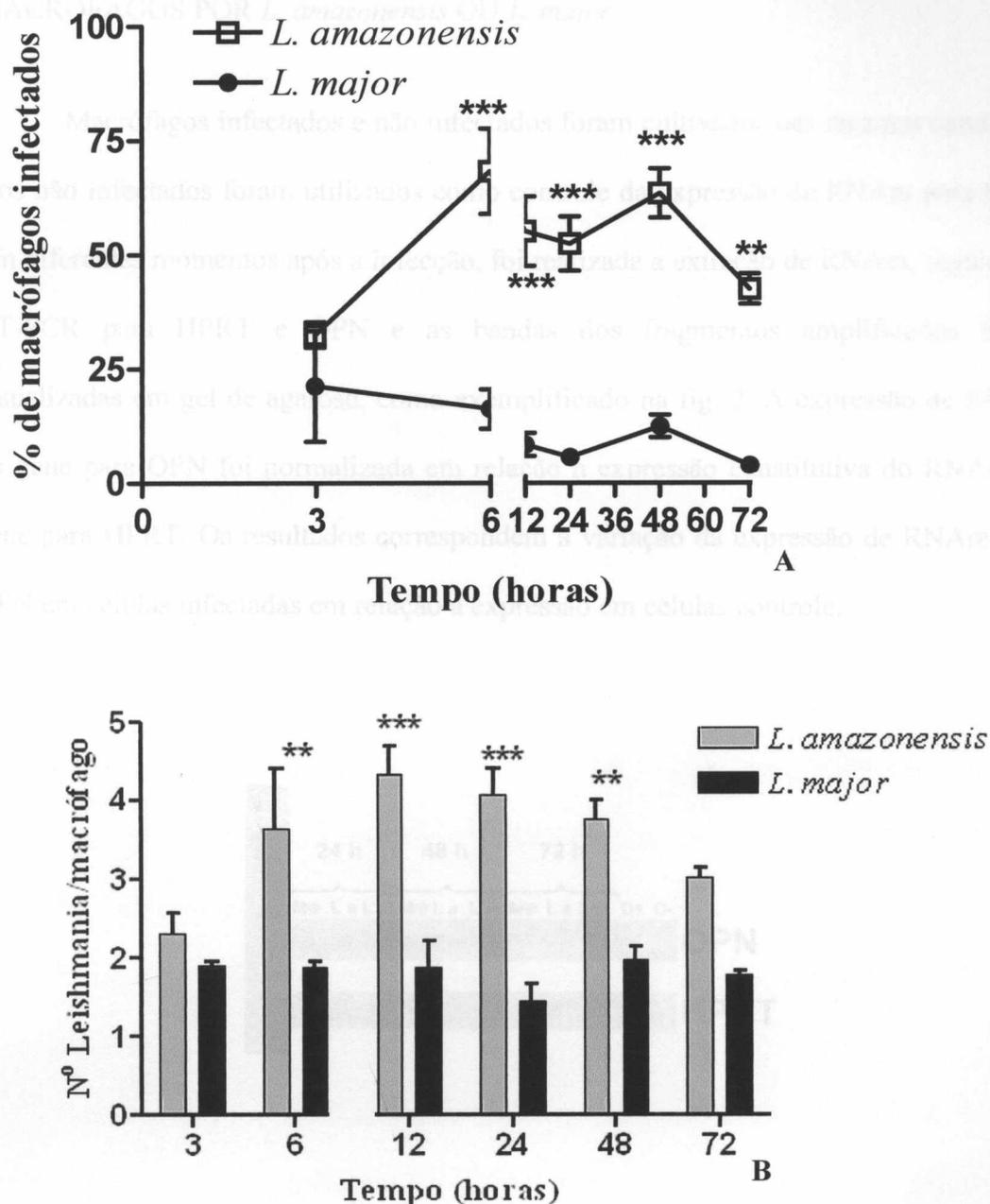


Figura 1 – Cinética da infecção de macrófagos por *L. amazonensis* ou *L. major*.

Macrófagos peritoneais inflamatórios foram incubados com promastigotas de *L. major* ou *L. amazonensis* em fase estacionária, na proporção de 10 parasitos/macrófago. Após 6 horas de pulso, as culturas foram lavadas com meio RPMI Hepar e re-incubadas por mais 12, 24, 48 e 72 horas em DMEM completo. Após fixação nos tempos indicados, foi realizada a contagem para determinação do percentual de células infectadas (A) e do número de amastigotas por macrófago (B). Esses dados correspondem à média de 3 experimentos em triplicata. A análise comparativa através de ANOVA e do pós-teste de Bonferroni evidenciou diferenças significativas entre os grupos (** $p=0,01$, *** $p=0,001$, $n=3$).

5.1 EXPRESSÃO DE RNAm PARA OPN E HPRT NA INFECÇÃO *in vitro* DE MACRÓFAGOS POR *L. amazonensis* OU *L. major*

Macrófagos infectados e não infectados foram cultivados nas mesmas condições e os não infectados foram utilizados como controle da expressão de RNAm para OPN. Em diferentes momentos após a infecção, foi realizada a extração de RNAm, seguida de RT-PCR para HPRT e OPN e as bandas dos fragmentos amplificados foram visualizadas em gel de agarose, como exemplificado na fig. 2. A expressão de RNAm do gene para OPN foi normalizada em relação à expressão constitutiva do RNAm do gene para HPRT. Os resultados correspondem à variação da expressão de RNAm para OPN em células infectadas em relação à expressão em células controle.

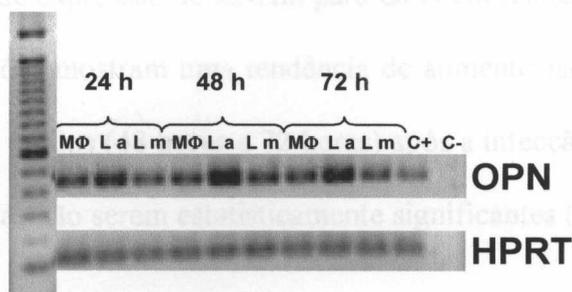


Figura 2 – Avaliação da expressão de OPN por RT-PCR. Gel ilustrativo do padrão de bandas obtidas por PCR. Macrófagos foram cultivados e infectados como descrito na fig. 1. Em diferentes momentos após a infecção, foi realizada a extração de RNAm, seguida de RT-PCR para HPRT e OPN e as bandas dos fragmentos amplificados correspondem ao produto de amplificação da expressão gênica para HPRT (104 pb) e OPN (472 pb). Cada linha corresponde ao produto de PCR de uma amostra dos tempos de 24, 48 e 72 horas após a infecção. Macrófagos estimulados por IFN- γ foram utilizados como controle positivo (C+) e água como controle negativo (C-) da reação de PCR.

No tempo de 3 horas após a infecção, foi observada uma discreta inibição da expressão de RNAm para OPN tanto em resposta à infecção por *L. major* quanto por *L. amazonensis* (fig. 3). Após 6 horas de infecção, a expressão de RNAm para OPN em macrófagos infectados se mostrou aumentada independente da espécie de *Leishmania* utilizada. Em células infectadas por *L. amazonensis* observou-se um aumento de $28,9\% \pm 11,98$ (n=3) e em células infectadas por *L. major* o aumento foi de $25,6\% \pm 4,39$ (n=3) em relação às células controles. A análise da expressão de OPN nos tempos de 12 e 24 horas após a infecção mostra uma estabilização nos níveis de RNAm correspondente tanto em células infectadas por *L. amazonensis* como por *L. major*. Já nos tempos mais tardios de infecção (48 e 72 horas) não se observou diferenças de expressão de RNAm em células infectadas por *L. major*, enquanto que, a partir de 48 horas, as células infectadas por *L. amazonensis* voltaram a apresentar um aumento de cerca de $34,5\% \pm 35,1$ (n=3) nos níveis de expressão de RNAm para OPN em relação às células controles. Em resumo, as variações mostram uma tendência de aumento na expressão de RNAm para OPN nos tempos tardios (48 horas e 72 horas) após a infecção por *L. amazonensis*, apesar dessas diferenças não serem estatisticamente significantes (p=0,6196 e p=0,1974, respectivamente).

Uma vez que foi observada uma tendência de aumento na expressão de RNAm para OPN ao longo da infecção por *L. amazonensis*, foram realizados estudos de correlação para avaliar se havia relação entre o percentual de infecção de macrófagos e a expressão de RNAm para OPN em células infectadas e estudos de regressão linear para avaliar a dependência da expressão de RNAm para OPN em relação ao tempo de infecção por *Leishmania*. Não foi possível observar correlação entre a infecção e a expressão de RNAm para OPN nem na infecção de células por *L. amazonensis* (r= 0,2676 , p= 0,3163) nem na infecção de células por *L. major* (r= -0,06176, p= 0,8202).

Além disso, não foi possível observar relação entre a expressão de RNAm para OPN na infecção por *L. major* e o tempo de infecção destas células ($r^2=0,1612$, $p=0,1232$). Entretanto, a tendência ao aumento progressivo na expressão de RNAm para OPN na infecção por *L. amazonensis* foi dependente do tempo de infecção dos macrófagos (fig. 4; $r^2=0,2564$, $p=0,0454$).

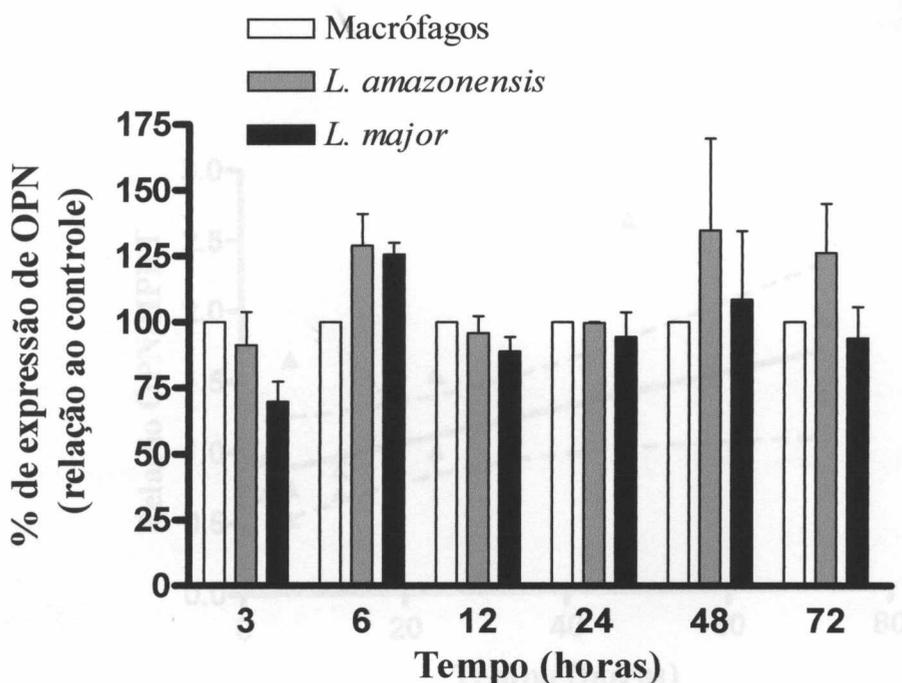


Figura 3 – Cinética da expressão de RNAm para OPN durante a infecção de macrófagos por *L. amazonensis* ou *L. major*. Detecção de RNAm para OPN e HPRT após a infecção de macrófagos por *L. amazonensis* ou *L. major*. A expressão gênica em macrófagos não infectados e cultivados em paralelo nas mesmas condições foi utilizada como controle e sua expressão considerada 100%. As barras representam a relação entre a expressão de RNAm em macrófagos infectados e a expressão de RNAm em macrófagos não infectados. Esses dados correspondem à média de 3 experimentos. A análise comparativa através de ANOVA não evidenciou diferenças significativas entre os grupos ($p= 0,189$, $n=3$).

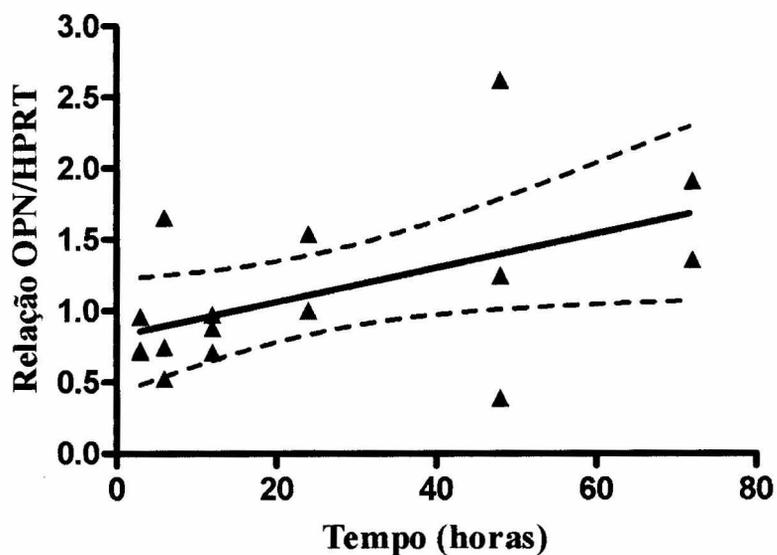


Figura 4 – Relação entre a expressão de RNAm para OPN e o tempo de infecção de macrófagos por *L. amazonensis*. Relação entre o percentual de expressão de RNAm para OPN e o tempo de infecção de macrófagos por *L. amazonensis*. Os triângulos representam dados de 2 ou 3 experimentos independentes. A análise através de regressão linear indica uma tendência linear de fraca associação e estatisticamente significativa ($r^2 = 0,2564$, $p = 0,0454$).

5.2 IDENTIFICAÇÃO DE OPN EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE INFILTRADO INFLAMATÓRIO DE CAMUNDONGOS CBA/J INFECTADOS POR *L. amazonensis* OU *L. major*

Camundongos CBA/J foram infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* e, após diferentes momentos da infecção, foram sacrificados e os coxins plantares retirados. Animais inoculados com solução salina estéril foram utilizados como controles. Foi realizada a imunohistoquímica para marcação de OPN e, em seguida, as lâminas foram analisadas quantitativamente a fim de avaliar diferenças na expressão de OPN entre os diferentes grupos e tempos estudados.

Foi observada marcação positiva para OPN na matriz extracelular e em diferentes tipos celulares presentes no coxim plantar tanto de animais infectados como de camundongos controles. Algumas células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos, poucas células musculares e também células mononucleares inflamatórias apresentaram marcação para OPN. Entretanto, foi determinado apenas o percentual de expressão de células mononucleares positivas para OPN no infiltrado inflamatório.

O número de células positivas para OPN no grupo controle foi usado como referência para avaliar a capacidade das duas espécies de *Leishmania* em alterar a expressão da proteína durante a reposta inflamatória local no decorrer da infecção. Foi observado um aumento no número de células mononucleares expressando ou não OPN, indicando que houve aumento progressivo do número de células no infiltrado inflamatório local (dado não mostrado).

Na infecção por *L. major* foi possível observar uma inibição mais evidente da expressão de OPN nos tempos de 24 horas e 7 dias após a infecção; enquanto nos tempos de 6 horas e 72 horas após a infecção, a quantidade de células marcadas foi similar ao controle (fig. 5).

Na infecção por *L. amazonensis* foi possível observar uma inibição na expressão de OPN em todos os tempos analisados em relação aos animais injetados com solução salina, com exceção do tempo de 72 horas, onde não há diferenças (fig. 5). Essa inibição é mais acentuada 6 horas após a infecção, quando também se observa uma redução estatisticamente significativa em relação ao grupo infectado por *L. major* (fig. 5; $p=0,0025$).

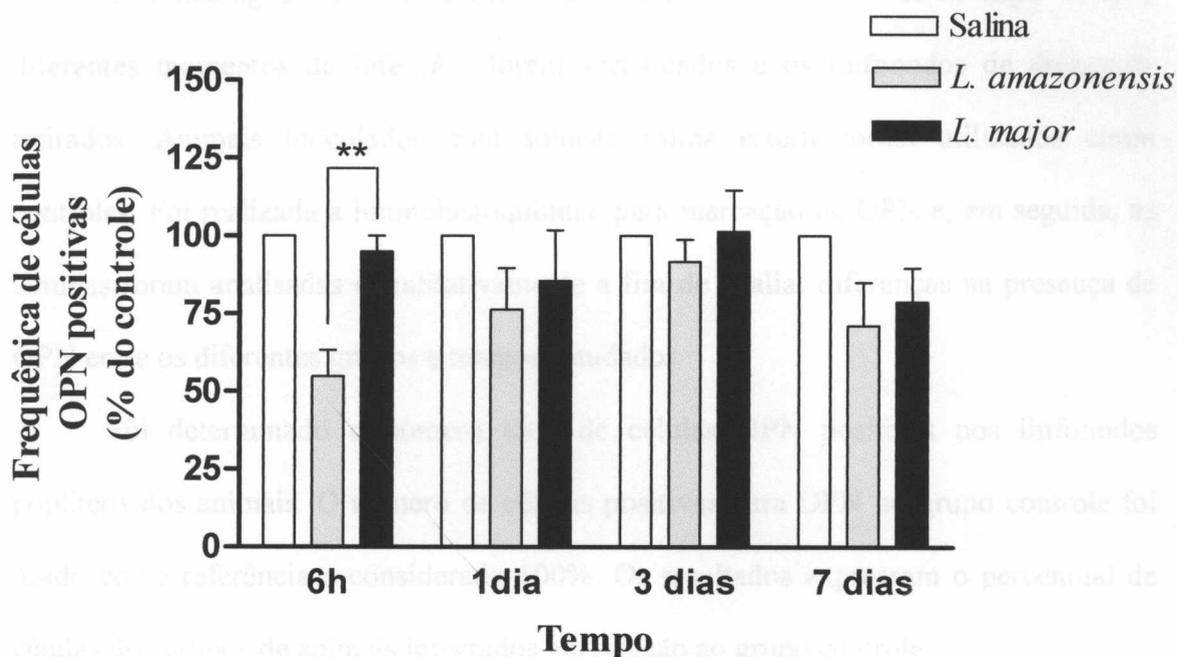


Figura 5 – Frequência de células positivas para OPN durante a infecção *in vivo* por *L. amazonensis* ou *L. major*. Percentual de células expressando OPN em lesões de pata decorrentes da infecção por *L. amazonensis* ou *L. major*. A frequência de células positivas para OPN em células mononucleares de infiltrados inflamatórios de animais não infectados foi considerada como padrão de expressão (100%). As barras representam a relação entre o percentual de células OPN positivas quantificadas em animais infectados e o grupo controle. Esses dados correspondem à média de 3 animais por grupo. A análise comparativa através de ANOVA e do pós-teste de Newman-Keuls evidenciou diferenças significativas no tempo de 6 horas após a infecção ($p= 0,0025$, $n=3$).

5.3 IDENTIFICAÇÃO DE OPN EM LINFONODOS POPLÍTEOS DE CAMUNDONGOS CBA/J INFECTADOS POR *L. amazonensis* OU *L. major*

Camundongos CBA/J foram infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* e, após diferentes momentos da infecção, foram sacrificados e os linfonodos de drenagem retirados. Animais inoculados com solução salina estéril foram utilizados como controles. Foi realizada a imunohistoquímica para marcação de OPN e, em seguida, as lâminas foram analisadas quantitativamente a fim de avaliar diferenças na presença de OPN entre os diferentes grupos e tempos estudados.

Foi determinado o número total de células OPN positivas nos linfonodos poplíteos dos animais. O número de células positivas para OPN no grupo controle foi usado como referência e considerado 100%. Os resultados expressam o percentual de células dos grupos de animais infectados em relação ao grupo controle.

No tempo de 6 horas após a infecção, não foi observada célula positiva para OPN nos linfonodos poplíteos em nenhum dos grupos analisados (dado não mostrado). Contudo, células apresentando OPN passaram a ser detectadas um dia após a infecção por *L. amazonensis* ou *L. major*. Em todos os grupos, as células OPN positivas apresentaram um aspecto comum: eram células grandes, de citoplasma amplo e com intensa marcação citoplasmática (fig. 6C). Além disso, estas células apresentaram também uma distribuição semelhante: localizavam-se em toda a região marginal do órgão e em maior concentração na região hilar.

Na infecção por *L. major* foi possível observar aumento na quantidade de células positivas para OPN a partir de três dias após a infecção. Entretanto, o percentual de células positivas para OPN nos linfonodos de drenagem dos animais infectados por *L. major* foi sempre menor em comparação ao percentual de células positivas na infecção

por *L. amazonensis* e menor ou semelhante ao percentual de células positivas no grupo controle (fig. 7).

A quantidade de células positivas para OPN foi maior que nos controles somente após a infecção por *L. amazonensis* no tempo de 7 dias após a infecção (fig. 7). Neste grupo de animais foi observado aumento no percentual de células positivas durante toda a infecção (fig. 7) quando comparado com os animais infectados por *L. major* e observou-se uma relação entre o aumento progressivo na quantidade de células positivas para OPN nos linfonodos de drenagem de animais infectados por *L. amazonensis* e o tempo de infecção (fig. 8; $r^2=0,3247$, $p=0,0266$). Além disso, a distribuição das células positivas para OPN na infecção por *L. amazonensis* foi diferente do grupo controle e do grupo infectado por *L. major*. Foi possível observar uma grande quantidade de células OPN positivas nas áreas hilares e de seios subcapsulares, mas também na área medular dos órgãos (fig. 6A e B).

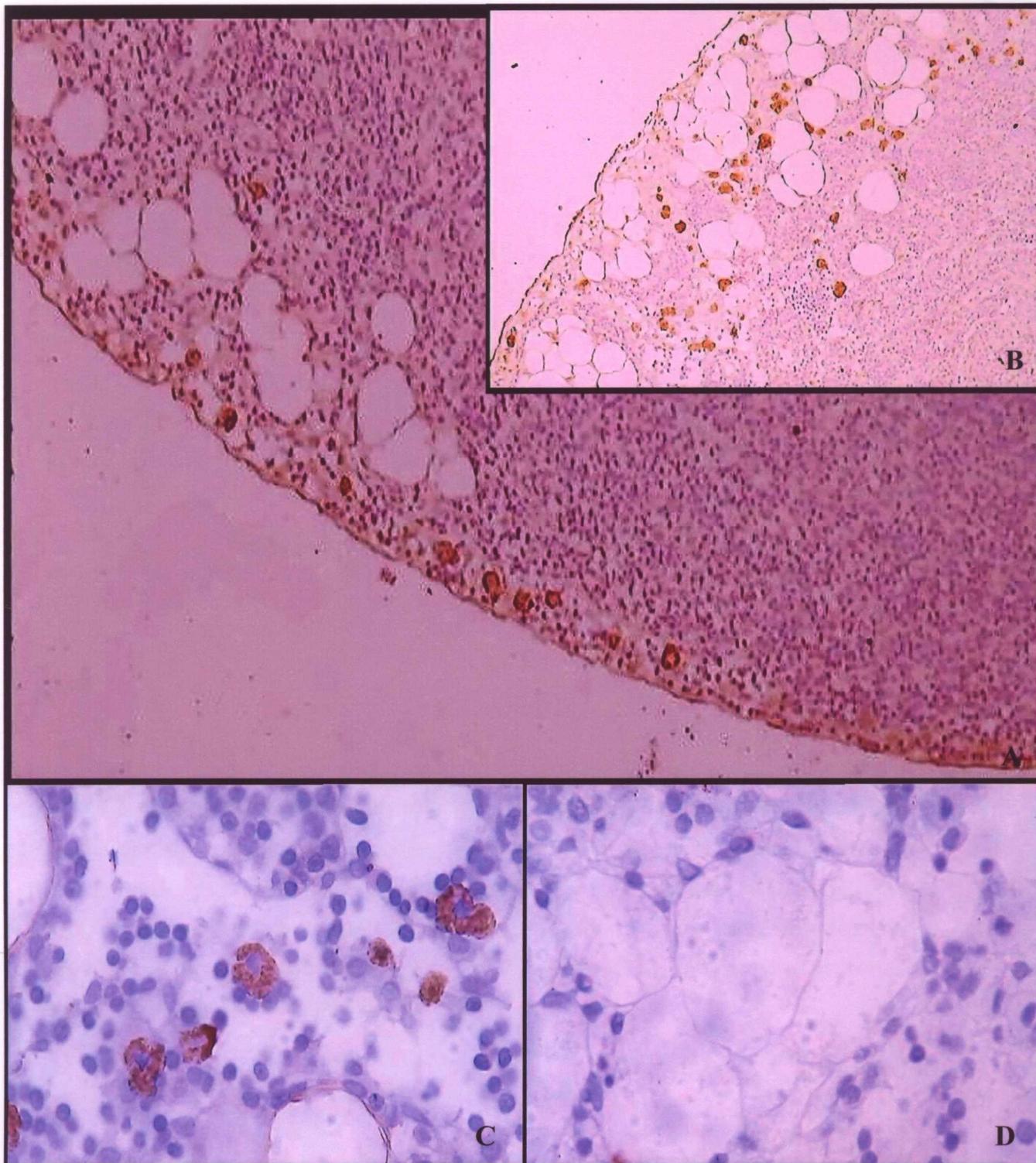


Figura 6 – Identificação de OPN durante a infecção *in vivo* por *L. amazonensis* ou *L. major*. Três dias após a infecção, é possível observar células positivas para OPN nos seios subcapsulares de linfonodos de drenagem das lesões de animais infectados por *L. major* (A) e por *L. amazonensis* (B). Células grandes e com citoplasma amplo se apresentaram intensamente positivas para OPN (C). Células incubadas com isotipo controle não apresentaram marcação (D) (Imunoperoxidase indireta/ anti-OPN – LF175 – 20x e 100x).

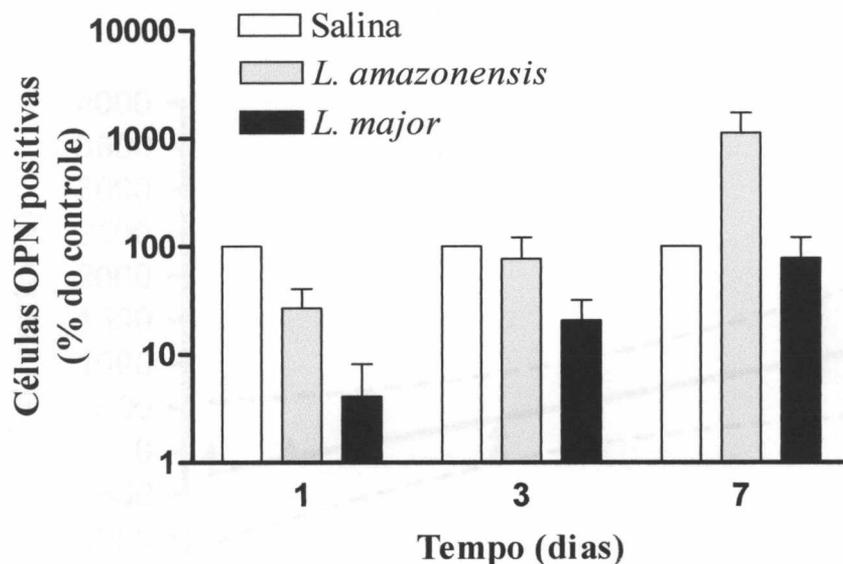


Figura 7 – Frequência de células positivas para OPN durante a infecção *in vivo* por *L. amazonensis* ou *L. major*. Expressão de OPN em linfonodos de drenagem das lesões de pata decorrentes da infecção por *L. amazonensis* ou *L. major*. A expressão de OPN em células de linfonodos poplíteos de animais não infectados foi utilizada como padrão e considerada 100%. As barras representam a relação entre o percentual de células OPN positivas em animais infectados e o grupo controle ($p= 0,0971$, $n=3-5$).

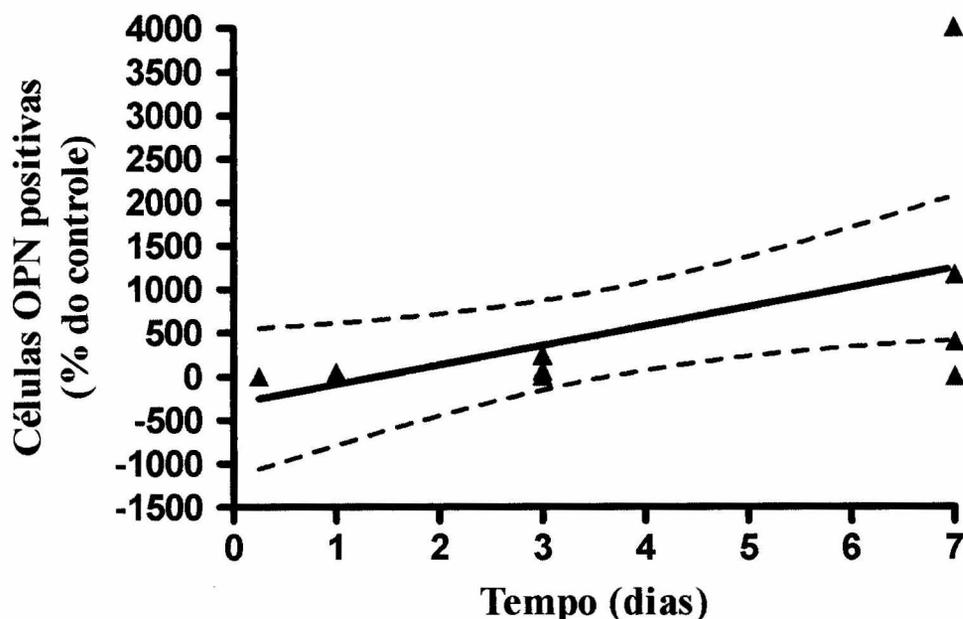


Figura 8 – Relação entre o percentual de células OPN positivas e o tempo de infecção de camundongos CBA/J por *L. amazonensis*. Relação entre o percentual de células OPN positivas em relação ao grupo controle nos linfonodos de drenagem das lesões e o tempo de infecção por *L. amazonensis*. Os triângulos representam dados de 2 a 5 animais. A análise através de regressão linear indica uma tendência linear de fraca associação e estatisticamente significativa ($r^2=0,3247$, $p=0,0266$).

6. DISCUSSÃO

OPN é uma citocina envolvida em diferentes etapas da resposta imuno-inflamatória. Existem evidências que OPN participa no recrutamento de macrófagos para o sítio de lesões e adesão de célula muscular lisa, célula endotelial e leucócitos dentro de sítios inflamatórios (Liaw *et al.*, 1995; O'Regan *et al.*, 1999; Senger *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 1990). Assim, foi observada produção aumentada de OPN em articulações no processo de artrite reumatóide (Denhardt *et al.*, 2001) e em macrófagos presentes em lesões renais (Pichler *et al.*, 1994). Em processos patológicos do rim, alta produção de OPN foi detectada em fibrose intersticial associada a glomerulonefrite, nefropatia induzida por ciclosporina e hidronefrose (Pichler *et al.*, 1994). Adicionalmente, estímulo por fMLP induz a atração de macrófagos expressando OPN e anticorpos neutralizantes para OPN bloquearam a atração desses macrófagos (Giachelli *et al.*, 1998). Entretanto, existem poucos trabalhos que evidenciam a participação de OPN em resposta a patógenos intracelulares (Nau *et al.*, 1997).

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar o perfil de expressão de OPN no modelo do camundongo CBA/J, que controla a infecção por *L. major* e é susceptível à *L. amazonensis*. Foi observado que há uma maior expressão de OPN tanto durante a infecção *in vitro* de macrófagos como nos linfonodos de animais infectados por *L. amazonensis* e que o aumento na expressão desta proteína é dependente do tempo de infecção por esta espécie de *Leishmania*.

Anteriormente, demonstramos que macrófagos de camundongo CBA/J seguem o padrão do modelo *in vivo*, sendo capazes de controlar *L. major*, mas não *L. amazonensis in vitro* (Gomes *et al.*, 2003). No trabalho atual observamos a tendência ao aumento na indução tardia (48 e 72 horas) da expressão de RNAm para OPN em macrófagos infectados por *L. amazonensis in vitro*. Essa diferença apesar de não ser estatisticamente

significante ($p=0,189$) sugere uma possível participação de OPN na resposta de susceptibilidade destas células à *L. amazonensis*. Essa sugestão é apoiada pela análise de regressão linear, que mostrou uma relação de dependência da expressão de RNAm para OPN com o tempo de infecção por *L. amazonensis* (fig. 4; $r^2=0,2564$, $p=0,0454$), indicando que a maior expressão de RNAm para OPN em macrófagos infectados por *L. amazonensis* pode ser biologicamente relevante.

A detecção de RNAm não garante que houve a produção da proteína. Porém, a expressão de RNAm se correlaciona com a produção de OPN e foi observado que RNAm e proteína podem ser simultaneamente detectados (Murry *et al.*, 1994). Trabalhos em andamento no nosso laboratório têm como objetivo identificar a expressão da proteína OPN em células infectadas, através de imunoblotting e ELISA.

Independente da espécie de Leishmania, até três dias após a infecção de camundongos CBA/J observou-se infiltrado predominantemente macrófágico no sítio de inoculação dos parasitos. Contudo, a partir de 7 dias após a infecção, observou-se diferenças progressivas nos infiltrados inflamatórios desses animais. Em camundongos infectados por *L. major* observa-se um infiltrado mononuclear misto, com aumento progressivo do número de linfócitos na lesão, que culmina com a cura espontânea das lesões. Por outro lado, na infecção por *L. amazonensis* observa-se infiltrado macrófágico difuso, com intenso parasitismo, seguido de disseminação dos parasitos e morte desses animais (Lemos de Souza *et al.*, 2000). Os mecanismos responsáveis pelas diferenças na composição de células do infiltrado inflamatório destes e de outras linhagens de camundongos ainda não foram amplamente explorados. Em camundongos susceptíveis C57BL/6, foi demonstrado que apesar da grande quantidade de macrófagos nas lesões de pata de camundongos infectados por *L. amazonensis* não havia expressão de RNAm para RANTES/CCL5, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4 e MIP-2/CXCL2

(quimiocinas que atraem macrófagos) até 4 semanas após a infecção (Ji *et al.*, 2003). Portanto, no presente estudo, buscamos avaliar a expressão de OPN em sítios inflamatórios de lesões de pata baseados na hipótese de que OPN teria participação na atração de macrófagos para as lesões nos camundongos infectados. OPN não é expressa constitutivamente por macrófagos residentes de diferentes tecidos, inclusive da pele (Murry *et al.*, 1994). A expressão de OPN em macrófagos é induzida por diferentes estímulos fisiológicos. Entretanto, em condições patológicas, OPN é também expressa por vários tipos celulares, inclusive células musculares lisas, células endoteliais, linfócitos T, células de músculo esquelético e fibroblastos (Giachelli *et al.*, 1998).

No presente trabalho, uma vez que foi observada a expressão de OPN no grupo controle, é possível que a simples injeção da agulha e do veículo (solução salina estéril) seja um estímulo inflamatório que promova a expressão de OPN. Além disso, nos coxins plantares, não foi observada diferença na quantidade de células expressando OPN tanto no grupo controle quanto nos grupos de camundongos infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* a partir de 24 horas após a infecção. É possível que a quantificação apenas de células mononucleares inflamatórias não reflita a expressão de OPN nas lesões, já que, corroborando dados descritos na literatura (Patarca *et al.*, 1989; Weber *et al.*, 1996), observamos OPN em matriz extracelular e em outros tipos celulares, como células endoteliais e fibroblastos. A avaliação da expressão de OPN por imunofluorescência e microscopia confocal poderia nos permitir uma quantificação mais precisa da proteína tanto intra como extracelular. Adicionalmente, é possível que a detecção de diferenças se torne possível apenas em tempos mais tardios após a infecção, quando as diferenças na quantidade de macrófagos no sítio inflamatório são mais evidentes (Lemos de Souza *et al.*, 2000).

Em tempos bem iniciais após a infecção (6 horas), foi observado que a lesão de animais infectados com *L. amazonensis* apresentava um número menor de células expressando OPN, sugerindo que este parasito inibe a expressão desta proteína. Essa inibição pontual pode estar relacionada com retardo no recrutamento inicial de macrófagos para os sítios inflamatórios. Uma outra possibilidade seria que as células recrutadas inibissem a expressão desta proteína, com diminuição temporária de sua ativação. De fato, foi demonstrado que, na ausência de OPN, macrófagos podem compor infiltrados inflamatórios de lesões, entretanto não são eficientemente ativados, o que foi evidenciado por alta expressão do receptor manose e pela sua baixa capacidade fagocítica (Liaw *et al.*, 1998).

De acordo com o observado *in vitro*, a partir de um dia após a infecção, a quantidade de células positivas para OPN é maior em linfonodos de drenagem de animais infectados por *L. amazonensis* do que por *L. major*. Durante todo o período analisado, a quantidade de células positivas para OPN foi maior na infecção por *L. amazonensis* do que na infecção por *L. major* (fig. 7), mas essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,0971$). Entretanto, a análise de regressão linear mostrou que há relação entre o tempo de infecção por *L. amazonensis* e a quantidade de células positivas para OPN nos linfonodos de drenagem (fig. 8; $r^2=0,3247$, $p=0,0266$), sugerindo que *L. amazonensis* pode modular o recrutamento destas células no decorrer da infecção. Estudos anteriores demonstraram que tanto RNAm para OPN quanto a proteína não são detectados em linfonodos de ratos normais (Murry *et al.*, 1994). Realmente, nossos dados mostraram que há ausência da marcação positiva para OPN em células dos linfonodos poplíteos de camundongos de todos os grupos estudados, no tempo de 6 horas após a infecção, e aparecimento de células positivas, a partir de 24 horas após a infecção (fig. 7), o que nos permite especular que as células positivas para

OPN foram recrutadas ou migraram para este órgão linfóide secundário. OPN foi descrita como uma molécula que medeia interação célula-célula e célula-matriz, resultando em “homing” de células imunes, osteócitos ou células tumorais para vários locais (Weber *et al.*, 1996). Em nossas observações, as células positivas para OPN possuíam características singulares em relação à disposição no órgão (fig. 6), estando presentes predominantemente em áreas de seios subcapsulares. Além disso, algumas células positivas para OPN em linfonodos poplíteos de animais infectados por *L. amazonensis* pareciam conter parasitos no seu interior (dados não mostrados) e, em tempos mais tardios após a infecção, foi possível identificar células positivas também nos seios medulares do órgão. É possível que estas células positivas para OPN tenham migrado a partir do infiltrado inflamatório das lesões. Entretanto, é necessária a realização de uma fenotipagem para identificar o tipo celular e fornecer dados mais conclusivos sobre a sua origem.

Os grupos experimentais utilizados para a infecção *in vivo* apresentaram uma certa variação na resposta individual dos camundongos estudados. Por outro lado, o fato de não haver diferenças estatisticamente significativas entre os grupos não implica que as diferenças encontradas não tenham significado biológico. A aplicação de estudos funcionais através da inibição desta proteína, bloqueando com anticorpo específico, inibição de seu RNAm, pela técnica de RNA interferente ou inibição de seu gene, utilizando animais “knockouts” poderia auxiliar na compreensão do papel de OPN nos mecanismos que envolvem recrutamento de macrófagos na infecção por *Leishmania*. Por outro lado, o aumento do número de animais e a repetição dos experimentos se fazem necessários para que os resultados atuais possam ser confirmados e ampliados.

O conjunto dos dados apresentados sugere que OPN está envolvida na resposta de susceptibilidade de camundongos CBA/J à infecção por *L. amazonensis* e aponta

para a necessidade de ampliar o conhecimento sobre o papel desta proteína no contexto da infecção por *Leishmania*.

7. CONCLUSÃO

1. Em tempos tardios, a infecção por *L. amazonensis* induz maior expressão de OPN *in vitro* em macrófagos inflamatórios e o aparecimento *in vivo* de maior número de células positivas para OPN em linfonodos de drenagem de camundongos infectados quando comparada à infecção por *L. major*.

2. A expressão diferencial de OPN na infecção por *L. amazonensis* em relação à infecção por *L. major* sugere sua contribuição para a resposta de susceptibilidade na infecção por *Leishmania* no modelo do CBA/J.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect. Immun.**, **61**: 2952-2959, 1993.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. Leishmania species: models of intracellular parasitism. **J. Cell Sci.**, **112**: 2993-3002, 1999.

ALMEIDA, T. **Caracterização dos leucócitos e da produção de quimiocinas envolvidas na resposta imuno-inflamatória *in situ* de camundongos CBA infectados com *Leishmania major* ou *Leishmania amazonensis***. 2002. 79 f. Dissertação (Monografia em Ecologia - Recursos Ambientais)). Ciências Biológicas, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

ANDRADE, Z. A.; REED, S. G.; ROTERS, S. B.; SADIGURSKY, M. Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Pathol.**, **114**: 137-148, 1984.

ASHKAR, A. A.; ROSENTHAL, K. L. Toll-like receptor 9, CpG DNA and innate immunity. **Curr. Mol. Med.**, **2**: 545-556, 2002.

ASHKAR, S.; TELOW, D. B.; GLIMCHER, M. J.; SAAVEDRA, R. A. *In vitro* phosphorylation of mouse osteopontin expressed in *E. coli*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **191**: 126-133, 1993.

ASHKAR, S.; WEBER, G. F.; PANOUTSAKOPOULOU, V.; SANCHIRICO, M. E.; JANSSON, M.; ZAWAIDEH, S.; RITTLING, S. R.; DENHARDT, D. T.; GLIMCHER, M. J.; CANTOR, H. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. **Science**, **287**: 860-864, 2000.

BADOLATO, R.; SACKS, D. L.; SAVOIA, D.; MUSSO, T. *Leishmania major*: infection of human monocytes induces expression of IL-8 and MCAF. **Exp. Parasitol.**, **82**: 21-26, 1996.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C. E.; SKEIKY, Y. A.; ELLINGSWORTH, L. R.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**, **257**: 545-548, 1992.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **44**: 536-546, 1991.

BARRAL, A.; PETERSEN, E. A.; SACKS, D. L.; NEVA, F. A. Late metastatic Leishmaniasis in the mouse. A model for mucocutaneous disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **32**: 277-285, 1983.

BEHIN, R.; MAUEL, J.; SORDAT, B. *Leishmania tropica*: pathogenicity and *in vitro* macrophage function in strains of inbred mice. **Exp. Parasitol.**, **48**: 81-91, 1979.

BELKAID, Y.; BUTCHER, B.; SACKS, D. L. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. **Eur. J. Immunol.**, **28**: 1389-1400, 1998.

BITTENCOURT, A. L.; BARRAL-NETTO, M. LEISHMANIASIS. In: DOERR, W.; SEIFERT, G. (Ed.). **Tropical Pathology**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. Leishmaniasis, p.597-651.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **Int. J. Parasitol.**, **28**: 121-134, 1998.

BOGDAN, C.; STENGER, S.; ROLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Cytokine interactions in experimental cutaneous leishmaniasis. Interleukin 4 synergizes with

interferon-gamma to activate murine macrophages for killing of *Leishmania major* amastigotes. **Eur. J. Immunol.**, **21**: 327-333, 1991.

BRASIL Ministério da Saúde. Guia de doenças. 2002. Disponível em:<<http://www.funasa.gov.br/>>. Acesso em: 24 set. 2002.

BRITTINGHAM, A.; MORRISON, C. J.; MCMASTER, W. R.; MCGWIRE, B. S.; CHANG, K. P.; MOSSER, D. M. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **J. Immunol.**, **155**: 3102-3111, 1995.

CARLSON, I.; TOGNAZZI, K.; MANSEAU, E. J.; DVORAK, H. F.; BROWN, L. F. Osteopontin is strongly expressed by histiocytes in granulomas of diverse etiology. **Lab. Invest.**, **77**: 103-108, 1997.

CARVALHAL, D. G.; BARBOSA JUNIOR, A.; D'EL-REI HERMIDA, M.; CLARENCIO, J.; PINHEIRO, N. F., JR.; VERAS, P. S.; DOS-SANTOS, W. L. The modelling of mononuclear phagocyte-connective tissue adhesion *in vitro*: application to disclose a specific inhibitory effect of *Leishmania* infection. **Exp. Parasitol.**, **107**: 189-199, 2004.

CHATELAIN, R.; VARKILA, K.; COFFMAN, R. L. IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. **J. Immunol.**, **148**: 1182-1187, 1992.

CHILDS, G. E.; LIGHTNER, L. K.; MCKINNEY, L.; GROVES, M. G.; PRICE, E. E.; HENDRICKS, L. D. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **78**: 25-34, 1984.

COUTINHO, S. G.; PIRMEZ, C.; MENDONÇA, S. C. F.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; DÓREA, R. C. C. Pathogenesis and immunopathology of *Leishmania*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **82**: 214-218, 1987.

DENHARDT, D. T.; GIACHELLI, C. M.; RITTLING, S. R. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **41**: 723-749, 2001.

DING, A.; NATHAN, C. F.; GRAYCAR, J.; DERYNCK, R.; STUEHR, D. J.; SRIMAL, S. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-beta 1 -beta 2 and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. **J. Immunol.**, **145**: 940-944, 1990.

EDDY, A. A.; GIACHELLI, C. M. Renal expression of genes that promote interstitial inflammation and fibrosis in rats with protein-overload proteinuria. **Kidney Int.**, **47**: 1546-1557, 1995.

FIorentino, D. F.; ZLOTNIK, A.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T. R.; HOWARD, M.; MOORE, K. W.; O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J. Immunol.**, **146**: 3444-3451, 1991.

FORTIER, A. H.; HOOVER, D. L.; NACY, C. A. Intracellular replication of *Leishmania tropica* in mouse peritoneal macrophages: amastigote infection of resident cells and inflammatory exudate macrophages. **Infect. Immun.**, **38**: 1304-1308, 1982.

GIACHELLI, C. M.; LOMBARDI, D.; JOHNSON, R. J.; MURRY, C. E.; ALMEIDA, M. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli *in vivo*. **Am. J. Pathol.**, **152**: 353-358, 1998.

GIACHELLI, C. M.; PICHLER, R.; LOMBARDI, D.; DENHARDT, D. T.; ALPERS, C. E.; SCHWARTZ, S. M.; JOHNSON, R. J. Osteopontin expression in angiotensin II-induced tubulointerstitial nephritis. **Kidney Int.**, **45**: 515-524, 1994.

GOMES, I. N.; CALABRICH, A. F.; TAVARES RDA, S.; WIETZERBIN, J.; DE FREITAS, L. A.; VERAS, P. S. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. **Microbes Infect.**, **5**: 251-260, 2003.

GRIMALDI JUNIOR, G.; MORIEARTY, P. L.; HOFF, R. *Leishmania mexicana*: immunology and histopathology in C3H mice. **Exp Parasitol**, **50**: 45-56, 1980.

HEINZEL, F. P.; SCHOENHAUT, D. S.; RERKO, R. M.; ROSSER, L. E.; GATELY, M. K. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, **177**: 1505-1509, 1993.

JANEWAY, C. A., JR.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, **20**: 197-216, 2002.

JANSSON, M.; PANOUTSAKOPOULOU, V.; BAKER, J.; KLEIN, L.; CANTOR, H. Cutting edge: Attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis in eta-1/osteopontin-deficient mice. **J. Immunol.**, **168**: 2096-2099, 2002.

JI, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. **Infect. Immun.**, **71**: 4278-4288, 2003.

LEMOS DE SOUZA, V.; ASCENCAO SOUZA, J.; CORREIA SILVA, T. M.; SAMPAIO TAVARES VERAS, P.; RODRIGUES DE-FREITAS, L. A. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. **Microbes Infect.**, **2**: 1807-1815, 2000.

LIAW, L.; BIRK, D. E.; BALLAS, C. B.; WHITSITT, J. S.; DAVIDSON, J. M.; HOGAN, B. L. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). **J. Clin. Invest.**, **101**: 1468-1478, 1998.

LIAW, L.; LINDNER, V.; SCHWARTZ, S. M.; CHAMBERS, A. F.; GIACHELLI, C. M. Osteopontin and beta 3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro. **Circ. Res.**, **77**: 665-672, 1995.

- LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **J. Immunol.**, **145**: 4306-4310, 1990.
- LIEW, F. Y.; MILLOTT, S.; LI, Y.; LELCHUK, R.; CHAN, W. L.; ZILTENER, H. Macrophage activation by interferon-gamma from host-protective T cells is inhibited by interleukin (IL)3 and IL4 produced by disease-promoting T cells in leishmaniasis. **Eur. J. Immunol.**, **19**: 1227-1232, 1989.
- LUSTER, A. D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N Engl. J. Med.**, **338**: 436-445, 1998.
- MAZZALI, M.; KIPARI, T.; OPHASCHAROENSUK, V.; WESSON, J. A.; JOHNSON, R.; HUGHES, J. Osteopontin--a molecule for all seasons. **QJM**, **95**: 3-13, 2002.
- MCKEE, M. D.; NANJI, A. Secretion of Osteopontin by macrophages and its accumulation at tissue surfaces during wound healing in mineralized tissues: a potential requirement for macrophage adhesion and phagocytosis. **Anat. Rec.**, **245**: 394-409, 1996.
- MITCHELL, G. F.; CURTIS, J. M.; HANDMAN, E. Resistance to cutaneous leishmaniasis in genetically susceptible BALB/c mice. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, **59**: 555-565, 1981.
- MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, **136**: 2348-2357, 1986.
- MURRY, C. E.; GIACHELLI, C. M.; SCHWARTZ, S. M.; VRACKO, R. Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. **Am. J. Pathol.**, **145**: 1450-1462, 1994.

NAU, G. J.; GUILFOILE, P.; CHUPP, G. L.; BERMAN, J. S.; KIM, S. J.; KORNFIELD, H.; YOUNG, R. A. A chemoattractant cytokine associated with granulomas in tuberculosis and silicosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **94**: 6414-6419, 1997.

O'REGAN, A. W.; CHUPP, G. L.; LOWRY, J. A.; GOETSCHKES, M.; MULLIGAN, N.; BERMAN, J. S. Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties *in vitro*. **J. Immunol.**, **162**: 1024-1031, 1999.

PATARCA, R.; FREEMAN, G. J.; SINGH, R. P.; WEI, F. Y.; DURFEE, T.; BLATTNER, F.; REGNIER, D. C.; KOZAK, C. A.; MOCK, B. A.; MORSE, H. C., 3RD; ET AL. Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection. **J. Exp. Med.**, **170**: 145-161, 1989.

PATARCA, R.; SAAVEDRA, R. A.; CANTOR, H. Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. **Crit. Rev. Immunol.**, **13**: 225-246, 1993.

PICHLER, R.; GIACHELLI, C. M.; LOMBARDI, D.; PIPPIN, J.; GORDON, K.; ALPERS, C. E.; SCHWARTZ, S. M.; JOHNSON, R. J. Tubulointerstitial disease in glomerulonephritis. Potential role of osteopontin (uropontin). **Am. J. Pathol.**, **144**: 915-926, 1994.

POLLACK, S. B.; LINNEMEYER, P. A.; GILL, S. Induction of osteopontin mRNA expression during activation of murine NK cells. **J. Leukoc. Biol.**, **55**: 398-400, 1994.

REINER, S. L.; ZHENG, S.; WANG, Z. E.; STOWRING, L.; LOCKSLEY, R. M. Leishmania promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4⁺ T cells during initiation of infection. **J. Exp. Med.**, **179**: 447-456, 1994.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitol. Today**, **16**: 292-297, 2000.

ROLLINS, B. J. Chemokines. **Blood**, **90**: 909-928, 1997.

RUOSLAHTI, E. RGD and other recognition sequences for integrins. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, **12**: 697-715, 1996.

SACKS, D. L.; BRODIN, T. N.; TURCO, S. J. Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **42**: 225-233, 1990.

SCHARTON-KERSTEN, T.; AFONSO, L. C.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. **J. Immunol.**, **154**: 5320-5330, 1995.

SENGER, D. R.; LEDBETTER, S. R.; CLAFFEY, K. P.; PAPADOPOULOS-SERGIU, A.; PERUZZI, C. A.; DETMAR, M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the α v β 3 integrin, osteopontin, and thrombin. **Am. J. Pathol.**, **149**: 293-305, 1996.

SINGH, K.; DEVOUGE, M. W.; MUKHERJEE, B. B. Physiological properties and differential glycosylation of phosphorylated and nonphosphorylated forms of osteopontin secreted by normal rat kidney cells. **J. Biol. Chem.**, **265**: 18696-18701, 1990.

SINGH, R. P.; PATARCA, R.; SCHWARTZ, J.; SINGH, P.; CANTOR, H. Definition of a specific interaction between the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) protein and murine macrophages *in vitro* and its effect upon macrophages *in vivo*. **J. Exp. Med.**, **171**: 1931-1942, 1990.

SOLBACH, W.; ASMUSS, P. A.; ZIMMERMANN, S.; HUMBORG, C.;
ROLLINGHOFF, M. Protective effect of leflunomide on the natural course of
Leishmania major-induced disease in genetically susceptible BALB/c mice. **Int. J.
Immunopharmacol.**, **17**: 481-488, 1995.

STENGER, S.; THURING, H.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Tissue
expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to
Leishmania major. **J. Exp. Med.**, **180**: 783-793, 1994.

STRIETER, R. M.; STANDIFORD, T. J.; HUFFNAGLE, G. B.; COLLETTI, L.
M.; LUKACS, N. W.; KUNKEL, S. L. "The good, the bad, and the ugly." The role
of chemokines in models of human disease. **J. Immunol.**, **156**: 3583-3586, 1996.

SUNDERKOTTER, C.; KUNZ, M.; STEINBRINK, K.; MEINARDUS-HAGER,
G.; GOEBELER, M.; BILDAU, H.; SORG, C. Resistance of mice to experimental
leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages *in
vitro* and *in vivo*. **J. Immunol.**, **151**: 4891-4901, 1993.

SYPEK, J. P.; CHUNG, C. L.; MAYOR, S. E.; SUBRAMANYAM, J. M.;
GOLDMAN, S. J.; SIEBURTH, D. S.; WOLF, S. F.; SCHAUB, R. G. Resolution of
cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1
immune response. **J. Exp. Med.**, **177**: 1797-1802, 1993.

TANAKA, T.; HU-LI, J.; SEDER, R. A.; FAZEKAS DE ST GROTH, B.; PAUL,
W. E. Interleukin 4 suppresses interleukin 2 and interferon gamma production by
naive T cells stimulated by accessory cell-dependent receptor engagement. **Proc.
Natl. Acad. Sci. USA**, **90**: 5914-5918, 1993.

TERABE, M.; KURAMOCHI, T.; ITO, M.; HATABU, T.; SANJOBA, C.;
CHANG, K. P.; ONODERA, T.; MATSUMOTO, Y. CD4(+) cells are indispensable
for ulcer development in murine cutaneous leishmaniasis. **Infect. Immun.**, **68**:
4574-4577, 2000.

TITUS, R. G.; SHERRY, B.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, **170**: 2097-2104, 1989.

TURCO, S. J.; DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. **Annu. Rev. Microbiol.**, **46**: 65-94, 1992.

VON STEBUT, E.; BELKAID, Y.; JAKOB, T.; SACKS, D. L.; UDEY, M. C. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. **J. Exp. Med.**, **188**: 1547-1552, 1998.

WEBER, G. F.; CANTOR, H. The immunology of Eta-1/osteopontin. **Cytokine Growth Factor Rev**, **7**: 241-248, 1996.

WEBER, G. F.; ZAWAIDEH, S.; HIKITA, S.; KUMAR, V. A.; CANTOR, H.; ASHKAR, S. Phosphorylation-dependent interaction of osteopontin with its receptors regulates macrophage migration and activation. **J. Leukoc. Biol.**, **72**: 752-761, 2002.

WEISS, J. M.; RENKL, A. C.; MAIER, C. S.; KIMMIG, M.; LIAW, L.; AHRENS, T.; KON, S.; MAEDA, M.; HOTTA, H.; UEDE, T.; SIMON, J. C. Osteopontin is involved in the initiation of cutaneous contact hypersensitivity by inducing Langerhans and dendritic cell migration to lymph nodes. **J. Exp. Med.**, **194**: 1219-1229, 2001.

WELBY-BORGES, M. O. **Avaliação comparativa da expressão de RNAm de quimiocinas na resposta imuno-inflamatória in situ de camundongos CBA infectados com *L. major* e *L. amazonensis*.** 2000. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental). Universidade Federal da Bahia, Salvador.

WIENER, J.; LOMBARDI, D. M.; SU, J. E.; SCHWARTZ, S. M.

Immunohistochemical and molecular characterization of the differential response of the rat mesenteric microvasculature to angiotensin-II infusion. **J. Vasc. Res.**, **33**: 195-208, 1996.